

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de métodos alternativos de valoración y criopreservación seminal  
en el delfín mular  
(*Tursiops truncatus*)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**María Jesús Sánchez Calabuig**

Directores

Julio de la Fuente Martínez  
José Félix Pérez Gutiérrez

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**DESARROLLO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS DE VALORACIÓN Y  
CRIOPRESERVACIÓN SEMINAL EN EL DELFÍN MULAR**  
**(*Tursiops truncatus*)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR  
**María-Jesús Sánchez Calabuig**

Bajo la dirección de los doctores

Julio de la Fuente Martínez  
Jose Félix Pérez Gutiérrez

Madrid, 2014





El Dr. Julio de la Fuente Martínez, con DNI 50794789W, Investigador Titular del Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y el Dr. Jose Félix Pérez Gutiérrez, con DNI 00412172N, Profesor titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM) hacen constar:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Desarrollo de métodos alternativos de valoración y criopreservación seminal en el delfín mular (*Tursiops truncatus*)”**, ha sido realizada por Dña. María-Jesús Sánchez Calabuig, Lcda. en Veterinaria, bajo nuestra dirección y que tras su revisión, consideramos que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, 22 de Abril 2014

Fdo.: Julio de la Fuente de Martínez

Jose Félix Pérez Gutiérrez



*La financiación de los trabajos realizados en la presente Tesis ha sido llevada a cabo mediante las aportaciones de los proyectos INIA: OT2006-02, RZP2012-0003 y RTA2012-0026, el Contrato CC07-072 (IDI 2008-0281) y el Convenio INIA CON-07-010, con el Zoo Aquarium de Madrid, ambos con sus correspondientes prórrogas. Así como con financiación propia para la realización de una estancia como Occupational Trainee en la Universidad de Queensland (Australia) y una colaboración con Sea World Gold Coast (Australia).*



*Todo se consigue con ímprobo esfuerzo y tenaz perseverancia*

*(Mariano Calabuig)*



## AGRADECIMIENTOS

*Este es, sin duda, la parte que menos me va a costar escribir. Tengo la suerte de haber contado con la ayuda de muchas personas en la realización de esta tesis.*

*En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de Tesis:*

*A Julio, por haberme dado la oportunidad de hacer lo que más me gusta, trabajar en reproducción y, además, con mamíferos marinos. Nunca pensé que sería posible. Gracias por tu ayuda, tus consejos, tus correcciones y por el tiempo que me has dedicado durante todo este proceso.*

*A Jose Félix, por tu ayuda incondicional, por estar siempre disponible. Por tu paciencia y entusiasmo. Por tu ayuda en el hospital, con las prácticas y las consultas. Por dedicarle tantas horas a esta tesis, por todas las técnicas que he aprendido contigo y que me has enseñado.*

*A Jaime Gosálvez y Carmen Fernández de la UAM, no sé qué hubiera hecho sin vuestra ayuda. Gracias por todo el tiempo que me habéis dedicado, vuestro cariño y vuestra paciencia. Por ayudarme a encontrar más delfines en el otro lado del mundo. Gracias Jaime por dedicarme muchos viernes por la tarde haciéndome correcciones y explicándome cómo escribir un paper. Gracias Carmen, por todas las correcciones que me has hecho y por los análisis estadísticos. Paqui, gracias por todo el tiempo que le dedicaste a este trabajo, tus explicaciones, tus trucos, tu música de fondo, tu simpatía. Me ha encantado encontrarme con tan buenas personas en el camino...*

*Al Zoo Aquarium de Madrid. A Jesús, a Eva, y al equipo de entrenadores del delfinario, en especial a Carlos de las Parras. Sin vuestra ayuda, nada habría empezado. A Tritón, mi primer delfín.*

*To Dr. Steve Johnston, for giving me the opportunity to discover Australia, for the amazing experience. For your help during my stay and during the experiments, your patience, your kindness and your paper corrections.*

## Agradecimientos

---

*To David Blyde, for your help and kindness during my stay. I am extremely grateful to the dolphin trainers at Sea World Gold Coast (Australia), specially Catherine Atkin, for spending many hours conditioning dolphins for sperm collection and for providing assistance in the physical collection of the semen samples*

*An Hern Dr. Hildebrandt una alle seine Mitarbeiter. Ich danke Ihnen für die Einladung in das IZW Institut und für die Gelegenheit an den interessanten Experimenten bezüglich Rehen und Elefanten teilnehmen zu können. Ebenso danke ich Ihnen für Ihre Freundlichkeit und dafür, dass Sie mir Ihre Zeit gewidmet haben. Ich hoffe fest, wieder mit Ihnen zusammenarbeiten zu können. Vielen Dank für Ihre Mühe*

*Al INIA, en especial al departamento de Reproducción Animal porque prácticamente todas las personas han contribuido en mayor o menor medida a esta tesis.*

*A Paula, porque has pasado de ser compañera a amiga. Por todo lo que me has enseñado con tanto cariño y paciencia, por los buenos y malos ratos que hemos pasado juntas. No creo que hubiera podido hacer este trabajo sin tu ayuda. De corazón, gracias.*

*A Dimitrios, por haberme ayudado tanto durante toda la tesis, por tener siempre un rato para ayudarme y aconsejarme. Por tus correcciones. Te agradezco mucho todo lo que has hecho por mí.*

*A Alfonso, porque siempre has sacado tiempo que no tenías para ayudarme. Por darme la oportunidad de hacer inyección pronuclear e ICSI, por tus consejos y sobre todo, por tu ejemplo.*

*A Miguel, por dejarme invadir tu laboratorio, por tu ayuda, tus consejos y tu simpatía.*

*A Julián, por darme la oportunidad de hacer una ponencia en el Congreso de Barcelona, por confiar en mí. Por tus consejos y tu amabilidad.*

*A Ricardito, por tu ayuda con los experimentos, por tus consejos, tus correcciones, tu paciencia, tus ánimos, los viajes, los “pues por alguna razón...”, por el pisito canillero y los “¡A muerte!”. Gracias por ayudarme a no volverme loca.*

*A Celia, por todo lo que hemos pasado juntas, casi todo bueno!! por enseñarme a hacer inyección pronuclear... Gracias por tus consejos, por tu apoyo, siempre estás a mi lado aunque no estés cerca.*

*A la princesita colombiana, por todo lo que me has enseñado con tanto cariño, por las tardes en el micromanipulador que me has dedicado. Por tu cariño y tu sonrisa.*

*A Raúl, por enseñarme con tanta tanta paciencia a hacer ICSI, por tu apoyo, tu entusiasmo, por tantos buenos ratos, por ser el boss del equipo relinchín..*

*A Pris, por estar dispuesta a ayudarme desde el principio. Porque con tu ejemplo, me has enseñado a no rendirme nunca. Eres genial.*

*A Vero, por tu apoyo y tu cariño, por todo lo que hemos pasado juntas... que no es poco...*

*A Eka, por tu visión tan peculiar de la vida. Por el viaje a Bilbao, por las risas, los enfados, las tortillas, las correcciones, tu disposición a ayudar a todo el mundo y por tu entusiasmo por tu trabajo.*

*A Richard, porque siempre has sacado tiempo para ayudarme y escucharme.*

*A Meriem, que siempre tienes una sonrisa para mí, y un sitio que dejarme en la cabina.*

*A Valeriano.*

*A Rommel. A Javi. A Bea.*

*A Eva, por preocuparte siempre por mí y por tus ánimos.*

*A Miriam, por ayudarme desde el principio. Por tus ánimos y por tus correcciones.*

*A Sandra, por compartir conmigo el CASA y el microscopio.*

*A Coloma y a Pablo.*

*A Sonia. A Raúl. A Mercedes. A Cristina.*

*A Toñi, por haberme acogido desde el principio.*

*A Mariluz, a María, a Eva. A Carol. A Virginia. A Angy.*

*A mi princesa indiana, por tantas cosas!!! Por el viaje a Berlín en coche, por tu ayuda en la estancia en el IZW, por acogerme en tu casa sin conocerme, por lo bien que nos lo*

## *Agradecimientos*

---

*pasamos juntas y todo lo que me has enseñado, por tus análisis estadísticos, tus correcciones, los papers, los agobios, las canciones....On fire!*

*A la Facultad de Veterinaria de la UCM, por confiar en mí y haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo, en especial al Departamento de Medicina y Cirugía Animal, por su paciencia y ayuda desde el principio.*

*A la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria de la UCM, en especial a Mar, por todas las citas y libros que me has buscado, por tu ayuda con el Endnote, por tu paciencia, eficacia y simpatía.*

*Al servicio de citometría de flujo de la UCM, en especial a Amelia, por tu paciencia y eficacia. Al servicio de microscopía confocal y de microscopía electrónica de la UCM.*

*A Jesús, por ayudarme con la microscopía electrónica y la citometría en los primeros pasos de esta tesis. Por tu ayuda en el congreso de Barcelona. Por tus ánimos y tu simpatía.*

*A Menchu, por formatearme toda la tesis, Por tus ánimos y tus correcciones.*

*Au Dr. Fontbonne, de l'École Vétérinaire de Maisons-Alfort, qui m'a fait découvrir et aimer la reproduction. C'est une véritable honneur d'avoir travaillé avec vous. Merci.*

*A Pilar, por confiar en mí desde el principio. Por tu simpatía, por cuidar de mi madre, por preocuparte por mí. Por todo lo que me has enseñado y todo lo que hemos aprendido juntas. A todos los pacientes de la clínica.*

*A Jose Manuel, por enseñarme en tus clases de yoga que todo está bien, por tu apoyo en los momentos difíciles sin apenas conocerme. Me has ayudado mucho a que esto sea posible. Carpe diem.*

*A mis amigos de siempre:*

*A Celia, siempre he contado con tu apoyo, en todos los momentos de mi vida. Eres una de las personas que más admiro y más quiero y estoy muy orgullosa de ti y de ser tu*

*amiga. Por las charlas reparadoras, las cerves, los paseos, las risas. Por estar siempre a mi lado, en lo bueno y en lo malo.*

*A Paula, por nunca dudar que terminaría la tesis. Por tus ánimos y por encontrar siempre un rato para una cervecita.*

*A mis niñas de la clínica, a Sandra, Chris, Marta, Cris, Ángela y Mireia . Gracias por todos los buenos momentos y todo lo que me habéis enseñado.*

*À Kristel et à Toon. Merci pour le bon temps, les soirées, les urgences.*

*A Lucía y a Luna que, desde la distancia, nunca os habéis olvidado de mí.*

*A mis amigas molonas, Nere, Luci y Ana, gracias por estar siempre cerca, siempre dispuestas a ayudarme, por tantos momentos buenos y tantas risas.*

*A Leti, Elena, Leti e Isa. Porque empezamos esta aventura juntas y la terminamos casi al mismo tiempo. Ha sido genial conoceros y compartir con vosotras tan buenos momentos!!!*

*A Isa, que aunque no nos veamos mucho, sé que estás siempre cerca. Cuántos momentos buenos!!!*

*A Juan, por estar siempre cerca, por enseñarme a hacer ecografías a las vacas con taaanta paciencia. Por todos los momentos mágicos que he pasado a tu lado.*

*A Bea y a Marta, gracias por los ánimos, y por la portada de la tesis y las figuras!!*

*A Nacho, Jesús, María, Jaime y Alberto.*

*A mi súper familia de la que estoy muy orgullosa:*

*A mis hermanos, somos el mejor dream team del mundo. A Iñigo, por tu una fe ciega en que todo va a salir “fenomenal”, porque siempre estás ahí cuando te necesito. A Laura, por ser mi bastón, por estar siempre cerca, por el dibujo de Tritón, por hacerme ser mejor persona. A Arantxa, por tu apoyo, tus ánimos, tu ayuda, tus correcciones, tus formateos, tu sonrisa, por siempre tener un rato para escucharme. Por el Comité de Intervención. Por las horas en el hospital, por todo lo que hemos vivido en los últimos dos años que podría habernos separado y sin embargo, ha sido todo lo contrario. Me habéis demostrado que podemos con todo, os quiero mucho.*

## Agradecimientos

---

*A mi madre, por demostrarme con tu ejemplo que todo se consigue con ímprobo esfuerzo y tenaz perseverancia, por apoyarme de manera incondicional, por ser tan valiente y tan tan fuerte. Por todas las aventuras de estos dos últimos años en el hospital. ¡Lo hemos conseguido!*

*A mis sobrinos, tan diferentes y tan increíbles, por enseñarme cuales son las cosas importantes de la vida.*

*A mis tíos, especialmente a Juancho, por enseñarme a no rendirme, por tu ayuda, por la impresión de la tesis, por corregirme las presentaciones, por tus correcciones y tus llamadas amenazadoras con la tesis.*

*A mis primos. Les ptits calabuig. A María, a Bea, a Jesús, a Teresa, a Ana y en especial a Juan, por apoyarme desde el principio y por creer en mí.*

*A Charito y a Nazar, por cuidarme, por las comiditas, los detalles, las risas, los viajes. Por vuestro cariño y por quererme tanto.*

*A West que me ha acompañado desde el principio en esta aventura, por haber estado en cada momento a mi lado sin hacer preguntas.*

*A Al, compañero de aventuras, porque haces que mi vida sea más bonita, por haber conseguido que no me vuelva loca, por cuidarme, por aguantarme incluso cuando no me aguanto ni yo, por tus figuras de la tesis, por la portada, por interesarte tanto por mi trabajo sin entenderlo muchas veces, por tu apoyo, por tu ayuda dentro y fuera del hospital y por creer en mí. Por quererme tanto y por quererme siempre.*

***A mi familia y a Al.***



---

## ÍNDICE

### SUMMARY

### RESUMEN

## INTRODUCCIÓN ..... 1

## OBJETIVOS ..... 7

## REVISION BIBLIOGRÁFICA..... 11

1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL DELFÍN MULAR (*Tursiops truncatus*) ..... 13
  - 1.1. Fisiología reproductiva de la hembra de delfín mular ..... 13
  - 1.2. Fisiología reproductiva del macho de delfín mular ..... 15
  - 1.3. Problemática actual ..... 21
2. EL ESPERMATOZOIDE DE DELFÍN MULAR ..... 22
  - 2.1. Características estructurales y funcionales del espermatozoide de delfín mular ..... 22
  - 2.2. Formación y proceso de capacitación del espermatozoide ..... 25
3. ESTRUCTURA Y VALORACIÓN DE LA CROMATINA NUCLEAR DE LOS ESPERMATOZOIDES ..... 30
  - 3.1. Condensación de la cromatina nuclear del espermatozoide ..... 31
  - 3.2. Factores implicados en el daño a la cromatina nuclear del espermatozoide .... 37
4. CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMA EN EL DELFÍN MULAR Y SU APLICACIÓN A LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA ..... 38
  - 4.1. Antecedentes de la criopreservación..... 39
  - 4.2. Diluyentes empleados en la congelación seminal en mamíferos..... 40
  - 4.3. Fases de la criopreservación seminal..... 43
  - 4.4. Efectos de las distintas fases de la crio conservación sobre la célula espermática ..... 45
  - 4.5. Metodología y éxito de la inseminación artificial en el delfín mular ..... 52
5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS SEMINAL..... 53
  - 5.1. Valoración macroscópica del eyaculado ..... 54
  - 5.2. Valoración de la concentración ..... 54
  - 5.3. Valoración de la motilidad espermática..... 55

5.4. Evaluación de la morfología espermática y de la integridad de la membrana acrosómica .....	55
5.5. Evaluación de la viabilidad espermática (integridad estructural de la membrana).....	56
5.6. Evaluación de la integridad funcional de la membrana.....	57
5.7. Actividad mitocondrial .....	58
5.8. Evaluación del daño en el ADN espermático .....	59
5.9. Fecundación heteróloga.....	66

**CAPITULO I: Efecto del empleo de un diluyente de origen vegetal en la crioconservación espermática y nuevos métodos de valoración de la calidad espermática en el delfín mular (*Tursiops truncatus*) .....**

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>81</b>
<b>MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>84</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>98</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>110</b>

**CAPITULO II: Validación del ensayo de dispersión de la cromatina espermática en condiciones de laboratorio y de campo en el delfín mular (*Tursiops truncatus*). Evaluación de las dinámicas de fragmentación del ADN espermático en muestras en fresco y descongelado el delfín mular. ....**

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>117</b>
<b>MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>120</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>131</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>141</b>

**CAPITULO III: Evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides de delfín mular (*Tursiops truncatus*) mediante fecundación *in vitro* heteróloga de ovocitos bovinos y murinos con zona pelúcida intacta. ....**

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>149</b>
<b>MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>153</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>170</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>183</b>

**DISCUSIÓN GENERAL..... 191**

**CONCLUSIONES** ..... 201

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**..... 105

**ANEXOS** ..... 235

**ABREVIATURAS**..... 239

**ÍNDICE DE FIGURAS** ..... 245

**ÍNDICE DE TABLAS** ..... 251



## SUMMARY

Biodiversity loss is a process that has deteriorated alarmingly in recent years. Today, it is estimated that the rate of extinction is up to a thousand times higher than what would correspond to the natural process of extinction. In order to curb this problem, biodiversity conservation programs have been developed, including the establishment of Genetic Resources Banks (GRB) and the improvement of assisted reproductive technologies (ART) which is a must to ensure genetically healthy offspring in captive marine mammals including bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Although the bottlenose dolphin produces offspring in captivity with almost the same efficiency than wild populations, inbreeding is an important problem in captive populations. Currently, the bottlenose dolphin is protected under Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) species.

The objective of this work is to improve the knowledge on reproductive physiology in this species, and to establish alternative assessment methods of sperm quality and semen freezing. In **Chapter I**, the development of an effective freezing method was described by comparing two concentrations of cryoprotectant (*Experiment 1*), the effectiveness of an animal protein free diluent (LP1<sup>®</sup>) compared to two different egg yolk based diluents previously tested in this species (EYB and EYB-TT; *Experiments 1 and 2* respectively) and, finally, the development of objective seminal assessment techniques: sperm motility using Integrated Semen Analysis System, (ISAS, *Experiment 1*) and mitochondrial activity evaluation using Mitotracker Deep Red 633 fluorochrome (*Experiment 3*). In *Experiment 1*, after cooling, total and progressive motility was significantly higher using a final glycerol concentration of 3% compared to 6%. Also, after thawing, viability was significantly higher when a 3% glycerol concentration was used. Therefore, a final glycerol concentration of 3% is sufficient to ensure effective spermatozoa protection in the bottlenose dolphin. This study showed that the LP1<sup>®</sup> lipid vesicles based diluent acts similarly and even better than egg yolk based diluents yolk with TRIS buffer (EYB) and TES-TRIS buffer. Considering also that LP1<sup>®</sup> diluent is animal protein free and thus prevents contamination by animal pathogens, it represents an excellent alternative to the use of egg yolk in the species from a health standpoint. In *Experiment 2*, a positive correlation between mitochondrial activity assessed with the fluorochrome Mitotracker Deep Red, viability, total motility and progressive motility was found. Therefore, the evaluation of the mitochondrial activity using fluorochrome is a reliable parameter of sperm quality. The

application of these objective methodologies facilitates to establish comparisons between different studies as well as to set up protocols in a more reliable way.

In **Chapter II**, we studied the effects of cryopreservation and the incubation time on dolphin sperm DNA fragmentation. In *Experiment 1*, validation of sperm chromatin dispersion test (SCDt) for bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) was presented as a means to evaluate DNA damage in the sperm in the laboratory and in field conditions. Two sperm morphotypes were identified: the sperm with fragmented DNA showed large halos of dispersed DNA fragments emerging from a compact core while sperm containing fragmented DNA displayed small compact halos surrounded by a non-dispersed compact dense core DNA. These results were compared directly with those obtained after a Comet assay and a high correlation was observed. This research also showed that the SCDt can also be performed easily in field trials with minor modifications to the standard laboratory protocol ( $r=0.993$ ,  $P=0.01$ ), which provides reliable information about the dolphin sperm DNA damage, opening new possibilities for assessment of sperm DNA fragmentation in other wild species.

In *Experiment 2*, semen samples from 5 bottlenose dolphins were cryopreserved for the evaluation of both standard seminal characteristics and sperm DNA fragmentation dynamics using the sperm chromatin dispersion test (Halomax®). Sperm DNA fragmentation was assessed immediately after collection (0h) and after 1, 4, 8, 24, 48 and 72h of incubation at 37°C and following cryopreservation (0h) and then after 0.5, 1, 4, 8, 24 and 48 hours of incubation at 37°C to mimic conditions in the female reproductive tract. Dolphin spermatozoa ( $n=4$ ) were frozen in a TES-TRIS Buffer (EYB-TT), in an egg yolk free vegetable lipid LP1® buffer (LP1®) and in an egg yolk free preservation medium (HSPM). Fresh ejaculated spermatozoa showed low levels of DNA fragmentation for up to 48h, but one individual that subsequently showed a rapid increase in SDF after 24h incubation. Lower SDF was found in the second fresh ejaculate compared to the first when more than one sample was collected on the same day; this difference was not apparent in any other seminal characteristic. Immediately after thawing, there was no difference observed in sperm DNA fragmentation between fresh and frozen-thawed sperm in the different extenders. Frozen-thawed spermatozoa incubated at 37°C showed an increase in the sperm DNA fragmentation rate after 24h. Sperm frozen in the LP1® buffer had higher levels ( $P<0.05$ ) of DNA fragmentation after 24 and 48h incubation than those frozen in EYB-TT buffer or HSPM. No correlation was found between any seminal characteristic and DNA fragmentation in either fresh and/or frozen-thawed samples.

In **Chapter III**, we studied the organization of genetic material and the heterologous *in vitro* fertilizing capacity of dolphin spermatozoa using *zona pellucida* (ZP) intact bovine and murine oocytes. In *Experiment 1*, IVF (n=12 replicates) was performed using ZP intact bovine oocytes (n=2698) and frozen-thawed dolphin or bovine sperm. Semen samples were obtained from the same bottlenose dolphin and the same bull. After freezing and thawing, both homologous and heterologous IVF were performed. A first group was subjected to homologous IVF; a second group to heterologous IVF and a third group was not inseminated and used as control for parthenogenesis. After *in vitro* maturation, insemination was done at day 0 sperm-oocyte interactions were evaluated at 2.5 hours of co-incubation whereas penetration and polyspermy were evaluated after 12 hours post-insemination (hpi). The remaining presumptive zygotes were allowed to continue the co-incubation process and, at 18 hpi, were divided in two groups. In one group, integrated by approximately the half of the presumptive zygotes, IVF was evaluated at different co-incubation times (18, 20, 22 and 24 hpi in the homologous and 18, 20, 22, 24, 26 and 28 hpi in the heterologous IVF group) by pronuclear formation. Half of the presumptive zygotes were washed and further incubated. At day 2 post IVF, cleavage rate was evaluated in the presumptive zygotes, as well as in the parthenogenic control group. In addition, hybrid embryos were confirmed by PCR.

The number of attached and bound spermatozoa after 2.5 hpi, was higher when co-incubating dolphin than bovine spermatozoa with zona intact bovine oocytes ( $P<0.001$ ). The experiments on heterologous IVF showed that dolphin spermatozoa are capable of penetrating cow oocytes (using phase-contrast and confocal microscopy), leading to pronuclear formation and hybrid embryo cleavage. The homologous IVF group showed the highest percentage of pronuclear formation at 18 hpi, which decreased afterwards and was significantly lower ( $P<0.05$ ) at 24 hpi. In the heterologous IVF group, the percentage of oocytes that showed pronuclei was significantly lower ( $P<0.05$ ) and pronuclear formation was observed at all the incubation times (18-28 hpi). The highest percentage of pronuclear formation was observed at 24 hpi. This result indicates that pronuclear formation occurs more slowly in the heterologous dolphin/bovine than in the homologous bovine IVF system. The polyspermy percentage evaluated after 12 hpi was  $11.0 \pm 1.2$  in the homologous IVF group, whereas interestingly, no polyspermic oocytes were observed in the heterologous IVF group. The cleavage rate at day 2 in the heterologous IVF group was 34%, lower than in the homologous IVF group ( $P>0.001$ ), which led to a cleavage of 89,3%. The presence of dolphin genetic material in the hybrid embryos was confirmed by PCR by evaluating the presence of a dolphin reference gene that encoded for the

## Summary

---

ribosomal 18S protein that resulted in a 486 bp electrophoretic band. 59.3% of all embryo tested showed the 486 bp band.

In *Experiment 2*, IVF (n =5 replicates) was performed using zona intact murine oocytes (n=998) and either murine or dolphin spermatozoa. Four groups were performed. A first group was subjected to homologous IVF, a second and third groups to heterologous IVF using zona intact murine oocytes provided or devoid of cumulus cells respectively and a fourth group used as control for parthenogenesis. In the homologous and heterologous IVF groups, sperm-oocyte interactions were evaluated at 2.5 hours of co-incubation. Fertilization ability and pronuclear formation was evaluated at 6 and 22 hpi in homologous and heterologous IVF groups respectively. Cleavage rate in the presumptive zygotes, as well as the parthenogenic control oocytes were evaluated after 22 hpi. Finally, hybrid embryos were confirmed by PCR. The number of attached murine or dolphin spermatozoa to the ZP after 2.5 hpi with murine oocytes were similar ( $0.69 \pm 0.68$  and  $0.66 \pm 0.74$  respectively) ( $P>0.05$ ). Pronuclear formation rate showed no difference between the heterologous IVF and parthenogenetic group and was significantly higher ( $P<0.001$ ) in the homologous IVF group. Cleavage rate in heterologous group ( $P<0.05$ ) was higher compared to the parthenogenetic group, but lower than in the homologous IVF group ( $P<0.001$ ). Interestingly, when the heterologous IVF was performed using cumulus-free zona oocytes, the cleavage rate was lower than when the heterologous IVF was performed in oocytes that possessed cumulus cells (3.3% compared to 9.6%). 92.3% of the 2-cell embryo tested exhibited a positive 486 bp band (n=13).

In *Experiment 3*, four proven breeding bottlenose dolphins were used and the sperm dolphin chromatin status was studied by evaluating the presence of histones, as well as the chromatin condensation and its stability. No stained sperm with aniline blue were observed in the bull. However, most of the dolphins showed positive stained spermatozoa, although the percentages of positively stained spermatozoa were low, ranging from 0 to 4%. Chromatin stability showed the same trend and was similar among ejaculates from the same species. The results of the sperm chromatin stability investigation also showed that dolphin sperm chromatin was more stable than bovine, because at the same EDTA and SDS concentrations, there was a significantly higher ( $P<0.05$ ) degree of decondensation observed in bovine spermatozoa. In addition, higher concentrations of EDTA and SDS were necessary to induce the maximum sperm chromatin decondensation degree in the dolphin spermatozoa.

In conclusion, this PhD thesis describes the use of an animal protein free diluent. The study also presents important advances concerning the knowledge on the bottlenose dolphin reproductive physiology. It describes the motility parameters evaluated by ISAS, the mitochondrial activity, the sperm chromatin fragmentation and chromatin status. The results from this study raise questions about the role of the chromatin status or the efficiency of the polyspermic blockage and their possible role in the sperm competition. Finally, the results of this study open a new window for future sperm function test in dolphins and raises questions about the mechanisms of fertilization that remain largely enigmatic in mammals. Further studies are necessary to give a full explanation of the process of heterologous fertilization and define their potential biological application.



## RESUMEN

La pérdida de biodiversidad es un proceso que se ha agravado de manera alarmante en los últimos años. Hoy en día, se estima que la tasa de extinción de especies es hasta mil veces superior a la que correspondería el proceso natural de extinción. Con el fin de frenar este problema, se han potenciado programas de conservación de la biodiversidad que incluyen la instauración de Bancos de Recursos Zoogenéticos (BRZ) y el desarrollo de técnicas de reproducción asistida (ART). Esta iniciativa supone una herramienta imprescindible para asegurar una descendencia genéticamente sana de diferentes especies de mamíferos marinos incluido el delfín mular (*Tursiops truncatus*). Pese a que esta especie en cautividad se reproduce prácticamente con la misma eficacia que en libertad, la consanguinidad constituye un problema en las poblaciones en cautividad. Actualmente, el delfín mular es una especie protegida bajo el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES).

El objetivo de esta tesis doctoral es ampliar el conocimiento sobre la fisiología reproductiva en esta especie, así como establecer métodos alternativos de evaluación de la calidad espermática y de congelación seminal. En el **Capítulo I**, se describe la puesta a punto de un método eficaz de congelación comparando dos concentraciones de crioprotector (*Experimento 1*), la eficacia de un diluyente sin proteína animal (LP1<sup>®</sup>) frente a dos diluyentes diferentes a base de yema de huevo previamente testados en esta especie (EYB y EYB-TT; *Experimentos 1 y 2* respectivamente), y, por último, la puesta a punto de técnicas de valoración seminal objetivas: valoración de la motilidad espermática utilizando el sistema computerizado de análisis seminal (ISAS, *Experimento 1*) y la evaluación de la actividad mitocondrial con el fluorocromo Mitotracker Deep Red 633 (*Experimento 3*).

En el *Experimento 1* se observó que, tras la refrigeración, la motilidad total y progresiva fueron significativamente superiores cuando se empleo un diluyente con una concentración final de glicerol del 3% con respecto a una del 6%. Asimismo, tras la descongelación, la viabilidad fue significativamente mayor cuando se empleo una concentración de glicerol del 3%. Por lo tanto, una concentración final de glicerol del 3% es suficiente para asegurar una protección eficaz del espermatozoide en esta especie. Además se probó la eficacia del diluyente LP1<sup>®</sup> frente a los diluyentes EYB y EYB-TT. En este estudio se demostró que el LP1<sup>®</sup>, a base de vesículas lipídicas actúa de

manera similar o superior a los diluyentes a base de yema de huevo con buffer TRIS (EYB) y con buffer TES-TRIS (EYB-TT). Teniendo en cuenta que, el diluyente LP1<sup>®</sup> tiene naturaleza vegetal, se puede evitar la contaminación por agentes patógenos de origen animal. Por ello, el diluyente LP1<sup>®</sup> constituye desde un punto de vista sanitario una excelente alternativa al uso de diluyentes de origen animal en el delfín mular.

En el *Experimento 2*, se observó una correlación positiva entre la actividad mitocondrial evaluada con el fluorocromo Mitotracker Deep Red y la viabilidad, la motilidad total así como la motilidad progresiva. Por lo tanto, la actividad mitocondrial determinada con este fluorocromo es un parámetro de calidad espermática fiable en esta especie. En este primer capítulo, se sientan las bases para el desarrollo de técnicas objetivas de evaluación seminal, específicamente desarrolladas para el delfín mular. De este modo, la utilización de estas técnicas permitirá comparar con mayor facilidad los resultados entre distintos estudios y establecer protocolos de una forma más fiable.

En el **Capítulo II**, se estudió el efecto de la congelación y del tiempo de incubación sobre la fragmentación del ADN del espermatozoide de delfín mular. En el *Experimento 1*, se presenta la validación del ensayo de dispersión de la cromatina espermática (SCD) para esta especie en el laboratorio y en condiciones de campo, como un medio para evaluar los daños del ADN espermático. Se identificaron dos morfotipos espermáticos: los espermatozoides con ADN fragmentado mostraron grandes halos de fragmentos de ADN dispersos que emergían de un núcleo compacto, mientras que los espermatozoides que contenían ADN no fragmentado mostraron pequeños halos compactos rodeados por un núcleo denso y compacto de ADN no disperso. Estos resultados se compararon directamente con los obtenidos después de un ensayo Cometa y se observó una alta correlación. Esta investigación también mostró que el ensayo SCD puede llevarse a cabo fácilmente tanto en condiciones de campo como en el laboratorio con modificaciones menores en el protocolo estándar ( $r=0,993$ ,  $P=0,01$ ). Por lo tanto el SCD permite obtener información fiable sobre el daño de ADN espermático en los delfines y se abren nuevas posibilidades para la evaluación de la fragmentación de ADN espermático en otras especies salvajes de difícil acceso.

En el *Experimento 2*, se evaluaron los parámetros seminales básicos y se realizaron las dinámicas de fragmentación de ADN espermático en muestras de semen fresco y criopreservado procedentes de 5 delfines mulares utilizando el test de dispersión de la cromatina espermática (Halomax<sup>®</sup>). La fragmentación del ADN

espermático se evaluó inmediatamente tras la colecta (0h) y a las 1, 4, 8, 24, 48 y 72h de incubación a 37°C e inmediatamente tras la descongelación (0h) así como a las 0.5, 1, 4, 8, 24 y 48 horas de incubación a 37°C para simular las condiciones en el tracto reproductivo femenino. Los espermatozoides de delfín (n=4) se congelaron utilizando tres diluyentes diferentes: un diluyente a base de yema de huevo con un tampón TES-TRIS (EYB-TT), un diluyente sin proteínas animal a base de lípidos vegetales (LP1<sup>®</sup>) y un diluyente sin proteínas animal utilizado previamente en espermatozoides de delfín mular (HSPM).

Inmediatamente después de la colecta, los espermatozoides mostraron niveles de fragmentación basales, que se mantuvieron así hasta un máximo de 48h, excepto en un individuo que mostró un rápido aumento en la tasa de la fragmentación espermática a las 24h de incubación. Cuando se compararon dos eyaculados sucesivos recogidos en la misma sesión se encontró un nivel de fragmentación más bajo en el segundo eyaculado y no se detectaron diferencias en el resto de los parámetros evaluados. Inmediatamente después de la descongelación, no se observaron diferencias en la fragmentación con respecto al semen fresco, independientemente del diluyente utilizado. En los espermatozoides descongelados, se observó un aumento en la tasa de fragmentación a las 24h. Se observó que las muestras congeladas con LP1<sup>®</sup> tenían niveles más altos de fragmentación del ADN ( $P<0.05$ ) a partir de las 24h de incubación que las muestras congeladas con los diluyentes EYB-TT o HSPM. No se encontró correlación entre ninguno de los parámetros de calidad seminal y la fragmentación de ADN espermático, bien en muestras frescas o descongeladas.

En el **Capítulo III**, se estudió la organización de la cromatina nuclear así como la capacidad del espermatozoide de delfín para fecundar ovocitos con la zona pelúcida intacta de bovino y murino.

En el *Experimento 1*, se realizó la FIV heteróloga (12 réplicas). Para ello se emplearon ovocitos bovinos con la zona pelúcida intacta (n=2.698) y espermatozoides descongelados de delfín o de bovino (control). Las muestras de semen se obtuvieron del mismo delfín mular y del mismo toro. Los espermatozoides descongelados se capacitaron y se realizaron tres grupos experimentales diferentes: FIV homóloga, FIV heteróloga y un grupo de ovocitos sin fecundar que se utilizó como control de evaluación de la partenogénesis. Tras la maduración *in vitro*, se realizó la FIV en el día 0. La interacción espermatozoide-ovocito se evaluó a las 2,5 horas post-inseminación (hpi) y la penetración de los espermatozoides se evaluó a las 12 hpi. Los presuntos

cigotos restantes se dejaron en co-incubación y, a las 18 hpi, se dividieron en dos grupos. En un grupo, integrado por aproximadamente la mitad de los presuntos cigotos, se evaluó la formación pronuclear a diferentes tiempos: 18, 20, 22 y 24 hpi en el grupo de FIV homóloga y 18, 20, 22, 24, 26 y 28 hpi en el grupo de FIV heteróloga. La mitad de los presuntos cigotos se lavaron y se dejaron en medio de cultivo. A día 2, se evaluó la tasa de división. Los parámetros FIV y la división embrionaria se evaluaron mediante microscopía convencional y confocal. La formación de embriones híbridos se confirmó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El número de espermatozoides anclados y unidos después de 2,5 hpi fue mayor en el grupo de FIV heteróloga ( $P < 0,001$ ). Los experimentos de FIV heteróloga mostraron que los espermatozoides de delfín mular son capaces de penetrar ovocitos de bovino, lo que lleva a la formación pronuclear y a la división del embrión híbrido. El grupo de FIV homóloga mostró un porcentaje más alto de formación pronuclear a las 18 hpi que disminuye paulatinamente en las siguientes horas de incubación. Fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) a las 24 hpi. En el grupo de FIV heteróloga, el porcentaje de ovocitos que mostró pronúcleos fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) obteniendo un porcentaje mayor a las 24 hpi poniendo de manifiesto un retraso en la formación pronuclear en la FIV heteróloga con respecto al grupo de FIV homóloga. El porcentaje de polispermia observado fue de  $11,0 \pm 1,2$  en el grupo de FIV homóloga, mientras que no se observaron ovocitos polispérmicos en el grupo de la FIV heteróloga. La tasa de división a día 2 en el grupo de FIV heteróloga fue de 34% mientras que en el grupo de FIV homóloga se obtuvo una tasa del 89,3% ( $P > 0,001$ ). La presencia de material genético de delfín mular en los embriones híbridos se confirmó por PCR mediante la evaluación de la presencia de un gen de referencia de esta especie que codifica para la proteína ribosómica 18S y que dio lugar a una banda electroforética de 486 pb. Se observó dicha banda en el 59,3% de los embriones evaluados.

En el *Experimento 2*, se realizó la FIV (5 réplicas) empleando para ello ovocitos murinos con la zona pelúcida intacta ( $n=998$ ) y espermatozoides homólogos o de delfín mular. Se realizaron cuatro grupos: FIV homóloga, FIV heteróloga usando ovocitos con la zona pelúcida intacta con o sin células del *cumulus oophorus* y grupo control para la evaluación de la partenogénesis. La interacción espermatozoide-ovocito se evaluó a las 2,5 hpi. La capacidad fecundante y formación pronuclear *in vitro* se evaluaron a las 6 y a las 22 hpi en el grupo de FIV homóloga y FIV heteróloga respectivamente. A las 22 hpi, se evaluó la tasa de división en los presuntos cigotos,

así como en los ovocitos del grupo control para la evaluación de la partenogénesis. Por último, se confirmaron los embriones híbridos por PCR.

El número de espermatozoides murinos o de delfín anclados a la ZP tras 2,5h de co-incubación fueron similares ( $0,69 \pm 0,68$  y  $0,66 \pm 0,74$ , respectivamente,  $P > 0,05$ ). La tasa de formación pronuclear no mostró diferencias entre el grupo FIV heteróloga y el grupo de partenogénesis y fue significativamente mayor ( $P < 0,001$ ) en el grupo de FIV homóloga. La tasa de división en el grupo de FIV heteróloga fue mayor ( $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo de partenogénesis, pero mucho más baja ( $P < 0,001$ ) que en el grupo de FIV homóloga. Cuando la FIV heteróloga se realizó con ovocitos que presentaban células del *cumulus oophorus*, la tasa de división fue menor que en ovocitos que conservaban las células (3,3% frente a 9,6%). El 92,3% de los embriones de 2 células evaluados por PCR mostraron una banda de 486 pb ( $n=13$ ), correspondiente al ADN del delfín.

En el *Experimento 3*, se utilizaron 4 delfines sexualmente maduros y se estudió el estado de la cromatina nuclear espermática de delfín mular mediante la evaluación de la presencia de histonas, así como la condensación y estabilidad de la cromatina nuclear espermática. No se observaron espermatozoides teñidos con la tinción con azul de anilina en los espermatozoides de toro. Sin embargo, se observaron de 0 a 4% de los espermatozoides de delfín teñidos con esta tinción. Los resultados de la evaluación de la estabilidad de cromatina de los espermatozoides mostraron que a las mismas concentraciones de EDTA y de SDS, existía un grado de descondensación mayor en los espermatozoides bovinos ( $P < 0,05$ ) que en los de delfín. Además, fueron necesarias concentraciones más altas de EDTA y SDS para inducir el máximo grado de descondensación de la cromatina en los espermatozoides de delfín.

En conclusión, en la presente tesis doctoral se describen el uso de un diluyente sin proteínas animal que evita la transmisión de patógenos en la inseminación artificial. Además, se presentan avances relevantes en el estudio de la fisiología reproductiva en esta especie, se describen por primera vez los parámetros de motilidad utilizando el sistema ISAS, la actividad mitocondrial, la fragmentación del ADN espermática en condiciones de campo así como el estado de la cromatina nuclear del espermatozoide del delfín mular. Los resultados de este estudio sugieren cuestiones sobre el papel que desempeña el estado de la cromatina en la protección frente a las elevadas temperaturas testiculares que experimentan las especies endóricas o como elemento implicado en la competencia espermática. En este sentido los resultados obtenidos sugieren que la competencia espermática podría

favorecer la presión evolutiva de espermatozoide en esta especie no solo hacia una morfología más dinámica, sino también hacia una cromatina más estable y hacia el desarrollo de un sistema eficaz de bloqueo de la polispermia. Finalmente los resultados de este estudio abren una nueva ventana para futuras pruebas de funcionalidad de espermatozoides en los delfines y plantea preguntas acerca de la especificidad del proceso de la fecundación cuyo mecanismo continúa siendo en gran medida desconocido en los mamíferos.

## **INTRODUCCIÓN**



La extinción de especies es un proceso natural tal y como describe Darwin en su trabajo *Teoría de la Evolución* (Darwin, 1859). Sin embargo, hoy en día, se estima que la tasa de extinción de especies es de cien a mil veces superior a la que correspondería el proceso natural de extinción (Rockström *et al.*, 2009). Actualmente, el 38% de las especies del planeta se encuentra en peligro, incluyendo mamíferos, aves y anfibios (Pimm *et al.*, 1995; Rockström *et al.*, 2009). Además, según la lista roja publicada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), este último año se han incluido 2000 especies nuevas, y uno de cada cuatro mamíferos se encuentra en riesgo de desaparición total (Pereira *et al.*, 2010). Esta aceleración del proceso de extinción es consecuencia de fenómenos tales como la deforestación masiva, la caza, la sobreexplotación, la contaminación del aire, del agua y del suelo así como el cambio climático, incluyendo el calentamiento global y la acidificación de los océanos, que han originado la fragmentación de poblaciones de diversas especies en las que se han incrementado los problemas de consanguinidad y reducido la diversidad genética, dando lugar a especies que se clasifican actualmente como “en peligro de extinción” (UICN, 2007) (Reid y Miller, 1989; Saragusty, 2006). Este fenómeno afecta a los mamíferos marinos que son especialmente sensibles a cambios en la composición y temperatura del agua (St. Aubinand y Dierauf, 2001).

El impacto del hombre sobre el medio ambiente, ha sido bien descrito en el artículo de Rockström publicado recientemente en *Nature* (Rockström *et al.*, 2009). Se propone en este artículo, un marco basado en «límites planetarios» (*Figura 1*), que, si se traspasan conllevaría consecuencias potencialmente desastrosas para la especie humana (Scheffer *et al.*, 2001; Lenton *et al.*, 2008). Se estima que los límites de tres de estos procesos ya se han transgredido: el cambio climático, la pérdida de biodiversidad y la interferencia con el ciclo del nitrógeno. Bajo estas circunstancias, la cría en cautividad supone una excelente alternativa para evitar la extinción (UICN, 2002).

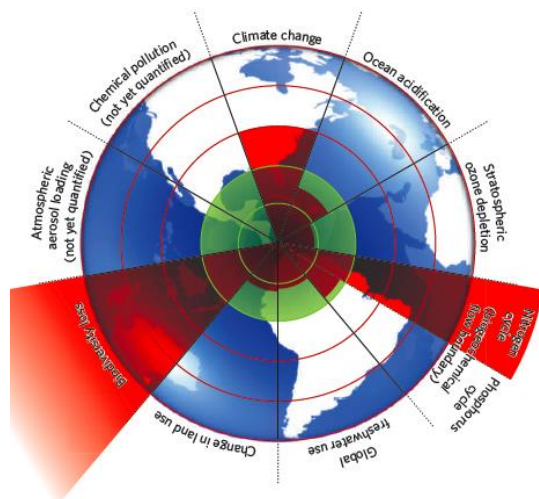


Figura 1. Representación de los sistemas planetarios y sus límites propuesto por Rockström *et al.*, 2009. El sombreado verde representa el espacio operativo seguro y las cuñas rojas representan una estimación de la posición actual de cada variable. Nótese como ya se han superado ampliamente los límites en tres sistemas.

La cría en cautividad desempeña un papel importante en la conservación de las especies en peligro de extinción. La creación de poblaciones en cautividad se debe a numerosas razones tales como la conservación, la exhibición de especies de interés o la investigación. Los parques zoológicos juegan un papel clave en los programas de conservación de especies en peligro de extinción. El objetivo principal de la mayoría de los programas de cría en cautividad de especies en peligro de extinción es el de establecer poblaciones en cautividad lo suficientemente grandes como para ser demográficamente estables y genéticamente sanas y, de este modo, garantizar la supervivencia de cada especie (Notter y Foose, 1985). Sin embargo, el número de individuos necesarios para garantizar la variabilidad genética adecuada es inmenso. Notter y Foose (1985) calcularon que serían necesarios cerca de 50.000 individuos para mantener el 99 por ciento de la diversidad genética de una especie para asegurar 1000 generaciones. Debido a las limitaciones de espacio en los parques zoológicos, la conservación de germoplasma constituye una alternativa muy interesante para preservar esta diversidad genética ideal, minimizar los requisitos de espacio y aumentar el número de especies que pueden ser conservadas a través de los programas de cría en cautividad (Wildt, 1992; Wildt *et al.*, 1997; Holt *et al.*, 2003; Holt y Lloyd, 2009). Otra ventaja de los programas de reproducción y almacenamiento de germoplasma mediante crioconservación es la posibilidad de realizar reproducción

asistida, mediante la utilización de espermatozoides, ovocitos o embriones, entre individuos separados por largas distancias (Holt y Lloyd, 2009) lo que permite una reducción de los efectos de la endogamia en estas poblaciones en cautividad (Lacy, 1987; 1997; Holt y Lloyd, 2009).

El delfín mular o nariz de botella (*Tursiops truncatus*) se encuentra actualmente protegido bajo el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). Esto significa, que no existen datos suficientes para considerarla como especie amenazada, pero el comercio debe ser controlado para evitar un uso incompatible con su supervivencia. La única zona del Mediterráneo con información histórica cuantitativa es el norte del Mar Adriático, donde la población de delfines mulares ha disminuido al menos un 50% en los últimos 60 años. Esto es debido probablemente a la matanza masiva de esta especie llevada a cabo a principios de los años 60 con el fin de reducir la competencia para la pesca, seguido por la degradación de su hábitat y la sobreexplotación de la pesca en esta zona (Berzin y Yablokov, 1978). Desgraciadamente, para el Mediterráneo noroccidental, la información disponible sugiere una tendencia similar (Bearzi, 2006).

El estudio de los mamíferos marinos ha despertado un gran interés en la comunidad científica. Se trata de animales con un alto atractivo para la sociedad, y este fenómeno es útil para concienciar a la población de la situación dramática de los océanos y de los seres vivos que habitan en ellos. En los últimos años, gracias a la colaboración con los parques zoológicos, el conocimiento sobre la fisiología y la biología de esta especie ha experimentado un gran avance (Robeck *et al.*, 2000; Robeck y O'Brien, 2004; Robeck *et al.*, 2005; Biancani *et al.*, 2009; Katsumata, 2010; Sánchez-Calabuig *et al.*, 2011). Entre las áreas que suscitan un mayor interés se encuentra la reproducción. Su estudio se justifica por el gran valor biológico de esta especie; de ahí la necesidad de desarrollar y aplicar técnicas de reproducción asistida que ayuden a su preservación. La aplicación de tecnologías reproductivas en especies que se encuentran en cautividad supone una herramienta muy valiosa ya que asegura su conservación a largo plazo mediante la utilización selectiva de los reproductores, evitando así problemas de consanguinidad.

Finalmente, el conocimiento del estatus reproductivo es clave para el manejo en cautividad, en particular cuando los programas de reproducción deben optimizarse con el fin de garantizar la máxima diversidad genética (Yuen *et al.*, 2009). La colecta y evaluación seminal son técnicas que se aplican de forma rutinaria en numerosas

especies animales y que contribuyen a revelar las características reproductivas del animal y la capacidad funcional del aparato reproductor, factores que determinan la selección de los reproductores más adecuados.

Por todo lo anteriormente citado, la presente tesis trata de profundizar sobre el conocimiento reproductivo de los mamíferos marinos, en particular sobre el delfín mular (*Tursiops truncatus*). Se trata de una especie de fácil manejo en cautividad, lo que permite la obtención de un elevado número de muestras sin necesidad de anestesia y sin provocar estrés en el animal. Además, se encuentra ampliamente representada en los parques zoológicos, lo que permite obtener muestras de un gran número de individuos.

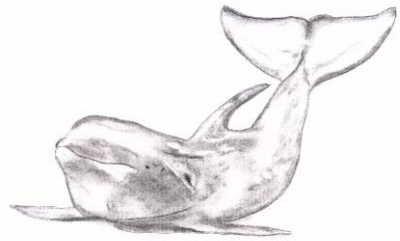
## **OBJETIVOS**



1. Comparar la eficacia de un nuevo diluyente de origen vegetal frente a tres diluyentes previamente testados sobre el proceso de criopreservación seminal del delfín mular (Capítulo I y Capítulo II).
2. Desarrollar técnicas de valoración de la motilidad y actividad mitocondrial espermática en el delfín mular establecidas en otras especies animales (Capítulo I).
3. Desarrollar el ensayo de dispersión de la cromatina espermática en el delfín mular y validar la eficacia del mismo en condiciones de campo (Capítulo II).
4. Comparar la variabilidad en la fragmentación del ADN espermático entre animales y eyaculados de un mismo individuo, correlacionar este parámetro con los parámetros seminales convencionales, y analizar el efecto de los diluyentes seminales sobre la fragmentación de la cromatina. (Capítulo II)
5. Analizar las dinámicas de fragmentación de ADN espermático en semen fresco y descongelado (Capítulo II).
6. Estudiar fecundación *in vitro heteróloga* empleando espermatozoides de delfín mular y ovocitos con la zona pelúcida intacta de especies bovina y murina (Capítulo III).
7. Estudiar la influencia de los complejos cumulo-ovocito en la fecundación *in vitro* heteróloga utilizando espermatozoides de delfín mular y ovocitos murinos con zona pelúcida intacta (Capítulo III).
8. Estudiar la maduración, condensación y estabilidad espermática de la cromatina nuclear del delfín mular (Capítulo III).



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA





## **1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL DELFÍN MULAR (*Tursiops truncatus*)**

El delfín mular o nariz de botella es un mamífero que pertenece al Superorden *Cetartiodactyla* y al Orden *Cetacea* (Mc Donald, 2006). Dentro de este orden, existen dos subórdenes: *Mysticeti* y *Odontocente*. El delfín mular pertenece a este último y a la familia *Delphinidae*. Existen dos subespecies: *Tursiops truncatus ponticus*, que es endémica en el Mar Negro y *Tursiops truncatus truncatus*, que habita los mares cálidos y templados, encontrándose por lo tanto repartido por todo el mundo en zonas templadas y tropicales (Wells, 2000). Sobre esta última subespecie se centra este trabajo. Se trata del cetáceo más común en cautividad.

Existe un dimorfismo sexual muy marcado en el delfín mular. Su éxito reproductivo en cautividad ha llegado a un punto que iguala e incluso supera el observado en poblaciones salvajes (Duffield *et al.*, 2000; Wells, 2000).

### **1.1. Fisiología reproductiva de la hembra de delfín mular**

El sistema reproductivo de la hembra de delfín mular, al igual que el resto de los mamíferos domésticos se compone de: ovario, oviducto, útero, cérvix, vagina, clítoris, vestíbulo vaginal y vulva (*Figura 2*). El sistema endocrino regula la actividad de estos órganos y por tanto el desarrollo del ciclo estral, fecundación, implantación, desarrollo fetal y parto. Existen variaciones morfológicas en las diferentes especies de mamíferos marinos. En los cetáceos, el útero es bicorne, el tipo de placenta es difusa al contrario que en el resto de mamíferos marinos donde la placenta es zonal; el cérvix es largo y estrecho con una pared muy fina. Una peculiaridad de muchos cetáceos, entre ellos el delfín mular, es la presencia de pliegues en la parte superior de la vagina; probablemente su función sea actuar como válvulas para retener el semen, pero existen todavía muchos interrogantes al respecto. Las glándulas mamarias son alargadas, estrechas y finas y se extienden por el tejido conectivo subcutáneo en ambos lados de la línea ventromedial. Poseen dos pezones, situados a los lados de la abertura urogenital (Stewart y Stewart, 2008).

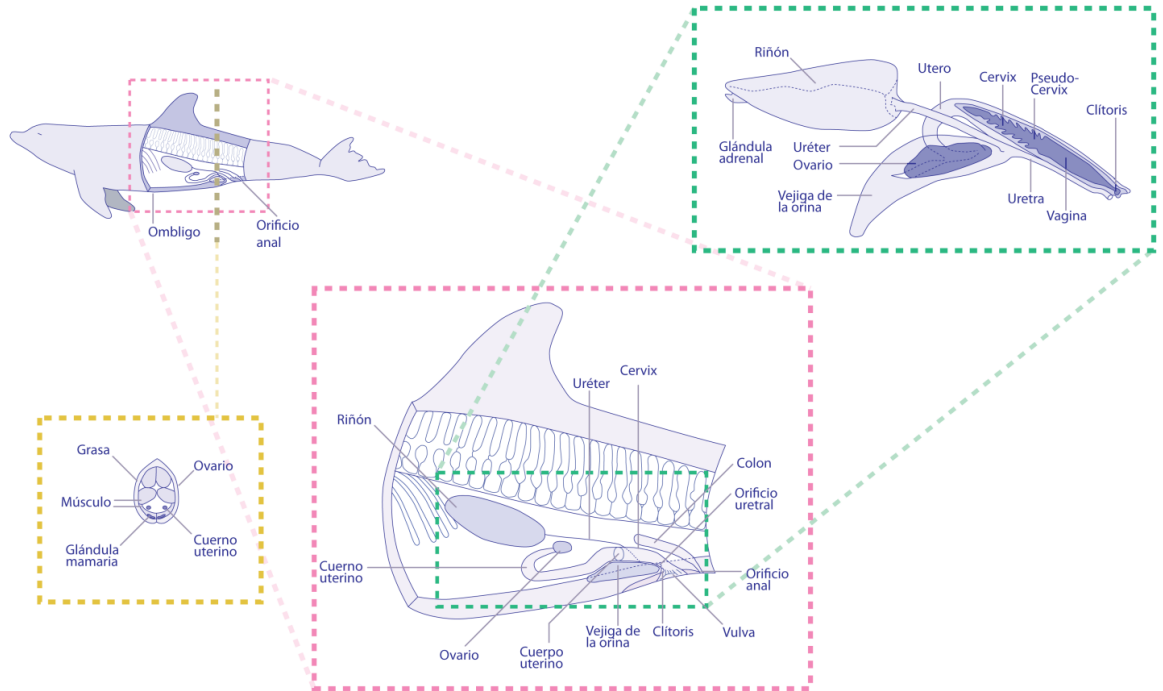


Figura 2. Esquema del aparato reproductor de la hembra de delfín mular. Modificado de Rommel *et al.*, 2007.

El estudio de la fisiología reproductiva en el delfín mular se inició en los años setenta y se basaba en la observación del comportamiento reproductivo (Cornell *et al.*, 1977). Posteriormente se determinó que la hembra no alcanza la madurez sexual hasta los 5–13 años, proceso que se adelanta cuando ésta se encuentra en cautividad.

Los métodos de adiestramiento en cautividad han permitido la puesta a punto de técnicas no invasivas, o de mínima invasión, obteniendo así una gran cantidad de información y preservando el bienestar animal. En el caso concreto de esta especie, ha permitido obtener muestras de sangre, orina y heces así como exudado respiratorio con relativa facilidad (Keller, 1986), dando lugar a estudios más precisos de la fisiología reproductora de la hembra.

En efecto, gracias a la toma de muestras diarias de orina y heces, se describió en 1983 el ciclo estral y la época de celo en el delfín mular mediante la valoración de los niveles hormonales (Sawyer-Steffan *et al.*, 1983; Biancani *et al.*, 2009). Se determinó que la duración del ciclo estral oscila entre 21 y 42 días en esta especie (Kirby y Ridgway, 1984; Robeck *et al.*, 1993; Robeck *et al.*, 1998), precisando en estudios posteriores, que la duración exacta es de 36 días (Robeck *et al.*, 2005, *Figura*

3). Asimismo, se ha observado que esta especie presenta una actividad reproductiva estacional que varía del poliestro anual, al estacional, presentando en ocasiones anoestros de uno a dos años, coincidiendo con la lactación de la cría (Cornell *et al.*, 1977; Schroeder, 1990).

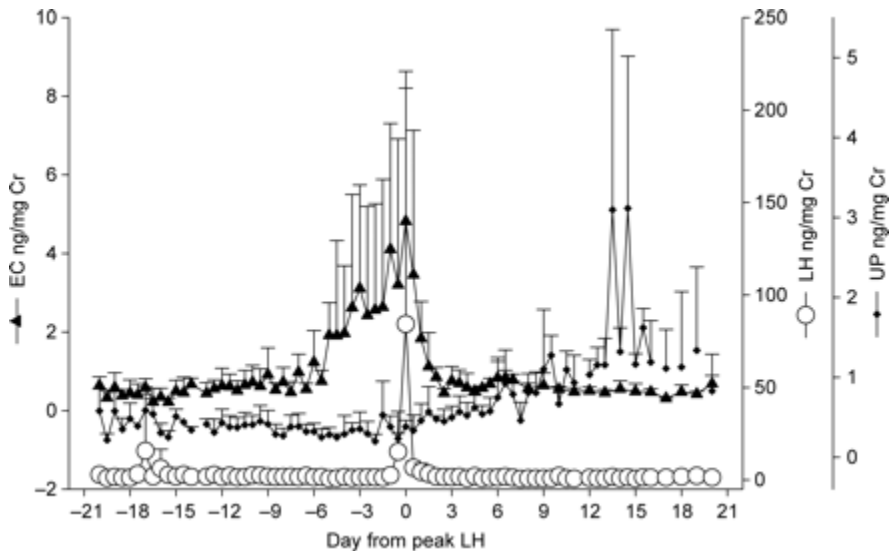


Figura 3. Ciclo estral de la hembra de delfín mular. Se incluyen valores de la concentración urinaria de LH (hormona luteinizante) EC (conjugado urinario estrogénico) y UP (metabolitos progestágenos urinarios). El pico de LH ocurre 8 horas después que el pico de EC. (Robeck *et al.*, 2005).

La duración de la gestación es de 12 meses y gestan normalmente una sola cría que es capaz de nadar y respirar a los pocos minutos después del nacimiento. La cría es amamantada durante un periodo de 18 a 20 meses. Pesa al nacer entre 10 y 15 kg y puede llegar a medir más de un metro. Generalmente nada cerca de la madre aprovechando las ventajas hidrodinámicas que le brinda el cuerpo de su progenitora y no se independizará hasta los dos años de edad (Schroeder, 1990).

### 1.2. Fisiología reproductiva del macho de delfín mular

Los machos de esta especie alcanzan la madurez sexual entre los 9 y 14 años, y, como en el caso de la hembra, los individuos en cautividad adquieren este estatus reproductivo de manera más precoz.

El tracto reproductivo del macho de delfín mular consta de pene fibroelástico y dos testículos alargados intra-abdominales. La próstata del delfín es relativamente grande en los individuos sexualmente maduros (Harrison, 1969) (Figura 4). Además, no existen vesículas seminales ni ampolla asociadas con el conducto deferente (Harrison, 1969). La proporción de la masa testicular en comparación a la masa corporal es superior al 0,5% (Turner *et al.*, 2006), muy por encima de la de otros mamíferos terrestres, como los humanos o los toros (0,05% y 0,01% respectivamente) (Kenergy y Trombulak, 1986). Los testículos se encuentran en la cavidad abdominal, caudales al riñón y el epidídimo está localizado en la superficie dorsolateral a lo largo de toda la superficie del testículo. (Harrison, 1969; Brook *et al.*, 2000).

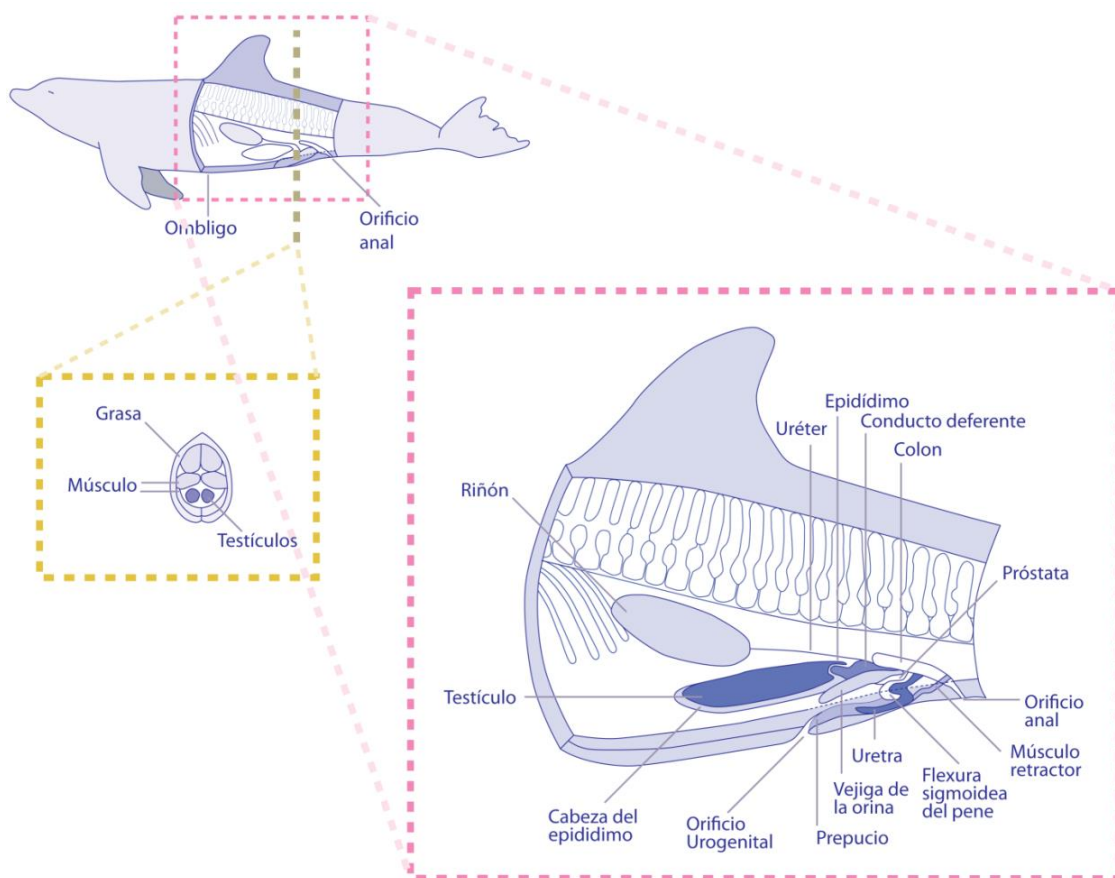


Figura 4. Esquema del aparato reproductivo del macho de delfín mular. Modificado de Rommel *et al.*, 2007.

En otras especies, el escroto se encuentra exterior a la cavidad abdominal ayudando así al mantenimiento de la temperatura hasta 7°C por debajo de la de la temperatura corporal (Harrison, 1949). En el delfín mular, con el fin de disminuir la temperatura de los testículos, existe un intercambio de calor a contracorriente vascular a nivel de los testículos. Está compuesto por un plexo venoso que devuelve la sangre con menor temperatura desde las venas superficiales de la aleta dorsal y caudal a la arteria testicular (Rommel *et al.*, 1992; Rommel *et al.*, 2007); *Figura 5*].

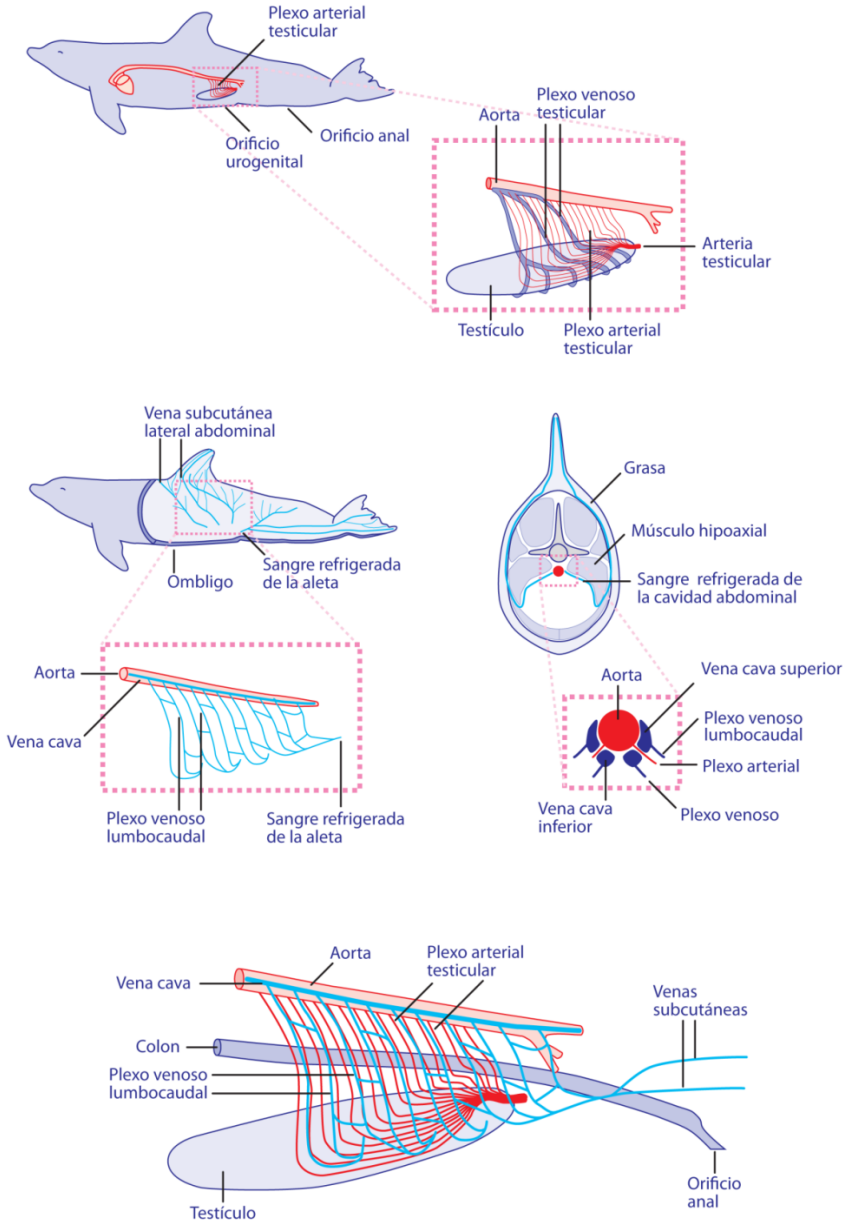


Figura 5. Representación de las estructuras vasculares que participan en el mecanismo de intercambio de calor a contracorriente vascular en el delfín mular macho. (A) Topografía de las venas superficiales que abastecen el plexo venoso lumbocaudal. La sangre en las venas superficiales de la aleta dorsal y la aleta caudal se enfría por transferencia de calor del agua que rodea al animal. (B) Topografía de los plexos arteriales testiculares derivados de la aorta dorsal y el suministro de los testículos. En el margen distal del plexo, las arterias se unen para formar una estructura en forma de cono, de la que una sola arteria testicular entra en el polo caudal del testículo. (C) Vista lateral izquierda del intercambiador de calor a contracorriente vascular. Las flechas indican las direcciones de flujo. Modificado de Rommel *et al.*, 2007.

Este mecanismo sugiere que la temperatura de los testículos está regulada con el fin de evitar los posibles efectos perjudiciales en el proceso de la espermatogénesis. Por otra parte, estudios anatómicos indican que tanto el epidídimo como el conducto deferente tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de esperma en individuos sexualmente maduros.

En definitiva, la anatomía del tracto reproductivo del delfín parece estar diseñada para producir, almacenar y liberar una gran cantidad de líquido seminal en un corto período de tiempo. El gran tamaño de los testículos es capaz de producir grandes cantidades de espermatozoides. Del mismo modo, el gran tamaño de la próstata también sugiere la producción de un gran volumen de fluido prostático. Asimismo, la anatomía del epidídimo y del conducto deferente permite el almacenamiento de grandes cantidades de espermatozoides para proporcionar un suministro inmediato de acuerdo a la exigencia del tipo de coito en esta especie (Yuen, 1997). En efecto, se ha demostrado que existe una relación funcional entre el tamaño de los testículos y el modo de cópula en los cetáceos y en los primates (Harcourt *et al.*, 1981; Kenney y Trombulak, 1986). En los delfines, el sistema de cópula se caracteriza por una alta frecuencia de cópulas de varios machos con una sola hembra (Kenney y Trombulak, 1986; Connor *et al.*, 2010). Por este motivo, para poder competir con otros machos y asegurar así su descendencia, el macho debe producir un gran volumen de eyaculado con un número elevado de espermatozoides y así, aparearse varias veces con la hembra. Con este fin, el delfín es capaz de producir más de diez eyaculados en una misma sesión con un intervalo de pocos minutos entre cada uno así como un gran volumen de esperma. Concretamente en el estudio realizado por Schroeder y Keller en 1989, obtuvieron un máximo de 12 eyaculados y un volumen de hasta 64 mL de eyaculado en una misma sesión. (Schroeder y Keller, 1989). En cuanto a la fisiología reproductiva se refiere, el análisis de estas muestras biológicas ha permitido el estudio de la madurez sexual (Sawyer-Steffan *et al.*, 1983).

Hay que tener en cuenta que debido a la ausencia de vesículas seminales, el macho de delfín no posee algunos de los elementos fundamentales para competir con otros machos; como la capacidad de formar un tapón vaginal a partir de la última fracción del eyaculado que dificulte el paso de los espermatozoides procedentes de un segundo macho. Por lo que en esta especie, la competencia entre los machos se establece probablemente a partir del número de espermatozoides, del volumen del eyaculado y de la morfología del pene (Brook, 1997; Yuen *et al.*, 2009). Tal como sugiere el elevado volumen del primer eyaculado así como la forma de cuña del pene

del delfín, se facilita el desplazamiento del esperma que se encuentre previamente en la vagina (Brook, 1997).

El estudio de la reproducción en el delfín mular se basó en un primer momento en el análisis post-mortem de los individuos. Sin embargo, muchos aspectos relacionados con la fisiología de la reproducción en esta especie no podían ser estudiados por esta vía, por lo que era ineludible y necesaria la realización de estudios *in vivo*. En un primer momento, la puesta en marcha de la reproducción controlada (Brook y Kinoshita, 2005) y más tarde de reproducción asistida, tanto por electroeyaculación (Seager *et al.*, 1981) como por donaciones voluntarias (Keller, 1986; Robeck y O'Brien, 2004; Robeck *et al.*, 2005), permitieron un avance exponencial en el estudio reproductivo de estos animales.

La colecta de eyaculados sucesivos en una misma sesión y la evaluación individual de cada uno de ellos, permite una selección de mayor calidad para la crioconservación y futura inseminación artificial (IA). Se han realizado colectas de varios eyaculados en un gran número de especies como la equina (Squires *et al.*, 1979), bovina (Coulter y Foote, 1979), canina (England, 1999), felina (Tanaka *et al.*, 2000) y cunícula (Ambriz *et al.*, 2002). En estas especies el intervalo entre eyaculados en una misma colecta es mayor que en el delfín, que oscila entre los 10 y 60 minutos. En el caso del delfín mular, se ha demostrado que el primer eyaculado es de menor calidad (menor viabilidad y motilidad) que los subsiguientes. Este fenómeno puede ser debido a que los espermatozoides presentan un mayor daño puesto que se encuentran en el conducto deferente espermatozoides de eyaculaciones anteriores o bien debido a la diferencia en la composición entre eyaculados sucesivos. La evaluación única del primer eyaculado puede inducir al error, ya que puede llegar a considerar a un individuo sexualmente inmaduro, azoospermico o bien subfétil. En efecto, el primer eyaculado tiene un mayor volumen de plasma seminal lo que, en muchas ocasiones, lleva a centrifugar la muestra con el fin de concentrarla para obtener una dosis óptima de inseminación. Los eyaculados subsiguientes suelen tener una mayor concentración (lo que difiere con otras especies como la equina), el número total de espermatozoides suele ser igual o superior a la media del primer eyaculado (Yuen *et al.*, 2009).

### 1.3. Problemática actual

En la actualidad, existe un incremento alarmante de animales protegidos o en peligro de extinción. Este problema tiene distintas causas. Por un lado, las poblaciones en libertad de especies amenazadas, suelen estar fragmentadas, son de pequeño tamaño y quedan separadas debido a la destrucción y degradación de su hábitat natural. En el caso de poblaciones mantenidas en reservas, la situación es similar, existiendo además barreras geográficas que impiden el movimiento de los animales. Este proceso disminuye el flujo genético aumentando así la consanguinidad dentro del grupo. Este hecho, en sí mismo, puede ser la causa que lleve esta especie a la extinción, sin necesidad de que incidan otros factores amenazantes. Esto se debe a que las poblaciones pequeñas, son especialmente susceptibles a las fluctuaciones aleatorias de las frecuencias génicas, distribución de edad y sexo de la población y tamaño de la misma. La pérdida de heterocigosis generacional es inversamente proporcional al tamaño de la población fundadora (Pérez-Garnelo, 2011).

El problema principal que presenta la reproducción del delfín mular en cautividad es la elevada consanguinidad. Entre los factores que han propiciado el desarrollo de este problema se encuentra la alta eficacia reproductiva de esta especie en cautividad, que prácticamente es la misma que en libertad (Duffield *et al.*, 2000; Wells, 2000) y la dificultad que entraña el transporte de individuos de una instalación a otra (Andrews, 2000). Debido a su elevado coste y al riesgo que conlleva para la salud del animal, tradicionalmente, el intercambio genético entre las distintas instalaciones ha sido mínimo. Esta falta de intercambio no solo ha generado problemas de consanguinidad sino también problemas para mantener la organización social ya que se desencadenan situaciones como la competencia entre machos y la necesidad de integrar grupos de distinto sexo y edad que no se darían en el ámbito natural. Por otra parte, hay que considerar que la introducción de nuevos ejemplares crea problemas de adaptación y aceptación dentro de la estructura social del grupo. (Connor *et al.*, 2010). Como consecuencia de este fenómeno, menos del 58% y del 51% (machos y hembras respectivamente) han contribuido a la variabilidad genética en esta especie en cautividad (Johnson *et al.*, 1989). Esto implica una pérdida potencial de al menos la mitad de la variabilidad genética de la población fundadora (Keller, 1986; Duffield *et al.*, 2000; Robeck y O'Brien, 2004). La necesidad de resolver el problema de la consanguinidad ha despertado el interés en la aplicación de las técnicas de reproducción asistida en esta especie. En este sentido, hay que considerar que el transporte de los individuos es de suma dificultad, costoso, y pone en peligro la salud del animal. Por ello, los parques zoológicos se muestran reticentes a realizar este

tipo de procedimientos (Connor *et al.*, 2010). La creación de un banco de germoplasma de esta especie, así como la puesta a punto de la inseminación artificial (Robeck *et al.*, 1998; Robeck *et al.*, 2005) facilita el intercambio genético y el subsiguiente incremento en la variabilidad genética sin necesidad de transportar individuos.

## **2. EL ESPERMATOZOIDE DE DELFÍN MULAR**

### **2.1. Características estructurales y funcionales del espermatozoide de delfín mular**

El espermatozoide de los mamíferos es una célula muy especializada con rasgos únicos que no están presentes en ningún otro tipo de célula. El espermatozoide es 10.000 veces más pequeño que el ovocito, no posee reservas y es móvil. Su función es el transporte del genoma paterno al ovocito, además de material perinuclear y algunos ARNs mensajeros que, en la mayoría de los mamíferos, aporta el centrosoma. El espermatozoide es también el encargado de desencadenar los recursos maternos y algunos genes durante el desarrollo embrionario.

El espermatozoide de delfín mular tiene una longitud de 65  $\mu\text{m}$  y está esquematizado en la *Figura 6*. Está formado, de los siguientes componentes:

- La cabeza: mide 4-5  $\mu\text{m}$  y está constituida por el núcleo, formado por ADN hipercondensado y el acrosoma. La región postacrosómica del espermatozoide de delfín mular es de gran tamaño y se caracteriza por la presencia de aristas paralelas al eje horizontal de la cabeza (Fleming *et al.*, 1981). El acrosoma es una gran vesícula secretora que contiene enzimas hidrolíticas que favorecen la penetración en el ovocito. Consta de una membrana externa que se pierde durante la reacción acrosómica (RA) y una membrana interna con moléculas receptoras que permiten la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP) del ovocito tras la reacción acrosómica (*Figura 6*).
- El cuello o pieza de conexión: corto y estrecho. Contiene una placa basal que lo separa de la cabeza y los centriolos modificados.
- El flagelo: proporciona motilidad al espermatozoide. Puede dividirse en diferentes regiones que comparten estructura (9+2 microtúbulos y

9 fibras densas exteriores) pero difieren en su estructura externa (Enciso *et al.*, 2009). En el caso del delfín, el flagelo es muy largo con una longitud de 60  $\mu\text{m}$ .

- La pieza intermedia: Está envuelta por una hélice de mitocondrias que proporcionan energía al espermatozoide. Tiene una longitud de 4  $\mu\text{m}$ .
- La pieza principal está separada de la pieza media por el annulus, un anillo transversal de material denso, y rodeada por la capa fibrosa.
- La pieza terminal contiene los dobletes del axonema, el final de las fibras densas y la capa fibrosa.
- 

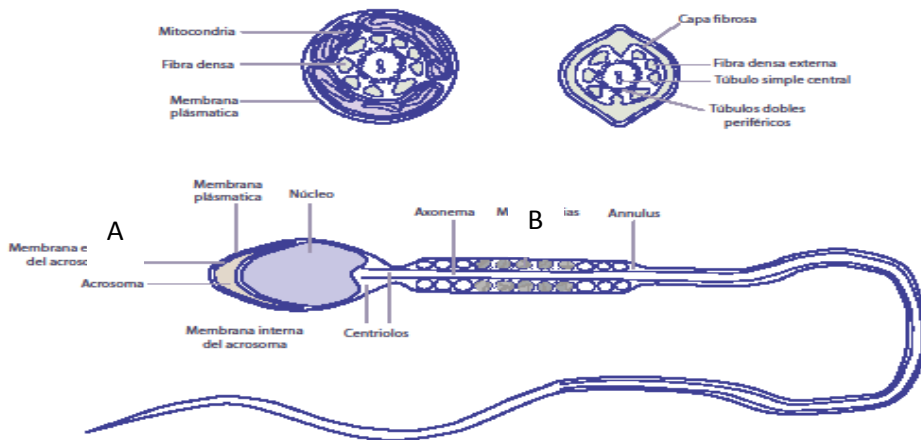


Figura 6. Estructura del espermatozoide de delfín mular. (A) Corte transversal de la pieza media del flagelo. (B) Corte transversal de la pieza principal del flagelo. Modificado de <http://www.embryology.ch>.

### Ultraestructura del espermatozoide de delfín mular

Hasta hace relativamente poco tiempo, las muestras seminales de delfín mular se obtenían mediante electroeyaculación (Seager *et al.*, 1981) que implica la utilización de anestesia con el consiguiente estrés para el animal. Mediante esta técnica, se obtuvo la primera muestra para el estudio de la ultraestructura del espermatozoide mediante microscopía electrónica (Fleming *et al.*, 1981) (Figura 7). En este primer estudio de 1981, se observó que la morfología del espermatozoide del delfín mular se

caracterizaba por una región postacrosómica de gran tamaño y por la presencia en la región post acrosomal de 8 aristas paralelas al eje longitudinal. Su función podría ser la participación en la fusión de la membrana del espermatozoide con el ovocito. También se observó en los cortes de la pieza intermedia con microscopía electrónica, que el espermatozoide de delfín mular posee dos tipos de mitocondrias cuya función es hasta el momento desconocida (Fleming *et al.*, 1981).

Sólo existe otro estudio (Miller *et al.*, 2002b) que describa la morfología del espermatozoide de delfín, pero en este caso de otra especie, *Lagenorhynchus obliquidens*, o delfín de lados blancos del Pacífico. En este estudio se compara la morfología espermática de distintas especies de mamíferos marinos: la orca, la beluga y el delfín de lados blancos del Pacífico. El acrosoma de este último, cubre dos tercios de la cabeza, es delgado y alargado, con bordes finos. En un corte longitudinal de la pieza intermedia, se describe la mitocondria formando un anillo alrededor del axonema pero no menciona diferentes tipos de mitocondria como en el estudio previo en el delfín mular (Figura 7). El examen del espermatozoide de esta especie con microscopía electrónica ha generado interesantes interrogantes sobre las particularidades del espermatozoide en esta especie.

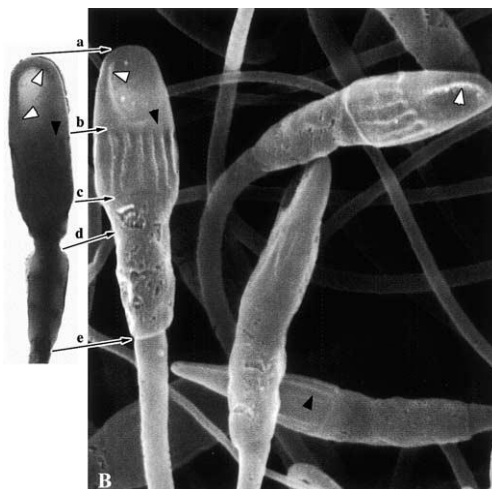


Figura 7. Espermatozoide de delfín visualizado mediante microscopía electrónica. (A) Tinción negativa del espermatozoide. (B) Imagen de microscopía electrónica del espermatozoide. Las flechas indican las correspondencias con la tinción negativa adyacente: (a-c) cabeza; (a-b) región acrosómica; (b-c) región postacrosómica; (c) anillo posterior; (c-d) cuello; (d-e) pieza intermedia; (e) anillo de Jensen; (c): flagelo. Las flechas blancas muestran la banda acrosómica y las flechas negras muestran las aristas de la región postacrosómica (Miller *et al.*, 2002b).

2.2. Formación y proceso de capacitación del espermatozoide

2.2.1. Espermatogénesis, espermiogénesis y maduración en el epidídimo

La espermatogénesis es el proceso sincronizado de diferenciación celular, en el que una espermatogonia se transforma de manera gradual a espermatozoide, célula haploide altamente diferenciada. La etapa final de este proceso se llama espermiogénesis y en ésta se produce la diferenciación de los espermatoцитos en espermatozoides (Figura 8). La espermatogénesis concluye con la espermiación, en la que los espermatozoides diferenciados se separan del epitelio seminífero y se liberan a la luz del túbulo (Guraya, 1995). Estos espermatozoides son todavía inmaduros y contienen parte del citoplasma alrededor del cuello, la gota citoplasmática, que será eliminada por el tránsito a través del epidídimo durante el proceso de maduración (Yanagimachi, 1994<sup>a</sup>, Figura 9A). Por lo tanto, tras la espermiogénesis, tiene lugar el proceso de maduración en el epidídimo, y finalmente el proceso de capacitación en el tracto reproductivo femenino (Austin, 1952; Bedford, 1983; Visconti *et al.*, 2002). Por tanto, el estudio de la diferenciación del espermatozoide ha de comprender todas estas etapas: espermatogénesis, espermiogénesis, maduración y capacitación (Esponda, 1985).

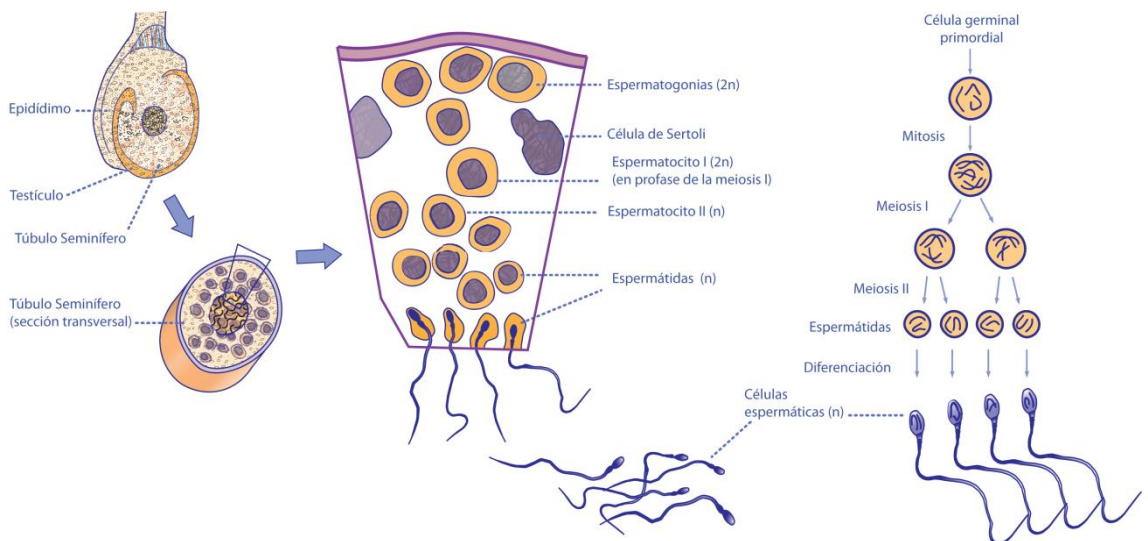


Figura 8. Representación de la espermatogénesis.

2.2.2. Capacitación: Secuencia de procesos que experimenta el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra

La capacitación es un proceso que se desarrolla en el espermatozoide a lo largo de su desplazamiento por el tracto genital femenino, se trata de un proceso gradual y reversible que requiere contacto con las secreciones del oviducto y se completa en el extremo distal del cuerno uterino (De Jonge, 2005). No todos los espermatozoides son capacitables, únicamente son capacitables aquellos espermatozoides que no están capacitados, que poseen un acrosoma íntegro y un grado óptimo de condensación del material genético. Los espermatozoides capacitables, se encuentran unidos a la región del istmo en el cuello uterino mediante glicoproteínas similares a la heparina, lecitinas y carbohidratos, que se retiran en el momento de la ovulación, entonces los espermatozoides acceden a la región de las trompas. Como consecuencia de la capacitación, se produce la hiperactivación del espermatozoide y la reacción acrosómica (de Lamirande y Gagnon, 1993).

La capacitación comprende varios procesos como la retirada de proteínas adheridas y el aumento de permeabilidad de la membrana.

El espermatozoide cuando no esta capacitado se encuentra unido a una serie de proteínas, que proceden de las glándulas anejas y de las secreciones uterinas, cuya misión es proteger la membrana y regular la actividad del espermatozoide. Hay proteínas que se encuentran adheridas al flagelo y reducen la movilidad del espermatozoide, interfieren con los brazos de dineína o bien se unen al calcio secuestrando e impidiendo que este ejerza sus efectos biológicos, propiciando un ahorro de energía. Existen proteínas que adhieren y protegen el acrosoma evitando que la reacción acrosómica se produzca antes de tiempo, proteínas que protegen a los receptores interaccionan con los receptores pero no los activan, y por último, las proteínas que recubren el espermatozoide y dificultan la incorporación de material genético exógeno procedente de bacterias en la vagina o material genético procedente de las células del útero en el genoma del espermatozoide. El pH local bajo existente en el oviducto favorece la retirada de las proteínas adheridas así como la capacitación.

Se podría decir que la capacitación se inicia en el conducto cervical que actúa a modo de filtro y se facilita por la retirada del plasma seminal rico en  $Zn^{2+}$  incrementando la

estabilidad de la cromatina y la fluidez de la membrana (Harrison y Gadella, 2005). Al retirar el  $Zn^{2+}$  aumenta la actividad de la fosfolipasa A2, los niveles de  $PGF2\alpha$  y por tanto, los fosfolípidos insaturados en la membrana con lo que aumenta su fluidez. El aumento de fluidez de la membrana facilita la entrada de  $Ca^{2+}$  que desestabiliza aún más la membrana, lo que facilita el desplazamiento de los receptores de membrana, que muchas veces se encuentran en la región del flagelo o en la región posterior de la cabeza, hacia la región apical, posicionados para interactuar con el ovocito. Otro proceso que contribuye a aumentar la fluidez de la membrana es la retirada de colesterol, fenómeno que se produce en los cuernos uterinos gracias a la presencia de receptores de colesterol. La retirada de colesterol facilita la entrada de bicarbonato y la activación de varias rutas de transducción de señales (*Figura 9*) que provocan un aumento de AMPc,  $Ca^{2+}$  así como la fosforilación en tirosina de las proteínas. Como consecuencia, aumenta la amplitud y la frecuencia del batido del flagelo, el espermatozoide adquiere un movimiento rectilíneo y se hiperactiva (de Lamirande y Gagnon, 1993) (Michaut *et al.*, 2000; Yunes *et al.*, 2000). Únicamente los espermatozoides capacitados son sensibles a las señales que emite el oviducto y el ovocito, pueden penetrar las capas células de *cumulus oophorus* y experimentar la reacción acrosómica (Osman *et al.*, 1989) (Yanagimachi, 1994a).

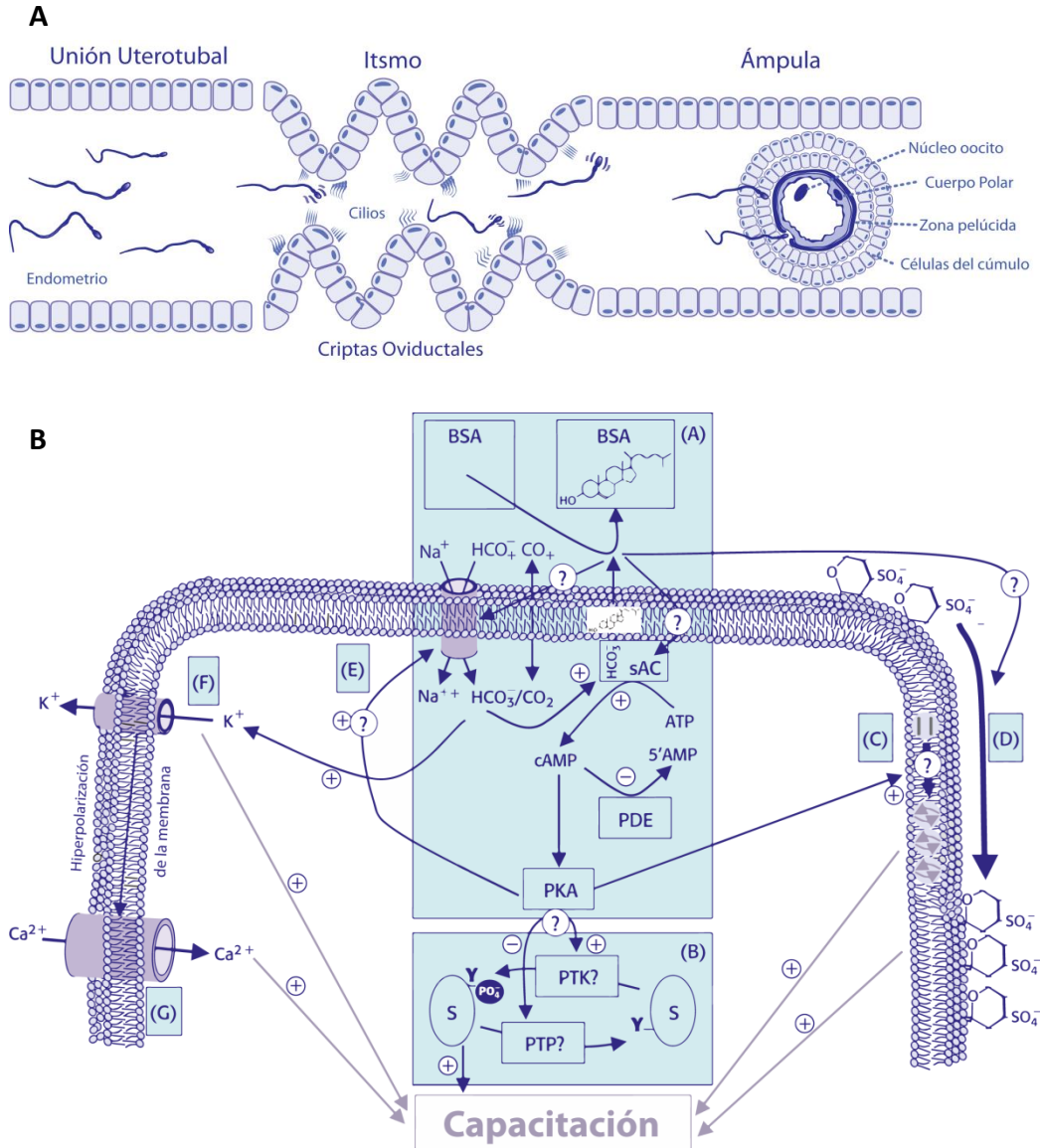


Figura 9. A. Secuencia de los procesos que experimenta el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra: 1. Activación. 2. Capacitación. 3. Hiperactivación. 4. Reconocimiento entre gametos. 5. Reacción acrosómica. 6. Adhesión y 7. Fusión. Modificado de Olivera *et al.*, 2006. B. Señalización durante la capacitación: secuencias propuestas de capacitación espermática de los mamíferos. (A) El bicarbonato podría entrar en las células espermáticas a través de un cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  o bien por difusión como dióxido de carbono. El bicarbonato intracelular cambia a adenilato ciclasa (AC) y produce de manera concomitante monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) que activa la proteína quinasa A (PKA). La salida de colesterol podría inducir un aumento de la entrada de bicarbonato o afectar directamente a la CA. (B) La PKA induce la fosforilación de la tirosina (Y) de varios sustratos (S)

lo más probable a través de la activación de la proteína tirosina quinasa (PTK) o bien por inhibición de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). La activación de la PKA induce cambios en la membrana plasmática. (C) Redistribución de la bicapa de aminofosfolípidos. (D) Redistribución lateral de seminolípidos y colesterol. Se requiere probablemente una mayor redistribución lateral de colesterol antes de su agotamiento por albúmina de sérica bovina (BSA). (E) El cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  podría potencialmente ser un sustrato para la PKA y podría dar lugar a un aumento sostenido de  $\text{HCO}_3^-$  después de su fosforilación; teniendo así una retroalimentación positiva sobre la síntesis de cAMP. (F) La capacitación se correlaciona también con la hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide, lo que podría deberse a la apertura de un canal de potasio sensible a la alcalinización en el citoplasma. (G) La consecuente hiperpolarización de la membrana puede, a su vez, provocar la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes e inducir el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ . El aumento de la fosforilación Tyr junto con los cambios iónicos y lipídicos en la membrana induce procesos que participan en el proceso de capacitación. PDE: fosfodiesterasa. Modificado de de Jonge y Barrat, 2005.

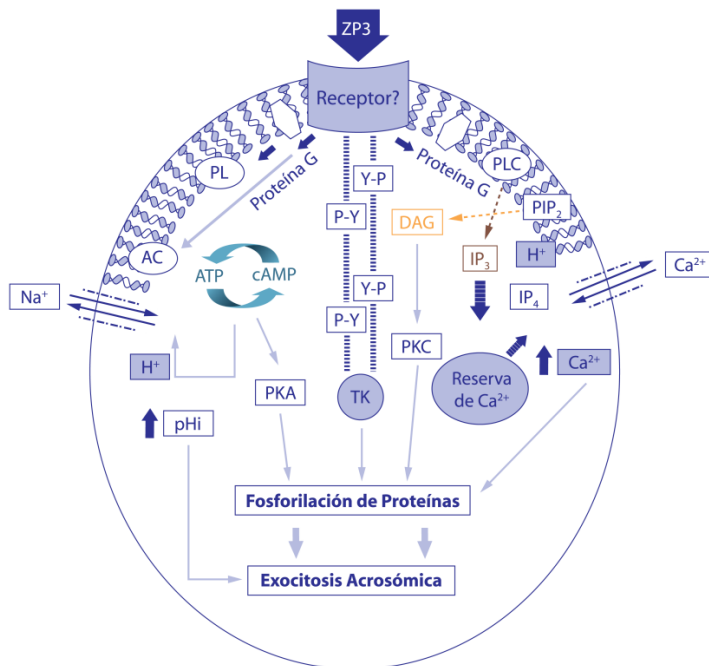


Figura 10. Diagrama de cascadas intracelulares que conducen a la reacción acrosómica. Tras la unión de ZP3 con su receptor, se pueden activar los tres sistemas principales de fosforilación que resultan en la excitación acrosomal. Estos sistemas de segundo mensajero son: activación de una tirosina quinasa, la proteína G-AMPC-proteína quinasa A, y fosfolipasa C-diacilglicerol-proteína quinasa C. Además, se puede provocar un aumento de los niveles de calcio intracelular tras la movilización de las reservas internas y por la entrada del mismo desde los canales de membrana activados. La salida de  $\text{H}^+$ , que a su vez determina un aumento del pH intracelular, también puede acompañar a este proceso Modificado de de Jonge y Barrat, 2005.

### **3. ESTRUCTURA Y VALORACIÓN DE LA CROMATINA NUCLEAR DE LOS ESPERMATOZOIDES**

La función del espermatozoide es transportar el material genético masculino al ovocito. Sin embargo, durante este proceso, la cromatina nuclear del espermatozoide puede dañarse.

Las alteraciones en el material genético se producen durante la espermatogénesis, o bien durante su desplazamiento hacia la región donde se produce la fecundación, concretamente en la ampolla del oviducto. Estas alteraciones pueden provocar una reducción de la capacidad fecundante, muerte embrionaria precoz y anomalías en el desarrollo embrionario. A menudo, se trata de lesiones sutiles en la cromatina, que no están relacionadas con alteraciones morfológicas, cambios de la motilidad o lesiones en la membrana, por lo que no se detectan con los métodos convencionales de valoración de los espermatozoides. De hecho, las alteraciones de la cromatina nuclear del espermatozoide han sido clasificadas como “factores uncompensables” de la fertilidad, ya que no es posible compensarlos aumentando el número de espermatozoides por dosis de inseminación o practicando técnicas específicas para combatir el factor masculino de infertilidad, como la inyección intracitoplasmática (Nebel y Saacke, 1994). Por ello, parece evidente que la detección de estas alteraciones podría mejorar el rendimiento de las técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, para optimizar y desarrollar métodos alternativos de valoración de espermatozoides es necesario entender los mecanismos de condensación y la naturaleza de las lesiones que se producen en el material genético de los espermatozoides.

Durante el largo viaje hacia el ovocito, el material genético del espermatozoide está expuesto a distintos ambientes tanto físicos, y/o químicos, como los cambios de pH, que podrían dañarlo si no está correctamente condensado, ya que estaría desprotegido (Oliva, 2006). El grado de condensación de la cromatina es un parámetro importante para evaluar su estado físico. Sin embargo, el material genético ha de ser capaz de descondensarse rápidamente, para que queden expuestas regiones, cuyo reconocimiento es necesario en un momento determinado del desarrollo embrionario.

Además del grado de condensación, es importante la naturaleza de las interacciones que se establecen dentro de la cromatina. Se considera que la cromatina es “estable” cuando las interacciones entre los residuos de cisteínas de las protaminas se encuentran mediadas por puentes disulfuro. Cuando se establecen interacciones que no se encuentran mediadas por puentes disulfuro, como un exceso de interacciones inespecíficas o de interacciones mediadas por cationes, se puede producir un proceso de “hipercondensación”. Este proceso se encuentra relacionado con un retraso en la formación del pronúcleo masculino después de la fecundación, por lo que puede provocar una demora en la singamia y la muerte embrionaria precoz (Madrid-Bury *et al.*, 2005). La correcta condensación de la cromatina nuclear del espermatozoide es, por lo tanto, fundamental para mantener su integridad y la sincronía del desarrollo embrionario (Lewis y Aitken, 2005).

### **3.1. Condensación de la cromatina nuclear del espermatozoide**

El espermatozoide es una célula preparada para transportar el material genético. Para optimizar su función, prácticamente carece de citoplasma y su núcleo es unas cuarenta veces más pequeño que el de una célula somática y, si bien es cierto que posee menos material genético, ya que se trata de una célula haploide, se estima que está unas seis veces más condensado (Ward y Coffey, 1991).

Para lograr el grado de condensación adecuado, la cromatina espermática se diferencia de las células somáticas en su estructura y composición. En las células somáticas, el material genético se encuentra condensado en nucleosomas. Se trata de complejos formados por dos copias de cada uno de los cuatro tipos de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) que constituyen un núcleo proteico, al que se unen 146 pares de bases de ADN en patrones helicoidales, y la histona H1, que es externa. Sin embargo, al ser de gran tamaño, estas proteínas no tendrían cabida en el núcleo del espermatozoide; por ello, durante la espermatogénesis las histonas se intercambian por unas proteínas de menor masa molecular, las protaminas (Oliva, 2006).

#### 3.1.1 Intercambio de histonas por protaminas

El proceso de condensación se produce en dos fases (*Figura 11*). La primera fase se produce en el conducto seminífero, en las espermatogonias durante la

espermatogénesis. En esta fase, se produce un empaquetamiento de la cromatina, que implica la sustitución de la mayoría de las histonas (ricas en lisina), por protaminas (ricas en arginina y cisteína). El hecho de que ambas proteínas sean básicas facilita su interacción con el ADN, que tiene una carga neta negativa. Sin embargo, las protaminas tienen menor masa molecular y proporcionan un grado mayor de condensación, estabilidad mecánica y química. A medida que el ADN se condensa, las histonas somáticas se van sustituyendo por histonas testiculares, éstas por proteínas de transición y finalmente por protaminas (Ward y Coffey, 1991).

La remodelación de la cromatina es un proceso gradual que se produce durante la espermatogénesis, fundamentalmente durante la meiosis y que precisa de varias modificaciones en las histonas entre las que se incluyen la acetilación, fosforilación, metilación y la ubiquitinización. Pero el proceso que se encuentra mejor caracterizado y resulta esencial es el de la hiperacetilación. Las histonas pueden acetilarse en las cadenas laterales en el grupo  $\text{NH}_3^+$  de los residuos de lisina, con lo que pierden gran parte de la carga positiva y, en consecuencia, se reduce su afinidad por el ADN. El proceso, que está regulado por acetiltransferasas y desacetilasas, finalmente provoca el desplazamiento de las histonas (Rajender *et al.*, 2011).

Posteriormente, las histonas acetiladas son reconocidas por la proteína específica del testículo que posee dominios de bromo (BRDT), (*Figura 11*). Se trata de una proteína que desempeña un papel relevante durante la espermatogénesis ya que no solo actúa como factor de transcripción y como regulador del ciclo celular, sino que también interviene en el procesamiento del ARNm y en la condensación del ADN. En este sentido la BRDT actúa manteniendo el grado de acetilación de las histonas y reclutando chaperonas que facilitan el intercambio de histonas por protaminas (Berkovits y Wolgemuth, 2013). De tal forma que, una vez que se desplazan, las histonas son destruidas mediante poliubiquitinización en los proteosomas 26S y son reemplazadas primero por proteínas de transición y luego por protaminas (Oliva, 2006).

El desplazamiento de las histonas requiere de una reorganización del genoma en el que intervienen nucleasas endógenas y ligasas que actúan en regiones determinadas que no se encuentran metiladas. Se trata de enzimas como topoisomerasa II  $\beta$  (TOPII  $\beta$ ) y la tirosil ADN fosfodiesterasa 2, que liberan el estrés de torsión del ADN y para ello realizan cortes transitorios, disminuyen el superenrollamiento y lo vuelven a ligar. Durante este proceso se cometen errores por

lo que de forma simultánea actúan diversos mecanismos de corrección (McPherson y Longo, 1993).

Al mismo tiempo se unen las proteínas de transición que son ligeramente básicas. Se han identificado dos proteínas de transición, TP-1 y TP-2, que están implicadas en la protección y reparación del material genético. Ambas se unen temporalmente al ADN hasta que lo hagan las protaminas y de esta forma, el material genético no queda, desprotegido en ningún momento (Oliva, 2006), (*Figura 11*).

Uno de los puntos de regulación en el proceso de la condensación de la cromatina nuclear del espermatozoide es el acceso de las protaminas al núcleo y su unión al ADN. Este fenómeno se encuentra regulado por un proceso de fosforilación/defosforilación. Las protaminas que se encuentran en el citoplasma tienen que viajar al núcleo y unirse al ADN. Para ello, las protaminas fosforiladas se unen a los receptores B presentes en la laminina y penetran en el núcleo; donde se defosforilan perdiendo parte de la carga negativa y facilitando su unión al ADN (Mylonis *et al.*, 2004), (*Figura 11*).

Se han identificado dos tipos de protaminas: la protamina 1, presente en todas las especies animales, y la protamina 2, que se encuentra también presente en los animales eutéricos (Ward y Coffey, 1991). Las protaminas se unen al surco mayor del ADN, anulan parcialmente la carga negativa de los enlaces fosfodiéster e inducen un cambio conformacional. De este modo, el ADN se pliega sobre sí mismo en forma de toroides, los cuales se unen entre sí por el denominado ADN "linker", ADN de unión o también conocido como región de unión a la matriz nuclear (MAR). El ADN se une a la matriz nuclear cada 50kb a través del ADN "linker", que está formado por secuencias cortas de no más de 100 pares de bases, y a diferencia del ADN que forma los toroides, está muy desprotegido. Estas regiones, al estar más expuestas son las que primero examina la maquinaria de detección de alteraciones del ovocito después de la fecundación, y su integridad puede ser determinante para el éxito reproductivo (Oliva, 2006), (*Figura 11*).

Algunas especies, como es el caso de la murina o la humana poseen una pequeña cantidad de histonas (entre el 2 y el 15% de la cromatina se encuentra unida a histonas) en la región MAR, que contribuyen a proteger el material genético ubicado en esta región. Pero además de la función protectora, estas histonas podrían realizar una función reguladora ya que pueden sufrir modificaciones epigenéticas y determinar el orden en el que se expresan los genes durante el desarrollo inicial del embrión.

Además se ha observado que pueden transportar ARN interferente y micro ARN que podrían modular la síntesis de proteínas (Boerke *et al.*, 2007).

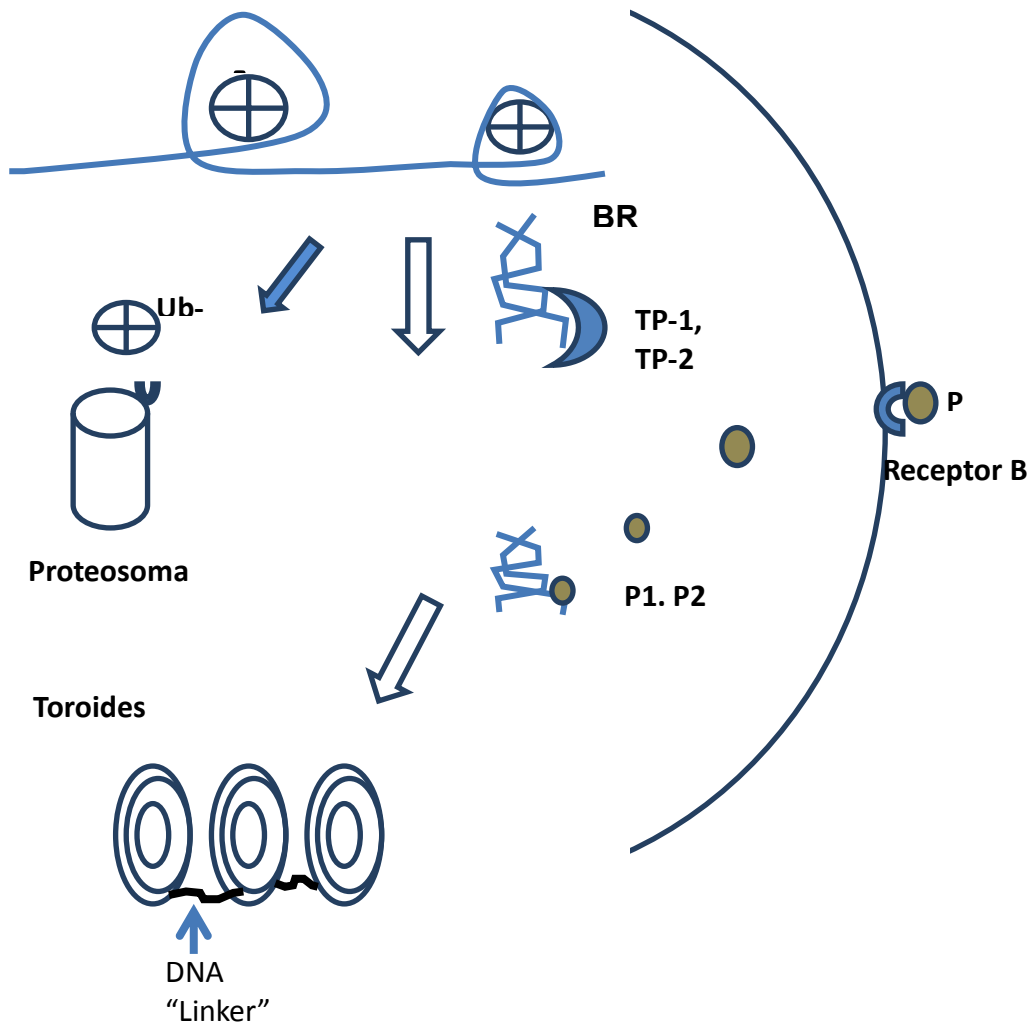


Figura 11. Modelo de compactación de la cromatina en las células somáticas y en los espermatozoides de mamífero. Histona, Acetilación (AC), Ubiquitina (Ub), proteína específica del testículo que posee dominios de bromo (BRDT), proteína de transición 1 y 2 (TP-1 y TP-2), protamina 1 y 2 (P1 y P2) y grupo fosfato (P).

3.1.2 Condensación de los toroides

Durante la segunda fase de la condensación se forman los puentes disulfuro entre los grupos tiol de los residuos de cisteína que integran las protaminas (Calvin y Bedford, 1971). Se trata de un proceso de oxidación que se desarrolla de forma gradual: se inicia en el conducto seminífero, se desarrolla fundamentalmente en la región caudal del epidídimo y se completa después de la eyaculación, en el tracto genital de la hembra. En este proceso juega un papel muy importante la retirada del plasma seminal (y por ende del zinc) que queda retenido en el conducto cervical que actúa como filtro. Algunos autores van más allá, y sugieren que el proceso realmente no se completa hasta que el espermatozoide interacciona con el líquido folicular en las inmediaciones del ovocito (Bahmanpour *et al.*, 2012). Brevemente, el proceso es el siguiente: los grupos tiol pierden el hidrógeno, quedando como grupos sulfuro que, al tener carga negativa, interactúan con los cationes especialmente con el  $Zn^{2+}$ , presente en el eyaculado procedente de las secreciones prostáticas, que facilita la interacción de los grupos sulfuro y la formación de los puentes disulfuro. Por ello, la presencia y retirada gradual del zinc favorece la correcta condensación de la cromatina nuclear del espermatozoide (Oliva, 2006), (Figura 12).

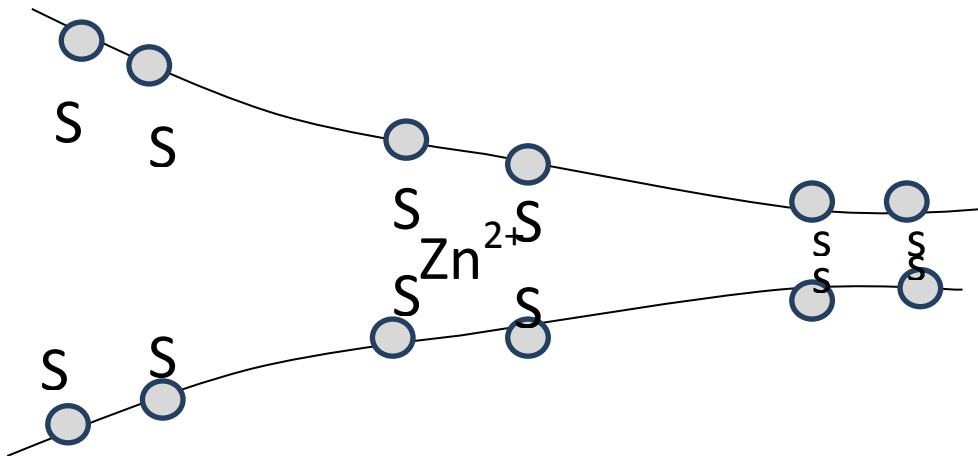


Figura 12. Formación de puentes disulfuro (SS) mediante la oxidación de los grupos tiol (SH) presentes en los residuos de cisteína que integran las protaminas (●). Esta reacción se encuentra facilitada por la presencia de cationes como el  $Zn^{2+}$  que propician la interacción entre los grupos sulfuro (S-) y la formación de puentes disulfuro (SS).

### **3.1.3 Organización del genoma**

La disposición de los cromosomas en el interior de la célula representa un sistema de protección adicional. En los espermatozoides, la región telomérica de los cromosomas se encuentra en la periferia mientras los centrómeros se encuentran ubicados en el interior del núcleo. Lo interesante es que cada cromosoma se encuentra situado en una región determinada, existiendo una organización territorial de tal forma que los cromosomas no se encuentran superpuestos. De esta forma, si se produce una lesión celular en una región muy concreta se reduce el número de cromosomas afectados (Zalensky *et al.*, 1995).

### **3.1.4 Regulación endocrina de la condensación del material genético**

La hormona folicestimulante (FSH) y la testosterona son dos hormonas clave en regulación de la espermatogénesis, por lo que desde el punto de vista fisiológico, tiene sentido que también actúen regulando la condensación de la cromatina. La FSH interviene fundamentalmente en la diferenciación pre-meiótica y estudios recientes señalan que actúa a través de la activación de quinasas como la PKA y la CKII quinasa, que ejercen diversos efectos biológicos encaminados a favorecer la condensación de la cromatina: activan enzimas que acetilan las histonas (HATs), fosforilan protaminas y ubiquitina ligasas. La testosterona actúa a nivel post-meiótico y en muchos aspectos lo hace en sinergismo con la FSH, pero fundamentalmente aumenta la expresión del gen que codifica para la TP-1 (Gill-Sharma *et al.*, 2011).

### **3.1.5 Remodelación de la cromatina espermática en el ovocito**

Una vez en el citoplasma, se produce la descondensación de la cromatina. En efecto, se rompen los enlaces disulfuro entre las protaminas gracias a un agente reductor, el glutatión, presente en el ovocito, y comienza el reemplazo de las protaminas por histonas maternas, mientras que las histonas que posee el espermatozoide se mantienen. Este proceso es esencial para el inicio de la embriogénesis e intervienen proteínas nucleoplasmínicas/nucleofosfínicas NPM1-3 (Okuwaki *et al.*, 2012). Un retraso en este proceso puede alterar la sincronización de la singamia, y entonces, las proteínas no se generan en el momento adecuado y se puede producir la muerte embrionaria precoz (Ménézo *et al.*, 2010).

### **3.2. Factores implicados en el daño a la cromatina nuclear del espermatozoide**

Existen numerosos factores, tanto endógenos como exógenos, que pueden dañar la cromatina espermática. Estos factores generalmente se traducen en un aumento del estrés oxidativo y en alteraciones en el proceso de la apoptosis.

#### **3.2.1. Estrés oxidativo**

Los espermatozoides son particularmente susceptibles al estrés oxidativo debido al elevado contenido de ácidos grasos insaturados en sus membranas y a la imposibilidad de sintetizar o almacenar enzimas antioxidantes. Los niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) alteran la función espermática y afectan a parámetros, como la motilidad, la integridad de membrana y del material genético. El incremento de ROS en el ADN puede causar una oxidación de la guanina y en consecuencia, puede formar dos puentes de hidrógeno, emparejándose con la adenina en vez de hacerlo con la citosina. En consecuencia se bloquea la transcripción, o bien se pierden las purinas. Los ROS se encuentran relacionados con un incremento en la fragmentación del ADN (Agarwal *et al.*, 2007).

Los factores que pueden provocar un incremento de los ROS son múltiples, entre los que se encuentran el incremento de temperatura, ya sea por una mala praxis en el laboratorio o por patologías en el individuo, procesos oncológicos, exposición a tóxicos, la edad avanzada o el sobrepeso. En definitiva, se ha de tener en cuenta que el daño del ADN espermático puede producirse en cualquier etapa de la espermatogénesis y que su origen es multifactorial (Agarwal *et al.*, 2007).

#### **3.2.2. La apoptosis defectuosa**

La apoptosis es un proceso que utiliza el organismo para eliminar los espermatozoides defectuosos, pero si no se completa con éxito se pueden producir lesiones en el material genético sin que se altere en exceso su funcionalidad. Este fenómeno es relativamente frecuente en el espermatozoide, ya que las mitocondrias, organelas implicadas en la activación de la apoptosis, se encuentran en esta célula algo alejadas del núcleo y, aunque se han detectado poros nucleares en la región posterior de la matriz nuclear, las caspasas activas no tienen fácil acceso al núcleo, quizás por ello la apoptosis en el espermatozoide se encuentre preferentemente mediada por la activación del receptor de membrana tipo I Fas (Lee *et al.*, 1999).

El primer paso de la apoptosis es la desestabilización de la membrana: la fosfatidilserina, que es un fosfolípido que se encuentra en el lado interno de la membrana pasa al lado externo y culmina con la activación de las caspasas, proteasas responsables de la muerte celular (Lee *et al.*, 1999).

La presencia de Fas está relacionada con alteraciones genéticas que se producen durante la espermatogénesis. Estas alteraciones pueden estar relacionadas con un aumento de actividad de la topoisomerasa II, encargada de hacer mellas para relajar el estrés. Si las alteraciones son muy graves, son detectadas por los sistemas de control de la espermatogonia que inducen la expresión de Fas y, con ello, su eliminación. El proceso de la apoptosis se desencadena debido a que las células de Sertoli producen de forma constitutiva ligando Fas que actuará sobre Fas, presente únicamente en las espermatogonias dañadas. El ligando Fas se produce también en el tracto genital femenino, se trata de un “mecanismo de seguridad” que garantiza la eliminación de los espermatozoides que presentan alteraciones en la cromatina y que hayan podido sobrevivir al sistema de selección descrito en el conducto seminífero (Lee *et al.*, 1999). La selección del material genético es fundamental para el éxito reproductivo.

#### **4. CRIOCONSERVACIÓN SEMINAL EN EL DELFÍN MULAR Y SU APLICACIÓN A LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Existen diferentes estrategias de conservación de animales protegidos o en peligro de extinción; una *in vivo* y otra *in vitro*. La primera consiste en el mantenimiento de diferentes especies fuera de su hábitat, favoreciendo el éxito de los cruzamientos que minimicen la consanguinidad para luego reintroducirlas en su hábitat de origen. La conservación *ex-situ* o *in vitro* hace referencia a la instauración de Bancos de Conservación de Recursos Zoogenéticos (BRZ), es decir, al mantenimiento de gametos, embriones o tejidos de forma permanente en nitrógeno líquido. Así pues, la aplicación de las técnicas de reproducción asistida permite almacenar muestras seminales de animales valiosos, eliminar limitaciones de manejo o sanitarias que impedirían utilizar algunos individuos, y facilitar la transferencia de material genético entre subpoblaciones que se encuentren geográfica y biológicamente aisladas (Eberhard y Cordero, 1995; Holt *et al.*, 1996). Los productos biológicos así almacenados pueden ser utilizados en los programas de cruzamiento lo que supone, junto con la aplicación de tecnologías reproductivas, una contribución

importante en la conservación (Wildt, 1992; Wildt *et al.*, 1997). Sin embargo, la aplicación de las tecnologías reproductivas se encuentra limitada por los conocimientos fisiológicos de la especie en cuestión, así como por el desarrollo de estrategias de conservación de su hábitat.

#### **4.1. Antecedentes de la criopreservación**

El primer ensayo sobre preservación seminal mediante enfriamiento del que se tiene constancia fue realizado por Lázaro Spallazani en 1776, que comprobó que las células de humano, caballo y rana pasaban a un estado de inactividad tras enfriar las muestras con nieve durante algo más de 30 minutos pero mantenían la capacidad de ser reavivadas con posterioridad. Desde entonces, la disminución de la temperatura ha sido el recurso de referencia para reducir la actividad metabólica de los espermatozoides incrementando con ello su vida útil (Bwanga, 1991).

Se realizaron los primeros ensayos sobre congelación casi un siglo después, en 1866, cuando Paolo Mantegazza descubrió que los espermatozoides humanos eran capaces de sobrevivir a una congelación de  $-17^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, Polge *et al.* (1949) descubrieron accidentalmente la acción del glicerol, al comprobar que agregándolo al medio de congelación de semen ofrecía protección a los espermatozoides de gallo evaluados en términos de recuperación de la motilidad y capacidad fecundante después de la descongelación (Polge *et al.*, 1949). Se trató de un importante descubrimiento, ya que, hasta la fecha, la inseminación artificial sólo se había conseguido implantar de una forma aceptable en la especie bovina con semen refrigerado. A partir de ese momento, durante la década de los años 50, se adapta esta técnica a numerosas especies, como el caballo, el toro, el morueco, el verraco o la especie humana consiguiendo los primeros nacimientos de crías a partir de semen congelado (Watson, 1990; Curry, 2000).

En definitiva, la crioconservación de esperma se puso en marcha en un primer momento con el fin de dispersar genotipos productivos valiosos en los animales domésticos. Más tarde, se puso en práctica la conservación de esperma como mecanismo de mantenimiento de la biodiversidad en especies en peligro de extinción o en núcleos zoológicos donde existe un elevado nivel de consanguinidad. Así, la criopreservación se ha llevado a cabo en numerosas especies de mamíferos, aves, reptiles y peces (Curry, 2000) con el fin de conservar los recursos genéticos de animales en peligro de extinción (Holt *et al.*, 1999; Yoshida, 2000).

Los primeros estudios sobre criopreservación de semen de delfín datan de los años ochenta. Seager *et al.* en 1981, fueron los primeros en describir la técnica de criopreservación de semen de delfín mular a partir de un eyaculado obtenido por electroeyaculación (Seager *et al.*, 1981). El éxito de la criopreservación de semen en esta especie no se repitió hasta que se pusieron en marcha las donaciones voluntarias de esperma (Keller, 1986; Schroeder y Keller, 1989) que permitieron además, la descripción de las características estacionales del semen en un macho de delfín mular (Schroeder y Keller, 1989). En efecto, el estudio de Schroeder en 1990, puso de manifiesto las fluctuaciones de testosterona en un macho de delfín en cautividad en Florida. Se observó que el número de espermatozoides aumenta entre Septiembre y Octubre coincidiendo con el periodo de cría. Estudios posteriores (Schroeder, 1990; Holt, 2000; Robeck y O'Brien, 2004; Robeck *et al.*, 2005) pusieron a punto técnicas de criopreservación obteniendo muy buenos resultados en la descongelación.

La criopreservación seminal presenta grandes ventajas como la drástica disminución del metabolismo que conlleva la posibilidad de almacenar los espermatozoides durante largos periodos de tiempo (Gao y Critser, 2000). Sin embargo, también produce numerosos inconvenientes que pueden llegar a provocar la muerte celular (Hammerstedt *et al.*, 1990) o bien producir cambios similares a los de capacitación espermática (Maxwell y Johnson, 1997) alterando la interacción del ovocito con el espermatozoide perdiendo, de este modo, la finalidad de la preservación.

La criopreservación espermática puede clasificarse en las siguientes etapas: dilución, refrigeración, envasado, congelación y descongelación. Cada una de las etapas afectan directamente a la recuperación de las células criopreservadas (Garde López-Brea, 1992). El éxito de la criopreservación va a depender por lo tanto, de la capacidad de adaptación de la célula a cada una de estas etapas; en concreto la adición del crioprotector supone la etapa más dañina (Watson, 2001) tanto por el estrés osmótico que produce como por su toxicidad. También son determinantes las etapas de congelación y descongelación puesto que los cambios de temperatura se corresponden con la formación y disolución de cristales de hielo así como con el cambio de temperatura que afecta a las estructuras celulares.

### **4.2. Diluyentes empleados en la congelación seminal en mamíferos**

Con el fin de reducir los efectos dañinos que se producen durante la congelación, se han elaborado diluyentes de congelación y se han establecido

protocolos optimizados de congelación y descongelación para cada especie. La composición de los diluyentes se ha ido optimizado en función de la especie aunque presentan características comunes como son un pH y osmolaridad óptimos, la presencia de agentes crioprotectores y un aporte extra de energía para el espermatozoide.

Con el fin de mantener un pH adecuado, próximo a la neutralidad, es necesario utilizar soluciones tampón. Entre las más empleadas se encuentran las de fosfato, citrato y bicarbonato sódico (Garde López-Brea, 1992).

Otro compuesto presente en la mayoría de los diluyentes es la yema de huevo y la leche descremada. El primero en constatar que la yema de huevo prolongaba la viabilidad de los espermatozoides de toro fue Phillips en 1939 (Phillips, 1939). Más tarde, se comprobó este mismo efecto en la mayoría de las especies de mamífero. La yema de huevo ayuda, en efecto, a minimizar los daños por enfriamiento de la célula espermática; a una concentración del 20% previene la desestabilización del plasmalema (Watson, 1990; Holt, 2000). También, se ha sugerido que estos aditivos influyen sobre la permeabilidad de la membrana al agua y a otros iones. Esta modificación de la permeabilidad de la membrana afectaría al comportamiento osmótico de la célula variando su respuesta frente a situaciones de estrés osmótico como la adición de crioprotector o la consecuente congelación y descongelación (Holt, 2000).

La utilización de proteínas vegetales en lugar de yema de huevo o leche resulta de gran interés, ya que, al carecer de proteínas animales, evita el riesgo de transmisión de patógenos como la *Salmonella Enteritidis*. Además, el diluyente de origen vegetal presenta la ventaja adicional de poseer un elevado contenido en fosfolípidos y colesterol, entre ellos la fosfatidil colina (PCH) que puede aumentar la fluidez de la membrana y la resistencia al choque frío (Parks y Lynch, 1992) Asimismo, los diluyentes compuestos por lípidos vegetales pueden constituirse con vesículas lipídicas de muy inferior diámetro, lo cual incrementa la protección física de las membranas; por todo ello resulta interesante la utilización de diluyentes de origen vegetal.

Este tipo de diluyentes han sido utilizados en toro y bisonte europeo (*Bison bonasus*) (Palasz *et al.*, 2003; Pérez-Garnelo *et al.*, 2006; Szczesniak-Fabianczyk *et al.*, 2008; Tamargo *et al.*, 2008) y requieren la preparación de vesículas unilamelares de lípidos de baja densidad mediante la homogenización a altas presiones (HPH) (Thundathil *et al.*, 2002; Perez-Garnelo *et al.*, 2006). De esta forma se obtienen

vesículas de reducido tamaño, del orden de 45-80 nm con lo que aumenta la relación volumen/superficie y mejora sustancialmente la capacidad reactiva de la superficie molecular, facilitando su incorporación a las membranas del espermatozoide durante la manipulación *in vitro* en el pre-enfriamiento frente al uso de otros componentes como el huevo o la leche descremada. Los liposomas son vesículas esféricas microscópicas que se forman cuando los fosfolípidos se hidratan y poseen una gran capacidad reactiva con la membrana del espermatozoide debido a que tiene una composición de unión similar.

La eficacia de los liposomas en las soluciones depende de la composición lipídica, el tamaño, la homogeneidad y la estabilidad de la solución (Palasz, 2007). Por otro lado, la capacidad reactiva de la membrana del espermatozoide depende de su fluidez. Ésta, a su vez, depende de muchos factores como la temperatura, la composición de fosfolípidos y su distribución en la zona interior y exterior de la membrana espermática, el contenido en colesterol y las interacciones lípido-lípido, así como las interacciones lípido-proteína tanto a temperaturas fisiológicas como durante la refrigeración (Cerolini *et al.*, 2001).

En el caso del delfín mular, se han realizado estudios sobre la composición del diluyente, la solución tampón o la concentración de glicerol empleada (Robeck y O'Brien, 2004; O'Brien *et al.*, 2009). Sin embargo, el diluyente utilizado contiene en todos los casos yema de huevo que, a pesar de todas las ventajas explicadas anteriormente, presenta asimismo, el riesgo de transmisión de patógenos (Sánchez-Calabuig, 2010)

Los diluyentes deben incluir un crioprotector con el fin de proteger a la célula espermática durante todo el proceso. Los crioprotectores disminuyen el punto de fusión de las soluciones, reducen la concentración intra y extracelular de electrolitos e incrementan la presión osmótica de las soluciones provocando pérdidas de agua intracelular. Evitando la excesiva deshidratación celular, a temperaturas bajo cero reducen el hielo durante la congelación e influyen en la forma de los cristales (Mazur, 1966; Polge, 1977). También inhiben la actividad de muchas enzimas disminuyendo o eliminando la actividad de radicales libres (Carpenter y Crowe, 1988), estabilizan proteínas celulares y mantienen en equilibrio el potencial químico del agua intra y extracelular (Polge, 1977).

Existen dos tipos de crioprotectores:

1. Penetrantes: La mayoría son alcoholes capaces de atravesar las membranas celulares. Unidos a la solución tampón, reemplazan

osmóticamente el agua intracelular antes y durante la congelación y disminuyen el punto de congelación del medio. Los más utilizados son el glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO), etilenglicol y otros polialcoholes (Watson, 1990; Curry, 2000). Sus pesos moleculares varían entre 32 y 212 Daltons.

2. No penetrantes: Se trata de azúcares y macromoléculas. Debido a su gran tamaño, no son capaces de penetrar dentro de la célula. Incrementan la presión osmótica del medio externo celular e influyen en la formación de cristales de hielo al provocar una deshidratación celular (Palasz y Del Campo, 1995). Poseen una eficacia protectora menor que la de los penetrantes. Si se emplea un crioprotector no penetrante, se recomienda combinarlo con uno penetrante para así optimizar su eficacia. Los no permeables actúan como deshidratadores, colaborando en la penetración de los permeables que pueden usarse a menor concentración y por lo tanto con menor toxicidad potencial.

### **4.3. Fases de la criopreservación seminal**

#### **4.3.1. Dilución**

La dilución del eyaculado tras su obtención es vital con el fin de evitar una rápida pérdida de viabilidad producida por el consumo de los componentes energéticos del plasma seminal (Garde López-Brea, 1992). En el caso del delfín mular, la dilución tras la obtención del eyaculado se realiza en una proporción 1:1 (Robeck y O'Brien, 2004).

#### **4.3.2. Refrigeración**

El enfriamiento es un paso previo a la congelación. Durante el enfriamiento, se disminuye progresivamente la temperatura de la muestra a 4°C, provocando un estado de hipotermia celular que puede resultar perjudicial para el espermatozoide (Parks, 1997). Este proceso ralentiza la penetración del crioprotector en la célula minimizando su toxicidad y favoreciendo alcanzar un equilibrio progresivo adecuado. En las células espermáticas de los mamíferos se suelen emplear velocidades moderadas y homogéneas (-0,1°C/min. a -0,5°C/min.), lo que provoca un descenso de la temperatura de la muestra de 30°C a 5°C en un periodo que oscila entre 1 y 2 horas (Fiser y Fairfull, 1984). En el caso de la congelación de espermatozoos de delfín mular la velocidad óptima es -0.27°C/min. (Robeck y O'Brien, 2004).

### **4.3.3. Congelación y envasado**

Durante el proceso de congelación, se produce la cristalización, cambio de estado de líquido a sólido. La velocidad óptima de congelación de las células espermáticas de delfín mular es de 100°C/min. hasta -80°C y de 200°C/min. hasta -140°C (Robeck y O'Brien, 2004).

Inicialmente, debido a que se trata de un proceso exotérmico que libera “el calor latente de fusión”, aumenta la temperatura hasta el punto de congelación de forma brusca. Cuando se produce la disipación completa de este calor, la temperatura de la muestra deja de discurrir de forma paralela a la de la curva establecida, lo que se conoce como “meseta del punto de congelación” a partir de la cual comienza el cambio progresivo del estado líquido al sólido de la muestra. El incremento de la duración de ese lapso de tiempo es claramente perjudicial para la supervivencia espermática (Holt, 2000). Por ello, la elección del envase es de suma importancia en la calidad final de la muestra, en concreto, resulta determinante, el valor de la relación superficie/volumen que éstos presenten. La mayoría de los autores coinciden en que los envases de mayor volumen son inapropiados puesto que el proceso de congelación/descongelación no se realiza de forma uniforme en toda la muestra (Bwanga *et al.*, 1991). Sin embargo, las diferencias entre los distintos envases de menor volumen son más controvertidas. En el caso del delfín mular, se determinó que no existía diferencia entre pajuelas de 0,25 mL y 0,5 mL al variar la velocidad de descongelación (Robeck y O'Brien, 2004).

### **4.3.4. Descongelación**

La velocidad de descongelación depende en gran medida de la velocidad de congelación empleada. En general, en células espermáticas de mamíferos, se emplean velocidades de descongelación rápidas (Tasseron *et al.*, 1977). En el caso del delfín mular, se emplean temperaturas de 12-28°C/s obteniendo buenos resultados de supervivencia después de la descongelación (Robeck y O'Brien, 2004).

#### **4.4. Efectos de las distintas fases de la crioconservación sobre la célula espermática**

##### **4.4.1. Efecto del enfriamiento celular**

Los daños celulares que puede sufrir la célula espermática durante este proceso no sólo dependen de la velocidad a la que sucede el enfriamiento sino también de la temperatura final que se alcance, si se produce “enfriamiento extremo”, la célula puede sufrir una pérdida de la integridad de las membranas y de sus funciones celulares como la pérdida de motilidad (Watson, 1995). La extensión de las lesiones resulta mayor cuanto más baja es la temperatura alcanzada por la célula, siendo además proporcional al tiempo de exposición (Mazur *et al.*, 2008).

La sensibilidad de los espermatozoides al enfriamiento varía considerablemente en función de la especie (Parks, 1997). Las diferencias en la sensibilidad entre especies han sido atribuidas a las características estructurales de las membranas celulares, fundamentalmente a las diferencias en su composición lipídica (Parks *et al.*, 1987; De Leeuw *et al.*, 1990; Parks y Lynch, 1992; White, 1993). Se ha puesto en evidencia la importancia de ciertos componentes de membrana, como la cantidad de los fosfolípidos o el tipo de ácido graso y la proporción de colesterol en la resistencia al enfriamiento así como en el mantenimiento de la integridad estructural de las membranas celulares (Parks *et al.*, 1987; White, 1993).

En cuanto a la proporción de colesterol, se ha determinado que cuanto menor es el cociente colesterol/fosfolípidos mayor resulta la susceptibilidad al choque por frío (De Leeuw *et al.*, 1990; White, 1993; Parks, 1997). La presencia del colesterol en las membranas celulares resulta importante en la cohesión y creación de una cierta impermeabilización de las membranas, fundamentalmente en aquellas ricas en ácidos grasos polinsaturados (White, 1993). Debido a la importancia de estos dos componentes, se ha llegado a afirmar que la escasez de moléculas de colesterol y la abundancia de fosfolípidos insaturados podría ser la causa de la elevada susceptibilidad al enfriamiento de ciertas especies (De Leeuw *et al.*, 1990).

##### **4.4.2. Efectos de la adición de un agente crioprotector**

Se ha comprobado que cualquier célula de mamífero congelada sin crioprotector muere entre los -5°C y -20°C; sin embargo si se añaden crioprotectores

disminuye progresivamente la temperatura letal hasta que la muerte celular se produce por debajo de los  $-100^{\circ}\text{C}$  (Polge, 1951; 1977).

Se cree que los efectos deletéreos del glicerol sobre la capacidad fecundante del espermatozoide son debidos principalmente a la acción tóxica y al estrés osmótico que esta sustancia ejerce sobre los espermatozoides (Watson, 2001). La escasa tolerancia al glicerol varia extremadamente entre las especies: así mientras en el toro, el morueco o el caballo, se utilizan concentraciones comprendidas entre el 4 y el 9% (Watson, 1990), y en el delfín mular la concentración varía entre un 3 y 6% (Robeck y O'Brien, 2004; Sánchez-Calabuig, 2010), la concentración óptima para los espermatozoides de los marsupiales varía entorno al 20% (Holt, 2000) o por el contrario, en otros como los espermatozoides de verraco (Watson, 1990; Holt, 2000; Watson, 2001) , o de ratón (Holt, 2000), no se recomienda incorporar a los diluyentes más de un 3 o un 1,75%, respectivamente dadas las graves lesiones que se originan a nivel de ciertas estructuras como el acrosoma.

Las características de los envases en los que se almacena las muestras seminales de forma previa a su congelación, también influyen de manera notable en la calidad de los espermatozoides después de la congelación, ya que afectan a la geometría de los cristales de hielo formados durante la congelación y a las velocidades alcanzadas durante el descenso de la temperatura (curvas de congelación) así como a la homogeneización del enfriamiento en el conjunto de la muestra.

### **4.4.3. Efecto de la criopreservación sobre la célula espermática**

Por lo que respecta a las fases de congelación y descongelación, las teorías propuestas para explicar el daño celular hacen referencia a las consecuencias de la formación de hielo y su disolución, que dependen, respectivamente, de las velocidades de enfriamiento y calentamiento (Watson, 1995) (*Figura 13*). Los procesos de formación y disolución del hielo así como sus consecuencias se pueden resumir en la *Figura 14*. En definitiva, el estrés que el proceso de congelación causa a la estructura de la célula está relacionado con la velocidad de circulación del agua a través de la membrana. La posibilidad de que se formen grandes cristales de hielo intracelular es mayor si el enfriamiento es rápido; del mismo modo se da la existencia de un proceso inverso en la descongelación.

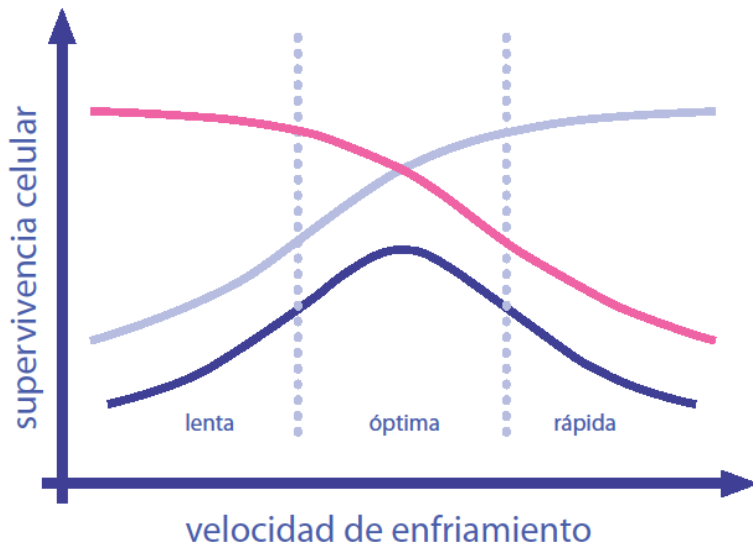


Figura 13. Curvas de supervivencia de las células según la velocidad de congelación. Modificado de Mazur y col 1972.

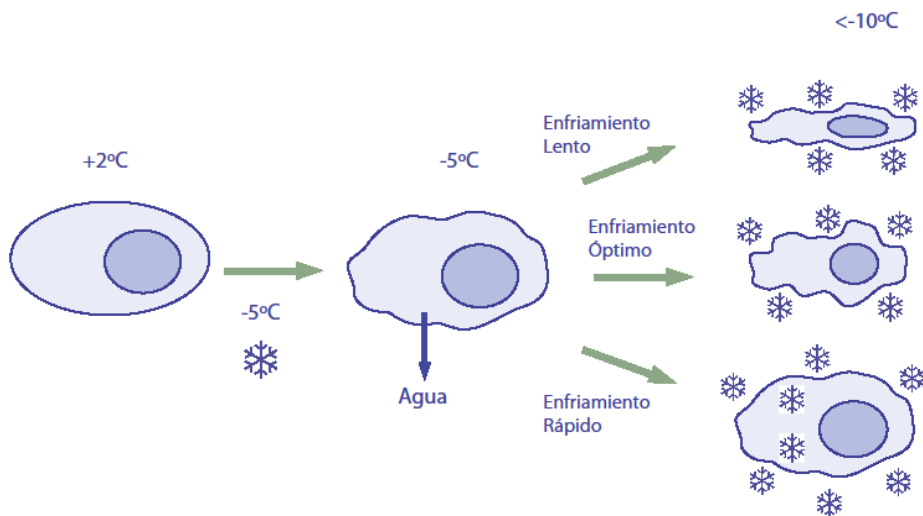


Figura 14. Representación esquemática de los fenómenos físicos que acontecen en la célula en función de la velocidad de enfriamiento. Modificado de Gao y Critser, 2000.

Las consecuencias en la supervivencia por descensos de la temperatura dependen principalmente del tamaño y la formación de cristales en el espacio intracelular. En efecto, un ritmo de enfriamiento muy rápido va a dar lugar a la formación de cristales voluminosos que podrán ocasionar rupturas de membranas y estructuras celulares. Por el contrario, velocidades demasiado lentas también provocan alteraciones importantes en la célula por una deshidratación excesiva celular, dando lugar a bajos índices de supervivencia. Existe pues una velocidad de enfriamiento considerado óptimo, por encima y por debajo de la cual, será menor el porcentaje de supervivencia celular (Mazur y Cole, 1985).

Independientemente de la velocidad de enfriamiento, la mayoría de los tipos celulares no sobreviven a la congelación sin un crioprotector. La incorporación de este tipo de sustancias incrementa el porcentaje de supervivencia. Se establece además, una interacción entre la concentración del crioprotector y la velocidad de enfriamiento, de tal manera que la optimización del proceso, cuando se utilizan altas

concentraciones de crioprotectores, requiere utilizar velocidades de enfriamiento mayores y viceversa (Watson, 1990).

La conjunción de situaciones estresantes a lo largo de todo el proceso de criopreservación tales como la adición de crioprotectores, las variaciones en el volumen celular en respuesta a cambios osmóticos, la aparición de fenómenos de transición de fases de fosfolípidos, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o de cristales de hielo, o, incluso el contacto celular con concentraciones elevadas de solutos va a determinar que la primera causa de daño celular en la congelación sea la alteración de la membrana plasmática (Parks y Lynch, 1992), también se verán afectadas la acrosómica y la mitocondrial (Watson, 1995). Así la estructura espermática parece ser la más severamente castigada por el proceso de descongelación/descongelación (Parks, 1997).

Los efectos del proceso de criopreservación sobre las membranas celulares van a consistir en:

- Alteración de su estructura (Holt y North, 1984; De Leeuw *et al.*, 1990).
- Modificación de su composición lipídica y organización molecular (Cerolini *et al.*, 2001).
- Pérdida de moléculas (ATP, ácidos nucleicos, enzimas) e iones intracelulares (magnesio, potasio) como consecuencia del incremento de permeabilidad, provocando notables trastornos en el balance iónico (White, 1993; Bailey y Buhr, 1995).

Las lesiones acontecidas en la membrana plasmática, el acrosoma y las mitocondrias producen como efectos inmediatos la pérdida de permeabilidad selectiva del plasmalema, la aparición de trastornos en el metabolismo aerobio y glucólisis anaerobia que limitan las posibilidades de generar nuevas moléculas de ATP, comprometiendo como consecuencia de ello, todas aquellas funciones celulares dependientes de energía, entre las que destaca la motilidad espermática (Bwanga, 1991; White, 1993).

En cuanto a las lesiones estructurales, se han estudiado con microscopía electrónica los daños producidos en distintas especies, detectando en todas ellas lesiones similares caracterizadas por agrupaciones de partículas intramembranas que reflejan la aparición de separaciones laterales de fase (Holt y North, 1984; De Leeuw *et al.*, 1990).

Los cambios de temperatura también provocan cambios en la composición lipídica en la membrana del espermatozoide, comprobando recientemente que dichos desórdenes pueden tener su origen en la movilización de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, desde su localización interna de la membrana hacia el exterior de la misma, como consecuencia del proceso de criocapacitación (Thomas *et al.*, 2006). Durante este proceso, se han detectado pérdidas de numerosas enzimas, entre ellas moléculas que se responsabilizan de la metabolización de las ROS (Lasso *et al.*, 1994), lo que va a originar un incremento de éstas (Cerolini *et al.*, 2001) causando alteraciones como la peroxidación lipídica de componentes de membranas celulares, alteraciones del citoesqueleto o la inhibición de la unión ovocito-espermatozoide.

Algunas proteínas, cuya función es estabilizar la membrana plasmática, sufren un proceso de despolimerización y repolimerización dependiente de la temperatura. Además, el glicerol puede alterar los procesos de polimerización de los microtúbulos pudiendo repercutir de manera indirecta sobre el citoesqueleto, lo que puede repercutir de manera indirecta sobre la membrana plasmática (Watson, 1995; Holt y North, 1984).

Los espermatozoides criopreservados experimentan una pérdida de motilidad que puede ser debida a varias causas: permeabilidad de la membrana con cambios en el transporte activo, alteración de la disponibilidad energética, peroxidación lipídica que afecta de manera más intensa a nivel de la pieza intermedia (Brouwers *et al.*, 2005), lo que hace suponer que va a interferir en la producción energética a través de la respiración oxidativa en las mitocondrias. Asimismo, se ha correlacionado el descenso de motilidad con la formación de ROS (Brouwers *et al.*, 2005). Las modificaciones que se producen durante el proceso de criopreservación en la movilidad del espermatozoide, no son únicamente cuantitativas sino que también existen cambios cualitativos que afectan al patrón del movimiento espermático, sufriendo procesos parecidos a la capacitación espermática, denominado este suceso como criocapacitación, produciendo en un elevado porcentaje la muerte celular. La capacitación espermática es un proceso de desestabilización del plasmalema caracterizado por la eliminación o la modificación de sustancias adsorbidas en la misma, que provocará un incremento del influjo de iones de calcio al interior de la célula (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988), posibilitando el movimiento de “hiperactivación” necesario para que el espermatozoide se desplace por los fluidos viscosos del oviducto (Yanagimachi, 1970), así como la preparación para sufrir la

reacción acrosómica. Este proceso disminuye de manera drástica la “vida fértil” de los espermatozoides lo que acelera la muerte celular.

Durante el proceso de congelación, el núcleo de la célula espermática también se ve afectado puesto que se produce una alteración de la cromatina. Esto puede provocar un retraso en la aparición de los pronúcleos y afectar, por lo tanto, a la capacidad fecundante del espermatozoide (Royere *et al.*, 1991). Además, otros estudios sostienen que el proceso de congelación/descongelación puede producir una desestabilización de la cromatina nuclear, lo que provocaría un incremento de la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización *in situ*; de hecho, se ha determinado que, tras la criopreservación, la fragmentación y oxidación del ADN sufren un incremento significativo en los espermatozoides humanos (Zribi *et al.*, 2010).

Como consecuencia de esta amplia gama de alteraciones que tienen lugar durante el proceso de criopreservación, en torno al 40-50% de las células espermáticas no consiguen sobrevivir, además los espermatozoides viables van a presentar alteraciones en su capacidad fecundante (Watson, 1995). Así, la exposición de los espermatozoides al enfriamiento, a la adición del crioprotector o la formación o disolución de hielo origina alteraciones de la capacidad motora, así como deficiencias en el reconocimiento de receptores y el mantenimiento de un posterior desarrollo embrionario. Asimismo, pueden presentar una alta susceptibilidad a la peroxidación lipídica (Watson, 2001). Todos estos fenómenos van a influir en la capacidad fecundante del espermatozoide debido a la reducción de tiempo de supervivencia. El conjunto de alteraciones morfofuncionales que sufre el espermatozoide que responde al nombre de criocapacitación o *capacitation like changes* provoca un estado de reactividad similar al observado en la capacitación fisiológica desde el momento de la descongelación. En definitiva, los espermatozoides no presentan una menor capacidad fecundante sino que la adquieren en un momento anterior al fisiológicamente establecido (Rota *et al.*, 1999).

#### **4.4.4. Efecto de la descongelación sobre la célula espermática**

Un óptimo descenso de la temperatura durante la congelación influye positivamente en la calidad post-descongelación seminal. Superar con éxito la etapa de descongelación supone superar con éxito la franja de temperatura de -15°C a -60°C que afecta muy negativamente a su integridad (Mazur y Cole, 1985).

El proceso de descongelación, así como el de congelación, ha de tener una velocidad óptima con el fin de minimizar los posibles daños que pueden ocasionarse. Por ejemplo, se pueden producir alteraciones de la membrana plasmática por desestabilizaciones moleculares en el plasmalema por cambios de temperatura a una velocidad inadecuada (Holt *et al.*, 1992). La velocidad de descongelación no sigue una relación lineal con la supervivencia espermática (Eriksson y Rodriguez-Martinez, 2000b) detectándose velocidades de descongelación óptima para cada envase (Eriksson y Rodriguez-Martinez, 2000a).

### 4.5. Metodología y éxito de la inseminación artificial en el delfín mular

El desarrollo de la inseminación artificial permite un intercambio genético global y ofrece una herramienta para futuras aplicaciones de bancos de recursos zoogenéticos.

El éxito del desarrollo de procedimientos de inseminación artificial para la gestión *ex-situ* de especies salvajes en cautividad requiere un conocimiento exhaustivo de la fisiología reproductiva tanto masculina como femenina. En el caso del delfín mular, la monitorización ecográfica de la actividad ovárica se describió por primera vez en los años 90 (Robeck *et al.*, 1998). Esta técnica, junto con la determinación de los perfiles hormonales a partir de muestras de sangre y orina, permitió mejorar el conocimiento de la fisiología reproductiva en esta especie (Sawyer-Steffan *et al.*, 1983; Brook *et al.*, 2000; Robeck *et al.*, 2005).

El conocimiento del ciclo del delfín mular ha mostrado, según los estudios de Urian en 1996, una variación individual que depende de la localización geográfica del individuo y ha permitido el desarrollo de diferentes protocolos para la sincronización de celos en esta especie (Robeck *et al.*, 2005; Robeck *et al.*, 2009; Katsumata, 2010). El altrenogest® es un progestágeno sintético que se ha utilizado previamente para la sincronización de celos en la especie equina y cerdos (Webel y Squires, 1982) sin que afecte a la fertilidad en la hembra (Squires *et al.*, 1983). En los cetáceos, el altrenogest® se ha utilizado como supresor de la ovulación a largo plazo (Young y Huff, 1996) y en la sincronización de celos para inseminación artificial en la orca (*Orcinus Orca*) (Robeck *et al.*, 2000), en el delfín de lados blancos (*Lagenorhynchus obliquens*) (Robeck *et al.*, 2005), en el delfín mular (Robeck *et al.*, 2005) y en la beluga (O'Brien *et al.*, 2008).

Se han realizado con éxito la inseminación artificial con espermatozoides congelados y descongelados en muchas especies de cetáceos como en la orca (Robeck *et al.*, 2004), en el delfín de lados blancos del Pacífico (Robeck *et al.*, 2005; O'Brien y Robeck, 2006) y la beluga (O'Brien *et al.*, 2008; Robeck *et al.*, 2010) y en el delfín mular, con un éxito del 63% (Robeck *et al.*, 2005). La sincronización de celos se realizó con una dosis diaria de 0,044 mg/Kg vía oral de altrenogest de 27 a 77 días seguidos. Se realizaron mediciones diarias de progesterona, estrógenos y LH en orina dos veces al día durante el tratamiento. A día de hoy, la técnica no está puesta a punto en esta especie ya que la sincronización sólo resultó en ovulación en un 46% de los casos (Robeck *et al.*, 2005). La ovulación se puede controlar por ecografía o por la medición de LH en la orina, ya que entre el pico de LH y la ovulación existe un intervalo de 24h. Para la detección de la ovulación, sería más conveniente la realización mínima de dos mediciones diarias, ya que sólo existe un intervalo de  $9,4 \pm 3h$  entre el nivel basal y el pico de LH (Robeck *et al.*, 2005). Se ha determinado que 270 millones de espermatozoides descongelados son suficientes para realizar con éxito una inseminación artificial en el delfín mular, aunque serían necesarios estudios complementarios con el fin de confirmar este dato sobre un número mayor de animales y así llegar a determinar el número mínimo de espermatozoides para realizar la inseminación artificial con éxito. Un estudio reciente comunicó que nacieron 13 delfines mulares por inseminación artificial empleando semen sexado, con un éxito en la predicción del sexo del 92% (O'Brien y Robeck, comunicación personal; Montano *et al.*, 2012).

## **5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS SEMINAL**

Las técnicas de contrastación seminal se utilizan para determinar la capacidad fecundante de una muestra seminal. Es necesario combinar diferentes técnicas con el fin de aportar la máxima información y que la predicción sea lo más fiable posible.

Otro aspecto de interés en la reproducción asistida de los mamíferos marinos es la puesta a punto de métodos que permitan la evaluación exhaustiva y objetiva de la calidad de los espermatozoides. Las técnicas de contrastación seminal resultan imprescindibles a la hora de valorar la calidad de una determinada muestra, para establecer el efecto que ejercen sobre ellas determinados factores, como pueden ser las variaciones de temperatura, los medios de dilución, o el efecto de la criopreservación. Su aplicación podría contribuir de manera significativa a mejorar la valoración de los protocolos de reproducción asistida e incluso el diagnóstico de alteraciones reproductivas.

En los últimos años, el desarrollo tecnológico ha posibilitado la mejora de sistemas como el análisis seminal computarizado, conocidos como sistemas CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) o ISAS (*Integrated Sperm Analysis System*) que permite evaluar muestras seminales con mayor exactitud y objetividad. Permiten además aportar nuevos parámetros en la evaluación seminal así como personalizar la evaluación para cada especie (Soler *et al.*, 2005). La especie en la que más se ha utilizado esta técnica es la especie humana, principalmente en los centros de fertilidad, donde se evalúa la calidad espermática antes de realizar la reproducción asistida, con la intención de establecer una correlación entre la calidad espermática (morfología y motilidad) con la fertilidad que permita predecir el comportamiento de una muestra. El interés en medicina veterinaria está orientado hacia la mejora en los sistemas de producción animal, pero también se aplica en centros de experimentación para determinar el efecto de diferentes fármacos y agentes medioambientales sobre la fertilidad (Verstegen *et al.*, 2002).

### **5.1. Valoración macroscópica del eyaculado**

La valoración macroscópica del eyaculado es el primer paso de la valoración seminal. Se procede a la determinación del volumen así como a la evaluación del aspecto, color y olor. El eyaculado ha de presentar un color blanquecino, lechoso o claro, en función de la concentración espermática, y un color *sui géneris*; la presencia de cualquier coloración diferente a ésta o de un olor anormal pueden ser debidos a la presencia de alteraciones patológicas del tracto genital como hemorragias (color rojizo), infecciones piógenas (tonalidad parda), o contaminación del material seminal en el momento de la eyaculación, generalmente con orina o con secreciones prepuciales (color amarillento y olor característico a orina). Posteriormente, se procede a la medición del pH y de la osmolaridad. Los valores fisiológicos del pH y osmolaridad en el eyaculado de delfín mular oscilan entre 7,4 y 7,6 y entre 339 y 351 mOsm/Kg respectivamente. Valores anómalos de pH y osmolaridad revelan alteraciones patológicas como las citadas anteriormente.

### **5.2. Valoración de la concentración**

La valoración de la concentración puede realizarse empleando distintos procedimientos. Los más empleados son sin duda las cámaras de recuento celular o hematocitómetros y en menor medida, pero cada vez con más frecuencia los sistemas

basados en el análisis de imagen, como los módulos de concentración de los sistemas CASA y ya con un uso muy reducido, limitado exclusivamente a la investigación debido al elevado coste de los aparatos, se encuentran los citómetros de flujo y los contadores electrónicos de partículas. Existen en el mercado numerosas cámaras de recuento celular, siendo las más usadas, la de Neubauer, de Bürker y de Makler.

### **5.3. Valoración de la motilidad espermática**

La motilidad espermática es uno de los parámetros más utilizados para definir la calidad del eyaculado y su idoneidad para ser utilizado en la inseminación artificial. La utilización de sistemas CASA aportan una mayor objetividad y repetitividad en los resultados (Farrell *et al.*, 1998).

En efecto, se ha demostrado que al realizar una evaluación subjetiva de la motilidad en el microscopio óptico, tanto en la especie humana como en otras especies de mamíferos, existen variaciones en las estimaciones que varían de un 30 a un 60% en los mismos eyaculados según los técnicos que la realicen (Coetzee *et al.*, 1999). Con este fin, el sistema CASA permite la valoración objetiva de los parámetros de motilidad (Dott y Foster, 1979). Las desventajas principales de este sistema son el coste del mismo así como la necesidad de estandarizar los diferentes parámetros para cada especie en estudio. Sin embargo, desde que se comenzó a utilizar, las publicaciones relacionadas con el uso de esta técnica han ido en aumento aunque, pese a su difusión en medicina humana y veterinaria, existen pocos estudios en mamíferos marinos. Recientemente se establecieron los parámetros relacionados con la motilidad e forma objetiva utilizando el sistema CASA en la beluga (*Delphinapterus leucas*) (Robeck *et al.*, 2010); igualmente se han realizado los primeros estudios de motilidad con este sistema en nuestro laboratorio sobre el delfín mular (Sánchez-Calabuig *et al.*, 2011).

### **5.4. Evaluación de la morfología espermática y de la integridad de la membrana acrosómica**

La evaluación de la morfología espermática es de suma importancia puesto que se trata de un parámetro relacionado directamente con la calidad seminal. Además, su uso permite diagnosticar patologías genitales así como alteraciones en la maduración epididimaria. Existen diferentes tipos de anomalías morfológicas: primarias, secundarias y terciarias. Las primarias son las que se producen por alteraciones durante el proceso de la espermiogénesis. Las secundarias son aquellas

que se producen a nivel del epidídimo; se suelen manifestar por alteraciones a nivel del flagelo. Las anomalías terciarias se deben a un manejo inadecuado de la muestra seminal en el laboratorio (González-Urdiales, 2010).

Existen varias técnicas para la evaluación morfológica de los espermatozoides. Entre los métodos tradicionales se encuentra la microscopía de contraste de fases, ampliamente utilizada debido a que permiten observar con nitidez la morfología espermática y además presenta la ventaja de la rapidez del proceso (Pintado Sanjuanbenito y Pérez Llano, 1992), tinción de Giemsa a partir de un frotis seminal (Watson, 1975). Entre las más recientes existen la tinción de Spermac<sup>®</sup>, que permite diferenciar los diferentes componentes del espermatozoide. Esta última técnica se ha empleado en la evaluación seminal del delfín mular con excelentes resultados (Robeck y O'Brien, 2004; O'Brien *et al.*, 2008). Asimismo, se pueden emplear previa tinción de las muestras sistemas informatizados de análisis morfométrico conocidos como ASMA (*Automated Semen Morphology Analysis*), aunque su uso está relegado sobre todo debido a los costes elevados, a la lentitud del proceso y a la necesidad y complejidad de poner a punto la técnica para cada una de las especies estudiadas (Verstegen *et al.*, 2002).

Con el fin de determinar el daño estructural del acrosoma se han desarrollado multitud de protocolos, destacan las técnicas de tinción que se clasifican en convencionales o fluorescentes. Las técnicas convencionales permiten detectar distintos grados de lesión en el espermatozoide y son sencillas y generalmente rápidas. Las más utilizadas son: Giemsa (Watson, 1975), eosina y nigrosina (Centola *et al.*, 1990), amarillo naftol S y eritrosina B (Steinholt *et al.*, 1991), amarillo naftol S y azul de anilina (Christensen *et al.*, 1994), Spermac<sup>®</sup> (Satoh *et al.*, 1989). Entre las técnicas fluorescentes destacan por su amplia difusión las lecitinas, las más importantes siendo la aglutinina de *Ricinus communis*, la aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) y la aglutinina de *Arachis hipogea* (PNA).

### **5.5. Evaluación de la viabilidad espermática (integridad estructural de la membrana)**

Las técnicas empleadas para la determinación de la viabilidad espermática que presentan mayor interés son las técnicas de tinción, que pueden ser en función del tipo de colorante empleado, convencionales o fluorescentes. En cuanto a las técnicas convencionales, comúnmente denominadas “vivos/muertos” se basan en el principio de que los espermatozoides que presentan una membrana plasmática intacta (vivos)

no captan el colorante al impedir su penetración los mecanismos de permeabilidad selectiva que ésta ejerce, mientras que las células con rotura en su membrana plasmática (muertas), no pueden evitar que el colorante se introduzca al no existir estos mecanismos, apareciendo por tanto, teñidas (Watson, 1990). Existen diversos colorantes para realizar este tipo de tinción, entre los que se encuentran la tinción de eosina y nigrosina y el Tripán Azul (Hancock, 1951), las sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e ioduro de propidio (IP) (Garner *et al.*, 1986; Harrison y Vickers, 1990) y la tinción de Hoechst 33258 (Pintado *et al.*, 2000). La utilización de técnicas fluorescentes para la evaluación del plasmalema proporciona mayor objetividad a este tipo de valoraciones. También se puede emplear la citometría de flujo tratando la muestra de espermatozoides con IP y SYBR-14 (Madrid-Bury, 2005).

### **5.6. Evaluación de la integridad funcional de la membrana**

Entre las diversas técnicas desarrolladas con este fin, destacan dos por su gran difusión: el Test de Endósmosis positiva y el Test de Resistencia Osmótica. Hay que tener en cuenta que la alteración de la membrana ya sea estructural o funcional supone la pérdida de la permeabilidad selectiva de la misma, impidiendo al espermatozoide mantener las concentraciones intracelulares de iones, solutos, enzimas y coenzimas, provocando la supresión del metabolismo energético, lo que conlleva la supresión de la motilidad y, posteriormente, de todas las funciones vitales (Woelders, 1990). De ahí que a las pruebas que evalúan la integridad de esta membrana se las denomine también de “vitalidad celular” o pruebas vitales.

El Test de Endósmosis Positiva, comúnmente conocido por sus siglas en inglés HOST (*Hypo Osmotic Swelling Test*) se basa en el principio de que los espermatozoides que se ven sometidos a un medio hiposmótico (<300 mOsm/Kg) reaccionan captando agua del medio extracelular hacia su interior, lo que provoca un hinchamiento de las células que provoca en el enrollamiento de los flagelos. Éste último signo indica que el transporte de agua a través de la membrana ocurre correctamente en el espermatozoide y que éste se caracteriza por una correcta integridad y actividad funcional normal de la membrana (Jeyendran *et al.*, 1984). El test de Resistencia Osmótica, más conocido como ORT (*Osmotic Resistance Test*) se basa en el sometimiento de los espermatozoides a un estrés hiposmótico, de forma similar al HOST, pero en este caso evaluando la integridad de la vesícula acrosómica. Para ello, se someten dos alícuotas de la misma muestra seminal a dos soluciones, una isosmótica (300 mOsm/Kg) y otra hiposmótica (50-150 mOsm/Kg) y a continuación se calcula el porcentaje de acrosomas morfológicamente normales.

### **5.7. Actividad mitocondrial**

La complejidad del proceso de fecundación requiere una función coordinada de las distintas organelas presentes en el espermatozoide. La motilidad constituye uno de los parámetros más importante del espermatozoide ya que permite su transporte al ovocito. Es, por lo tanto, el parámetro más comúnmente asociado a la calidad espermática. La motilidad puede medirse empleando un microscopio o mediante metodologías más objetivas como los sistemas CASA (Budworth *et al.*, 1988; Holt *et al.*, 1997; Hallap *et al.*, 2005).

El descubrimiento de una gran variedad de fluorocromos ha permitido un análisis más extenso de la calidad seminal desde un punto de vista bioquímico, ultraestructural y funcional. La citometría de flujo permite la observación desde un punto de vista físico, como el tamaño celular, la forma o la complejidad interna, así como cualquier componente o función del espermatozoide que puede ser detectado por un fluorocromo (Gillan *et al.*, 2005). Ofrece una evaluación más precisa de la calidad espermática frente a la viabilidad, la integridad del acrosoma y la integridad del ADN (Evenson *et al.*, 1982; Graham, 2001). Mientras que el análisis microscópico sólo permite el análisis de un número limitado de espermatozoides, 200 de media, el empleo del citómetro de flujo permite evaluar un gran número de espermatozoides en un corto periodo de tiempo, normalmente 10.000 espermatozoides analizados por muestra. Este hecho convierte al citómetro de flujo en una prueba con una alta sensibilidad para la detección de cambios sutiles que podrían no detectarse empleando otras técnicas (Gillan *et al.*, 2005).

El espermatozoide depende de la energía derivada del ATP producida en las mitocondrias para producir el movimiento flagelar. La evaluación de la función mitocondrial por medio de citometría de flujo supone una herramienta útil para evaluar de manera más objetiva la calidad espermática (Evenson *et al.*, 1982). Existen aproximadamente 100 mitocondrias en la pieza intermedia del espermatozoide. La mayoría de los fluorocromos destinados a visualizarlas funcionan penetrando en la célula y acumulándose en las mitocondrias (Nagy *et al.*, 2003).

Con el fin de detectar la actividad funcional de las mitocondrias, se han empleado dos fluorocromos: La rodamina 123 (R123) y el Mitotracker. Estos dos fluorocromos se transportan a mitocondrias activas y su acumulación en éstas provoca la fluorescencia verde. Se han comparado estas medidas con la motilidad en la especie bovina obteniendo una buena correlación con ambas técnicas (Garner *et al.*, 1997).

Nagy *et al* (2003) sugirieron una nueva sonda destinada a evaluar la actividad mitocondrial en el espermatozoide, el Mitotracker Deep Red (Molecular Probes). Esta sonda es un fluorocromo selectivo de las mitocondrias que difunde a través de la célula y contiene un grupo clorometil. Este último parece ser el responsable de mantener el fluorocromo asociado a las mitocondrias después de la fijación. Las células se incuban a concentraciones submicromolares de Mitotracker, que difunde de manera pasiva a través de la membrana plasmática y se acumula en las mitocondrias activas (Nagy *et al.*, 2003; Gregory, 2002).

## **5.8. Evaluación del daño en el ADN espermático**

### **5.8.1. Métodos para la detección de alteraciones en la condensación de la cromatina espermática**

Existen varios estudios que relacionan la capacidad fecundante del espermatozoide con la influencia de agentes ambientales o incluso el proceso de la congelación sobre el estado de la cromatina nuclear. En la actualidad, se emplean distintas técnicas para estudiar el estado de la cromatina. Entre ellas, se encuentran técnicas orientadas a valorar el grado de condensación y estabilidad de la cromatina espermática. El grado de condensación se evalúa mediante la incorporación de un agente intercalante como el IP. La estabilidad se evalúa valorando la condensación tras haber sometido a los espermatozoides a la acción de un agente quelante, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que retira los cationes y a un detergente como el dodecilsulfato sódico (SDS) que rompe las uniones inespecíficas, quedando, por tanto, sólo los puentes disulfuro (SDS) (Madrid-Bury *et al.*, 2005) Existe una relación inversa entre la fluorescencia y el grado de condensación y estabilidad a su vez relacionadas con la formación del pronúcleo masculino (Córdoba *et al.* 2002)

La aplicación de técnicas orientadas a valorar el estado del material genético resulta de difícil interpretación en el delfín mular ya que no existe información sobre el mecanismo de condensación de la cromatina nuclear del espermatozoide en esta especie. La presencia de histonas en el material genético del espermatozoide puede determinar el mecanismo y el grado de condensación de la cromatina, así como la posibilidad de experimentar modificaciones epigenéticas.

Además, existen técnicas que evalúan la presencia de proteínas asociadas a la cromatina o la naturaleza de las interacciones entre las protaminas, cuyos resultados están correlacionados con los índices de fragmentación y facilitan información sobre la etiología de la alteración. El grado de protaminación se evalúa utilizando la

cromomicina A3 (CMA3), fluorocromo que tiene afinidad por la guanina y la citosina y que compite con las protaminas por su unión al ADN. El daño en la cromatina está relacionado con fluorescencia elevada (Zubkova *et al.* 2005). Además, se puede evaluar el tipo de protaminas para lo que se emplean técnicas electroforéticas u otras técnicas de análisis de proteínas. Un aumento en el ratio P1/P2 está relacionado con la infertilidad, con alteraciones morfológicas y con alteraciones de la motilidad (Mengual *et al.* 2003). Para evaluar la naturaleza de los enlaces entre las protaminas se emplean distintas técnicas. La presencia de grupos tiol (SH) reactivos se puede detectar con monobromobimane (mBBr). Existe una relación directa entre la fluorescencia y el daño en la cromatina (Aleem *et al.* 2008).

Las técnicas de detección de histonas se practican de forma rutinaria en la especie humana en la que existe una gran proporción de espermatozoides inmaduros, que presentan histonas. Para identificarlos, se emplea azul de anilina que tiene afinidad por la lisina de las histonas (Hammadeh *et al.* 2001). En la especie humana, el valor de referencia se encuentra por encima del 70% de espermatozoides no teñidos, es decir una 30% de espermatozoides con presencia de histonas. Un porcentaje inferior se relaciona con cuadros de infertilidad (Dadoune *et al.*, 1988). Una técnica similar emplea el azul de toluidina, un colorante nuclear básico que genera reacciones metacromáticas que reacciona con la cromatina. EL azul de anilina se incorpora en cromatina rica en histonas presentando una coloración violeta azulada intensa mientras que al incorporarse en cromatina rica en protaminas presenta una coloración azul pálido. La presencia de histonas se correlaciona positivamente con la fragmentación del ADN (Erenpreisa *et al.* 2003). Se ha empleado esta técnica en especies animales como en la especie bovina (de Oliveira *et al.*, 2013). Sin embargo, en la mayoría de las especies animales, esta técnica se encuentra aún por explorar.

Por último, se pueden emplear técnicas basadas en la detección de marcadores de apoptosis, que informan de manera indirecta sobre el estado de la cromatina. Entre estos marcadores los más fiables son la externalización de fosfatidilserina y la presencia de Fas, ya que se encuentran en la membrana y son fáciles de detectar con anexina V y con anticuerpos frente a Fas, respectivamente. (Peña *et al.* 2003). Identificar y separar los espermatozoides portadores de alteraciones en la cromatina es uno de los retos de la biología reproductiva. La utilización de columnas preparativas u otros soportes que tengan ligados anexina V o anti-Fas podrían ser útiles para la selección de espermatozoides en técnicas de reproducción asistida.

La valoración del estado de la cromatina puede aportar información relevante en los casos de infertilidad idiopática. No existe un consenso claro sobre la técnica más adecuada. Uno de los retos actuales consiste en adecuar estas técnicas a las distintas especies de interés veterinario y establecer claramente los "límites" de la fertilidad.

### 5.8.2. Evaluación de la fragmentación en el ADN espermático

Pese a que los parámetros estudiados en un seminograma convencional constituyen una información esencial para la evaluación de la fertilidad, no permiten detectar la presencia de alteraciones sutiles en el espermatozoide que condicionan su funcionalidad.

Existen diferentes estrategias destinadas a detectar alteraciones en la fragmentación en el ADN espermático. La primera, incluye las metodologías basadas en la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos 3' del ADN que presenta una rotura en una de las cadenas (rotura de cadena sencilla) o en las dos (rotura de cadena doble). Dentro de este grupo, se incluye el uso de procesos enzimáticos para la incorporación *in situ* de nucleótidos marcados, tales como el ensayo TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling*) o el ensayo ISNT (*In Situ Nick Translation*). La segunda estrategia incluye aquellas técnicas para el estudio del ADN basadas en la susceptibilidad del DNA para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. En este grupo, se incluyen técnicas tales como el ensayo SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*), el ensayo DBD-FISH (*DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization*), el ensayo SCD (*Sperm Chromatin Dispersion Test*) o el ensayo Cometa (*Comet Assay*) (Singh *et al.* 1989, Gorczyca *et al.* 1993, Evenson *et al.* 1999, Córdova *et al.* 2002, Fernández *et al.* 2003). A continuación, se describe cada uno de los ensayos, y están resumidos en la *Tabla 1*.

#### a) *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA)

EL ensayo SCSA detecta la cromatina anormal ya que ésta presenta una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente (Evenson *et al.*, 1994). Se somete la muestra a un tratamiento ácido que permite determinar el grado de desnaturalización de la misma al medir el paso metacromático del fluorocromo naranja de acridina de fluorescencia verde a fluorescencia roja (Evenson *et al.*, 1980). Los espermatozoides con el ADN intacto mantienen así las dos cadenas de ADN mientras que los espermatozoides que presentan ADN fragmentado pasan a ser

cadena sencilla. El fluorocromo naranja de acridina se intercala entre las cadenas dobles como un monómero emitiendo fluorescencia verde. En el caso de ADN fragmentado, se liga a las cadenas sencillas como un agregado emitiendo fluorescencia roja (Van Duijn, 1954). El cociente de la fluorescencia roja y la fluorescencia roja más la verde permite calcular el índice de fragmentación de ADN (*Sperm Fragmentation Index*, SFI) de una muestra. Se trata de una técnica ampliamente utilizada en los laboratorios de andrología para la especie humana y se ha utilizado en varias especies animales como la bovina o porcina (Boe-Hansen *et al.*, 2005). El inconveniente principal que presenta esta técnica es el requerimiento de un citómetro de flujo, no disponible en muchos laboratorios ni en la mayoría de los parques zoológicos.

b) Ensayo *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling* (TUNEL)

El ensayo TUNEL detecta roturas de ADN de cadena sencilla y doble en una reacción enzimática catalizada por una transferasa terminal (Gorczyca *et al.*, 1993a; Gorczyca *et al.*, 1993b) que incorpora nucleótidos (dUTP) modificados al grupo hidroxilo libre del extremo 3'. La incorporación de nucleótidos es directamente proporcional al número de roturas que posea el ADN. Los nucleótidos incorporados pueden cuantificarse tanto mediante citometría de flujo como a través de microscopía de fluorescencia. Este ensayo es uno de los más utilizados para la evaluación de anomalías en el ADN. Sin embargo, su uso está restringido a la investigación ya que todavía no se ha desarrollado a nivel clínico debido principalmente a que requiere un equipo sofisticado y específico así como personal especializado.

c) Ensayo *In Situ Nick Translation* (ISNT)

El ensayo ISNT cuantifica la incorporación de nucleótidos (dUTPs) marcados en los extremos de las roturas de ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por una ADN polimerasa I. Este ensayo identifica espermatozoides con niveles variables de daño de ADN (Gorczyca *et al.*, 1993a; Manicardi *et al.*, 1995). La incorporación de dUTPs es directamente proporcional al número de roturas de ADN. Los resultados de este ensayo ponen de manifiesto la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide. La cuantificación de los nucleótidos incorporados se realiza mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.

d) Ensayo Cometa o *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)

El ensayo SCGE, también conocido como ensayo cometa, consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa, y proceder a su lisis con un agente reductor de los grupos sulfhidrilo. Finalmente, se procede a la electroforesis de la muestra. EL ADN al estar sometido a la acción de un campo eléctrico, se desplaza y genera una imagen en forma de cometa. Los espermatozoides con ADN íntegro no generan colas de cometa mientras que aquellos que poseen DNA dañado presentan un desplazamiento de los fragmentos de DNA produciendo así colas de cometa. Con el fin de cuantificar la fragmentación en el ADN de una muestra, se procede a la medida de la longitud y la densidad de la cola del cometa (Ostling y Johanson, 1984; Singh y Rao, 1988). El ensayo Cometa bajo condiciones neutras revela el daño en el ADN de doble cadena (Ds-DNAd), mientras que el ensayo Cometa bajo condiciones alcalinas permite la detección de daño de ADN de cadena sencilla (ss-DNAd). Ambas pruebas pueden llevarse a cabo simultáneamente en el mismo microgel de agarosa y este proceso (ensayo Cometa de dos colas o Cometa-2T) permite la identificación de daño de cadena sencilla y doble en el mismo espermatozoide. Tras la electroforesis, se procede a la tinción del microgel con sondas fluorescentes tipo DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol), IP o Sybr-Green. Este ensayo se utiliza de manera rutinaria en investigación, no siendo así en los laboratorios de andrología debido a la necesidad de material específico así como de personal con experiencia o bien un software específico para la evaluación objetiva de las muestras.

e) Ensayo *DNA Breakage Detection by Fluorescence in situ Hybridization* (DBD-FISH)

EL ensayo DBD-FISH se basa en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas de provocar una desnaturalización del DNA a partir de los extremos de roturas de doble cadena o de cadena sencilla. Después de la desnaturalización y extracción de las proteínas, el DNA generado de cadena sencilla, puede hibridarse con una sonda de DNA (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). La intensidad de la señal de hibridación es directamente proporcional al número de roturas presentes en el ADN (Fernández y Gosálvez, 2002). Esta técnica se limita al campo de la investigación como es el caso de las técnicas previamente citadas, TUNEL e ISNT.

f) *Sperm chromatin Dispersion Test* (SCDt)

El ensayo SCD consiste en someter a los espermatozoides a una desnaturalización ácida y a una posterior lisis de proteínas. Se estima el porcentaje de fragmentación nuclear valorando el tamaño de los halos de dispersión de la

cromatina, tanto en campo claro como empleando fluorescencia. Cuantificando los núcleos de cromatina dispersa y los núcleos condensados se puede estimar la fragmentación nuclear (Fernandez *et al.*, 2003; Enciso *et al.*, 2006b; Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). La puesta a punto de la detección de la fragmentación de ADN con la técnica SCD se ha visto aceptada de manera exponencial como una medida de predicción de la fertilidad masculina en especies de mamíferos incluyendo a la especie humana (García-Peiró *et al.*, 2011). Tiene la ventaja que puede evaluarse tanto con microscopía de fluorescencia como de campo claro.

De todas las metodologías descritas, la técnica de SCSA representa la técnica más utilizada en los últimos 30 años como modelo para medir la fragmentación del ADN espermático. En la actualidad, el ensayo SCD posee una buena correlación con la fragmentación espermática, una interpretación sencilla, es de fácil manejo y resulta útil en los laboratorios clínicos, ya que no es necesario un citómetro de flujo (Fernández *et al.*, 2005a). Como valor añadido a la técnica de SCSA, estudios realizados demuestran que la determinación de la frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado debería ser considerada como parte de un proceso dinámico y no estático. Este fenómeno compete a la especie humana así como a otras especies de mamíferos (Gosálvez *et al.*, 2008).

La *Tabla 1* resume las diferentes técnicas para la evaluación de la fragmentación del ADN espermático.

Tabla 1. Técnicas más comunes utilizadas para la evaluación de anomalías en el ADN espermático.

TÉCNICA	FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA	TIPO DE DAÑO DETECTADO O PARÁMETRO MEDIDO	MÉTODO COMÚN DE DETECCIÓN
<b>SCSA</b>	Susceptibilidad de los espermatozoides con cromatina dañada a la desnaturalización ácida.	Daño en la cromatina espermática El fluorocromo se intercala: -entre las dos cadenas de ADN emitiendo en verde al ser excitado (ADN intacto) -entre cadenas sencillas de ADN emitiendo en rojo/naranja al ser excitado (ADN dañado)	Citometría de flujo
<b>TUNEL</b>	Incorporación de nucleótidos marcados con un fluorocromo en los extremos 3'-OH libres	Presencia de roturas en el ADN de cadena sencilla y doble	Microscopio de fluorescencia Citometría de flujo
<b>ISNT</b>	Incorporación de nucleótidos (dUTPs) marcados en los extremos de las roturas de ADN en una reacción catalizada por una ADN polimerasa I.	Presencia de roturas en el ADN de cadena sencilla y doble	Microscopio de fluorescencia Citometría de flujo
<b>COMETA</b>	Inmovilización de los espermatozoides en un gel de agarosa. Se reducen los grupos sulfidrilos de las protaminas del ADN mediante agentes reductores. Migración del ADN fragmentado tras electroforesis.	Presencia de roturas en el ADN de cadena sencilla y/o doble	Microscopio de fluorescencia
<b>DBD-FISH</b>	Hibridación con una sonda de ADN marcado de las roturas generadas tras someter a los espermatozoides a una solución alcalina.	Presencia de roturas en el ADN espermático. Daño in situ en secuencias específicas de ADN	Microscopio de Fluorescencia
<b>SCD</b>	Evaluación de los halos de dispersión de la cromatina tras someter a los espermatozoides a una desnaturalización ácida.	Compactación y rotura en la cadena de ADN ➤ halos pequeños, densos y homogéneos ➤ Halos dispersos y punteados	Microscopio de Fluorescencia Microscopio de campo claro

## **5.9. FECUNDACIÓN HETEROLOGA**

### **5.9.1. Mecanismos implicados en la fecundación**

La capacidad fecundante de los espermatozoides se ha definido como la habilidad que tienen estas células para fecundar un ovocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto (Yanagimachi, 1994a). Sin embargo, tras esta sencilla definición hay un complejo proceso que incluye una serie de fases en las que el espermatozoide debe presentar las cualidades adecuadas para poder fecundar el ovocito tales como la unión con la ZP, el desencadenamiento de la reacción acrosómica, la penetración de la ZP, la unión con la membrana plasmática del ovocito y la fusión con dicha membrana (Yanagimachi, 1994b; Berger, 1996; Wassarman, 1999). Sin embargo, y a pesar de la importancia de estudios sobre la fecundación para la reproducción humana, producción animal y conservación de especies en peligro de extinción, las bases moleculares así como los mecanismos implicados en la interacción ovocito-espermatozoide todavía no se conocen por completo (Canovas, 2007).

La secuencia de los acontecimientos implicados en la fecundación se describe a continuación, así como en la *Figura 15*.

#### **a) Interacción espermatozoide-células del *cumulus oophorus* (*Figura 15; 1*)**

Una vez completada la capacitación el espermatozoide se dirige hacia la región de la ampulla del oviducto, donde se produce la fecundación. En este proceso, la sincronización es muy importante ya que el ovocito y los espermatozoides tienen que interactuar en la región de la ampulla en un momento determinado ya que el ovocito solo es fecundable durante un corto periodo de tiempo.

El ovocito, para acceder a la región del ampulla, depende de señales que se liberan en el momento del coito, tales como la oxitocina y la PGF2 $\alpha$  que provocan contracciones en el oviducto y de señales que libera el ovocito que regulan el movimiento de las células ciliadas del oviducto, como los estrógenos que favorecen el movimiento de los cilios en dirección caudal y la progesterona que induce el movimiento de los cilios en dirección craneal. Durante este proceso, los receptores y la zona pelúcida van experimentando una serie de modificaciones orientadas a adquirir especificidad y a evitar la polispermia (Coy *et al.*, 2008b).

Por otro lado el espermatozoide es atraído hacia el oviducto por un proceso de termotaxis y posteriormente hacia el ovocito por un proceso de quimiotaxis. El espermatozoide, primero, interacciona con las células del *cumulus oophorus* (COCs) que es una estructura que rodea los ovocitos de mamíferos y está formada por un conjunto de células y una matriz extracelular que une las células entre sí. Las células del *cumulus oophorus* actúan a modo del filtro selectivo ya que únicamente los espermatozoides hiperactivados, capacitados y que tienen el acrosoma íntegro, son capaces de atravesarlo. Esto sugiere que la penetración de las células del COCs se realiza gracias a los patrones de motilidad, tanto del flagelo como de la cabeza y a la acción enzimática.

Las células del COC están muy bien comunicadas entre sí y con el ovocito, mediante uniones GAP y existe un flujo muy activo de señales entre las células del *cumulus* y el ovocito. La matriz es rica en ácido hialurónico (Salustri *et al.*, 1992). El espermatozoide atraviesa esta primera barrera gracias a su motilidad, a la presencia de hialuronidasa procedente del acrosoma y a la presencia de las denominadas "enzimas secuestradas"; se trata de receptores generalmente dímeros formados por una proteína que interactúa con el ovocito y otra que presenta actividad hialuronidasa (Kim *et al.*, 2005). Por otra parte, el ácido hialurónico puede actuar sobre los espermatozoides aumentando su motilidad y sobre el CCO donde se induce la síntesis de quimioquinas que a su vez, actúan sobre el espermatozoide y facilitan la capacitación.

#### **b) Interacción espermatozoide-zona pelúcida (Figura 15; 2)**

La ZP constituye la primera barrera en la interacción del ovocito y el espermatozoide. Se trata de una matriz transparente extracelular que rodea al ovocito y al embrión temprano (Sinowatz *et al.*, 2001). La ZP de la mayoría de los mamíferos está compuesta de tres glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3, y en algunos casos, ZP4), productos de las familias de genes ZPA, ZPB y ZPC, altamente conservados entre las especies de mamíferos (Sinowatz *et al.*, 1995). Las principales funciones de estas glicoproteínas son la unión del espermatozoide, la protección del embrión hasta que se produce la implantación, la prevención de la polispermia así como el bloqueo de la fecundación heteroespecífica (Yanagimachi, 1994a; Wassarman y Litscher, 2001; Rath *et al.*, 2006; Canovas, 2007). La ZP cumple con una serie de funciones en la secuencia orquestada de interacciones entre los gametos masculino y femenino. (Yanagimachi, 1978; Bleil y Wassarman, 1980). Confiere receptores para uniones específicas de especie y está involucrada en la subsecuente reacción acrosómica (Florman y Storey, 1982; Berger *et al.*, 1989; Urch y Patel, 1991).

Los receptores ZP2 y ZP3 se encuentran unidos por ZP1 constituyendo una estructura tridimensional característica. Estas proteínas se encuentran muy glicosiladas, lo que sugiere que interactúan con gran especificidad. La interacción del espermatozoide con la ZP3 se denomina unión primaria, la unión entre el espermatozoide y la zona pelúcida requiere de entre 10.000 y 50.000 receptores ZP3.

Hasta la fecha se han identificado, la mayoría de los estudios han sido realizados en murino y en porcino, varios receptores en la membrana del espermatozoide que están implicados en la unión primaria: Sp 56, Sp 38, RSA/Sp 38, zonadhesina, espermadhesinas, galactosiltransferasa, PH 26, PH 20. El hecho de que existan tantas moléculas implicadas en el proceso de adhesión podría representar, o bien un mecanismo de seguridad que garantiza que la unión primaria se produzca, o bien un mecanismo que garantiza la especificidad de la interacción.

La unión primaria entre el espermatozoide y la ZP3 desencadena la reacción acrosómica. Este proceso puede estar modulado por señales que emite el CCOs como la progesterona, el factor de crecimiento epidérmico o la secretagogina que inducen la reacción acrosómica; o bien, mediante la producción de inhibidores serina proteasas que inhiben el proceso. La reacción acrosómica se encuentra mediada por una compleja interacción de señales celulares en las que se activan la proteína quinasa A, la proteína quinasa C y tirosina quinasas que regulan la fosforilación de distintas proteínas (Figura 15; 2). Además, la activación de estas rutas provoca la activación de canales iónicos, generando un aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  así como la liberación del calcio almacenado en depósitos intracelulares tales como el retículo endoplásmico liso. El  $Ca^{2+}$  desestabiliza las membranas, induce la síntesis de proteínas fusogénicas SNAREs con lo que facilita la fusión de la membrana externa y la interna del acrosoma (Breitbart *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2002a; Canovas, 2007). Además, como consecuencia de la entrada de protones aumenta el pH que provoca que se activan algunas enzimas como la acrosina que se encontraba inactiva, en forma de proacrosina, y desempeña un papel importante en la digestión de la ZP; por último y como consecuencia de la rotura del acrosoma, se liberan más de veinte enzimas acrosómicas y queda expuesto el *perforatorium* del espermatozoide así como la cara interna del acrosoma que presenta receptores implicados en la unión secundaria (unión con el receptor ZP2) y en la unión con la membrana plasmática del ovocito (Miller *et al.*, 2002a).

**c) Interacción espermatozoide-membrana plasmática (Figura 15; 3)**

Una vez penetrada la zona pelúcida, los espermatozoides, entran en el espacio perivitelino y se fusionan con la membrana plasmática. Cuando el espermatozoide accede al espacio perivitelino se produce la “reacción de la cola”. La cola del espermatozoide deja de moverse y aumenta la rigidez del flagelo. Se trata de un proceso muy poco estudiado, pero posiblemente esté orientado a disminuir la motilidad de la cabeza y facilitar la interacción con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994b).

La interacción se produce entre las proteínas situadas en la membrana plasmática del ovocito integrinas, CD9, GPI y Juno que interaccionan con proteínas situadas en el espermatozoide como la fertilina e Izumo (Bianchi *et al.*, 2014). Se produce la fusión y se forma una estructura “fagosoma”, híbrido formado por la membrana interna del acrosoma y la membrana plasmática del ovocito (Williams, 2002; Canovas, 2007).

**d) Interacción con el citoplasma del ovocito (Figura 15; 4, 5, 6)**

El siguiente componente es el citoplasma del ovocito donde, tras la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática, se desencadena la activación del ovocito (Yanagimachi, 1994b). Esta activación provoca la reanudación de la meiosis y la formación de los pronúcleos masculino y femenino (Ben-Yosef y Shalgi, 2001). Se han propuesto dos modelos en cuanto a la activación del ovocito: activación mediada por receptor y activación mediada por factor espermático. La activación mediada por el receptor incluye la activación de la proteína quinasa A, la proteína quinasa C y las tirosina quinasas. Sin embargo, la activación mediada por un factor espermático es el más aceptado actualmente; al fusionarse los dos gametos, se libera el factor activador del ovocito que reside en el segmento ecuatorial del acrosoma y es capaz de producir un aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ . Se han identificado varios factores como la oscilina que es un factor similar al inositol tri fosfato, tr-kit y la fosfolipasa C $\zeta$  (Williams, 2002; Canovas, 2007).

La activación del ovocito comprende procesos inmediatos y tardíos. Los procesos inmediatos incluyen un aumento transitorio en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  que desencadenan: el restablecimiento de la meiosis, que provoca la inactivación del factor citostático (CSF) y la exocitosis de los gránulos corticales que liberan el

contenido enzimático ZP proteasas en el espacio perivitelino. Se altera la conformación de los receptores ZP en un proceso que se conoce con el nombre de reacción cortical y es el responsable en gran medida del bloqueo de la polispermia.

Los procesos tardíos de la activación incluyen: la liberación del segundo corpúsculo polar, la descondensación de la cromatina nuclear del espermatozoide, el reclutamiento del RNA materno, la formación de los pronúcleos, el inicio de la síntesis de ADN y la división.

Cuando penetra el espermatozoide en el citoplasma, se produce la separación entre la cola y la cabeza. Prácticamente al mismo tiempo, se van a producir una serie de cambios, como son: la destrucción de las mitocondrias del espermatozoide, la desintegración de su membrana nuclear y descondensación del material genético, orientados a formar el pronúcleo masculino.

El primero de estos cambios consiste en la destrucción de las mitocondrias mediante ubiquitinización. Las mitocondrias del espermatozoide ya han cumplido su función y, además, arrastran muchas alteraciones, al haber sido sometidas a los efectos de los radicales libres y productos del metabolismo del oxígeno, por lo que, desde el punto de vista evolutivo, no interesa que esta información sea transmitida a la descendencia. Toda información genética mitocondrial heredada procede de las mitocondrias del ovocito ((Yanagimachi, 1994b; Terada *et al.*, 2000).

La formación del pronúcleo masculino comprende: la desintegración de la membrana nuclear del espermatozoide, la reducción de los puentes disulfuro entre las protaminas y la sustitución de las protaminas por histonas.

Un proceso clave en la formación del pronúcleo es la reducción de los puentes disulfuro. Este proceso se encuentra mediado por el glutatión (GSH), agente reductor presente en el ovocito maduro. Por lo general, el material genético del macho dispone de aproximadamente media hora para descondensarse. Un retraso en este proceso que se puede producir, si las interacciones no se encuentran mediadas por puentes disulfuro o si el contenido en glutatión es bajo, provocando un retraso en la singamia, un retraso en el desarrollo embrionario así como una desincronía entre el desarrollo del embrión y su desplazamiento en el oviducto. El embrión no recibe señales acordes con su grado de desarrollo, desincronía que conduce a la muerte embrionaria precoz.

Una vez que el material genético se ha descondensado, se intercambian las protaminas por histonas. En este proceso juega un papel muy importante la nucléoplasmina, una chaperona que facilita la interacción entre las protaminas y las histonas enmascarando sus cargas.

Posteriormente se forman en el citoplasma los pronúcleos masculino y femenino mediante la formación de envolturas nucleares alrededor de ambos

pronúcleos. La formación de los pronúcleos conlleva cambios en la composición de laminina que provoca cambios en la composición de la membrana nuclear. Los dos pronúcleos se desplazan hacia el centro del ovocito y se rompen sus membranas (singamia) y se ordenan en el uso mitótico dando comienzo al proceso de la mitosis.

De este modo, gracias a la unión del material genético de dos células haploides, el embrión vuelve a ser una célula diploide. En este proceso, el espermatozoide no solo aporta el material genético nuclear, sino que también aporta un centrosoma (excepto en la especie murina donde los centrosomas son de origen materno) y material genético exógeno, generalmente ARN (micro ARN), procedente del tracto genital de la hembra, que en interior del ovocito se une al material genético y puede regular o interferir e incluso silenciar la expresión de algunos genes. La aportación del espermatozoide es clave en este proceso y contribuye a evitar la partenogénesis.

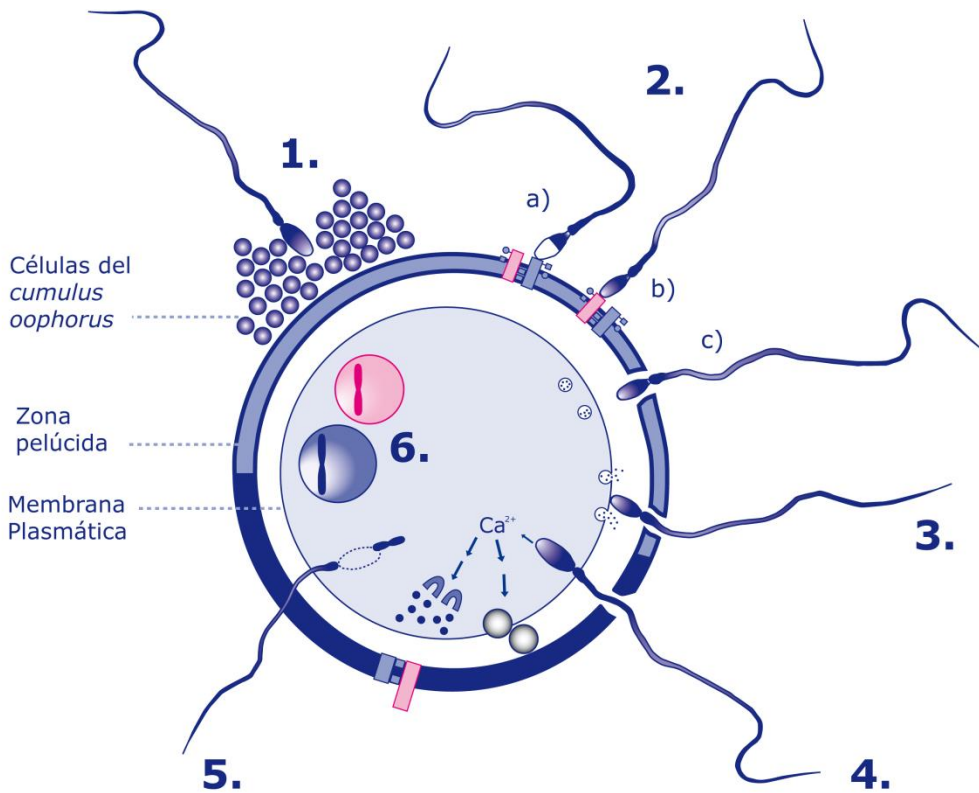


Figura 15. Diagrama de los seis pasos necesarios para una fecundación exitosa. El paso 1 implica la penetración del espermatozoide de células del *cumulus oophorus*. El paso 2 requiere el reconocimiento de la zona pelúcida, depende de las cuatro proteínas ZP (ZP 1, 2, 3, 4), así como de los oligosacáridos. (a) unión espermatozoide-ZP3, (b) reacción acrosómica e unión espermatozoide- ZP2, (c) el espermatozoide adquiere la competencia para penetrar la zona pelúcida. El paso 3 corresponde a los eventos de fusión espermatozoide/ovocito cuando (a) el espermatozoide se une a la membrana plasmática a través de interacciones con microvellosidades y proteínas de membrana y, posteriormente, forman un poro de fusión. El paso 4 abarca los procesos de activación del ovocito, donde una cascada de señalización conduce a la reacción cortical y al bloqueo de la polispermia mediante la modificación de ZP2 y ZP3, así como la finalización de la segunda meiosis y la extrusión del segundo cuerpo polar. El paso 5 incluye los procesos requeridos para que el espermatozoide libere el contenido nuclear. El paso 6 completa el proceso de la fecundación a través de la formación pronuclear y su migración a medida que se preparan para singamia. Modificado de Swain y Pool, 2008.

### 5.9.2. Antecedentes de fecundación heteróloga

La puesta a punto del potencial de fertilidad es esencial previo a la realización de la inseminación artificial. Muchos estudios se han basado en la relación de los diferentes parámetros espermáticos y fertilidad *in vivo*. Obviamente, no existe una prueba que permita evaluar de forma conjunta todas estas propiedades. Sin embargo, el análisis secuencial de los principales eventos críticos en la fecundación puede ser de gran utilidad a nivel clínico para la predicción de la capacidad fecundante (Oehninger *et al.*, 2000). Los bioensayos de interacción de gametos han sido ampliamente referenciados, ya que estudian el comportamiento de los espermatozoides frente a las barreras que deben superar en condiciones fisiológicas durante el proceso de fecundación: capacidad de penetración del espermatozoide a través del moco cervical, interacción espermatozoide-ZP, interacción espermatozoide-membrana citoplasmática, inducción de la reacción acrosómica, capacidad de activación del ovocito y descondensación espermática tras realización de inyección intra citoplasmática (ICSI), La fecundación *in vitro* constituye el método más adecuado para evaluar la fertilidad, puesto que esta técnica evalúa la interacción entre el espermatozoide y el ovocito a diferentes niveles (Cánovas Bernabé, 2007).

En efecto, la fecundación *in vitro* (FIV) homóloga se ha utilizado para predecir la fertilidad del espermatozoide en especies domésticas (Zhang *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 2005). Este sistema permite estudiar todas las fases implicadas en el proceso de fecundación, y permite predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides. De forma alternativa, el uso de la FIV heteróloga permite, no sólo aportar información valiosa sobre la capacidad fecundante de muestras de esperma en especies salvajes o en peligro de extinción, sino que tiene la ventaja añadida de no requerir el uso de ovocitos homólogos de gran valor biológico. No hace falta decir que existen barreras interespecíficas y que intervienen en diferentes etapas de la reproducción. Sin embargo, en algunas especies como la yegua y el burro, es posible solventarlas ya que da lugar a un animal híbrido viable, la mula, aunque estéril (Cánovas, 2007).

Se admite que la ZP es la principal barrera entre el espermatozoide y el ovocito, y aunque no es totalmente específica de especie, presenta grandes restricciones (Moller *et al.*, 1990; Yanagimachi, 1994b; Hoodbhoy *et al.*, 2005), aunque las secreciones oviductales también se han visto implicadas en el establecimiento de la especificidad de especie (Wang *et al.*, 1998). Una de las pruebas de que la ZP actúa

como barrera, es que cuando ésta se elimina, los ovocitos pueden ser penetrados por espermatozoides de numerosas especies heterólogas (Yanagimachi *et al.*, 1976; Zhao *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha puesto en evidencia la formación pronuclear masculina en ovocitos de ratón (Wakayama *et al.*, 1997), hámster (Yanagida *et al.*, 1991) y cerdo (Kim *et al.*, 1999) tras de la microinyección de espermatozoides de especies heterólogas. Sin embargo, también se ha observado que espermatozoides de rata no son capaces de formar pronúcleos masculinos en ovocitos libres de ZP de cerdo, hámster o conejo (Hanada y Chang, 1976; Zhao *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que existe diferente capacidad del espermatozoide según la especie para provocar la activación del ovocito (Canovas, 2007).

La FIV heteróloga se puede realizar en ovocitos con o sin zona pelúcida dependiendo del tipo de experimento que se quiera llevar a cabo. Una alternativa es emplear ovocitos de animales de laboratorio, como el hámster, ya que éste puede ser penetrado por espermatozoides de distintas especies (Hanada y Chang, 1972; Yanagimachi *et al.*, 1976; Bousquet y Brackett, 1982; Berger *et al.*, 1989). Mecanismos específicos relacionados con el ovocito de hámster podrían explicar la capacidad de éstos para fusionarse con espermatozoides de numerosas especies (Cánovas, 2007).

A pesar de las indudables ventajas del empleo de estas especies para la fecundación heteróloga, el uso de roedores presenta algunos inconvenientes para el estudio de la funcionalidad del esperma de especies de mamíferos, entre ellas la humana. En efecto, el centrosoma de la mayoría de los mamíferos es introducido por el espermatozoide mientras que en los roedores es de origen materno (Schatten *et al.*, 1991; Simerly *et al.*, 1995; Schatten y Sun, 2009). Además, la dificultad que conlleva realizar ensayos con este tipo de animales incluye la necesidad de mantenerlos en condiciones específicas en el laboratorio y precisa el control del ciclo estral seguido por el sacrificio de los animales para recuperar los ovocitos. Otra alternativa es obtener los ovocitos de especies domésticas en el matadero (Comizzoli *et al.*, 2001). Se pueden emplear especies como la bovina o porcina en las que el centrosoma es cedido por el espermatozoide (Szollosi y Hunter, 1973; Navara *et al.*, 1994) y que ofrecen la gran disponibilidad de gametos femeninos en el matadero.

### 5.9.3. Estudios de la interacción ovocito-espermatozoide

#### a) Unión del espermatozoide a la zona pelúcida

La unión entre el espermatozoide y el ovocito, tanto en ensayos de fecundación homóloga como heteróloga, conlleva reconocimiento entre los receptores del espermatozoide en la zona pelúcida del ovocito y las proteínas de unión del espermatozoide. Se ha documentado la importancia de las glicoproteínas de la zona pelúcida en el primer contacto con el espermatozoide, la unión del espermatozoide a ésta y, finalmente, su penetración (Töpfer-Petersen y Cechová, 1990; Töpfer-Petersen y Calvete, 1995; Sinowatz *et al.*, 1998). Para ello, se expone la zona pelúcida a espermatozoides capacitados y se evalúa el número de espermatozoides totales unidos a la ZP.

Se han realizado numerosos ensayos que únicamente estudian la unión de espermatozoides a la ZP del ovocito, ya que se ha demostrado que esta unión está directamente relacionada con la fertilidad (Fazeli *et al.*, 1995; Meyers *et al.*, 1996). Este tipo de estudios permite determinar la capacidad del espermatozoide para detectar el ovocito, unirse a la ZP y provocar la reacción acrosómica (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). Para este tipo de ensayos, se han utilizado ovocitos y espermatozoides de distintas especies. Algunos ejemplos incluyen espermatozoides porcinos y equinos interaccionando con ovocitos bovinos (Sinowatz *et al.*, 2003) y porcinos (Meyers *et al.*, 1995), y espermatozoides de equino con ovocitos de especie humana (Liu *et al.*, 1991).

Por ejemplo, en un estudio, se observó que espermatozoides de verraco y de equino se unen de manera específica a la ZP de bovino. Esto demuestra que existe un sistema ligando receptor entre los espermatozoides de verraco y equino y la zona pelúcida de bovino, mediante al menos las primeras señales de reconocimiento entre ambos. Además, en este estudio, se induce la reacción acrosómica y en el caso del espermatozoide equino atraviesa la ZP de bovino (Sinowatz *et al.*, 2003). En otro estudio, se observó que los espermatozoides de especie humana son capaces de unirse de manera estable a ovocitos de porcino e inducir la RA, aunque no son capaces de atravesar la ZP (Canovas *et al.*, 2007).

b) Interacción entre el espermatozoide y el ovocito de hámster libre de zona pelúcida.

Yanagimachi en el año 1972 fue el primero en poner a punto el test de penetración espermática empleando para ello ovocitos de hámster libres de ZP (Yanagimachi, 1972). Este tipo de ensayo permite evaluar la inducción de la capacitación espermática y la reacción acrosómica, la unión a la membrana plasmática del ovocito así como la descondensación nuclear para la formación del pronúcleo. En efecto, los espermatozoides de mamífero requieren un periodo de incubación en el tracto reproductor femenino para adquirir la capacidad de fecundar el ovocito. Durante el proceso, el espermatozoide sufre el proceso de capacitación (Austin, 1951; 1952). Asimismo, Yanagimachi puso a punto la técnica de interacción de especies heterólogas en la especie humana (Yanagimachi *et al.*, 1976) y ha sido ampliamente utilizada *a posteriori* para la evaluación espermática en esta especie (Rogers, 1985) debido a las implicaciones éticas que supone la utilización de ovocitos humanos en las FIV homólogas. Del mismo modo, se han puesto a punto en un importante número de especies: roedores (Hanada y Chang, 1976), porcino (Imai *et al.*, 1977), conejo (Hanada y Chang, 1978), porcino (Imai *et al.*, 1980; Berger y Horton, 1988), vacuno (Brackett *et al.*, 1982), equino (Padilla *et al.*, 1991), caprino (Berger *et al.*, 1994), ovino (Choudhry *et al.*, 1995) y felinos (Andrews *et al.*, 1992). En el caso del delfín, Yanagimachi realizó con éxito el test de hámster en esta especie (Fleming *et al.*, 1981).

c) Estudio de interacción entre el espermatozoide y el ovocito con la zona pelúcida intacta

A pesar de que el ensayo de FIV empleando ovocitos libres de ZP evalúa una parte importante de los procesos implicados en la fecundación, esta prueba no valora fases fundamentales del proceso de penetración del ovocito como son el reconocimiento, la unión y la penetración de la ZP. Esta última barrera parece ser la más difícil de atravesar, y por ello, Conde y Berger sugieren que el espermatozoide que logre atravesarla será, muy probablemente, fértil (Codde y Berger, 1995). Por tanto, parece lógico pensar que con la utilización de un test de penetración de ovocitos homólogos, y en el caso de no ser posible tener acceso a ovocitos homólogos, con la utilización de un test de penetración con ovocitos heterólogos con ZP intacta, se obtendrían unos resultados más ajustados a la realidad, ya que permitiría el estudio de todas las fases del proceso de fecundación.

Este tipo de experimentos permitió determinar que la FIV heteróloga utilizando ovocitos con la ZP intacta de bovino es un buen procedimiento para

predecir la fertilidad de muestras seminales descongeladas de distintas especies (O'Brien y Roth, 2000; García-Alvarez *et al.*, 2009). Los cruces entre distintas especies de granja han tenido éxito, utilizando espermatozoides criopreservados de ciervo y de otras especies de rumiantes (McHugh y Rutledge, 1998; Soler *et al.*, 2008). Recientemente, la función espermática se ha evaluado en varios antílopes africanos en peligro de extinción a través de un sistema de fecundación *in vitro* heteróloga con ovocitos de bovino con ZP intacta (Kouba *et al.*, 2001). En efecto, a raíz de realizar este tipo de experimentos, se pone en duda la especificidad de especie de la ZP (Lynham y Harrison, 1998).



**CAPÍTULO I. Efecto del empleo de un diluyente de origen vegetal en la crioconservación espermática y nuevos métodos de valoración de la calidad espermática en el delfín mular (*Tursiops truncatus*)**



## 1. INTRODUCCIÓN

La Reproducción asistida así como la formación de Bancos de conservación de Recursos Zoogenéticos (BRZ) ha sido ampliamente desarrollada recientemente en diferentes especies de mamíferos marinos en cautividad como el delfín mular (*Tursiops truncatus*), el delfín del Pacífico de lados blancos (*Lagenorhynchus obliquidens*), la orca (*Orcinus Orca*) o la beluga (*Delphinapterus leucas*) (Robeck y O'Brien, 2004; Robeck *et al.*, 2004; Robeck *et al.*, 2005; O'Brien y Robeck, 2006; Robeck y Monfort, 2006; O'Brien *et al.*, 2009; Robeck *et al.*, 2010). Esta inquietud por la conservación de recursos zoogenéticos en estas especies se justifica por el rápido incremento de la vulnerabilidad de las mismas al proceso de extinción (Rockström *et al.*, 2009).

Pese a que el delfín mular se reproduce prácticamente con la misma eficacia en libertad que en cautividad (Wells, 2000), la consanguinidad en estas últimas poblaciones ha aumentado de manera alarmante (Duffield *et al.*, 2000). A este proceso han contribuido diferentes factores. En primer lugar, los parques zoológicos tratan de mimetizar las condiciones naturales del delfín como su estructura social, por lo que se suele incluir un solo macho reproductor por grupo. Por otra parte, el transporte de machos entre instalaciones, con el fin de incrementar la variabilidad genética implica, además de unos costes económicos importantes, un gran estrés y riesgos para la salud del animal (St. Aubinand y Dierauf, 2001). Por ello, los parques zoológicos se muestran reticentes a realizar traslados con finalidades reproductivas en cautividad (Connor *et al.*, 2010). Como consecuencia, el intercambio genético ha sido mínimo entre las diferentes instalaciones. Además, hay que tener en cuenta, que la introducción de nuevos ejemplares crea problemas de adaptación y aceptación dentro de la estructura social del grupo (Connor *et al.*, 2010). Debido a estos procesos, al menos la mitad de la variabilidad genética de la población fundadora se ha perdido (Keller, 1986; Duffield *et al.*, 2000). La creación de un banco de germoplasma de esta especie constituye una solución acertada para favorecer el intercambio genético y el subsiguiente incremento en la variabilidad genética (Notter y Foose, 1985; Wildt, 1992; Wildt *et al.*, 1997; Holt *et al.*, 2003; Holt y Lloyd, 2009).

En estudios previos, se han descrito metodologías eficaces tanto para el almacenamiento a largo plazo de espermatozoides como para la inseminación artificial con semen criopreservado en el delfín mular (Robeck y O'Brien, 2004; Robeck *et al.*, 2005). Sin embargo, los diluyentes empleados para tal efecto estaban constituidos a

base de proteínas animales como las presentes en la yema de huevo o en la leche. La utilización de proteínas vegetales como sustitutas de las animales resulta de gran interés, ya que evita el riesgo de transmisión de patógenos como la *Salmonella Enteritidis* (Pérez-Garnelo *et al.*, 2006). Este tipo de diluyentes, libres de componentes de origen animal, representa un seguro sanitario en el caso de transporte de germoplasma entre poblaciones a nivel mundial contribuyendo así a la diversidad genética de esta especie (Thundathil *et al.*, 2002).

El diluyente vegetal (LP1<sup>®</sup>) utilizado en este estudio está constituido a base de proteínas de soja. Para su elaboración, se emplean vesículas unilamelares de lípidos de baja densidad mediante la homogenización a altas presiones (HPH) (Palasz *et al.*, 2003; Pérez-Garnelo *et al.*, 2006; Szczesniak-Fabianczyk *et al.*, 2008; Tamargo *et al.*, 2008). Al tratarse de vesículas de reducido tamaño (45-80 nm), aumenta la relación volumen/superficie y además presenta la ventaja de poseer un elevado contenido en fosfolípidos y colesterol, entre ellos la fosfatidil colina (PCH) que tiene la capacidad de aumentar la fluidez de la membrana espermática y su resistencia al choque de frío (Parks y Lynch, 1992). Este diluyente se ha utilizado en diferentes especies, como el toro o el bisonte europeo (*Bison bonasus*) (Palasz *et al.*, 2003; Pérez-Garnelo *et al.*, 2006; Szczesniak-Fabianczyk *et al.*, 2008; Tamargo *et al.*, 2008).

Para la valoración de la eficacia en la congelación espermática de un diluyente es imprescindible evaluar la calidad espermática post-descongelación mediante análisis exhaustivos de parámetros seminales directamente relacionados con la fertilidad. A pesar de que la valoración real más exacta es, sin duda, la tasa de gestación post-inseminación, es muy complicado realizar este tipo de ensayos en especies salvajes. Con el fin de medir la calidad seminal en la actualidad, se están realizando nuevos análisis complementarios, cuyo objetivo es la obtención de resultados sin la intervención de parámetros subjetivos. La motilidad espermática es uno de los parámetros más utilizados para definir la calidad de un eyaculado, ya que se trata de un parámetro relacionado directamente con la fertilidad (Barth y Oko, 1989). La utilización de sistemas CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), como por ejemplo el sistema ISAS (*Integrated Semen Analysis System*) aportan mayor objetividad y repetitividad en los resultados y permite, además, aportar nuevos parámetros en la evaluación seminal así como personalizar la evaluación para cada especie (Farrell *et al.*, 1995). Actualmente, estos sistemas se utilizan de manera rutinaria en la especie humana, en los centros de fertilidad. Asimismo, se utilizan en veterinaria, fundamentalmente en especies de producción como la bovina, ovina o porcina. La utilización de este sistema en veterinaria se ha desarrollado sobre todo en

centros de experimentación para determinar el efecto de diferentes agentes sobre la fertilidad (Verstegen *et al.*, 2002), y se aplica cada vez más en centros de investigación de reproducción de especies salvajes (Hussain *et al.*, 2011; Jenkins *et al.*, 2011; de Paz *et al.*, 2012).

Otra herramienta útil para la evaluación de la calidad espermática es la evaluación de la función mitocondrial por medio de citometría de flujo (Evenson *et al.*, 1982), ya que el espermatozoide depende de la energía derivada del ATP producido en las mitocondrias para producir el movimiento flagelar. El uso del fluorocromo Mitotracker Deep Red 633 (M-22426), previamente utilizado por Nagy (Nagy *et al.*, 2003; Hallap *et al.*, 2005) es una herramienta adecuada para la evaluación de la función mitocondrial. Se trata de una técnica de evaluación espermática muy potente desde el punto de vista de la velocidad, la precisión y la posibilidad de combinar diferentes fluorocromos en el caso de ensayos multiparamétricos (Hallap *et al.*, 2005).

Los objetivos de este trabajo, son: poner a punto un método eficaz de congelación, evaluar la eficacia de un diluyente libre de proteínas animales frente a dos diluyentes a base de yema de huevo (*Experimento 1 y 2*) y poner a punto técnicas de valoración seminal objetivas en el delfín mular (*Experimento 1 y 3*).

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

Los protocolos de colecta seminal se realizaron en el departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y de acuerdo a la Ley de Bienestar Animal para el cuidado de los Mamíferos Marinos (Universidad de Queensland, departamento de bienestar animal SAFS/133/11) y revisado por el Comité de Bienestar Animal del Zoo Aquarium de Madrid. Todos los animales se entrenaron previamente para la colecta seminal por los entrenadores del Zoo Aquarium de Madrid (España) y de Sea World Gold Coast (Australia).

### **2.1. Animales**

Las muestras seminales se obtuvieron de 5 delfines adultos, sexualmente maduros. El primero se alojaba en el Zoo Aquarium de Madrid (DM1) y los cuatro restantes en Sea World Gold Coast (DM2, DM3, DM4 y DM5).

Las condiciones de alojamiento de DM1 consistían en una piscina al aire libre de 2.000 m<sup>3</sup> de agua salada artificial y dos pequeñas piscinas cubiertas. Su alimentación se basaba en una dieta de capelins descongelados (*Mallotus villosus*), espadines (*Sprattus sprattus*) y arenque (*Clupea harengus*), la cantidad diaria correspondía a un 5% de su peso corporal. Los delfines DM2 a DM5 se alojaban en varias piscinas naturales de agua salada y rotaban en los tres sistemas principales: piscina *Endeavour/Nursery*, *Dolphin Cove* y la laguna *Dolphin Bay*. El complejo *Endeavour* tenía un volumen total de 21.213.750 litros con 5 piscinas comunicadas entre sí. El complejo *Dolphin Bay* tenía un volumen de 9.244.575 litros con 5 piscinas comunicadas entre sí. Finalmente, el complejo *Dolphin Cove* constaba de un total de 4 piscinas de 20.000.000 litros. Los machos tenían acceso a las diferentes piscinas varias veces al día. Su dieta se basaba en mújol (*Mugil cephalus*), seriola (*Seriola quinqueradiata*), salmón (*Oncorhynchus keta*), atún (*Euthynnus affinis*), paparda del Pacífico (*Cololabis saira*), calamares (*Architeuthis dux*), pescadilla del Pacífico (*Merluccius Productus*), sardinas (*Sardina pilchardus*), lucio (*Esox lucius*) y biddies (*Acaena novae-zelyica*). La cantidad diaria ingerida correspondía, como en el caso de DM1, al 5% del peso corporal. El DM1 se incluyó en los *Experimentos 1* y *3*, y los delfines DM2, DM3, DM4 y DM5 en los *Experimentos 2* y *3*.

## 2.2. Diseño experimental

El diseño experimental del *Experimento 1* está descrito en la *Figura 16*. Las muestras se obtuvieron de un macho de delfín mular (DM1) alojado en el Zoo Aquarium de Madrid (n=14). Se puso a punto un protocolo de congelación adecuado comparando dos diluyentes y dos concentraciones de crioprotector y se llevó a cabo un estudio previo de las curvas de congelación. Los diluyentes utilizados fueron: un diluyente libre de proteínas animales (LP1<sup>®</sup>, composición recogida en el *Anexo I*), y un diluyente a base de yema de huevo con un tampón TRIS (EYB, composición recogida en el *Anexo II*). Se compararon dos concentraciones finales de glicerol, 3% y 6%. Las colectas seminales se realizaron en las instalaciones del zoológico donde se evaluó el color, el volumen y la motilidad subjetiva de las muestras. El resto de parámetros seminales se evaluaron en el laboratorio. La muestra se dividió en 4 alícuotas y se realizó una primera dilución donde cada alícuota fue diluida (1:1) con uno de los diluyentes que se detallan a continuación: LP1<sup>®</sup> con 1,5 % de glicerol, LP1<sup>®</sup> con 3% glicerol, EYB con 1,5% de glicerol y EYB con 3% de glicerol. Una vez diluidas, las alícuotas se transportaron al laboratorio a una temperatura de 4°C. Tras una hora y media de refrigeración, se evaluaron de nuevo los parámetros seminales (Refrigeración 1). Posteriormente se realizó una segunda dilución (cada alícuota con su diluyente correspondiente). Las concentraciones de glicerol del diluyente se ajustaron para obtener una concentración final del 3% o 6% así como una concentración espermática de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Tras 10 min de equilibrado, se evaluaron de nuevo los parámetros seminales (Refrigeración 2). Una vez finalizada la segunda evaluación, las muestras se empaquetaron en pajuelas de 0,25 mL y se congelaron en vapores de nitrógeno. Las muestras congeladas se almacenaron para su posterior descongelación y análisis.

El *Experimento 2* se diseñó en base a los resultados obtenidos en el *Experimento 1* y se describe gráficamente en la *Figura 17*. Las muestras se obtuvieron de cuatro machos de delfín mular (DM2, DM3, DM4 y DM5) alojados en Sea World Gold Coast (Australia). Se obtuvieron entre 3 y 4 eyaculados por animal. En este experimento, se comparó la eficacia del diluyente LP1<sup>®</sup> frente a un diluyente a base de yema de huevo con un tampón TES-TRIS (EYB-TT, composición recogida en el *Anexo III*) ambos con una concentración final de crioprotector de 3%. La evaluación seminal y la congelación de las muestras se realizaron en las instalaciones de Sea World. Tras la colecta se evaluaron el color, el volumen, la concentración y los parámetros seminales. Una vez evaluada, la muestra fue dividida en 2 alícuotas y se realizó una primera dilución (1:1) con cada uno de los siguientes diluyentes: LP1<sup>®</sup> con 1,5% glicerol y EYB-

TT con 1,5% de glicerol. Una vez realizada la dilución, y el atemperamiento a temperatura ambiente, las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4°C. Tras una hora y media de refrigeración, se hizo una segunda dilución con el diluyente correspondiente. Las concentraciones de glicerol del diluyente se ajustaron para obtener una concentración final del 3% en ambos diluyentes así como una concentración espermática de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Tras 10 min de equilibrado, se evaluaron de nuevo los parámetros seminales y posteriormente las muestras se empajuelaron en pajuelas de 0,25 mL y congelaron en vapores de nitrógeno. Una vez congeladas, se almacenaron para su posterior descongelación y análisis.

El diseño experimental del *Experimento 3* está descrito en la *Figura 18*. Para el desarrollo del Experimento, se utilizaron muestras seminales de cuatro machos de delfín mular (DM1, DM3, DM4 y DM5) alojados en el Zoo de Madrid (DM1) y en Sea World Gold Coast, (DM3, DM4 y DM5). En este experimento se evaluó la actividad mitocondrial de los espermatozoides tras la descongelación por medio de citometría de flujo empleando el fluorocromo Mitotracker Deep Red. El protocolo de criopreservación aplicado fue el mismo que en el *Experimento 2*. Se analizaron dos réplicas de cada eyaculado y de 2 a 3 eyaculados por macho.

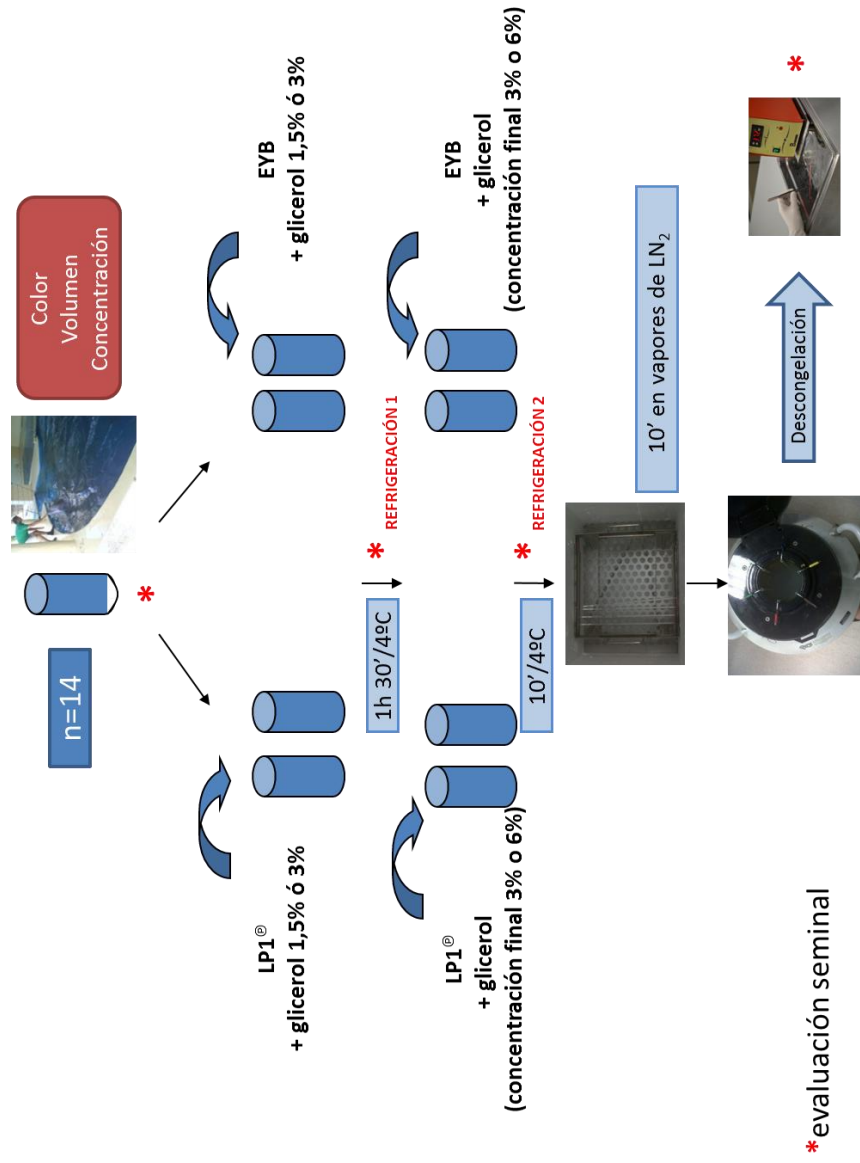


Figura 16. Diseño experimental del Experimento 1 del Capítulo I

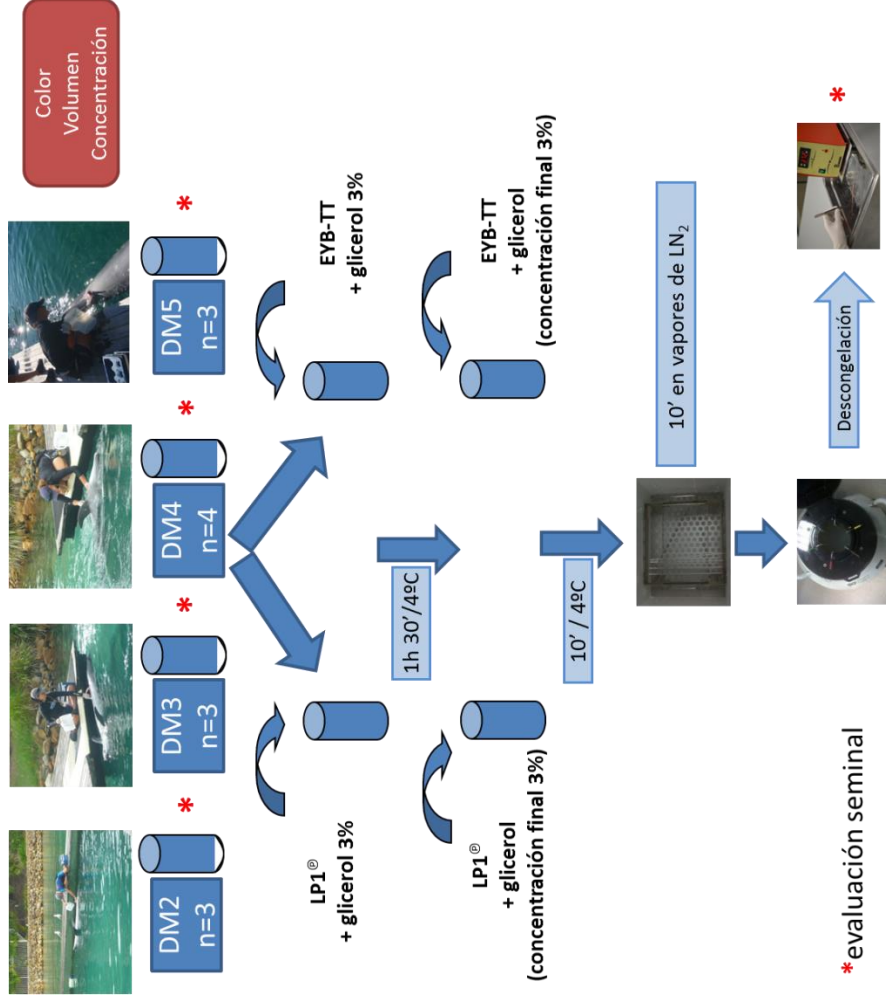


Figura 17. Diseño experimental del Experimento 2 del Capítulo I..

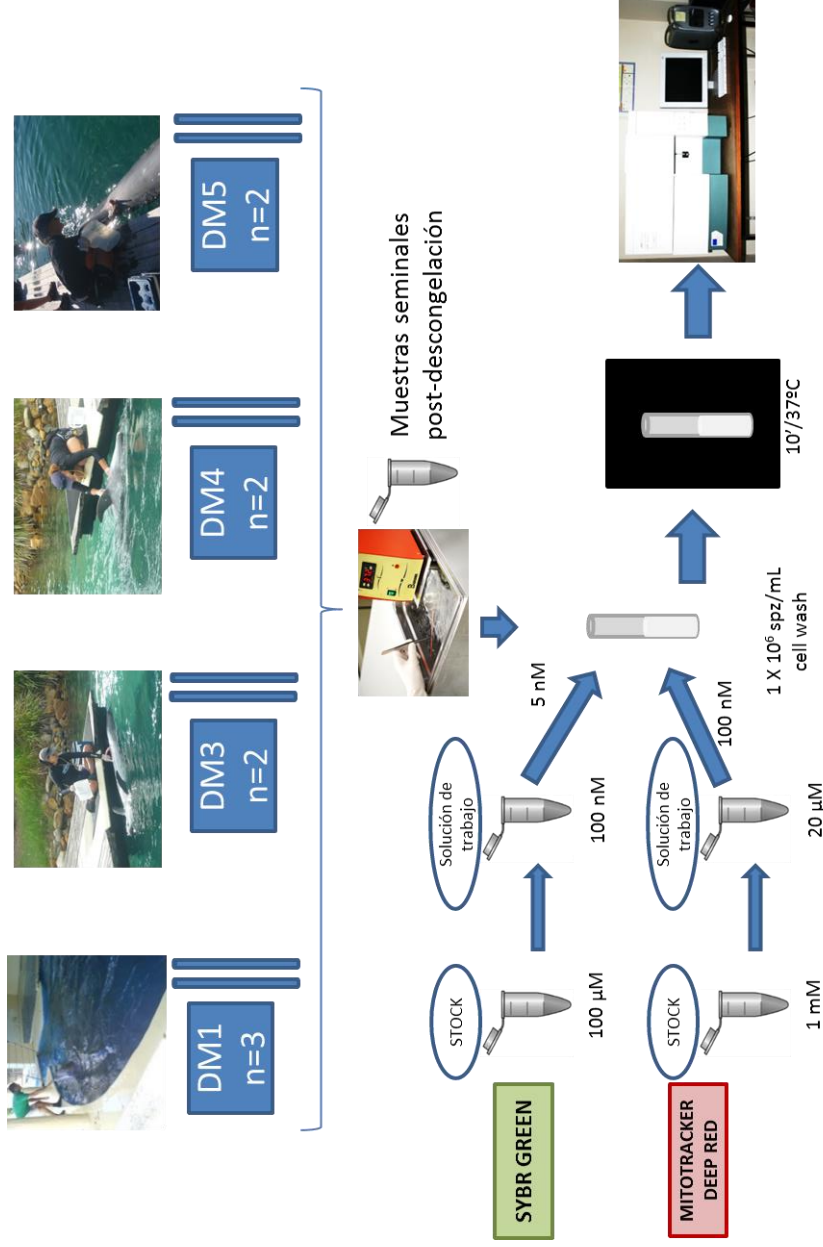


Figura 18. Diseño experimental del Experimento 3 del Capítulo I.

Todos los reactivos utilizados en este estudio se adquirieron en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) a menos que se indique lo contrario.

### **2.3. Colecta de las muestras seminales**

Los delfines se entrenaron para la colecta voluntaria de semen como se ha descrito anteriormente por otros autores (Keller, 1986; Robeck y O'Brien, 2004) con algunas modificaciones. Brevemente, se realizaron estimulaciones táctiles en la zona anterior al orificio genital con el fin de producir una erección del pene y la consecuente extrusión del mismo. A continuación, el entrenador realizó una breve estimulación manual durante unos segundos. Finalmente, la colecta del eyaculado se realizó en un recipiente estéril de polipropileno. Se colectaron de 1 a 4 eyaculados por delfín, en eyaculados sucesivos y en diferentes días.

### **2.4. Evaluación de las características seminales**

La evaluación de las características seminales se realizó inmediatamente tras la colecta, la refrigeración y la descongelación.

#### **2.4.1. Evaluación macroscópica**

Las muestras seminales se evaluaron tras la colecta en la piscina, donde se valoró el color, el volumen y la motilidad subjetiva de la muestra. La evaluación de parámetros de calidad seminal se realizó en el laboratorio siguiendo el protocolo de análisis descrito por Robeck (Robeck y O'Brien, 2004). Se determinó la concentración espermática utilizando la cámara de recuento Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel), el pH (MicropH 2000, Crison Instruments, Barcelona, Spain) y la osmolaridad [(Advanced micro osmometer, modelo 3300, Norwood, MA (*Experimento 1*) y Advanced Instruments Inc., Modelo 3320, Norwood, MA (*Experimento 2*)].

#### **2.4.2. Evaluación microscópica**

Se utilizó un microscopio de contraste de fases para la evaluación de las muestras (Nikon Eclipse E400, Nikon Corporation, Tokio, Japón). Con el fin de evitar valoraciones sesgadas, se realizaron ensayos ciegos para cada método de congelación.

#### 2.4.2.1. Evaluación de la motilidad espermática

Sólo se utilizaron para los experimentos aquellas muestras seminales cuya motilidad progresiva era igual o superior al 50%.

En el *Experimento 1*, los parámetros de motilidad de la muestra se evaluaron primero en las instalaciones de Zoo Aquarium de Madrid de forma subjetiva y, después, en el laboratorio de forma objetiva utilizando el programa informático ISAS (Projectes y Serveis R+D S.L., Valencia, España) tras una puesta a punto previa para esta especie que consistió en el ajuste de los parámetros del programa de acuerdo a las características del espermatozoide de delfín mular (parámetros recogidos en el *Anexo IV*). Para la correcta captación del movimiento espermático, se tomó una alícuota 10  $\mu$ L de muestra que fue diluida con medio de fecundación *in vitro* (FIV, composición recogida en el *Anexo V*) atemperado a 37°C, hasta una concentración final de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL para la correcta captación del movimiento.

Una vez realizada la primera dilución, se añadieron 10  $\mu$ L de la muestra a un portaobjetos, ambos previamente atemperados a 37°C y se colocó suavemente un cubreobjetos igualmente atemperado. Se seleccionaron 7 campos para cada una de las muestras de manera aleatoria con el fin de calcular los siguientes parámetros de motilidad: motilidad total (MT; %), motilidad progresiva (MP; %), velocidad rápida (VR; %), velocidad media (VAP;  $\mu$ m/s), velocidad rectilínea (VSL;  $\mu$ m/s), velocidad curvilínea (VCL;  $\mu$ m/s), rectitud del movimiento del espermatozoide (STR (%)=VSL/VAP), linealidad de la trayectoria curvilínea (LIN= VSL/VCL), oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio (WOB=VAP/VCL), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza con respecto a su trayectoria promedio (ALH;  $\mu$ m) y frecuencia de cruces o promedio de la frecuencia (en el tiempo) con la que la trayectoria curvilínea del espermatozoide cruza la trayectoria promedio (BCF; Hz). Se muestra un ejemplo de la visualización de los espermatozoides de delfín mular en el sistema ISAS en la *Figura 19*. Los espermatozoides con una STR superior al 85% se consideraron mótils progresivos. Las trayectorias de los espermatozoides con una motilidad superior a 35mm/s se visualizaron en color rojo y correspondían a espermatozoides “rápidos”. Las trayectorias con una motilidad comprendida entre 10 mm/s y 35mm/s se visualizaron en color verde y correspondían a espermatozoides “medios”. Las trayectorias con una motilidad inferior a 10mm/s se visualizan en color azul y correspondían a espermatozoides “lentos”. Finalmente, los espermatozoides estáticos se visualizaron en color amarillo.

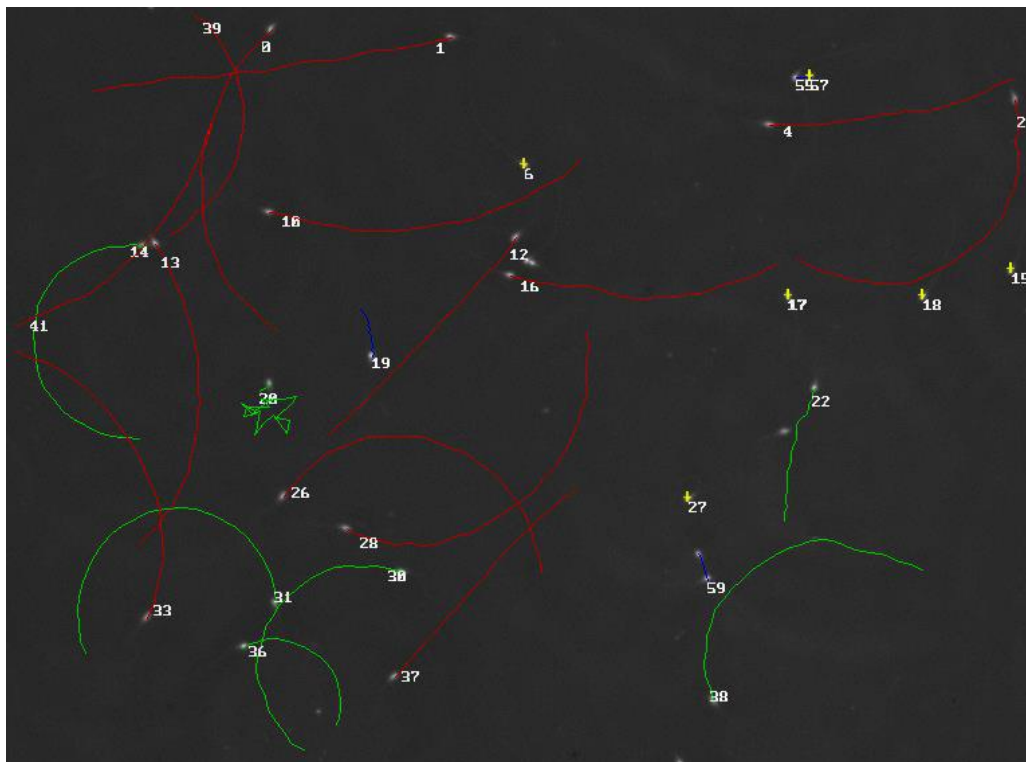


Figura 19. Trayectorias de espermatozoides descongelados y previamente congelados con diluyente LP1<sup>®</sup> de DM1 visualizados con el sistema ISAS. Rojo: espermatozoides “rápidos”, verde: espermatozoides “medios”, azul: espermatozoides “lentos” y amarillo: espermatozoides estáticos (Objetivo 100X).

En el *Experimento 2*, la motilidad se evaluó de manera subjetiva. Brevemente, se depositaron 10  $\mu$ l de muestra seminal inmediatamente después de la colecta y tras la descongelación, en un portaobjetos previamente atemperado a 37°C, y se colocó suavemente un cubreobjetos igualmente atemperado. Se evaluó la motilidad total y progresiva en un total de 200 espermatozoides por muestra.

#### 2.4.2.2. Valoración de la morfología espermática y de la integridad del acrosoma.

La evaluación de la integridad del acrosoma así como de las morfoanomalías se realizó mediante una extensión de la muestra en un portaobjetos que se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, la extensión se fijó con formol neutro y se procedió a su tinción (Spermac; Minitube of America, Verona, USA). Los acrosomas se clasificaron en normales y anormales, valorando 200 espermatozoides

por muestra, bajo microscopio con un objetivo de 1000X. Los acrosomas se clasificaron como anormales cuando se observó una pérdida total o parcial de la membrana, o cuando presentaban irregularidades intrínsecas (Chan *et al.*, 1996). En cuanto a la morfología, se evaluaron alteraciones en la cabeza, pieza intermedia y flagelo, valorando 200 espermatozoides por muestra bajo microscopio con un objetivo de 1000X tal y como ha sido descrito anteriormente en el delfín mular (Robeck y O'Brien, 2004).

#### **2.4.2.3. Valoración de la integridad de membrana**

La integridad de membrana se evaluó mediante el test de endósmosis. Se realizó una dilución 1:10 de esperma en una solución hiposmótica de citrato sódico a 100 mOsm/Kg (Correa y Zavos, 1994). Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min y se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2%. Los espermatozoides se evaluaron en el microscopio de contraste de fases a 400X. Se evaluaron 200 espermatozoides para cada muestra seminal bajo microscopio con un objetivo de 400X. Se consideraron como positivos al test de endósmosis aquellos que mostraron una torsión helicoidal del flagelo.

#### **2.4.2.4. Valoración de la viabilidad espermática**

Para la evaluación de la viabilidad, se emplearon dos técnicas: la tinción con eosina-nigrosina y la tinción con los fluorocromos SYBR-14 e IP. Para la primera de las técnicas, se añadieron 10 µL de muestra seminal a una solución de 40 µL de eosina-nigrosina previamente atemperada en un portaobjetos. Se dejó actuar 30 segundos y, a continuación, se realizó la extensión. Se evaluaron 200 espermatozoides utilizando el microscopio óptico a 1000X. Los espermatozoides no viables se mostraron con la cabeza parcial o totalmente teñida mientras que los espermatozoides viables no se mostraron teñidos.

Para la segunda técnica, se trató la suspensión de espermatozoides con SYBR 14 (SY) e IP (Live/Dead Sperm Viability Kit, L-7011, Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA). Para el marcaje de los espermatozoides con SBR14 e IP, la muestra se diluyó en Hepes-buffer (10mM HEPES, 0,85% NaCl, 10% BSA, pH= 7,4). A continuación, se diluyó el SY 1:50 en Hepes-buffer y se añadieron 5µL/mL de muestra. La solución se incubó 10 min a 36°C y se añadieron 5 µL de IP. Finalmente, la fluorescencia verde y roja se valoró con la ayuda de un citómetro de flujo (FACscan, Becton Dickinson, S.A, CA, USA). Al excitarse por un láser de 488 nm, los espermatozoides viables emitieron

luz a 516 nm y los no viables a 617 nm Se generaron dos poblaciones: la población 1 correspondía a espermatozoides dañados, no viables, teñidos IP/SY positivas (IP+/SY+) y la población 2 correspondía a espermatozoides viables ya que son IP negativas/SY positivas (IP-/SY+). La lectura realizada por el citómetro de flujo indicó el porcentaje de viabilidad de cada población con lo que se determinó el porcentaje de viabilidad de cada muestra seminal.

Se realizó un experimento previo empleando cinco pajuelas descongeladas de cinco eyaculados diferentes de DM1 con el fin de comparar las dos técnicas de valoración de la viabilidad espermática y establecer una correlación entre las mismas en el momento de la descongelación. Todas las muestras de este trabajo se evaluaron mediante la tinción eosina-nigrosina para la evaluación de la viabilidad.

### **2.4.2.5. Análisis de la actividad mitocondrial**

El análisis de la actividad mitocondrial se realizó mediante la utilización de fluorocromos y citometría de flujo. El protocolo utilizado fue el siguiente:

Se emplearon los siguientes reactivos: kit de viabilidad de los espermatozoides SYBR-14 de LIVE/DEAD Sperm viability kit (L-7011, Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA) y Mitotracker Deep Red, (M-22426, Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA), dimetil sulfóxido (DMSO; Fluka, 41640) y una solución tampón (340242 CycleTEST Plus buffer solution, Becton Dickinson, San Jose, USA).

Se preparó una solución de trabajo de 100 nM en una solución tampón (*Buffer Solution*: DMSO en tampón citrato-sacarosa) a partir de una solución Stock de 100  $\mu$ M de SYBR-14 en DMSO media hora antes de la preparación de las muestras. Del mismo modo, se preparó una solución de trabajo de 20 nM de Mitotracker Deep Red en *Cell Wash* a partir de una solución madre de 1mM Mitotracker Deep Red en DMSO, seguido por la preparación de una solución de 20  $\mu$ M de trabajo en solución tampón justo antes de la preparación de muestras.

El protocolo de tinción fue el siguiente. Las muestras espermáticas se diluyeron en solución tampón a una concentración final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL en tubos Falcon de 5 mL (Sterilin Ltd, Newport, United Kingdom). Se añadieron a cada tubo 5 nM de la solución de trabajo de SYBR-14 y 100 nM de la solución de trabajo Mitotracker Deep Red. Se realizó la mezcla suavemente y se incubó a 38°C en la oscuridad durante 10 min. Antes de realizar el análisis, la muestra se homogenizó de nuevo.

Las mediciones se realizaron utilizando un citómetro de flujo Facscalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.). El IP se excitó a 488 nm y la fluorescencia del IP se detectó a 605 nm, utilizando un filtro de paso de banda 600/40. Para cada muestra, se evaluaron un total de 10.000 células por minuto. Los datos se analizaron utilizando el software Cell Quest de Becton Dickinson. Se expresó la intensidad de fluorescencia como unidades de intensidad de fluorescencia media (UMIF), relacionados con la captación de IP por el ADN. La fluorescencia del SYBR 14 (células con membrana plasmática intacta) se detectó en un detector FL1 (530/28 nm), mientras que Mitotracker Deep Red se detectó en un detector FL3 (661/16 BP). Los valores de dispersión frontal y lateral se registraron en una escala lineal, mientras que los valores fluorescentes se registraron en una escala logarítmica. Las adquisiciones se realizaron utilizando el software Cell Quest 3.1 (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.). Se empleó la citometría de flujo a un caudal bajo de 6-24  $\mu\text{L}/\text{min}$  y se registraron 10.000 acontecimientos para cada muestra.

## **2.5. Protocolo de congelación**

Se realizó previamente una curva de congelación con ambos diluyentes utilizando para ello 5 eyaculados diferentes de DM1. Las muestras se diluyeron en dos pasos con los diluyentes elegidos previamente. Cada muestra seminal se dividió en 4 alícuotas y se realizó una primera dilución. Cada alícuota fue diluida (1:1) con uno de los diluyentes descritos a continuación: LP1<sup>®</sup> con 1,5 % de glicerol, LP1<sup>®</sup> con 3% glicerol, EYB con 1,5% de glicerol y EYB con 3% de glicerol. Una vez realizada la primera dilución las muestras se dejaron a temperatura ambiente, hasta alcanzar los 20-22°C. Posteriormente, se procedió a la refrigeración de las muestras a 4°C durante hora y media con un descenso de la temperatura de -0,27°C/min. A continuación, se tomó una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  con el fin de analizar los parámetros de motilidad así como la viabilidad y la integridad del acrosoma (Refrigeración 1) y se añadió a cada alícuota el diluyente correspondiente (mantenido a 4°C). Las concentraciones de glicerol del diluyente se ajustaron para obtener una concentración final del 3 o 6% así como una concentración espermática de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Se realizó un nuevo equilibrado de 10 min y se tomó de nuevo una muestra de 30  $\mu\text{L}$  para la evaluación de los parámetros anteriormente mencionados (parámetros de motilidad, integridad del acrosoma y viabilidad: Refrigeración 2). Las muestras se envasaron empleando pajuelas de 0,25 mL (mini Straw, Minitüb, Germany) que fueron selladas posteriormente. Finalmente, las pajuelas se colocaron en vapores de nitrógeno a una distancia de 4,5 cm sobre el nivel de nitrógeno durante 10 min. Transcurrido este

tiempo, las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido y almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido hasta su descongelación y posterior análisis.

Las temperaturas de enfriamiento de las muestras en cada diluyente se obtuvieron mediante la introducción de un termopar RS216-249 (Marlin Corp., USA) conectado a un termómetro digital (T206TC, Digitron, England) con un rango de 400°C a -250°C, que fue introducido en el interior de los continentes de cada diluyente, promediando los datos luego de 10 réplicas de descenso de la temperatura.

### 2.6. Protocolo de descongelación

La descongelación de las muestras se llevó a cabo mediante la inmersión, durante 50 segundos de las pajuelas en un baño maría ajustado a 38°C (Robeck y O'Brien, 2004). Para la evaluación del estado del acrosoma, la viabilidad y la motilidad, se emplearon las técnicas que se han descrito anteriormente.

### 2.7. Análisis estadístico

En el *Experimento 1*, los datos de cada parámetro de la motilidad espermática se analizaron utilizando un análisis de varianza bi-factorial ANOVA y las medias se compararon por medio del test de Duncan.

Los datos de la viabilidad y la integridad del acrosoma se analizaron con un análisis de varianza ANOVA unifactorial y las medias se compararon por medio del test de Duncan. La comparación de las dos técnicas de evaluación de viabilidad se realizó mediante una correlación de Pearson. Los datos de las curvas de congelación se analizaron con un análisis de varianza ANOVA unifactorial. El nivel de significación se estableció en  $P < 0,05$ .

En el *Experimento 2*, con el fin de analizar las diferencias en parámetros de calidad seminal entre eyaculados diferentes se utilizó un análisis de varianza factorial con el siguiente modelo estadístico:

$$x_{ij} = \mu + A_i + a_j + Aa_{ij} + \epsilon_{ij}$$

$x_{ij}$  = medida analizada (parámetros de calidad seminal)

$\mu$  = media general

$A_i$  = efecto del eyaculado ( $i = 1...4$ )

$a_j$  = efecto animal ( $j = 1...5$ )

$A_{ij}$  = interacción

$\epsilon_{ij}$  = residuo.

El efecto eyaculado se consideró como efecto fijo y el animal se consideró un efecto aleatorio.

Un modelo similar se utilizó para el análisis de las diferencias entre diluyentes:

$$x_{ij} = \mu + B_i + a_j + B_{ij} + \epsilon_{ij}$$

$B_i$  = el efecto del diluyente ( $i = 1...2$ )

$a_j$  = el efecto animal ( $j = 1...6$ )

$B_{ij}$  = la interacción

$\epsilon_{ij}$  = el residuo.

El efecto diluyente se consideró como efecto fijo y el animal se consideró un efecto aleatorio.

Las diferencias significativas entre eyaculados y entre diluyentes se estimaron por medio de la prueba múltiple de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación se estableció en  $P < 0,05$ .

En el *Experimento 3*, se determinó la zona de eventos del SYBR-14 (FL1/FL2) alrededor del grupo SYBR-14-positiva y estos eventos se clasificaron como espermatozoides. Asimismo, se determinó la zona de eventos de SYBR-14/Mitotracker Deep Red alrededor de la zona de eventos Mitotracker Deep Red positiva. El análisis descriptivo se realizó a través Microsoft Excel 2010. Los resultados se analizaron estadísticamente incluyendo 12 observaciones de cuatro delfines y de dos a cuatro eyaculados por delfín. Se realizó una prueba de correlación de Pearson con el fin de establecer correlaciones simples entre los parámetros de calidad medidos. El nivel de significación se estableció en  $P < 0,05$ .

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v.17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) en colaboración con el servicio de Estadística de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Experimento 1:

##### 3.1.1. Características seminales del semen fresco tras la colecta

Las características seminales de DM1 (n=14) tras la colecta fueron las siguientes: Volumen (mL):  $13,46 \pm 10,64$ ; pH:  $7,88 \pm 0,57$ ; osmolaridad (mOsm/Kg):  $388,2 \pm 42,99$ ; concentración (espermatozoides $\times 10^6$ /mL):  $696,41 \pm 380,17$ ; viabilidad (%):  $90,5 \pm 4,85$ ; MT (%):  $85,55 \pm 6,7$ ; MP (%):  $62,0 \pm 13,63$ ; VAP ( $\mu\text{m/s}$ ):  $82,77 \pm 19,27$ ; VSL ( $\mu\text{m/s}$ )  $91,98 \pm 20,63$ ; ALH ( $\mu\text{m}$ ):  $2,1 \pm 0,47$ ; BCF (Hz)  $8,13 \pm 0,6$ ; STR (%):  $76,13 \pm 11,6$ ; LIN (%):  $64,01 \pm 14,13$ ; morfología normal (%):  $84,4 \pm 3,26$ ; anormalidad del flagelo (%):  $3,5 \pm 1,6$ ; anormalidad de la pieza intermedia (%):  $5,8 \pm 2,1$ ; anormalidad de la cabeza (%):  $1,17 \pm 1,19$  e integridad del acrosoma (%):  $88,88 \pm 1,03$ . La *Figura 20* muestra espermatozoides de delfín mular teñidos con Spermac para la evaluación de la morfología y la integridad del acrosoma espermático. La *Figura 21* refleja la viabilidad de una muestra seminal en fresco estimada por citometría de flujo empleando los fluorocromos Sybr-14 e IP.



*Figura 20.* Espermatozoides de delfín mular (DM1) fijados y teñidos con la tinción Spermac bajo microscopio de contraste de fases (X1000). En este caso los cuatro espermatozoides poseen un acrosoma intacto (teñido de verde azulado).

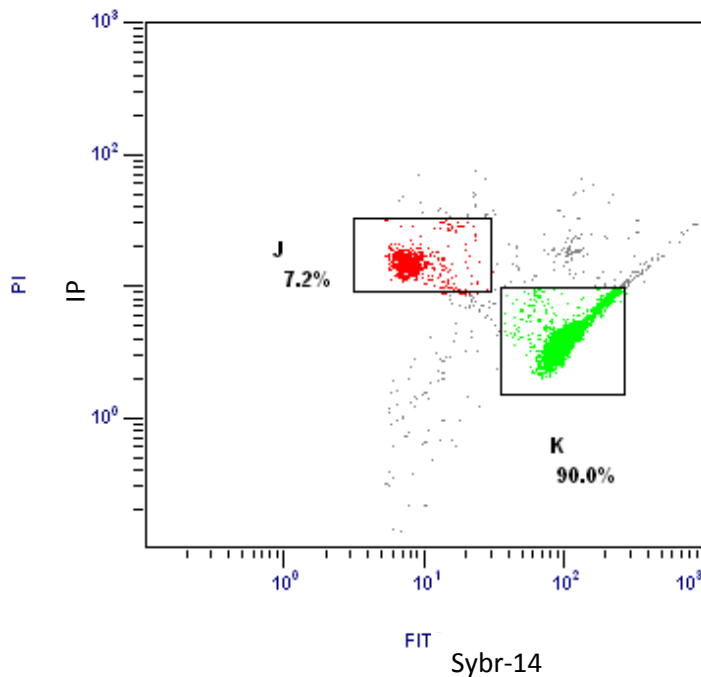


Figura 21. Citometría de flujo de espermatozoides de delfín mular después de la colecta seminal teñidos con IP y Sybr-14. La población J (en rojo) corresponde a espermatozoides dañados, no viables, positivos a IP y a Syber-14 (SY) (teñidos IP+ SY+), la población K (en verde) corresponde a espermatozoides viables, negativos a IP y positivos a Syber-14 (IP- SY+).

### 3.1.2. Puesta a punto del método de congelación y comparación de los diluyentes

#### 3.1.2.1. Curva de congelación

La curva de descenso de temperatura para la congelación de esperma de delfín mular se basó en un estudio previo (Robeck y O'Brien, 2004) y está representada en la Figura 22, con una ampliación de escala en el primer minuto.

Una vez introducidas las muestras en los vapores de nitrógeno líquido se produce una meseta en el primer minuto durante el cual las muestras en EYB descienden su temperatura hasta los -6°C en los 20 primeros segundos, al cabo de los cuales se comienza a producir el cambio de estado y a eliminar el calor latente hasta alcanzar los -1.1°C, temperatura del punto de congelación, a los 10 segundos.

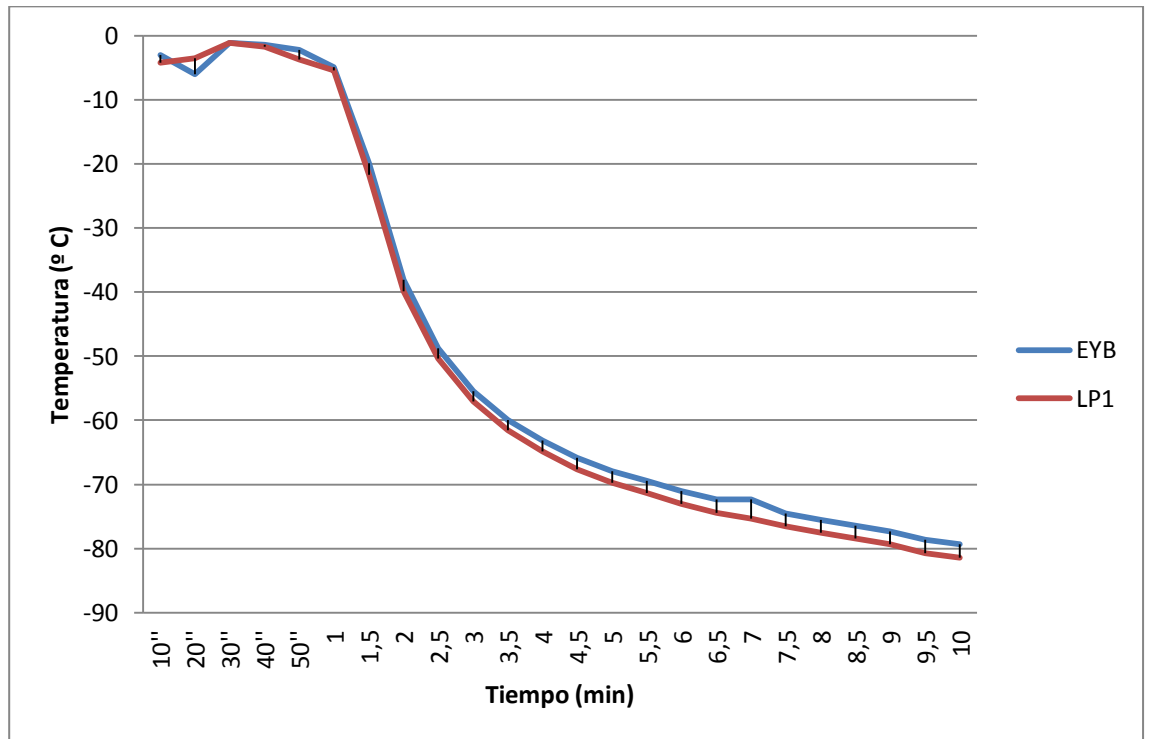
Posteriormente se produce una pequeña disminución de la temperatura hasta  $-3.8^{\circ}\text{C}$  en el siguiente minuto. Las muestras incluidas en LP1<sup>®</sup> tienen un comportamiento similar durante este primer minuto, aunque comienzan desprendiendo calor latente con una pendiente menos brusca pero de igual forma a los 30 segundos alcanzan la misma temperatura de cambio de estado ( $-1.1^{\circ}\text{C}$ ). A partir del minuto inicial las curvas de enfriamiento muestras pendientes similares para ambos diluyentes, descendiendo a  $-32^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en los siguientes 30 segundos,  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  durante el medio minuto siguiente continuando a  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta llegar a los dos minutos y medio de exposición, momento en el que se mantiene la pendiente durante el minuto siguiente alcanzándose los  $-60^{\circ}\text{C}$ . Es a partir de este momento cuando se lentifica el descenso de la temperatura, necesitando un minuto y medio más para reducir en  $10^{\circ}\text{C}$  su temperatura ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) y finalmente para bajar otros  $10^{\circ}\text{C}$  requiere tres minutos y medio. Finalmente la temperatura de ambos diluyentes se estabiliza a  $-80 \pm 1^{\circ}\text{C}$  al cabo de 4,5 minutos. Después de 30-60 segundos de equilibrado, las muestras son sumergidas en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento y posterior evaluación.

Así la curva comienza durante el primer minuto con un periodo de pequeñas variaciones donde se origina el cambio de estado y una pequeño equilibrado hasta su compleción, posteriormente a este minuto inicial, la rampa de enfriamiento es de  $-32^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . durante los 30 segundos siguientes, de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . los siguientes y de  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . el minuto y medio siguiente, durante el minuto y medio posterior el descenso es de  $-6.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , para reducirse a  $-2.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en los tres minutos y medio siguientes, donde se alcanzan los  $-80 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y donde se estabiliza la temperatura y la muestra durante los 30-60 segundos finales hasta completar los 10 min de exposición.

Expresando de forma más global las velocidades de congelación del proceso, las muestras alcanzan los  $-79^{\circ}\text{C}$  a los 9,5 min con el diluyente EYB a una pendiente  $-5,23^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y los  $-81^{\circ}\text{C}$  con el diluyente LP1<sup>®</sup> a razón de  $-5,74^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Figura 22). No se observaron diferencias significativas en las curvas de descenso de temperatura entre ambos diluyentes ( $P < 0,05$ ).

No se observaron diferencias significativas entre ambos diluyentes ( $P < 0,05$ ). La temperatura descendió durante los primeros 20 segundos hasta  $-1,1^{\circ}\text{C}$  y volvió a aumentar hasta  $2,2^{\circ}\text{C}$  con el diluyente EYB y hasta  $3,8^{\circ}\text{C}$  con el diluyente LP1<sup>®</sup> a los 50 segundos y, a continuación, comenzó de nuevo el descenso de temperatura. La temperatura descendió rápidamente entre el minuto 1 y el minuto 2, de  $-4,8^{\circ}\text{C}$  a  $-38,1^{\circ}\text{C}$  (a  $33,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .) para el diluyente EYB y de  $-5,4^{\circ}\text{C}$  a  $-39,8^{\circ}\text{C}$  (a  $34,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .) para

el diluyente LP1<sup>®</sup>. A partir del minuto 2, la temperatura descendió de manera progresiva y alcanzó -80°C a los 10 min con el diluyente EYB a 5,23°C/min y a los 9 minutos con el diluyente LP1<sup>®</sup> a 5,74°C/min. No se observaron diferencias significativas entre ambas curvas de congelación ( $P>0,05$ )



	10"	20"	30"	40"	50"	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
EYB	-3,0	-6,0	-1,1	-1,4	-2,2	-4,9	-19,9	-38,1	-48,7	-55,5	-60,0	-63,1	-65,9	-67,9	-69,4	-71,1	-72,3	-72,4	-74,5	-75,5	-76,4	-77,3	-78,7	-79,4
LP1	-4,3	-3,5	-1,1	-1,8	-3,8	-5,4	-21,7	-39,8	-50,3	-57,1	-61,6	-64,8	-67,6	-69,7	-71,3	-73,1	-74,4	-75,4	-76,6	-77,6	-78,5	-79,3	-80,7	-81,4

$P<0,05$ , ANOVA

Figura 22: Curva de descenso de la temperatura durante la congelación de espermatozoides de delfín mular empleando los diluyentes EYB y LP1<sup>®</sup>.

**3.1.2.2. Valoración de los parámetros de la motilidad durante la refrigeración a 4°C.**

Los resultados de los parámetros de motilidad evaluados con el programa ISAS se resumen en las *Tabla 2* y en el *Gráfico 2*.

*Tabla 2.* Parámetros medios de motilidad (media  $\pm$  SEM) durante la refrigeración (Refrigeración 1 y 2) empleando los diluyentes EYB y LP1<sup>®</sup> con una concentración final de glicerol del 3% y del 6% (n= 13).

REFRIGERACIÓN 1	GLICEROL 1,5%		GLICEROL 3%	
	EYB	LP1 <sup>®</sup>	EYB	LP1 <sup>®</sup>
MT (%)	85,3 $\pm$ 11,27	87,02 $\pm$ 4,9	84,28 $\pm$ 8,34	83,03 $\pm$ 7,48
MP (%)	64,23 <sup>a</sup> $\pm$ 4,58	71,82 <sup>a</sup> $\pm$ 10,15	50,5 <sup>b</sup> $\pm$ 20,96	49,38 <sup>b</sup> $\pm$ 17,19
VR (%)	69,17 <sup>a</sup> $\pm$ 13,25	75,23 <sup>a</sup> $\pm$ 11,23	58,61 <sup>b</sup> $\pm$ 22,53	57,08 <sup>b</sup> $\pm$ 12,81
VAP ( $\mu$ m/s)	68,98 $\pm$ 34,47	62,17 $\pm$ 11,15	61,93 $\pm$ 18,3	86,59 $\pm$ 21,27
VSL ( $\mu$ m/s)	43,25 $\pm$ 16,34	44,50 $\pm$ 8,50	52,06 $\pm$ 10,78	58,39 $\pm$ 11,90
VCL ( $\mu$ m/s)	79,73 $\pm$ 33,74	78,75 $\pm$ 17,48	93,39 $\pm$ 27,69	101,46 $\pm$ 23,84
ALH ( $\mu$ m/s)	2,83 $\pm$ 0,62	2,75 $\pm$ 0,68	2,29 $\pm$ 0,42	1,99 $\pm$ 0,32
BCF ( $\mu$ m/s)	8,32 $\pm$ 0,94	8,08 $\pm$ 0,41	8,53 $\pm$ 0,31	8,35 $\pm$ 0,69
STR (%)	76,74 $\pm$ 17,83	78,54 $\pm$ 15,17	69,64 $\pm$ 11,42	68,75 $\pm$ 7,85
LIN (%)	56,78 $\pm$ 12,27	55,98 $\pm$ 4,27	53,76 $\pm$ 5,21	58,61 $\pm$ 9,06
WOB (%)	82,45 <sup>a</sup> $\pm$ 3,78	86,00 <sup>b</sup> $\pm$ 4,05	80,46 <sup>a</sup> $\pm$ 5,28	88,39 <sup>b</sup> $\pm$ 4,99
REFRIGERACIÓN 2	GLICEROL 3% final		GLICEROL 6% final	
	EYB	LP1 <sup>®</sup>	EYB	LP1 <sup>®</sup>
MT (%)	88,34 <sup>a</sup> $\pm$ 4,76	87,48 <sup>a</sup> $\pm$ 7,39	82,87 <sup>b</sup> $\pm$ 5,55	83,12 <sup>b</sup> $\pm$ 4,31
MP (%)	69,26 <sup>a</sup> $\pm$ 13,90	78,08 <sup>a</sup> $\pm$ 10,80	53,81 <sup>b</sup> $\pm$ 16,38	59,05 <sup>b</sup> $\pm$ 17,17
VR (%)	70,26 <sup>a</sup> $\pm$ 10,84	77,08 <sup>a</sup> $\pm$ 15,89	58,57 <sup>b</sup> $\pm$ 7,11	56,37 <sup>b</sup> $\pm$ 19,75
VAP ( $\mu$ m/s)	57,2 $\pm$ 13,49	80,68 $\pm$ 27,52	76,01 $\pm$ 15,15	70,92 $\pm$ 23,10
VSL ( $\mu$ m/s)	37,9 $\pm$ 9,27	55,34 $\pm$ 17,33	54,64 $\pm$ 7,70	54,40 $\pm$ 13,46
VCL ( $\mu$ m/s)	71,64 $\pm$ 14,73	86,85 $\pm$ 30,79	89,73 $\pm$ 19,12	77,07 $\pm$ 24,84
ALH ( $\mu$ m/s)	2,58 $\pm$ 0,48	2,32 $\pm$ 0,39	2,06 $\pm$ 0,30	1,75 $\pm$ 0,39
BCF ( $\mu$ m/s)	7,88 $\pm$ 0,75	8,37 $\pm$ 0,48	8,44 $\pm$ 0,65	8,32 $\pm$ 0,62
STR (%)	75,33 $\pm$ 15,12	73,38 $\pm$ 12,38	72,97 $\pm$ 9,39	78,65 $\pm$ 8,91
LIN (%)	57,13 $\pm$ 3,15	61,46 $\pm$ 6,15	62,67 $\pm$ 12,86	72,43 $\pm$ 9,58
WOB (%)	84,18 <sup>a</sup> $\pm$ 5,05	89,18 <sup>b</sup> $\pm$ 5,87	85,30 <sup>a</sup> $\pm$ 6,68	92,07 <sup>b</sup> $\pm$ 3,30

a vs b:  $P < 0,05$ ; ANOVA.

Los parámetros VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR Y LIN no presentaron diferencias significativas entre diluyentes ni entre concentraciones de crioprotector en ningún momento de la refrigeración. En Refrigeración 1, no se observaron diferencias entre diluyentes ni entre concentraciones de glicerol en la MT. En el caso de la Refrigeración 2, se obtuvieron una MT, MP y VR mayor empleando una concentración final de glicerol del 3%. No se observaron diferencias significativas entre los dos diluyentes para la motilidad progresiva en ningún momento de la refrigeración. Sin embargo, sí se observaron entre las dos concentraciones de crioprotector, con una concentración final de glicerol del 3% se obtuvo una motilidad significativamente más alta que con una concentración final del 6%, tanto en Refrigeración 1 ( $P<0,05$ ) como en Refrigeración 2 ( $P<0,05$ ). Para ambos diluyentes, ocurre lo mismo en el caso de la VR, no se encontraron diferencias entre los diluyentes durante la refrigeración. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de glicerol, obteniendo una mayor VR con una concentración final de glicerol del 3% ( $P<0,05$ ). El porcentaje de oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio (WOB) presentó diferencias, tanto en Refrigeración 1 como en Refrigeración 2, existiendo diferencias entre las concentraciones de glicerol para los que se obtuvieron valores más altos para una concentración final de glicerol del 3% ( $P<0,05$ ).

### **3.1.2.3. Valoración de las características post- descongelación**

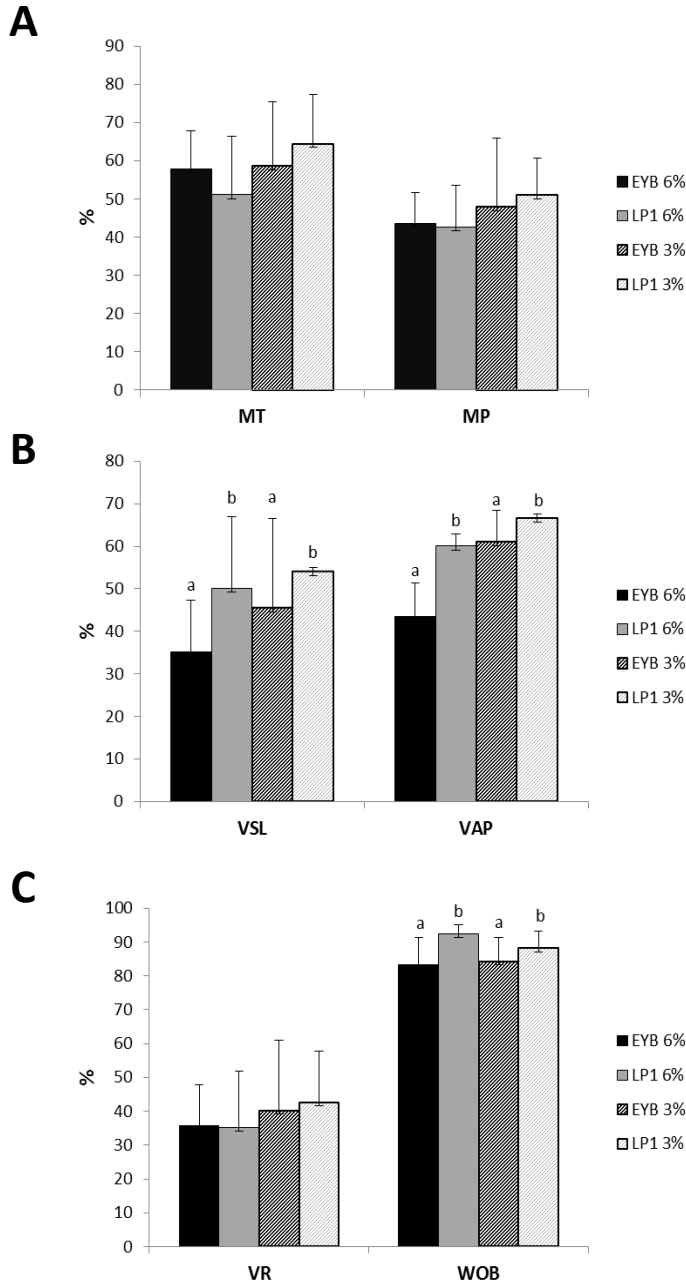
Los resultados de viabilidad y de integridad del acrosoma obtenidos en fresco con los obtenidos tras la descongelación se muestran en la *Tabla 3*. En el momento de la descongelación, se observó una disminución en los valores de viabilidad de las muestras descongeladas con respecto al grupo en fresco ( $P<0,05$ ) así como un incremento de los valores de viabilidad en el grupo con una concentración final de glicerol del 3% con respecto al grupo del 6% en el momento de la descongelación ( $P<0,05$ ). Sin embargo, no se observó diferencia entre los diluyentes en el momento de la descongelación. Asimismo, no se observaron diferencias referentes a la integridad del acrosoma con respecto a la evaluación del semen en fresco, ni entre los diferentes diluyentes ni entre las dos concentraciones de glicerol.

Tabla 3. Viabilidad e integridad del acrosoma (media  $\pm$  SEM) del espermatozoide del delfín mular en fresco y tras la descongelación (n=11).

	Fresco	Descongelado			
		Glicerol 3%		GLICEROL 6%	
		EYB	LP1 <sup>®</sup>	EYB	LP1 <sup>®</sup>
Viabilidad (%)	88,6 <sup>a</sup> $\pm$ 3,0	79,83 <sup>b</sup> $\pm$ 6,31	80,50 <sup>b</sup> $\pm$ 1,64	68,40 <sup>c</sup> $\pm$ 9,76	76,8 <sup>c</sup> $\pm$ 13,3
Acrosoma (%)	94,2 $\pm$ 1,8	91,00 $\pm$ 1,26	92,00 $\pm$ 2,00	92,40 $\pm$ 1,67	89,80 $\pm$ 3,42

a vs b vs c: P<0,05; ANOVA.

Los datos de los diferentes parámetros de la motilidad en el momento de la descongelación están reflejados en la *Figura 23*. No se observó diferencia en la motilidad total entre las concentraciones de glicerol obteniendo 61,55% y 54,41% para una concentración de glicerol del 3% y 6% respectivamente. Tampoco se observaron diferencias entre los diluyentes en la motilidad total obteniendo 58,25% y 58,35% para los diluyentes EYB y LP1<sup>®</sup> respectivamente. Asimismo, no se encontró diferencia para la motilidad progresiva: 49,39% (glicerol 3%) frente a 43,18% (glicerol 6%) y 45,92% para el EYB frente a 47,22% para el LP1<sup>®</sup>. Sin embargo, sí se observó diferencia en cuanto a la VSL y VAP entre los dos diluyentes, ésta fue significativamente mayor en el caso del LP1<sup>®</sup> (52,26% y 63,29% respectivamente) frente al EYB (40,36% y 52,23% respectivamente). Los parámetros ALH, BCF, STR, velocidad rápida y LIN no presentaron diferencias entre los dos diluyentes ni entre las dos concentraciones de crioprotector.



a vs b:  $P < 0,05$ ; ANOVA.

Figura 23. Datos de motilidad (media  $\pm$  SEM) obtenidos con el programa ISAS post-descongelación empleando dos diluyentes diferentes (EYB y LP1<sup>®</sup>) y dos concentraciones diferentes de crioprotector (3% y 6%). (A) Motilidad total (MT; %) y motilidad progresiva (MP; %); (B) velocidad rectilínea (VSL;  $\mu\text{ms}^{-1}$ ), velocidad media (VAP;  $\mu\text{ms}^{-1}$ ); (C) velocidad rápida (VR; %) y oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio (WOB=VAP/VCL).

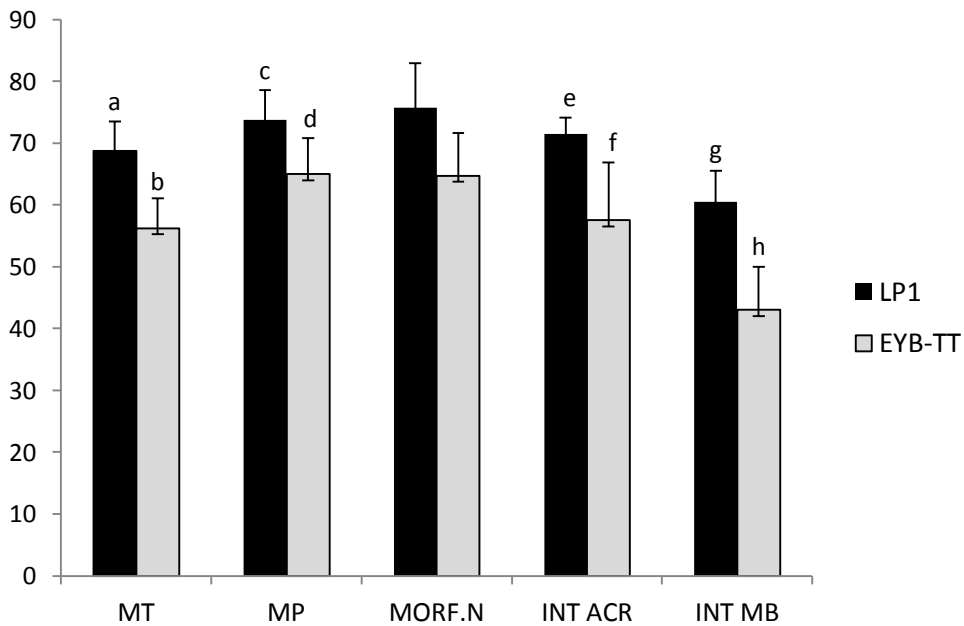
### **3.2. Experimento 2**

#### **3.2.1. Características seminales tras la colecta**

Las características seminales medias tras la colecta fueron las siguientes: volumen:  $9,94 \pm 10,05$  mL; pH:  $7,86 \pm 0,24$ ; osmolaridad:  $345,38 \pm 45,40$  (mOsm/Kg); Concentración:  $200,65 \pm 167,40$  espermatozoides $\times 10^6$ /mL; motilidad total (%):  $83,13 \pm 6,19$ ; motilidad progresiva (%):  $70,00 \pm 11,9$ ; morfología normal (%):  $78,48 \pm 5,22$ ; integridad del acrosoma (%):  $86,5 \pm 1,8$ ; integridad de la membrana (%):  $67,9 \pm 0,8$ . No se observaron diferencias en las características seminales entre los eyaculados de los sementales.

#### **3.2.2. Características seminales post- descongelación**

Las características seminales medias post descongelación correspondientes a los diluyentes LP1<sup>®</sup> y EYB-TT respectivamente vienen recogidas en el *Figura 24* y son las siguientes: Motilidad total (%):  $68,8 \pm 4,8$  y  $56,3 \pm 4,8$ , motilidad progresiva (%):  $73,8 \pm 4,6$  y  $65,0 \pm 5,8$ , tasa cinética (1-5):  $4,8 \pm 0,3$  y  $3,8 \pm 0,5$ , morfología normal (%):  $78,48 \pm 5,22$  (LP1<sup>®</sup>) y  $64,75 \pm 6,85$  (EYB), integridad del acrosoma (%):  $71,50 \pm 2,65$  (LP1<sup>®</sup>) y  $57,50 \pm 9,33$  (EYB-TT), integridad de la membrana (%):  $60,50 \pm 5,00$  (LP1<sup>®</sup>) y  $43,00 \pm 7,24$  (EYB-TT). Se observaron diferencias significativas en cuanto a la motilidad total (a vs b,  $P=0,03$ ), motilidad progresiva (c vs d,  $P=0,006$ ), integridad del acrosoma (e vs f,  $P=0,035$ ) y en la integridad de la membrana (g vs h,  $P=0,046$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias de los parámetros seminales entre animales en el momento de la descongelación.

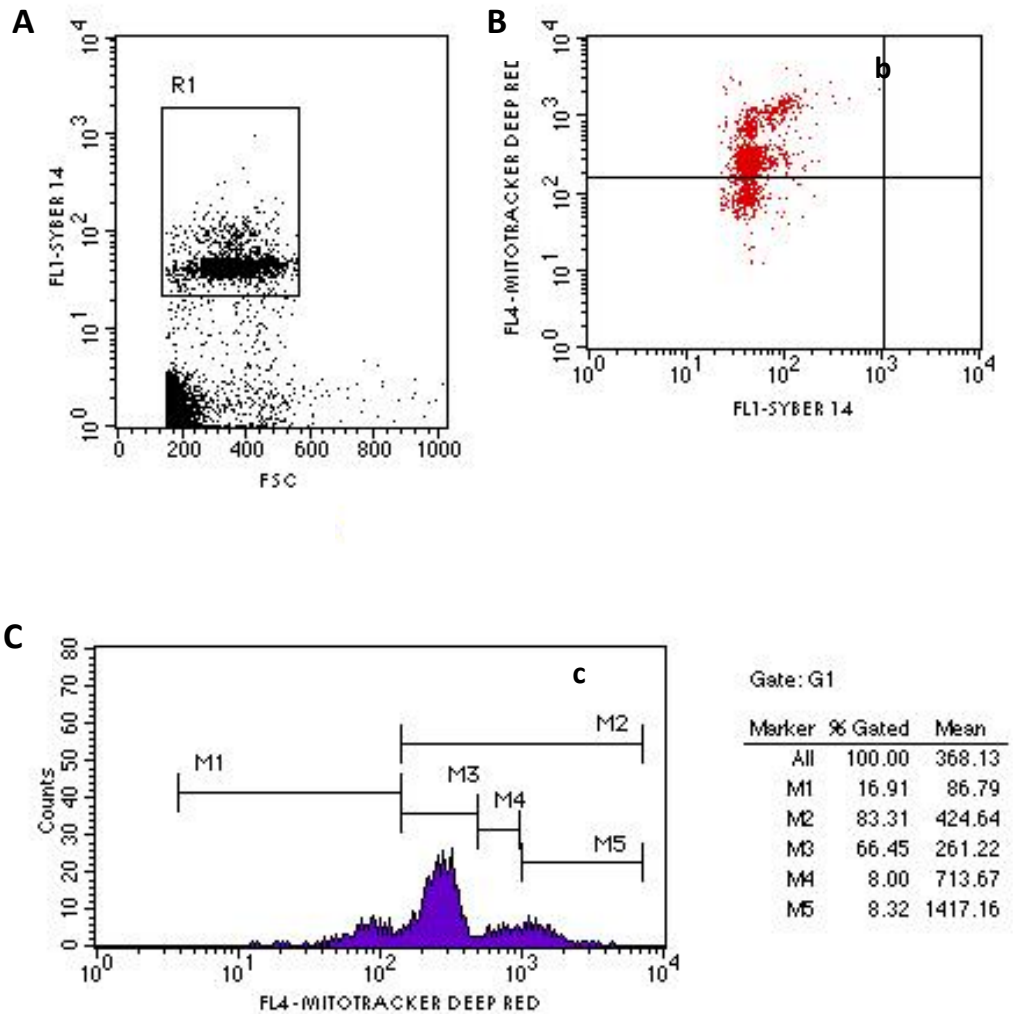


a vs b, c vs d, e vs f, g vs h,  $P < 0,05$ ; análisis de varianza factorial

*Figura 24.* Características post- desgelación de muestras seminales criopreservadas con dos diluyentes diferentes (LP1<sup>®</sup> y EYB-TT), (n=4 delfines mulares). MT: Motilidad total, MP: Motilidad progresiva; Morf. N: morfología normal, Int Acr: Integridad del acrosoma, Int Mb: Integridad de membrana.

### 3.3. Experimento 3

Se evaluaron por citometría de flujo los espermatozoides tratados con Sybr-14 y Mitotracker Deep Red. La *Figura 25* muestra la actividad mitocondrial por citometría de flujo en una de las muestras seminales. Se observan 5 poblaciones con intensidades diferentes de actividad mitocondrial en orden creciente, siendo M1 y M5 las poblaciones con menor y mayor actividad mitocondrial respectivamente.



M 2: agrupación de las poblaciones M3, M4 Y M5 (MITO)

Figura 25. Evaluación por citometría de flujo de espermatozoides de delfín mular tratados con Sybr-14 y Mitotracker Deep Red. (A) Regiones de selección de partículas (*gating*) siendo R1 la población de espermatozoides; (B) SYBR 14 vs MitoTracker; (C) Poblaciones con intensidades diferentes de actividad mitocondrial siendo M1 y M5 las poblaciones con menor y mayor actividad mitocondrial respectivamente.

Los resultados de viabilidad, motilidad y actividad mitocondrial están recogidos en la *Tabla 4*. No se observaron diferencias entre los animales en cuanto a la viabilidad ( $P>0,05$ ). Asimismo, los resultados de motilidad total y progresiva también fueron similares ( $P>0,05$ ) para todos los individuos.

En cuanto a la exactitud de la evaluación, los valores referentes a la viabilidad, motilidad y actividad mitocondrial mostraron un coeficiente de variación entre las réplicas de cada eyaculado inferior al 5% ( $P < 0,05$ ).

Asimismo, se encontró una correlación positiva entre la actividad mitocondrial que agrupó las poblaciones M3, M4 y M5 (denominada MITO) y la motilidad total (MT), ( $r = 0,871$ ,  $P < 0,001$ ), la motilidad progresiva (MP) ( $r = 0,758$ ,  $P < 0,001$ ) y la viabilidad ( $r = 0,68$ ,  $P < 0,05$ ).

*Tabla 4.* Motilidad total y progresiva, actividad mitocondrial y viabilidad evaluadas en cuatro delfines (Media  $\pm$  SEM)

Animal	MITO	MT	MP	Viabilidad
DM1	82,49 $\pm$ 12,73	77,27 $\pm$ 12,49	58,18 $\pm$ 12,28	84,50 $\pm$ 8,92
DM3	78,38 $\pm$ 6,97	76,65 $\pm$ 4,45	58,05 $\pm$ 4,17	84,00 $\pm$ 4,24
DM4	81,32 $\pm$ 1,44	74,00 $\pm$ 2,83	56,10 $\pm$ 0,71	80,50 $\pm$ 3,54
DM5	77,04 $\pm$ 1,93	64,90 $\pm$ 13,42	37,70 $\pm$ 19,94	84,50 $\pm$ 9,19
(Media $\pm$ DE)	80,70 $\pm$ 9,15	74,59 $\pm$ 10,68	54,40 $\pm$ 12,95	83,75 $\pm$ 7,00

MITO: actividad mitocondrial (agrupa las poblaciones M3, M4, M5), MT: Motilidad Total, MP: Motilidad Progresiva,  $P < 0,05$ , correlación de Pearson.

#### **4. DISCUSIÓN**

Los resultados de este estudio revelan una buena calidad seminal de los eyaculados en fresco de los individuos analizados, con una motilidad progresiva superior al 60% y una integridad del acrosoma superior al 85%. Se observó un porcentaje moderado de alteraciones en la morfología espermática siendo las más comunes las relacionadas con la pieza intermedia. Una de las particularidades observadas fue la gran variabilidad del volumen y la concentración del eyaculado. Este hecho podría deberse a fenómenos de estacionalidad, donde en determinadas épocas del año y en función de la localización geográfica del individuo, el volumen y la concentración seminal varía debido a las fluctuaciones de testosterona (Urian *et al.*, 1996).

Por otro lado, la tinción empleada para la evaluación de la morfología permitió la diferenciación de los distintos componentes del espermatozoide. Se ha utilizado con anterioridad la tinción Spermac en la especie canina (Oettlé, 1986; Rota *et al.*, 1995) y se ha demostrado recientemente, en un estudio retrospectivo, que esta tinción ayuda a seleccionar espermatozoides de mayor calidad y a realizar una correcta evaluación seminal en esta especie (Goericke-Pesch y Failing, 2013). Asimismo, se ha puesto en evidencia que esta tinción es efectiva en el delfín mular así como en otras especies de mamíferos marinos como se ha descrito en estudios anteriores (Robeck y O'Brien, 2004; Robeck *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 2008). Las tinciones con IP y Sybr-14, así como la tinción eosina-nigrosina han sido igualmente efectivas en esta especie. Se encontró una gran correlación ( $r= 0,996$ ) entre la viabilidad obtenida mediante la técnica eosina-nigrosina y la técnica llevada a cabo con Sybr y IP. Las características del eyaculado detalladas en este estudio se describen de manera objetiva por primera vez en el delfín mular (Sánchez-Calabuig *et al.*, 2011). Estudios anteriores (Robeck *et al.*, 2000; Robeck y O'Brien, 2004; Robeck *et al.*, 2005) se basan en observaciones subjetivas del semen para determinar los parámetros de motilidad. Un estudio posterior al nuestro (Montano *et al.*, 2012) corrobora por medio de análisis computarizado (CASA) la alta motilidad aquí descrita de los espermatozoides del delfín mular tras la colecta.

Se observó en este experimento que, tras la refrigeración, la motilidad total así como la motilidad progresiva fueron significativamente superiores con una concentración final de glicerol fue del 3% con respecto al 6%. Estos resultados están corroborados por un estudio anterior de congelación seminal en el delfín mular (Robeck y O'Brien, 2004). Asimismo, la viabilidad fue significativamente mayor en el

momento de la descongelación con una concentración de crioprotector de 3%. Pese a que no se observaron diferencias significativas en la motilidad entre las concentraciones de glicerol en el momento de la descongelación, en base a los resultados anteriores, una concentración de glicerol de 3% sería suficiente para asegurar la crioprotección del semen de delfín mular.

Al analizar las curvas de enfriamiento con ambos diluyentes se apreció que se requirió el mismo tiempo para llegar a la temperatura de inmersión en nitrógeno líquido, pues las velocidades de enfriamiento fueron similares, de  $-5,23^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y de  $-5,74^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para el diluyente EYB y el LP1<sup>®</sup>, respectivamente. Sucedió lo mismo con las velocidades de enfriamiento parciales hasta los  $-20^{\circ}\text{C}$ , de  $-40^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$  (franja de temperatura crítica),  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  (temperatura de inmersión), y sólo se apreció una ligera variación no significativa durante los primeros 30 segundos del proceso, que obviamente no representa mayor relevancia. Así pues, ambas muestras fueron sometidas a similares shocks osmóticos y la formación de cristales (aunque no determinada) tuvieron de ser igualmente similares y, por tanto, mínimos los daños potenciales originados por la congelación.

En cuanto a la elección del diluyente, en este estudio se demuestra que el LP1<sup>®</sup> a base de vesículas lipídicas actúa de manera similar o superior a los diluyentes a base de yema de huevo con tampón TRIS (EYB) y con buffer TES-TRIS respectivamente. Este hecho está en desacuerdo con un estudio publicado donde los mejores resultados se obtenían con buffer TES-TRIS respecto al TES o TRIS (Robeck y O'Brien, 2004). Teniendo en cuenta que, además, el diluyente LP1<sup>®</sup> es de origen vegetal y por lo tanto, evita contaminaciones por patógenos de origen animal, como puede ser la *Salmonella Enteritidis*, constituye una excelente alternativa al uso de la yema de huevo en esta especie desde un punto de vista sanitario.

El objetivo a largo plazo de este estudio es la realización de inseminaciones artificiales con éxito empleando este diluyente en la congelación espermática. Para ello, se podrían emplear distintos protocolos para la sincronización de celos en el delfín (Robeck *et al.*, 2005; Robeck *et al.*, 2009; Katsumata, 2010). Estudios anteriores utilizando para la congelación diluyentes a base de yema de huevo, describen esta técnica con resultados prometedores tanto en el delfín mular (Robeck *et al.*, 2005; Robeck *et al.*, 2009; Katsumata, 2010) como en la orca (*Orcinus Orca*) (Robeck *et al.*, 2004; Katsumata, 2010), en la beluga (*Delphinapterus leucas*) (O'Brien *et al.*, 2008; Katsumata, 2010; Robeck *et al.*, 2010), así como en el delfín del Pacífico de lados blancos (*Lagenorhynchus obliquidens*) (Robeck *et al.*, 2009).

Por otro lado, existe una gran variedad de fluorocromos que presentan capacidad de unión a las mitocondrias; sin embargo, existen controversias en el uso de muchos de ellos (Ericsson *et al.*, 1993; Garner *et al.*, 1997; Gravance *et al.*, 2001; Hallap *et al.*, 2005). Por ello, se recomienda la puesta a punto previa en muestras descongeladas y previamente congeladas con el diluyente que se empleará para la evaluación de las muestras, ya que, una vez puesto a punto para una especie y un diluyente en concreto, la evaluación de la actividad mitocondrial con Mitotracker Deep Red se realiza de manera rutinaria. En nuestro estudio, se encontró una correlación positiva entre la actividad mitocondrial evaluada con este fluorocromo (poblaciones M3+M4+M5), la viabilidad, la motilidad total y la motilidad progresiva. La diferencia encontrada entre la actividad mitocondrial y la motilidad total fue menor al 7,6% y, entre la actividad mitocondrial y la viabilidad menor al 3,8%. Asimismo, la desviación estándar en este caso fue mínima. En un artículo previo realizado sobre la actividad mitocondrial en bovino empleando este mismo fluorocromo (Hallap *et al.*, 2005), se observó una diferencia de 15% entre la actividad mitocondrial y la motilidad total. Asimismo, en otro estudio, se correlacionó positivamente la actividad mitocondrial con la morfología normal y se sugirió que la combinación de técnicas de medida de calidad seminal es útil en la estimación del potencial de fertilidad (Ericsson *et al.*, 1993). Consideramos pues que la evaluación de la actividad mitocondrial empleando el Mitotracker Deep Red es un parámetro fiable de la calidad espermática, como marcador de viabilidad y de motilidad en el delfín mular.

El objetivo a largo plazo de este estudio es la realización de inseminaciones artificiales con éxito empleando este diluyente en la congelación espermática. Para ello, se podrían emplear distintos protocolos para la sincronización de celos en el delfín mular (Robeck *et al.*, 2005; Robeck *et al.*, 2009; Katsumata, 2010). Estudios anteriores utilizando para la congelación diluyentes a base de yema de huevo, describen esta técnica con resultados prometedores tanto en el delfín mular (Robeck *et al.*, 2005; Robeck *et al.*, 2009; Katsumata, 2010) como en la orca (*Orcinus Orca*) (Robeck *et al.*, 2004; Katsumata, 2010), en la beluga (*Delphinapterus leucas*) (O'Brien *et al.*, 2008; Katsumata, 2010; Robeck *et al.*, 2010), así como en el delfín del Pacífico de lados blancos (*Lagenorhynchus obliquidens*) (Robeck *et al.*, 2009).

En este capítulo se describen dos técnicas de evaluación objetiva de la calidad seminal: la evaluación de la motilidad espermática con el sistema CASA ampliamente estudiada, y la evaluación de la actividad mitocondrial por medio de la citometría de

flujo. Resulta conveniente que exista una tendencia hacia una evaluación de la calidad espermática en la que análisis subjetivos intervengan lo menos posible. De este modo, se podrían establecer comparaciones entre diferentes estudios y establecer así protocolos en especies protegidas con mayor eficacia, ya que el acceso a las mismas es muy limitado.



**CAPÍTULO II. Validación del ensayo de dispersión de la cromatina espermática en condiciones de laboratorio y de campo en el delfín mular. Evaluación de las dinámicas de fragmentación del ADN espermático en muestras en fresco y descongelado en el delfín mular.**



## INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años se ha realizado un gran esfuerzo con el fin de mejorar la diversidad genética del delfín mular (*Tursiops truncatus*) que se considera como especie protegida bajo el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) (<http://www.cites.org/eng/resources/species.html> consultado en septiembre 2013). Aunque la eficacia reproductiva de esta especie en libertad es similar a la que existe en cautividad, la consanguinidad ha aumentado en esta última de manera alarmante debido a diferentes razones como el número limitado de individuos reproductores, las restricciones en cuanto al transporte de los mismos, o la prohibición de la introducción de especies salvajes a poblaciones cautivas. Con el fin de aumentar la diversidad genética en esta especie, se han desarrollado bancos de recursos zoogenéticos (BRZ). Esta alternativa sólo es posible si existe un conocimiento exhaustivo previo de la fisiología reproductiva así como de la criopreservación de gametos en esta especie. En los últimos años, se han puesto a punto técnicas de reproducción asistida en el delfín mular, incluyendo la inseminación artificial utilizando tanto semen congelado como semen sexado previo a la congelación (O'Brien y Robeck, 2006; Robeck *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la fragmentación del ADN espermático es una de las causas más importantes de la infertilidad masculina (Evenson, 1999; Larson *et al.*, 2000). En la especie humana, se ha observado que niveles de fragmentación del ADN por encima de 30-40% pueden ser incompatibles con el mantenimiento del embarazo (Evenson, 1999; Larson *et al.*, 2000). Asimismo, existe una correlación entre la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado en el eyaculado y la infertilidad (Ollero *et al.*, 2001; Agarwal y Said, 2003; Vicente-Fiel *et al.*, 2014). Por otra parte, los individuos con daño nuclear en el espermatozoide generalmente muestran una mayor incidencia de los parámetros seminales anormales (Irvine *et al.*, 2000; Ollero *et al.*, 2001; de la Torre *et al.*, 2007). En consecuencia, la evaluación de la fragmentación del ADN representa una herramienta importante para la predicción de la fertilidad masculina (Evenson *et al.*, 2002; Agarwal y Said, 2003; Sakkas *et al.*, 2003; Agarwal y Allamaneni, 2005).

Actualmente, existen numerosas técnicas disponibles para la evaluación de fragmentación del ADN espermático, incluyendo el ensayo Cometa (Hughes *et al.*, 1996; Aravindan *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1998; Gwo *et al.*, 2003; Fraser y Strzerek, 2004), el ensayo TUNEL (*terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP nick-end labeling method*) (Lopes *et al.*, 1998; Agarwal y Allamaneni, 2005; Chohan *et al.*, 2006),

el ensayo SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) (Evenson *et al.*, 1980; Evenson *et al.*, 1994; Evenson, 1999), el ensayo DBD-FISH (*DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization*) (Fernández *et al.*, 1998; Fernández y Gosálvez, 2002) así como el ensayo SCD (ensayo de dispersión de la cromatina espermática; SCD, *Sperm chromatin dispersión test*) (Fernández *et al.*, 2005a). Se ha descrito recientemente el ensayo SCSA como técnica de valoración de la fragmentación espermática en el delfín mular (Montano *et al.*, 2012). El ensayo SCD se desarrolló en un primer momento para la especie humana (Fernández *et al.*, 2005a; Chohan *et al.*, 2006; Enciso *et al.*, 2006b) y se adaptó más adelante a un gran número de especies de mamíferos (Enciso *et al.*, 2006b; Fraser y Strzezek, 2004; Johnston *et al.*, 2007; Zee *et al.*, 2009). Este ensayo tiene la ventaja añadida de ser un procedimiento de bajo coste que se puede realizar utilizando tanto microscopía de fluorescencia como de campo claro. La simplicidad de este procedimiento permite que la prueba pueda utilizarse en condiciones de campo (Gosálvez *et al.*, 2008) y en el caso de esta especie, este aspecto puede tener un interés adicional ya que las instalaciones necesarias no siempre están disponible en las proximidades del lugar donde están alojados los animales.

El equipo del Dr. Gosálvez ha introducido progresivamente el concepto de evaluación de dinámica de fragmentación del ADN espermático (López-Fernández *et al.*, 2008; Imrat P, 2012). Para una evaluación dinámica empleando el ensayo SCD, se evalúa la tasa de fragmentación del ADN a diferentes tiempos de incubación desde el momento de la colecta seminal (semen fresco) o desde el momento de la descongelación (semen criopreservado). La evaluación de la fragmentación del ADN espermático tras un período de incubación es similar a examinar el comportamiento del mismo en condiciones que reflejan el microambiente del tracto reproductivo femenino. Se ha demostrado en un gran número de especies (López-Fernández *et al.*, 2008; Gosálvez *et al.*, 2009; García-Peiró *et al.*, 2011), que, si bien se pueden encontrar valoraciones similares en la fragmentación del ADN espermático entre diferentes eyaculados en el momento de la colecta o inmediatamente después de la descongelación (T0), estas mismas muestras de semen pueden mostrar diferencias dramáticas en cuanto al daño en el ADN transcurrida la incubación. La tasa de fragmentación no sólo depende del individuo o de los eyaculados de un mismo individuo sino que se trata también de un fenómeno específico la especie. Por ejemplo, el ADN de la especie *Suis* puede permanecer estable durante días o incluso semanas, mientras que el ADN espermático de la especie *Ovis* tan sólo es estable durante unas horas (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2008b).

En este estudio se llevaron a cabo dos experimentos. Los objetivos del *Experimento 1* fueron:

- (1) modificar y validar el ensayo SCD en los espermatozoides de delfín mular empleando el ensayo Cometa como control externo.
- (2) evaluar la eficacia del ensayo SCD en condiciones de campo, sin acceso a una fuente de alimentación ni a microscopía de fluorescencia.

Los objetivos del *Experimento 2* de este estudio fueron:

- (1) comparar la tasa de fragmentación del ADN espermático entre los diferentes animales y diferentes eyaculados, y correlacionar este parámetro con las características seminales convencionales
- (2) analizar las dinámicas de fragmentación del ADN espermático en semen fresco y descongelado
- (3) determinar el diluyente más adecuado de congelación en esta especie, haciendo especial énfasis en el mantenimiento de la integridad del ADN espermático.

### 1. MATERIAL Y MÉTODOS

Los protocolos de colecta seminal fueron revisados y aprobados por el Comité de Bienestar Animal del Zoo Aquarium de Madrid y de acuerdo a la Ley de Bienestar Animal para el cuidado de los Mamíferos Marinos (Universidad de Queensland, departamento de bienestar animal SAFS/133/11). Todos los animales se entrenaron previamente para la colecta seminal por los entrenadores del Zoo Aquarium de Madrid (España) y de Sea World Gold Coast (Australia) como se ha descrito anteriormente (Keller, 1986; Robeck y O'Brien, 2004).

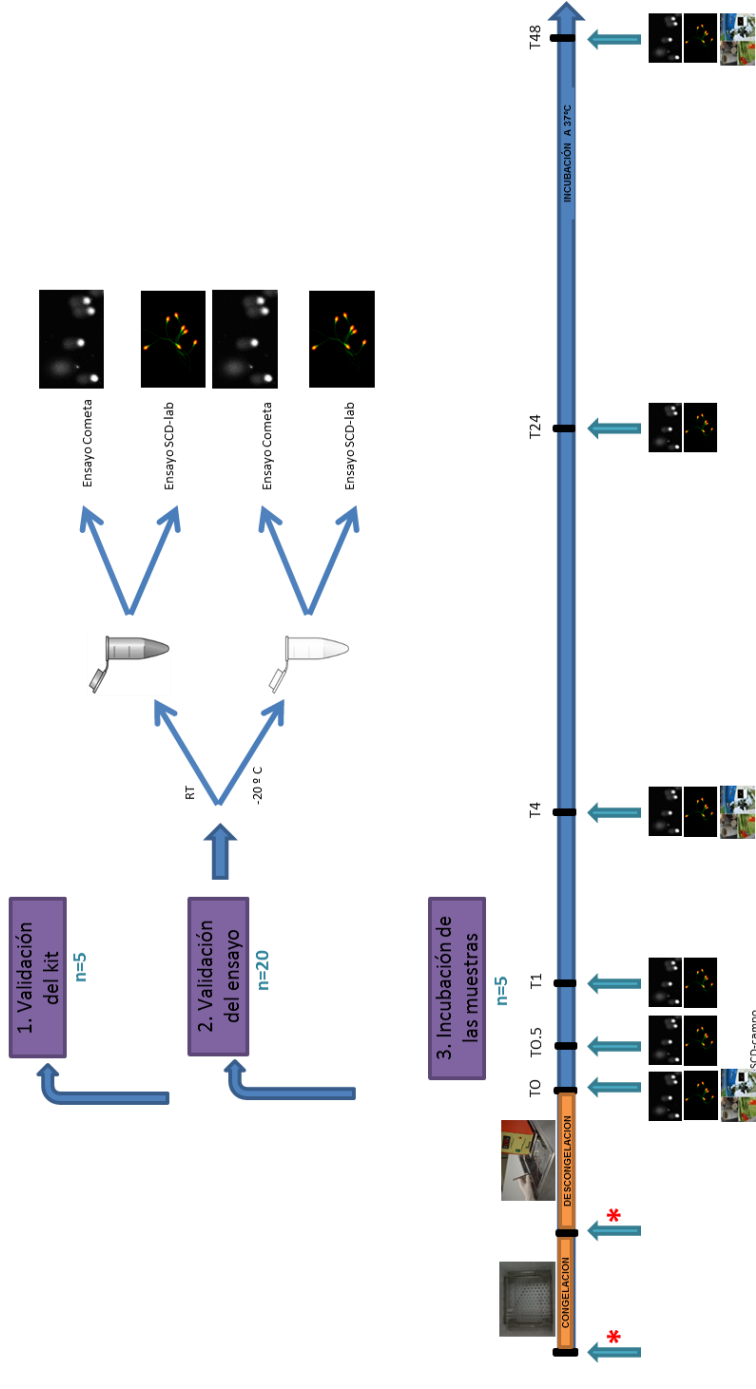
#### 1.1. Animales

Las muestras seminales para el *Experimento 1* se obtuvieron de un delfín mular macho "Tritón" de 38 años (Tri38) que se alojaba en el Zoo Aquarium de Madrid (España). En el *Experimento 2*, las muestras seminales se obtuvieron de cinco delfines mulares "Sirius", "Coen", "Tyson", "Kiama" y "Starbucks" de edades comprendidas entre 9 y 33 años alojados en Sea World Gold Coast (Australia) (Si33, CO16, Ty19, Ki9 y St14). Las condiciones de alojamiento y alimentación están descritas en el *Capítulo I*.

#### 1.2. Diseño experimental

***Experimento 1: Validación del ensayo SCD en condiciones de laboratorio y de campo en el delfín mular.***

Para este experimento, la evaluación del ADN espermático se realizó sobre muestras congeladas y descongeladas (protocolo descrito en el *Experimento 1, Capítulo I*). El diseño experimental del *Experimento 1* está descrito en la *Figura 26*. Se utilizaron cinco pajuelas diferentes del mismo eyaculado con el fin de validar el ensayo SCD y producir un kit adaptado específicamente a la evaluación del daño del ADN espermático de delfín mular (Halomax, Halotech SL, Madrid, España). Una vez establecida la metodología, se realizó un ensayo Cometa y un ensayo SCD de forma simultánea utilizando para ello 20 pajuelas diferentes de dos eyaculados diferentes y se correlacionaron los resultados de ambos ensayos. Además, se incubaron 5 muestras de 5 eyaculados diferentes previamente congeladas y descongeladas y se evaluaron mediante el ensayo de SCD y cometa inmediatamente después de la descongelación (T0) y a las 0,5h (T0.5), 1h (T1), 4h (T4), 24h (T24) y 48 h (T48) de incubación a 37°C. Asimismo, se utilizaron alícuotas de las 5 mismas muestras con el fin de examinar la idoneidad del ensayo SCD modificado en condiciones de campo.

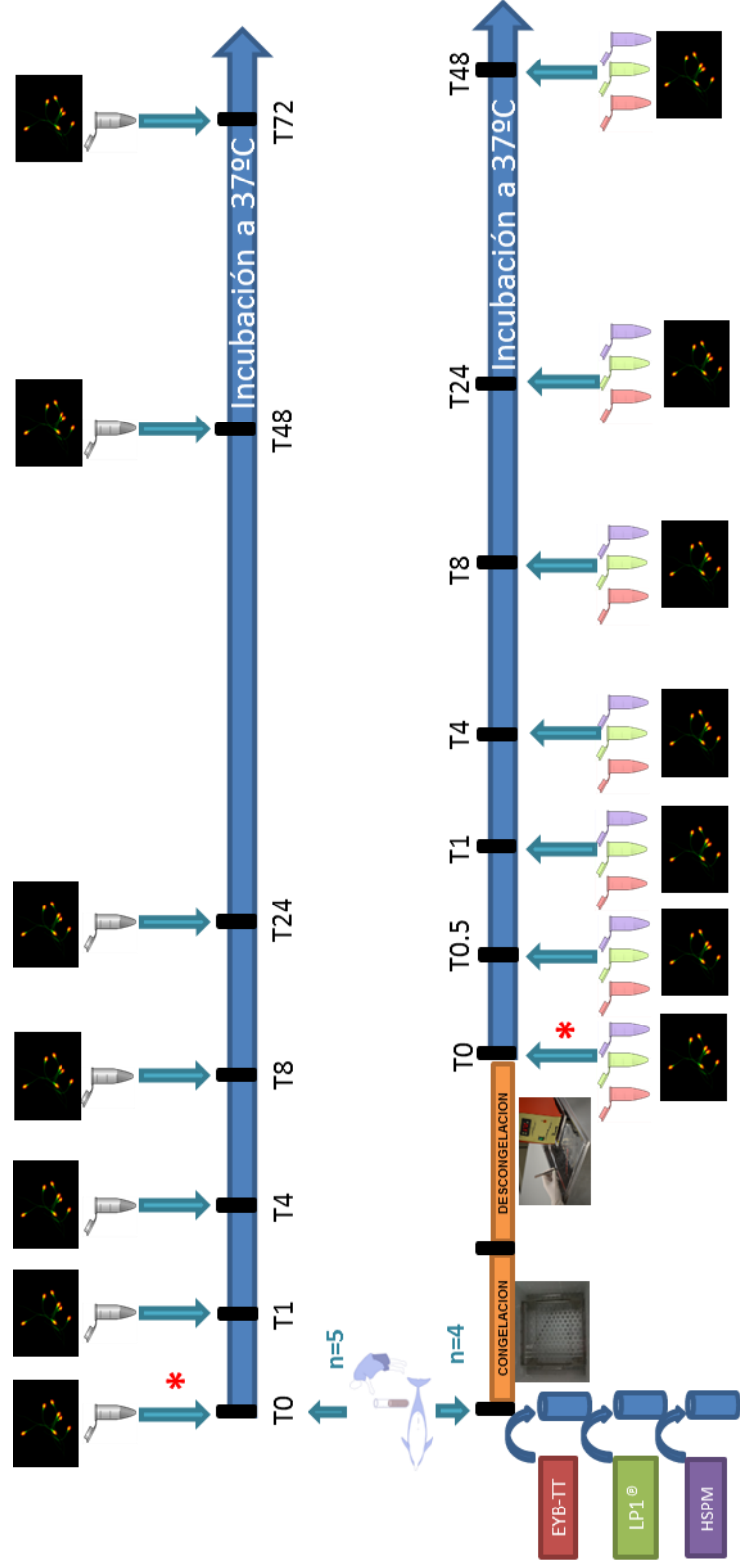


\* evaluación seminal

Figura 26. Diseño experimental del Experimento 1 del Capítulo II. Validación del ensayo de dispersión de la cromatina espermática en condiciones de laboratorio y de campo en el delfín mular (*Tursiops truncatus*).

### ***Experimento 2:* Estudio de las dinámicas de fragmentación y estudio de tres diluyentes diferentes para la congelación seminal.**

Se utilizaron de 1 a 4 muestras seminales de cada animal (n=5). El diseño experimental del *Experimento 1* está descrito en la *Figura 27*. La dinámica de fragmentación del ADN espermático se evaluó a inmediatez tras la colecta seminal (T0), después de 1 (T1), 4 (T4), 8 (T8), 24 (T24), 48 (T48) y 72 (T72) horas de incubación, mientras que la dinámica de muestras descongeladas con los tres diluyentes diferentes se evaluó inmediatamente después de la descongelación (T0) a las 0,5 (T0.5), 1 (T1), 4 (T4), 8 (T8), 24 (T24) y 48 (T48) horas de incubación a 37°C. Inmediatamente después de la colecta, se evaluaron las diferencias entre el primer y segundo eyaculado de cada individuo obtenidos en el mismo día y se evaluó la calidad espermática así como la dinámica de fragmentación de ADN de espermático. Se estudió la dinámica de la fragmentación del ADN espermático para diferentes eyaculados de cada animal con el fin de analizar las diferencias entre los animales así como las diferencias entre los eyaculados del mismo animal; se utilizaron hasta cuatro eyaculados por animal para este propósito. Asimismo, se correlacionaron los parámetros seminales convencionales y la fragmentación del ADN espermático.



\* evaluación seminal

Figura 27. Diseño experimental del Experimento 2 del Capítulo II. Estudio de las dinámicas de fragmentación y estudio de tres diluyentes diferentes para la congelación seminal.

### 1.3. Colecta de semen y evaluación seminal

La obtención de muestras seminales se realizó como se ha descrito en el *Capítulo I*. Se recogieron de 1 a 3 eyaculados sucesivos en cada colecta hasta que el eyaculado o combinación de eyaculados, tuvieran un número adecuado de espermatozoides viables. Inmediatamente después de la colecta, se evaluó el color, el volumen, la concentración espermática, el pH y la osmolaridad tal y como se describe en el *Capítulo I*. Los parámetros seminales (motilidad total, motilidad progresiva, viabilidad, integridad de membrana, integridad del acrosoma y morfoanomalías) se evaluaron como se ha descrito previamente en el *Capítulo I* con algunas modificaciones. En el *Experimento 1*, la motilidad se evaluó de manera objetiva gracias al programa informático ISAS (*Integrated Sperm Analysis System*, Projectes y Serveis R+D S.L., Valencia, España) como se describe en el *Capítulo I* y en el *Experimento 2* se evaluó de manera subjetiva como se describe en el *Capítulo I*. Con el fin de evitar valoraciones sesgadas, se realizaron ensayos ciegos para cada método de congelación. Sólo se utilizaron para los experimentos aquellas muestras seminales cuya motilidad progresiva era igual o superior al 50%.

### 1.4. Congelación seminal

#### 1.4.1. Experimento 1

Las muestras espermáticas obtenidas de Tri38 se congelaron con el diluyente EYB (composición recogida en el *Anexo II*) tal y como se describe en el *Experimento 2* del *Capítulo I*.

Los resultados de la evaluación de los parámetros seminales post-descongelación fueron los siguientes: Motilidad total:  $59,25 \pm 4,7$ ; Motilidad progresiva:  $49,25 \pm 3,7$ ; Viabilidad  $93 \pm 3$ ; integridad del acrosoma (%):  $86,83 \pm 0,7$  y la morfología normal:  $80 \pm 6$ .

#### 1.4.2. Experimento 2

La congelación seminal se realizó empleando tres diluyentes diferentes: un diluyente basado en yema de huevo (EYB-TT, con 6% de glicerol, composición descrita en el *Anexo III*), un diluyente libre de proteínas animales a base de vesículas de lípidos vegetales (LP1<sup>®</sup>, composición descrita en el *Anexo I*) y un diluyente libre de proteínas animales descrito para la congelación seminal en la especie humana y previamente en

la especie de delfín mular HSPM, composición descrita en el *Anexo VI*) (Mahadevan y Trounson, 1983).

Después de la colecta, las muestras se diluyeron 1:1 (v/v) lentamente durante 5 min con los tres diluyentes seminales. Las tres diluciones de esperma se enfriaron lentamente a 5°C (a una velocidad de -0,5°C/min. para los diluyentes EYB-TT y HSPM y a -0,27°C/min. para el diluyente LP1<sup>®</sup>). Transcurrido el tiempo de equilibrado de las muestras, se diluyeron de nuevo con la segunda fracción del diluyente LP1<sup>®</sup> con el fin de obtener una concentración final de glicerol del 3% así como una concentración espermática de 100x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Las muestras seminales diluidas en EYB-TT y LP1<sup>®</sup> se congelaron en pajuelas de 0,5 y 0,25 mL respectivamente, mientras que las muestras seminales diluidas en HSPM se congelaron en criotubos de 3 mL. Las muestras se congelaron en vapores de nitrógeno líquido 4 cm por encima del LN<sub>2</sub> para el diluyente EYB-TT (-9°C/min. durante 15 min) o 4,5 cm por encima del LN<sub>2</sub> las muestras diluidas en LP1<sup>®</sup> y HSPM (-12°C/min. durante 10 min). Finalmente, se sumergieron en nitrógeno líquido para su almacenamiento. La descongelación de las muestras se realizó sumergiendo las pajuelas o criotubos en un baño atemperado a 37°C durante 50 segundos y 2 min respectivamente (Mahadevan y Trounson, 1983; Robeck y O'Brien, 2004).

### 1.5. Validación del *Experimento 1*

El equipo necesario para llevar a cabo el ensayo SCD en el laboratorio (SCD-laboratorio) se compuso de un refrigerador estándar, un microondas para calentar la agarosa, un incubador ajustado a 37°C y un microscopio de epifluorescencia. En nuestro caso, utilizamos un modelo de microscopio de fluorescencia Leica DMLA controlado con el software para el escaneo automático y la digitalización de imágenes (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Este microscopio está equipado con una fuente de luz fluorescente EL6000 con halogenuros metálicos, un dispositivo de carga acoplada (Leica DFC350 FX, Leica Microsystems) y objetivos de 400X y 600X. Se evaluaron trescientos espermatozoides por muestra y se determinó el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado. El ADN espermático se visualizó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el fluorocromo GelRed (Biotium, Hayward, CA, EE.UU).

Las mismas 5 muestras se procesaron de manera similar en condiciones de campo (SCD-campo) con el fin de comparar estos resultados con los resultados de SCD obtenidos en el laboratorio. El objetivo de este experimento fue (1) evaluar cualquier

posible diferencia entre los resultados de la fragmentación de ADN espermático procesado en el laboratorio y en condiciones de campo y (2) poner a prueba la capacidad y la fiabilidad del procedimiento SCD-campo para que se pueda llevar a cabo fuera del laboratorio con equipos que no requieran energía eléctrica. Para este procedimiento de validación, las mismas 5 alícuotas de las muestras evaluadas en el laboratorio, se procesaron en condiciones de campo tras una incubación a 37 ° C a T0, T4 y T48.

Los equipos necesarios para las condiciones de campo incluyeron un microscopio BA310E Motic equipado con una batería (Motic, Barcelona, España; *Figura 28c*) y con un módulo de fluorescencia LED que contiene un bloque de filtros que consiste en un excitador 470, 480 dicroico y un filtro de barrera 485. Esta configuración ha sido diseñada para tinción con Auramina O, pero también es muy eficiente para la visualización con SYBR Green. Además, se utilizó un aerosol de CO<sub>2</sub> para producir una superficie "fría" sobre el portaobjetos (*Figura 28b*). Para calentar el agua y realizar la incubación de los espermatozoides, se utilizó un termo de transporte específico para el transporte de muestras seminales (MT 47/40, Minitüb) prefijado a 37°C. Este dispositivo se puede conectar a la batería del coche durante el transporte de las muestras (*Figura 28a*).

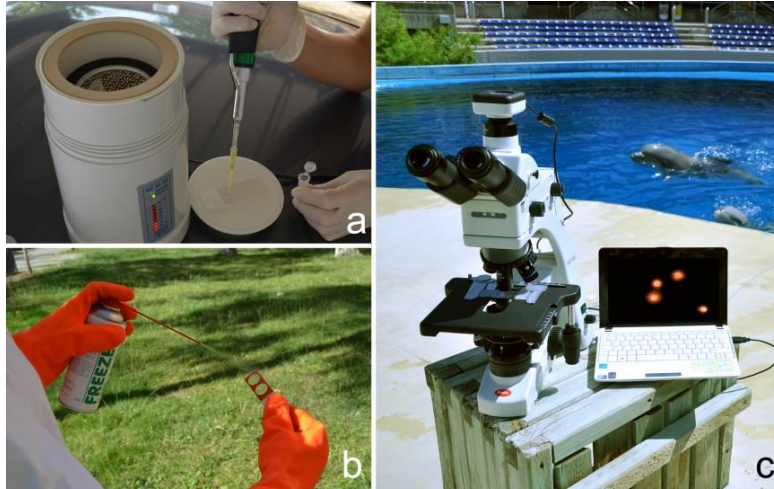


Figura 28. Equipo básico para realizar el ensayo de dispersión de la cromatina espermática en condiciones de campo; (a) incubador portátil prefijado a 37°C para la incubación las muestras, (b) aerosol de CO<sub>2</sub> para acelerar la gelificación, (c) microscopio de fluorescencia LED.

### 1.6. Ensayo de dispersión de la Cromatina nuclear espermática (SCDt)

Las muestras seminales se diluyeron en INRA 96 (IMV Inc., L'Aigle Cedex, Francia) a una concentración entre  $10 \times 10^6$  y  $15 \times 10^6$  espermatozoides/mL y se añadieron 25  $\mu$ L a un vial que contenía agarosa de bajo punto de fusión, que se calentó previamente en el microondas (SCD-laboratorio) y atemperado a 37°C en un baño o con el termo de transporte (SCD-campo). Los espermatozoides se mezclaron suavemente con la agarosa y se añadieron 10  $\mu$ L de la mezcla sobre un portaobjetos pre-tratado y se cubrió finalmente con un cubreobjetos de vidrio. A continuación, la muestra se solidificó por enfriamiento sobre una superficie metálica refrigerada (4°C) durante 5 min (SCD-laboratorio) o mediante el uso de la pulverización de CO<sub>2</sub> sobre el porta objetos (SCD-campo); realizándose la pulverización se realice a 10 cm de distancia (Figura 28b).

Una vez que se formó el microgel, se retiró el cubreobjetos cuidadosamente y el portaobjetos se colocó horizontalmente en 10 mL de la solución de lisis proporcionada en el kit durante 5 min con el fin de producir la depleción controlada de la proteína. Esto se puede realizar a temperatura ambiente pero nunca a temperaturas inferiores a 15°C. Debido a que la temperatura puede ser impredecible en condiciones de campo, se recomienda llevar a cabo la etapa de la lisis en la parte superior del incubador portátil ajustado a 37°C como se muestra en la Figura 28a. A continuación, se lavó la preparación en agua destilada durante 5 min y posteriormente se pasó por

diluciones secuenciales de etanol (70%, 90%, y 100%). En el laboratorio, se tiñeron los espermatozoides con Gel-Red (Biotium, Hayward, CA, EE.UU.) para visualizar el DNA teñido de rojo y con 2,7-dibromo-4-hidroxi mercurifluoresceína (Sigma Aldridge, Irvine, UK) para visualizar las-proteínas teñidas de verde. Este método de doble tinción permite la diferenciación del ADN de las proteínas espermáticas. En el campo, se utilizó un módulo de fluorescencia LED y se adaptó el fluorocromo a la longitud de onda correspondiente. Para este experimento se empleó el fluorocromo Sybr-Green (Molecular Probes, Eurogene, OR).

### 1.7. Ensayo Cometa

El ensayo Cometa bajo condiciones neutras revela el daño en el ADN de doble cadena (Ds-DNAd), mientras que el ensayo Cometa bajo condiciones alcalinas permite la detección de daño de ADN de cadena sencilla (ss-DNAd). Ambas pruebas pueden llevarse a cabo simultáneamente en el mismo microgel de agarosa y este proceso (ensayo Cometa de dos colas o Cometa-2T) permite la identificación de daño de cadena sencilla y doble en el mismo espermatozoide; los daños de cadena doble se observaron en el eje de las X, mientras el daño de cadena sencilla (Ss-DNAd) se observó en el eje de las Y. Para el ensayo Cometa-2T, los espermatozoides se cargaron inicialmente en microgeles como se ha descrito para el ensayo SCD. Para el ensayo Cometa neutro, los espermatozoides se sometieron durante 5 min a la misma solución de lisis que la utilizada para el ensayo SCD y se incubaron en un tampón Tris-borato-EDTA (TBE 1X) (0,089 M Tris, ácido bórico 0,089 M y 0,002 M de EDTA) durante 15 min. La primera electroforesis se realizó durante 12 min a 20 voltios y dio lugar a fragmentos de ADN de doble cadena que migraron desde el cátodo al ánodo. El portaobjetos de microgel se sumergió en una solución de cloruro sódico al 0,9% durante 2 min seguido por 5 min en 0,4 M tampón Tris-hidrocloruro (pH 7,5) y 2 min en TBE (1X). A continuación, el porta objetos se transfirió a una solución alcalina fría (4°C) (0,03 M de hidróxido de sodio y cloruro sódico 1 M, pH= 12,5) durante 2 min y 30 s. Después, se sometió a una segunda electroforesis durante 4 min a 20 voltios en una solución alcalina a temperatura ambiente, pero con una orientación a 90° de su posición inicial en el campo eléctrico. Este proceso provoca la liberación de fragmentos de ADN causados por daño de ADN de cadena sencilla a migrar hacia el ánodo. Con el fin de desecar los microgeles, los portaobjetos se colocaron en un tampón Tris-hidrocloruro durante 5 min, seguido de 2 min en TBE (1X) y finalmente 2 min en cada concentración de etanol (70%, 90% y 100%). Los cometas de ADN espermático se tiñeron con IP bajo microscopio de fluorescencia (X600); se analizaron 200 células para cada muestra seminal.

### **1.8. Dinámica de fragmentación del ADN espermático con el ensayo SCD en espermatozoides tras la colecta y post-descongelación.**

Para la evaluación de la dinámica de fragmentación del ADN espermático, se diluyeron las muestras seminales con INRA 96 (IMV Inc., L'Aigle Cedex, Francia) inmediatamente después de la colecta y de la descongelación con el fin de obtener una concentración final de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL y se incubaron a 37°C. La dinámica de fragmentación de ADN espermático se evaluó inmediatamente después de la colecta seminal (T0), y después de 1 (T1), 4 (T4), 8 (T8), 24 (T24), 48 (T48) y 72 (T72) horas de incubación a 37°C, mientras que la dinámica de muestras descongeladas se evaluó a T0 (inmediatamente después de la descongelación), después de 0,5 (T0.5), 1 (T1), 4 (T4), 8 (T8), 24 (T24) y 48 (T48) horas de incubación a 37°C. Se utilizaron un total de 5 delfines para el análisis de muestras de semen fresco (SI33, CO16, Ty19, ST14 y Ki9), pero St14 no se incluyó en el estudio de muestras descongeladas porque se obtuvo un único eyaculado para este animal y tenía calidad suficiente para la congelación.

### **1.9. Captura de imagen y procesamiento de las mismas**

Los espermatozoides se visualizaron en el laboratorio utilizando un microscopio Leica DMRB y las imágenes se capturaron utilizando un CCD Leica DFC350 FX. Se realizó una fusión de las imágenes resultantes con asignación de canal para el rojo (ADN) y verde (proteínas; *Figura 29a*) con el fin de delimitar el ADN y las proteínas de dominio. Las imágenes se convierten en archivos RGB.

### **1.10. Análisis estadístico**

Las dinámicas de la pérdida de la integridad del ADN y las diferencias entre los eyaculados se analizaron mediante la prueba no paramétrica de máxima verosimilitud de Kaplan-Meier. Asimismo, se utilizó la prueba de log-rank (Mantel-Cox), que estima las funciones debidas al azar entre los dos grupos en cada intervalo de tiempo. Se empleó un análisis univariado para identificar las diferencias entre el ensayo SCD y el ensayo Cometa así como entre el ensayo SCD-laboratorio y el ensayo SCD-campo utilizando la prueba Mann-Whitney U-test. El análisis de correlación entre el ensayo SCD y el ensayo Cometa se realizó usando un test de Pearson no paramétrico.

El análisis de las diferencias en los parámetros de calidad espermática se realizó mediante un análisis factorial de varianza con el siguiente modelo estadístico:

$$x_{ij} = \mu + A_i + a_j + A_{ij} + \epsilon_{ij}$$

$x_{ij}$  = medida analizada (parámetros de calidad seminal)

$\mu$  = media general

$A_i$  = efecto del eyaculado ( $i = 1...4$ )

$a_j$  = efecto animal ( $j = 1...5$ )

$A_{ij}$  = interacción

$\epsilon_{ij}$  = residuo.

El efecto eyaculado se consideró como efecto fijo y el animal se consideró un efecto aleatorio.

Un modelo similar se utilizó para el análisis de las diferencias entre diluyentes:

$$x_{ij} = \mu + B_i + a_j + B_{ij} + \epsilon_{ij}$$

$B_i$  = el efecto del diluyente ( $i = 1...2$ )

$a_j$  = el efecto animal ( $j = 1...6$ )

$B_{ij}$  = la interacción

$\epsilon_{ij}$  = el residuo.

El efecto diluyente se consideró como efecto fijo y el animal se consideró un efecto aleatorio.

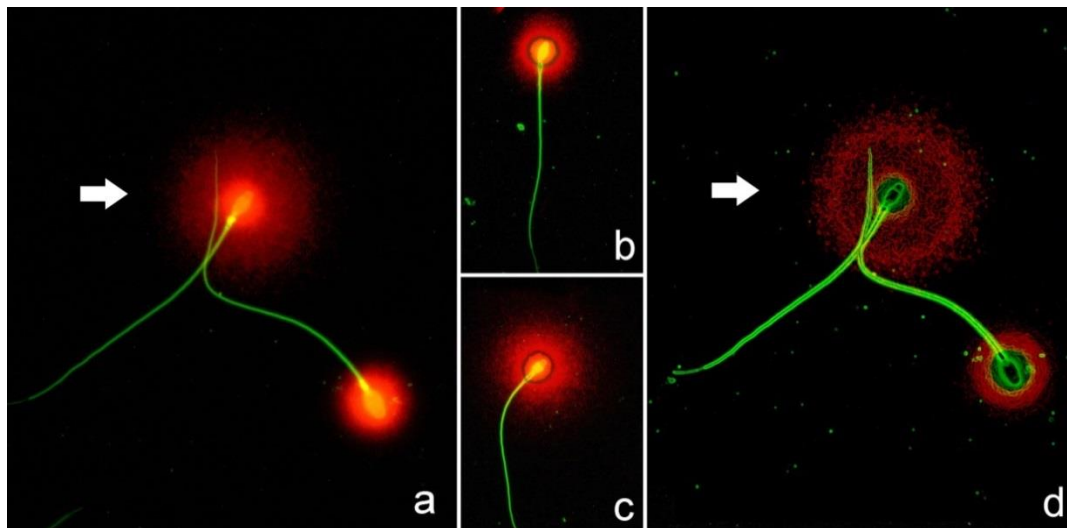
Las diferencias entre los eyaculados y entre los diluyentes se estimaron utilizando múltiples de Student -Newman- Keuls. Se utilizó el análisis de correlación de Pearson para la evaluación de los parámetros de calidad seminal y la fragmentación del ADN espermático. El nivel de significación se estableció en  $P < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v.17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

## 2. RESULTADOS

### 2.1. Experimento 1

#### 2.1.1. Ensayo de dispersión de la cromatina espermática

Se observaron características similares entre las imágenes obtenidas con el ensayo SCD en delfín mular y las obtenidas en otras especies de mamíferos no humanos. Se obtuvieron dos morfotipos principales en los espermatozoides descongelados de delfín mular empleando el ensayo SCD: los espermatozoides con ADN fragmentado presentaban un núcleo espermático con un halo grande disperso, irregular y punteado que emergía de un núcleo compacto (primer morfotipo, *Figura 29a*, (flecha) *Figura 29c*), mientras que los espermatozoides que contenían ADN no fragmentado mostraron un pequeño halo compacto rodeado por un núcleo denso compacto de ADN no disperso (segundo morfotipo, *Figura 29a*, *29b*). El flagelo se distinguía claramente de la cromatina mediante la tinción fluorescente doble (emisión verde de las proteínas y emisión roja del ADN, *Figura 29*). El espermatozoide se tiñó en su totalidad con el fin de ilustrar tanto la distribución como las proporciones relativas de las proteínas en el espermatozoide (teñidas en verde). El núcleo, que resistió parcialmente a la depleción proteica mostró un color amarillo debido a la mezcla de rojo y verde en esta región (*Figura 29a*). El filtrado electrónico de las imágenes originales permitió la mejora de la distribución de las proteínas y del ADN después del ensayo SCD (*Figura 29d*). Los resultados de la tasa de fragmentación en el ADN espermático (SDF) obtenidos en este experimento se muestran en la *Tabla 5*.



*Figura 29.* Fragmentación del ADN espermático de delfín mular después del ensayo de dispersión de la cromatina nuclear espermática. (a) Dos espermatozoides: el primero con ADN fragmentado (flecha) y el segundo con ADN no fragmentado; (b) Espermatozoide con ADN no fragmentado; (c) Espermatozoide con ADN fragmentado; (d) Imagen con filtro electrónico para ilustrar la distribución del ADN (fluorescencia roja) y de las proteínas (fluorescencia verde).

Tabla 5. Fragmentación del ADN espermático (%) empleando el ensayo Cometa-2T y el ensayo SCD a diferentes tiempos de incubación (T0, T0.5, T1, T4, T24 y T48).

		Ensayo Cometa-2T (%)			Ensayo SCD (%)			
		S+DS	DS+SS	SS	SDF-Cometa	SDF-lab	SDF-campo	r-SDF-lab
T0	M-1	1.3	0.3	0.6	2.2	2.0	1.7	
	M-2	1.6	0.0	0.0	1.6	2.2	2.3	
	M-3	1.3	0.3	0.6	2.2	1.7	1.7	
	M-4	1.6	1.6	1.0	4.2	3.0	4.5	
	M-5	1.0	0.0	2.6	3.6	2.3	2.3	
	<b>Media</b>	<b>1.4 ± 0.3</b>	<b>0.44 ± 0.7</b>	<b>1.0 ± 1.0</b>	<b>2.8 ± 1.1</b>	<b>2.2 ± 0.5</b>	<b>2.5 ± 1.2</b>	
T0.5	M-1					1.1		
	M-2	1.0	1.0	1.7	3.7	2.7		
	M-3	0.8	2.3	3.2	6.3	1.3		
	M-4					3.0		
	M-5	0.7	2.3	3.3	6.3	1.3		
	<b>Media</b>	<b>0.8 ± 0.2</b>	<b>1.9 ± 0.8</b>	<b>2.7 ± 0.9</b>	<b>5.4 ± 1.5</b>	<b>2.1 ± 0.9</b>		
T1	M-1	1.4	1.0	3.0	5.4	3.0		
	M-2	1.0	1.0	4.0	6.0	1.2		
	M-3	6.7	5.7	1.7	14.1	3.7		
	M-4					4.0		
	M-5	6.7	5.5	1.7	13.9	3.7		
	<b>Media</b>	<b>4.0 ± 3.2</b>	<b>3.3 ± 2.7</b>	<b>2.6 ± 1.1</b>	<b>9.9 ± 4.8</b>	<b>3.1 ± 1.1</b>		<b>0.9</b>
T4	M-1	14.7	4.0	32.3	51.0	22.0	18.0	
	M-2	14.7	4.0	32.3	51.0	21.0	22.0	
	M-3	33.7	9.3	0.3	43.3	38.0	41.0	
	M-4					25.0	23.0	
	M-5	33.7	9.3	0.3	43.3	37.0	37.0	
	<b>Media</b>	<b>24.2 ± 11.0</b>	<b>6.7 ± 3.1</b>	<b>16.3 ± 18.5</b>	<b>47.2 ± 4.4</b>	<b>30.0 ± 8.3</b>	<b>28.2 ± 10.1</b>	<b>9.0</b>
T24	M-1	76.7	10.3	11.0	98.0	61.0		
	M-2	29.1	39.8	22.3	91.2	60.0		
	M-3	44.0	34.0	21.0	99.0	76.3		
	M-4	93.0	2.3	2.0	97.3	77.0		
	M-5	44.0	34.0	21.0	99.0	75.0		
	<b>Media</b>	<b>57.4 ± 26.5</b>	<b>24.1 ± 16.6</b>	<b>15.5 ± 8.8</b>	<b>96.9 ± 3.3</b>	<b>69.9 ± 8.6</b>		<b>2.0</b>
T48	M-1	85.0	8.0	6.0	99.0	73.0	82.0	
	M-2	47.6	43.8	7.4	98.8	80.0	84.0	
	M-3	56.2	40.0	2.6	98.8	88.0	85.0	
	M-4	95.9	3.1	0.0	99.0	85.0	90.0	
	M-5	96.8	1.2	2.0	100	79.0	85.0	
	<b>Media</b>	<b>76.3 ± 23.0</b>	<b>19.2 ± 20.9</b>	<b>3.6 ± 3.0</b>	<b>99.1 ± 0.5</b>	<b>81.0 ± 5.8</b>	<b>85.2 ± 2.9</b>	<b>0.5</b>

S: cometa estructural; DS: cometa con rotura de doble cadena; SS: cometa con rotura de cadena sencilla; M: muestra espermática; rSDF: Tasa de incremento de la fragmentación del ADN espermático; SDF-lab: Tasa de fragmentación del ADN espermático en condiciones de laboratorio. SDF-campo: Tasa de fragmentación del ADN espermático en condiciones de campo.

### 2.1.2. Puesta a punto de las dinámicas de fragmentación del ADN espermático

Se obtuvo un nivel medio de fragmentación del ADN espermático a T0 de  $2,2 \pm 0,5$  del ADN en Tri38 empleando el ensayo SCD. Se observó un aumento significativo en el daño del ADN espermático tras la incubación a 37°C (*Tabla 5*). Asimismo, la *Tabla 5* aporta información sobre la tasa de incremento del daño del ADN espermático. Las diferencias de daño del ADN espermático entre eyaculados se observaron hasta las 48 horas de incubación ( $P=0,002$ ).

### 2.1.3. Ensayo del cometa

Tras el ensayo Cometa-2T, se observaron tres categorías principales de espermatozoides (*Figura 30*). El primer grupo de espermatozoides mostró una pequeña cola de cometa localizado en el eje de las ordenadas (Y) así como un núcleo compacto que corresponde a cometas estructurales (*Figura. 30a*). Los dos otros grupos indicaron la presencia de daño en el DNA espermático. El primero de ellos está representado en la *Figura 30b* y se caracterizó por la migración de fragmentos de ADN en la misma dirección que las descritas para los cometas estructurales, pero con un núcleo más pequeño y una cola de cometa más larga. En este caso, no se detectó una migración perpendicular de fragmentos de ADN (eje X) por lo que este tipo correspondía a un daño en cadena sencilla del ADN (Ss-DNAd). El segundo grupo de espermatozoides con ADN dañado (*Figura 30c*) se caracterizó por la migración del ADN en dos direcciones (eje X y eje Y). Se observó el daño en la cadena sencilla de ADN (Ss-DNAd; eje Y) y en la cadena doble de ADN (Ds-DNAd; eje X). Los resultados obtenidos con el ensayo Cometa-2T se muestran en la *Tabla 5*. El nivel medio porcentual de fragmentación del ADN espermático fue el siguiente: a T0 fue de  $2,8 \pm 1,1$ . Tras 0,5, 1, 4, 24 y 48h de incubación a 37°C, el nivel medio (%) de la fragmentación del ADN espermático fue de  $5,4 \pm 1,5$ ,  $9,9 \pm 4,9$ ,  $47,2 \pm 4,4$ ,  $96,9 \pm 3,3$  y  $99,1 \pm 0,5$ , respectivamente. No se encontraron diferencias entre el ensayo SCD y el ensayo Cometa-2T en cuanto a la detección de del daño del ADN espermático de cadena sencilla y doble. ( $U=309.000$  y  $Z=-2.085$ ). Por lo tanto, se observó una alta correlación entre estas dos técnicas ( $r=0,961$ ,  $P<0,001$ ; *Figura 31a*).

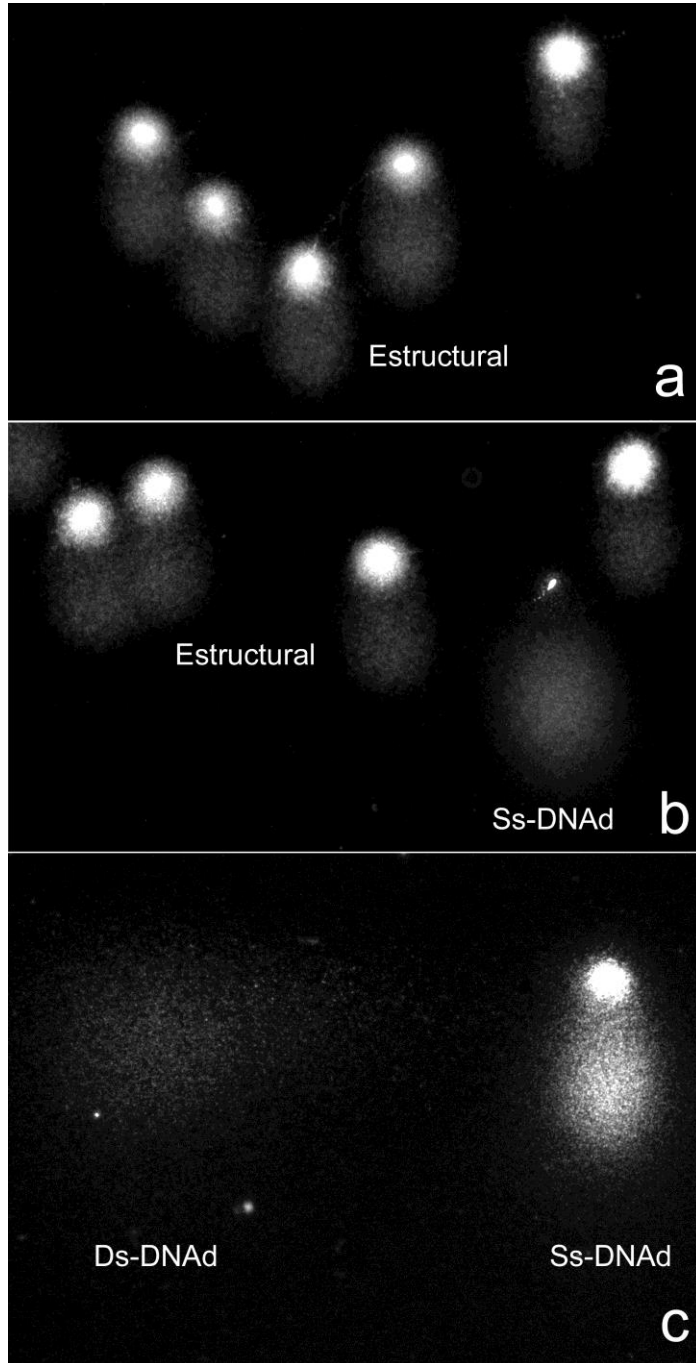


Figura 30. Ensayo Cometa-2T de ADN espermático en el delfín mular. (a) ADN no fragmentado se visualiza como núcleos espermáticos con una pequeña cola de cometa; (b) Rotura de cadena sencilla de ADN presente en uno de espermatozoides (Ss-DNA); (c) Ss-DNA y rotura de doble cadena de ADN (Ds-DNA) que se visualizan como dos grandes colas de cometa con migración en posición perpendicular.

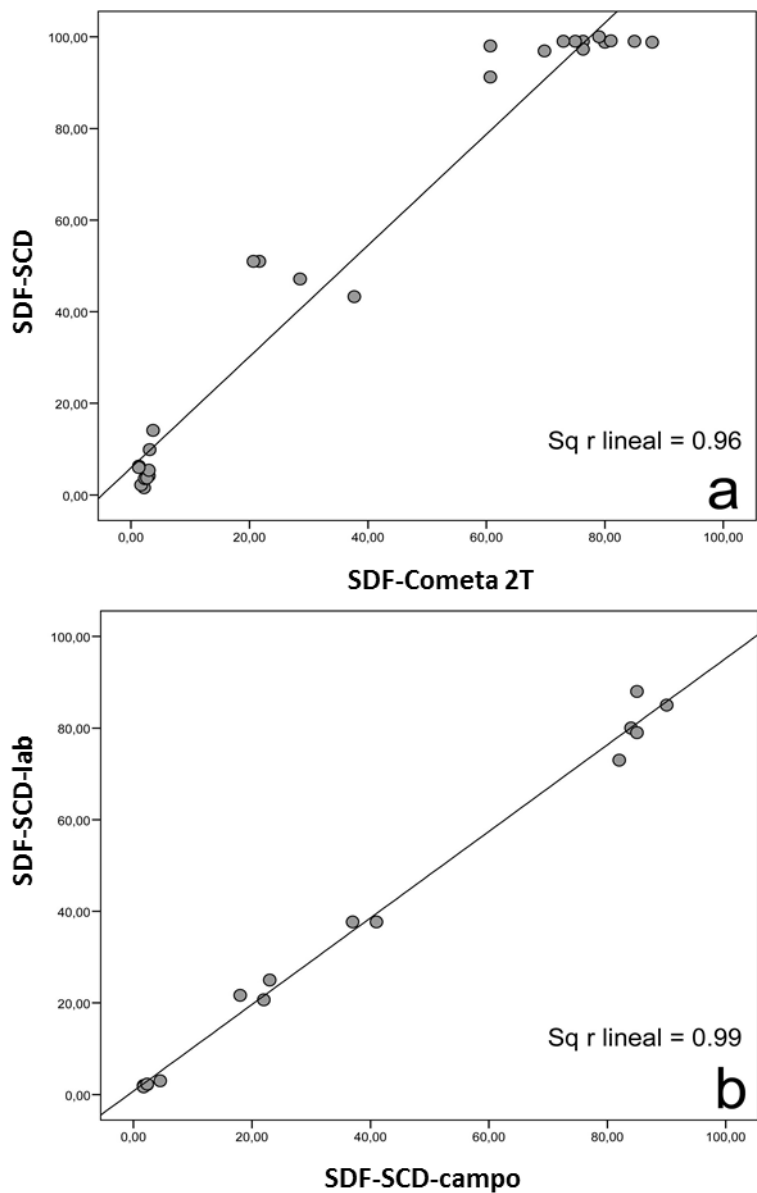


Figura 31. (a) Correlación entre la tasa de fragmentación del ADN espermático (SDF) entre el ensayo de dispersión de la cromatina (SCD) y el ensayo Cometa-2T en condiciones de laboratorio (SCD-Lab) ( $r=0,961$ ,  $P<0,01$ ), (b) Correlación entre la tasa de espermatozoides con ADN fragmentado después del ensayo SCD en condiciones de laboratorio y de campo (SCD-campo) ( $r=0,993$ ,  $P<0,01$ ).

#### **2.1.4. SCD-Laboratorio versus SCD-Campo.**

No se observó ninguna diferencia significativa entre SCD-laboratorio y SCD-campo ( $U=107,0$ ;  $Z=-0,228$ ) en ningún momento durante la incubación y se observó una alta correlación entre los valores de daño de ADN espermático procesado bajo las dos condiciones diferentes ( $r=0,993$ ,  $P=0,01$ ; *Figura 31b*).

### **2.2. Experimento 2**

#### **2.2.1. Evaluación de las muestras seminales en fresco**

Las características seminales así como las dinámicas de fragmentación de las muestras de semen fresco de los cinco delfines mulares se resumen en la *Tabla 6*. Las diferencias significativas en las características seminales entre los animales sólo se observaron para los parámetros de viabilidad ( $P<0,05$ ) y morfología normal ( $P<0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas observadas en las características seminales convencionales entre los eyaculados 1 y 2 de cada delfín obtenidos en el mismo día. Se observó, sin embargo, una menor tasa de fragmentación del ADN espermático en el segundo eyaculado con respecto al primero en CO16 ( $P=0,003$ ), S133 ( $P=0,001$ ) y Ki9 ( $P=0,083$ ) a T0. No se encontraron diferencias entre el primer y segundo eyaculado en Ty19 ( $P=0,285$ ).

*Tabla 6.* Características seminales tras la colecta de los eyaculados de delfín mular (n=5).

	Si33	Co16	Ty19	Ki 9	St14
N	3	3	4	4	1
pH	8.0 ± 0.1	7.9 ± 0.1	7.8 ± 0.3	8.0 ± 0.1	7.8
Osmolaridad (mOsm/Kg)	335 ± 16.5	316.7 ± 19.1	329.5 ± 9.2	338.3 ± 31.8	-
Motilidad total (%)	91.7 ± 2.9	83.3 ± 5.8	77.5 ± 9.6	80.0 ± 8.7	65
Motilidad progresiva (%)	80.0 ± 15.0	76.7 ± 5.8	70.0 ± 14.1	53.3 ± 5.8	55
Tasa cinética	5.0 ± 0.0	4.8 ± 0.4	5.0 ± 0.0	4.3 ± 0.6	4.5
Conc. spz x 10 <sup>6</sup> /mL	37.3 ± 33.5	413.3 ± 206.5	102.0 ± 105.6	250.0 ± 261.5	7
Viabilidad (%) <sup>a</sup>	88.3 ± 3.01	94.0 ± 3.0	90.8 ± 7.1	76.3 ± 3.1	82
Morfología normal (%) <sup>a</sup>	80.3 ± 1.2	85.0 ± 3.6	80.0 ± 2.9	73.7 ± 6.1	75
Morfoan. de flagelo (%)	5.3 ± 3.5	2.7 ± 3.8	5.5 ± 2.6	3.7 ± 3.2	12
Morfoan. de cabeza (%)	6.3 ± 1.5	2.7 ± 2.3	2.8 ± 0.9	5.0 ± 3.0	3
Morfoan. de PI (%)	12.0 ± 9.8	10.0 ± 3.5	12.5 ± 2.5	18.0 ± 3.6	10
Acrosoma intacto (%)	84.3 ± 8.7	87.7 ± 9.9	88.3 ± 3.4	75.7 ± 0.6	89
Int de membrana (%)	69.0 ± 5.3	67.0 ± 19.7	66.5 ± 5.5	71.0 ± 13.7	ND
SFI (T0)	0.7 ± 1.6	0.7 ± 0.6	1.5 ± 1.3	2.0 ± 2.0	0

Conc. spz: Concentración espermática; Morfoan.: Morfoanomalías; PI: Pieza intermedia; Int. Membrana (%): integridad de la membrana espermática; SFI: Índice de fragmentación espermática.

<sup>a</sup>,  $P < 0,05$ , análisis de varianza factorial.

Las dinámicas de fragmentación del ADN espermático en fresco están recogidas en la *Tabla 7*, tanto la media de los eyaculados individuales para cada uno de los delfines como la media de los eyaculados de todos los delfines. Cuando las muestras se consideraron como un grupo, no se observó un aumento significativo en la tasa de fragmentación del ADN espermático en todo el período de incubación de 72h. Sin embargo, uno de los delfines en el estudio individual (Si33) mostró un aumento masivo de la fragmentación del ADN espermático trascurridas 72h de incubación ( $93,0 \pm 9,9$ ). Cuando se comparó la dinámica de fragmentación entre el primero y segundo eyaculado de los diferentes individuos recogidos en el mismo día, no se observaron diferencias entre los individuos ( $P=0,13$ ).

Tabla 7. Media ( $\pm$ SEM) de las dinámicas de fragmentación del ADN espermático de cinco individuos de delfín mular tras la colecta y la incubación a 37°C durante 72h.

Animal	N	Tiempo de incubación (h)						
		0	1	4	8	24	48	72
Si33	3	0.7 $\pm$ 1.6	1.3 $\pm$ 1.5	1.7 $\pm$ 1.5	3.0 $\pm$ 3.0	2.7 $\pm$ 2.3	3.7 $\pm$ 2.5	93.0 $\pm$ 9.9
Co16	3	0.7 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 1.5	1.7 $\pm$ 2.0	2.3 $\pm$ 2.3	3.3 $\pm$ 3.2	8.7 $\pm$ 5.9	6.5 $\pm$ 6.4
Ty19	4	1.5 $\pm$ 1.3	1.3 $\pm$ 1.5	2.0 $\pm$ 1.6	2.8 $\pm$ 1.0	4.8 $\pm$ 3.0	11.8 $\pm$ 5.6	10.0 $\pm$ 1.4
Ki9	3	2.0 $\pm$ 2.0	1.7 $\pm$ 1.5	1.3 $\pm$ 1.2	2.0 $\pm$ 0.0	3.3 $\pm$ 2.3	6.7 $\pm$ 6.4	9.0 $\pm$ 4.2
St14	1	0	1.0	1.0	3.0	2.0	26.0	
Media ( $\pm$ DE)	14	1.1 $\pm$ 1.3	1.6 $\pm$ 1.3	1.6 $\pm$ 1.5	2.6 $\pm$ 1.6	3.5 $\pm$ 2.5	9.3 $\pm$ 7.2	29.6 $\pm$ 39.4

### 2.2.2. Evaluación de las muestras descongeladas

La Tabla 8 recoge la evaluación de las características seminales inmediatamente después de la descongelación (T0) de las muestras previamente congeladas con los diferentes diluyentes. No se encontraron diferencias entre los distintos diluyentes en cuanto a la motilidad progresiva, la tasa cinética y la morfología normal. Sin embargo, se observó una mayor motilidad total ( $P < 0,05$ ), integridad del acrosoma ( $P < 0,05$ ) e integridad de la membrana ( $P < 0,01$ ) en las muestras congeladas con los diluyentes LP1<sup>®</sup> y HSPM con respecto al EYB-TT. No se observaron diferencias en la fragmentación del ADN espermático entre los diferentes diluyentes inmediatamente después de la descongelación (T0).

Tabla 8. Características seminales de delfín mular tras la descongelación (n=4), muestras congeladas con tres diluyentes seminales diferentes.

	EYB-TT	LP1 <sup>®</sup>	HSPM
Motilidad total (%)	56.3 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	68.8 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>	65.0 $\pm$ 7.1 <sup>b</sup>
Motilidad progresiva (%)	65.0 $\pm$ 5.8	73.8 $\pm$ 4.8	75.0 $\pm$ 7.1
Tasa cinética (0-5)	3.8 $\pm$ 0.5	4.7 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 0.0
Morfología normal	64.8 $\pm$ 6.8	75.8 $\pm$ 7.1	74.0 $\pm$ 11.3
Morfoan. de flagelo (%)	14.0 $\pm$ 5.3	6.0 $\pm$ 4.1	5.0 $\pm$ 1.4
Morfoan. de cabeza (%)	2.8 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 8.1	5.0 $\pm$ 2.8
Morfoan. de PI (%)	19.8 $\pm$ 7.6	8.5 $\pm$ 6.5	16.0 $\pm$ 9.9
Integridad del acrosoma (%)	57.5 $\pm$ 9.3 <sup>a</sup>	71.5 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	75.5 $\pm$ 9.2 <sup>b</sup>
Integridad de membrana (%)	43.0 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	60.5 $\pm$ 5.0 <sup>b</sup>	63.0 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>
% SDF (T0)	1.3 $\pm$ 1.0	1.8 $\pm$ 1.5	1.5 $\pm$ 0.7

a vs b,  $P < 0,05$ , análisis de varianza factorial,  $P < 0,05$  Kaplan-Meier (SDF).

Las dinámicas de fragmentación del ADN espermático tras la descongelación están recogidas en la *Tabla 9*. Durante las primeras 8 horas de incubación a 37°C después de la descongelación, la tasa de fragmentación del ADN espermático se mantuvo a niveles basales y no se encontraron diferencias entre los tres diluyentes. A partir de las 24 horas de incubación, los espermatozoides congelados con el diluyente LP1<sup>®</sup> mostraron un nivel de ADN fragmentado mayor que los espermatozoides congelados con los diluyentes EYB-TT y HSPM.

*Tabla 9.* Media ( $\pm$ SEM) de las dinámicas de fragmentación de ADN espermático de 4 individuos de delfín mular tras la criopreservación con 3 diluyentes diferentes y la incubación a 37°C durante un periodo de 48h.

	Tiempo de incubación (h)						
	0	0.5	1	4	8	24	48
EYB-TT	1.3 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>
LP1 <sup>®</sup>	1.8 $\pm$ 1.5	1.5 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 1.5	2.3 $\pm$ 1.5	2.7 $\pm$ 1.2	6.0 $\pm$ 6.1 <sup>b</sup>	10.5 $\pm$ 7.3 <sup>b</sup>
HSPM	1.5 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.7	3.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>

a vs b,  $P < 0,05$ , Kaplan-Meier.

### **2.2.3. Correlación entre las características seminales y la fragmentación del ADN espermático**

No se observó correlación entre ninguno de los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático, tanto en fresco como en las dinámicas de fragmentación transcurrida la incubación a 37°C.

### 3. DISCUSIÓN

Los resultados del *Experimento 1* revelaron que (1) el ensayo SCD modificado constituye una metodología eficaz para la detección de la fragmentación del ADN espermático en el delfín mular y (2) que puede llevarse a cabo en condiciones de campo utilizando microscopía de fluorescencia LED ya que se obtienen resultados equivalentes a los obtenidos en condiciones de laboratorio.

Además, se observó una fuerte correlación entre el ensayo cometa y el ensayo SCD. Por lo tanto, se puede concluir que los grandes halos observados como resultado del ensayo SCD son representativos de la presencia de roturas de cadena sencilla y/o doble del ADN espermático en el delfín. Al realizar el ensayo Cometa, los espermatozoides con una cola del cometa pequeña corresponden a cometas estructurales en esta especie y se relacionan principalmente con la presencia de sitios lábiles alcalinos repartidos en el esperma maduro de todas las especies de mamíferos, lo que significa que no están relacionados con la presencia de daño en el ADN.

La evaluación del daño en el ADN espermático empleando el ensayo SCD se ha descrito en una variedad de mamíferos, incluyendo los seres humanos (Zini y Libman, 2006), los mamíferos euterios no humanos (Fraser y Strzezek, 2004), metaterios (Johnston *et al.*, 2007; Zee *et al.*, 2009) e incluso un prototerio (Johnston *et al.*, 2009). Como el ensayo SCD se valida progresivamente a través de estas especies, existe actualmente un correspondiente aumento de los conocimientos sobre la dinámica de fragmentación de ADN espermático, que revela diferencias significativas en la tasa de fragmentación del ADN, no sólo entre especies (Gosálvez *et al.*, 2011b), sino también entre los individuos (Pérez-Llano *et al.*, 2006; López-Fernández *et al.*, 2007; Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2008a; Portas *et al.*, 2009; López-Fernández *et al.*, 2010) e incluso entre eyaculados sucesivos de un mismo individuo (Foote, 1978; Squires *et al.*, 1979; England, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Ambriz *et al.*, 2002; Yuen *et al.*, 2009; Sánchez-Martín *et al.*, 2013).

La evaluación de la dinámica de fragmentación del ADN espermático tras la incubación confirma que el espermatozoide de delfín está sujeto a un daño iatrogénico que resulta en un mayor número de roturas de cadenas simple y doble de ADN. Es interesante destacar que, inmediatamente después de la descongelación, el nivel de fragmentación de ADN espermático es bajo, lo que indica que la criopreservación por sí sola tiene muy poco efecto sobre la rotura de ADN espermático, y que el daño sólo fue detectable tras la incubación. Este es un tema

controvertido en la literatura, ya que algunos estudios afirman que la criopreservación afecta el nivel de daño en el ADN espermático (Zribi *et al.*, 2010). Sin embargo, en este estudio no hemos podido ver este efecto ya sea utilizando el ensayo Cometa o el ensayo SCD.

Sugerimos que el ADN *per se*, no se ve afectado por el procedimiento de criopreservación, pero el daño criogénico causado a la célula durante el proceso de congelación-descongelación finalmente contribuye al daño oxidativo y al aumento en el daño de ADN espermático durante la incubación. Si bien la estabilidad del ADN espermático después de la crioconservación ha sido reportado en otras especies, incluyendo a la especie humana (Duru *et al.*, 2001), el cerdo (Evenson *et al.*, 1994) y el toro (van der Schans *et al.*, 2000) entre otros, la fragmentación del ADN espermático en el delfín mular utilizado en el *Experimento 1* mostró un aumento detectable en el nivel de daño en el ADN espermático después de 1 hora de incubación a 37°C.

Asimismo, se observó un aumento similar de la fragmentación del ADN espermático al comparar el ensayo SCD con en el ensayo Cometa. La correlación positiva entre estas dos técnicas se ha observado también en espermatozoides de diferentes especies, incluyendo a la especie humana, tras la descongelación (Fernández *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2005b; Enciso *et al.*, 2006a; Enciso *et al.*, 2006b; Zee *et al.*, 2009). Otros estudios también han encontrado una alta correlación entre el ensayo SCD y otros ensayos de evaluación de la integridad de ADN tales como el ensayo SCSA y TUNEL (Fernández *et al.*, 2005b; Chohan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010) demostrando la eficacia de esta técnica.

Los resultados del *Experimento 1* se corroboran con un estudio previo en muestras descongeladas de delfín mular donde la tasa de fragmentación del ADN espermático evaluada con la técnica SCSA es basal inmediatamente después de la congelación ( $6,6 \pm 4,1\%$ ). Sin embargo, en el *Experimento 1*, la fragmentación del ADN espermático de Tri38 aumenta a partir de una hora de incubación. Estos resultados están en desacuerdo con el estudio previamente citado donde la fragmentación se mantiene estable después de 6h y 24h de incubación (Montano *et al.*, 2012). Creemos que las diferencias en estos resultados se basan en la edad del donante del *Experimento 1*. El delfín tenía 38 años por lo que no se puede descartar que la dinámica de fragmentación de ADN de este animal en particular esté relacionada con su edad. Por otra parte, se ha demostrado en la especie humana y en otras especies de mamíferos, que existen diferencias en la dinámica de fragmentación del ADN entre los individuos e incluso entre diferentes eyaculados del mismo individuo (Fraser y

Strzerek, 2004). En efecto, en el *Experimento 2*, realizado en individuos más jóvenes, se puso en evidencia que el ADN espermático tras la colecta parece ser particularmente resistente al deterioro cuando se incuban *in vitro* durante un máximo de 72h a 37°C y, en muestras descongeladas no se observó un aumento significativo de la tasa de fragmentación hasta las 24h de incubación. Estos resultados están de acuerdo, en este caso, con los resultados obtenidos empleando la técnica SCSA en el estudio previamente citado (Montano *et al.*, 2012). La técnica SCSA es capaz de analizar la integridad del ADN de un gran número de espermatozoides con alta precisión, pero también requiere el uso de instrumentación costosa y experiencia técnica. Además, se ha sugerido que los resultados podrían verse afectados por factores técnicos y subjetivos (Boe-Hansen *et al.*, 2005). Estos resultados son similares a los de la tasa de fragmentación de ADN descritos en el jabalí (Pérez-Llano *et al.*, 2010; Alkmin *et al.*, 2013) y el koala (Johnston *et al.*, 2012) pero diferentes a los encontrados en el verraco (López-Fernández *et al.*, 2008). A pesar del alto grado de integridad estructural, un individuo de este segundo experimento alcanzó más de un 90% de daño en el ADN espermático transcurridas 72 horas de incubación; este dato sugiere un grado de diferencia individual en este parámetro que, posiblemente, podría utilizarse como estimación de la fecundación potencial. Curiosamente, no se encontró correlación entre las características seminales convencionales y la fragmentación de ADN espermático en este estudio, ni inmediatamente después de la colecta (T0) ni después de la incubación a 37°C durante 72h.

En comparación con otras técnicas de evaluación de la fragmentación de ADN espermático, el ensayo SCD tiene algunas ventajas significativas sobre ellas, incluyendo su rapidez, sencillez y la posibilidad de determinar la calidad del ADN en el momento de la colecta seminal o antes de la inseminación artificial con muestras seminales tanto frescas como descongeladas. Con este estudio, hemos avanzado un paso más en la evaluación de la integridad del ADN espermático técnica en condiciones de campo.

Por otra parte, en un estudio anterior (Gosálvez *et al.*, 2008), encontró una alta correlación entre los ensayos SCD-laboratorio y SCD-campo. De hecho, en condiciones de campo no es viable realizar técnicas alternativas de la evaluación de la integridad del ADN espermático ya que no pueden utilizarse equipos tales como la citometría de flujo (Evenson *et al.*, 2002), la electroforesis (Aravindan *et al.*, 1997) o el marcaje de ADN usando reacciones enzimáticas (Gorczyca *et al.*, 1993b; Enciso *et al.*, 2006a). Sin embargo, el ensayo SCD puede realizarse en el campo incluso con mayor rapidez que en el laboratorio, en 15 minutos, ya que se emplea en condiciones de

campo un spray de CO<sub>2</sub> para acelerar la solidificación del microgel (Sánchez-Calabuig, M.J. *et al.*, 2014). Esto supone una ventaja añadida cuando se realiza reproducción asistida en la fauna silvestre. El corto periodo de respuesta en términos de análisis de ADN implica que la toma de decisión sobre la calidad del ADN espermático puede hacerse dentro de los 30 min desde la colecta espermática, por lo que, en última instancia, puede ser incorporada como una consideración importante cuando se trata de la toma de decisiones sobre inseminación, criopreservación o evaluación de la fertilidad.

Además, el *Experimento 2* proporcionó una evidencia adicional en cuanto a que el segundo eyaculado de una misma colecta seminal muestra una menor incidencia de la fragmentación de ADN espermático. Se ha descrito este fenómeno en los espermatozoides humanos recogidos a las 3h del primer eyaculado. Sin embargo, esta práctica influye en los resultados de la selección espermática en gradiente de densidad después de la centrifugación (Gosálvez *et al.*, 2011a). En este estudio, no se observó una mejora correspondiente en cualquier otra característica seminal al comparar el primer y el segundo eyaculado. Tras la colecta e inmediatamente después de la descongelación (T0), no se observaron diferencias en cuanto a la fragmentación del ADN espermático entre las muestras congeladas con los diferentes diluyentes. Los resultados del *Experimento 2* demostraron que el ADN espermático se mantiene estable durante un máximo de 48h tras el proceso de congelación y descongelación. Este fenómeno también se produce en otras especies tales como jabalíes (Evenson *et al.*, 1994), toros (van der Schans *et al.*, 2000) y la especie humana (Duru *et al.*, 2001).

En este estudio también se evaluó el efecto de tres posibles diluyentes para la congelación seminal en esta especie. Los espermatozoides de delfín mular mostraron una alta tolerancia a la crioconservación con los diluyentes LP1<sup>®</sup> y HSPM para la mayoría de parámetros seminales, pero los espermatozoides criopreservados en el LP1<sup>®</sup> indicaron un aumento en la fragmentación del ADN en comparación con los diluyentes HSPM y EYB-TT a partir de las 24h de incubación. Sería conveniente realizar un estudio complementario con el fin de verificar si esta pérdida de la estabilidad del ADN del esperma después de 24h podría traducirse en una reducción de la fertilidad. Además, los diluyentes LP1<sup>®</sup> y HSPM tienen el atractivo añadido de ser libre de proteínas animales lo que constituye una ventaja cuando se trata de la transmisión de enfermedades.

En conclusión este estudio ha demostrado que existen diferencias en la fragmentación del ADN espermático entre los eyaculados del mismo individuo y entre

los diferentes individuos utilizados. También se encontró una falta de correlación entre la fragmentación del ADN espermático y los parámetros convencionales de calidad espermática, poniendo de relieve la importancia de la detección de la fragmentación del ADN espermático que subyace en cada muestra. El delfín parece ser similar al verraco (Enciso *et al.*, 2006a) en cuanto a la estabilidad del ADN espermático. También hemos demostrado cómo la fragmentación de ADN espermático se puede utilizar para investigar el valor relativo de diferentes crioprotectores; es posible que el protocolo que protege la membrana plasmática del espermatozoide así como el acrosoma por ejemplo, no sea adecuado para la protección de la fragmentación del ADN o la reducción de los factores ROS que, en última instancia, conducen a daños de ADN espermático.

Finalmente, el delfín mular es una especie protegida bajo el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). Esto significa que el movimiento de los animales o de sus productos es limitado. Más que nunca, las muestras seminales de alta calidad en los bancos de recursos zoogenéticos constituyen una herramienta valiosa para evitar la consanguinidad y asegurar una descendencia con una variabilidad genética adecuada. Este estudio demuestra la importancia de la detección de daños en el ADN espermático, ya que, en este caso concreto del animal estudiado en el *Experimento 1* tenía parámetros seminales de calidad adecuada, pero que, sin embargo, el índice de fragmentación del ADN comenzó a aumentar de manera considerable tras una hora de incubación a 37°C. Este fenómeno es crítico a la hora de realizar la reproducción asistida y obtener una adecuada tasa de gestación.



**CAPÍTULO III. Evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides de delfín mular (*Tursiops truncatus*) mediante fecundación *in vitro* heteróloga de ovocitos bovinos y murinos con zona pelúcida intacta.**



## 1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida desempeñan un papel importante en la conservación de especies en peligro de extinción, ya que permiten aumentar la diversidad genética de los animales en cautividad, evitando el transporte de los mismos. El desarrollo y la mejora de dichas técnicas se basan en gran medida en la optimización del rendimiento de los espermatozoides, que a su vez exige un conocimiento profundo de su fisiología así como el desarrollo de métodos precisos para la evaluación de la función espermática.

El mejor indicador de la calidad de los espermatozoides es la evaluación de su capacidad fecundante (Brahmkshtri *et al.*, 1999). Este parámetro comprende varios procesos fisiológicos, tales como la interacción ovocito-espermatozoide, la penetración y la formación pronuclear. Estos eventos están relacionados con los parámetros básicos seminales, la fragmentación del ADN espermático, la estructura de la cromatina nuclear espermática, la capacidad del espermatozoide para activar el ovocito así como el contenido de glutatión del ovocito. En los últimos años, se han descrito los parámetros seminales básicos (Robeck *et al.*, 2005) e incluso, recientemente, la fragmentación del ADN espermático en el delfín mular (*Tursiops truncatus*) (Montano *et al.*, 2012; Sánchez-Calabuig *et al.*, 2014). Sin embargo, el conocimiento sobre la estructura de la cromatina espermática, así como la capacidad de fecundación *in vitro* en esta especie es muy limitado.

Los sistemas de fecundación *in vitro* (FIV) homóloga y heteróloga, no reflejan totalmente las condiciones fisiológicas, pero ofrecen ventajas importantes sobre la fecundación *in vivo*, tales como el uso de un menor número de espermatozoides, difíciles de obtener en los animales salvajes, el coste relativamente bajo y la posibilidad de obtener información relevante en un corto período de tiempo. Además, el uso de la FIV heteróloga en especies silvestres presenta otras ventajas con respecto a la FIV homóloga, como con la accesibilidad a los ovocitos y un conocimiento previo de la maduración *in vitro* de los mismos.

Debido a la especificidad de la zona pelúcida (ZP), la aplicación de la FIV heteróloga se limita generalmente a las especies estrechamente relacionadas filogenéticamente. La FIV heteróloga se ha realizado con éxito en varias especies, empleando ovocitos de gato doméstico y espermatozoides de tigre (Donoghue *et al.*, 1992), ovocitos bovinos y espermatozoides de cabra, carnero o antílope (Cox *et al.*,

1994; Kouba *et al.*, 2001; García-Alvarez *et al.*, 2009) y ovocitos de oveja y espermatozoides de ciervo (Soler *et al.*, 2008). También se ha realizado la FIV heteróloga empleando ovocitos en los que la ZP se había retirado previamente. Tal es el caso de la FIV heteróloga realizada por Fleming *et al.* (1981) utilizando ovocitos de hámster y espermatozoides de delfín mular. La ausencia de ZP elimina la especificidad de especie y proporciona información sobre la reacción acrosómica así como sobre la capacidad del espermatozoide para fusionarse con la membrana vitelina e iniciar la descondensación nuclear (Fleming *et al.*, 1981). Sin embargo, la eliminación de la ZP impide la obtención de información sobre las funciones básicas espermáticas, tales como la interacción espermatozoide-ZP y la penetración de ésta. Además, las células del *cumulus oophorus* se eliminan con la ZP, lo que puede alterar la homeostasis del ovocito y afectar a parámetros tales como la polispermia, la formación pronuclear y la división del embrión (Tanghe *et al.*, 2002; Tanihara *et al.*, 2013).

A pesar de las aparentes ventajas, la FIV heteróloga empleando ovocitos con la ZP intacta no se ha realizado en el delfín, ni tampoco se ha estudiado el efecto de las células del *cumulus oophorus* sobre la FIV heteróloga. Debido a la disponibilidad de ovarios, la FIV heteróloga se realiza generalmente empleando ovocitos bovinos, porcinos o murinos. Los ovocitos bovinos y murinos tienen diferentes concentraciones de glutatión y diferentes mecanismos de herencia del centrosoma, paterna y materna, respectivamente, que pueden conducir a diferentes dinámicas de la formación pronuclear masculina (Calvin *et al.*, 1986; Schatten *et al.*, 1991; de Matos *et al.*, 1996). Desde un punto de vista filogenético, la especie bovina se encuentra más cercana al delfín que la especie murina, ya que pertenecen al mismo Superorden Cetartiodactyla (Figura 32).

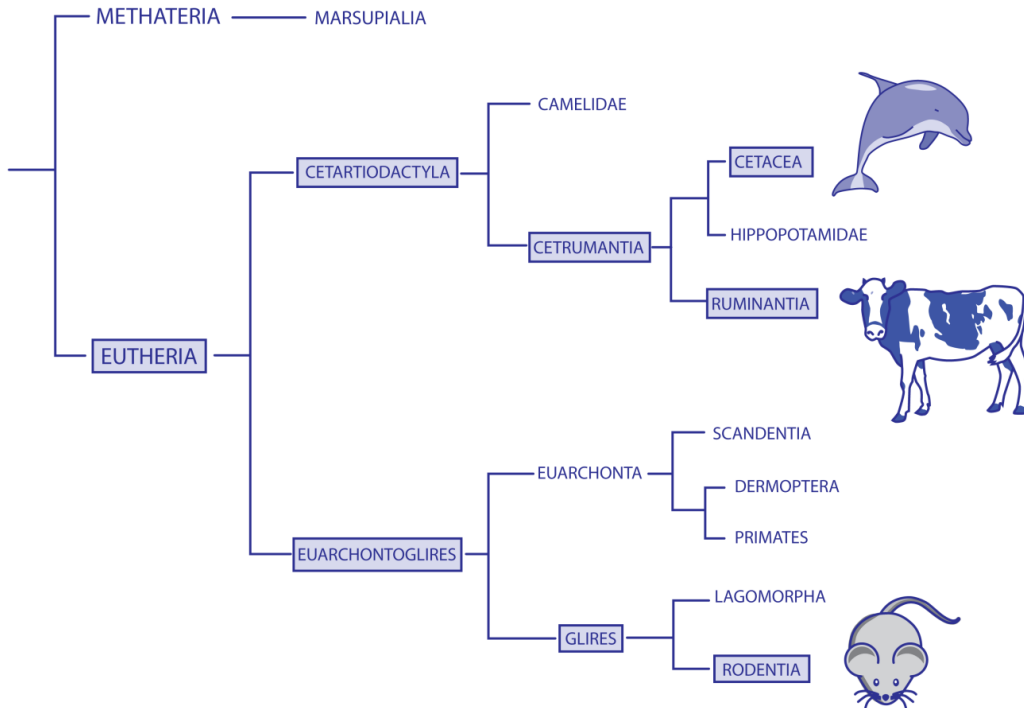


Figura 32. Cladograma de la subclase *Euteria* con las relaciones filogenéticas entre los Órdenes *Cetacea*, *Rodentia* y *Ruminantia*. Modificado de Hickman *et al.*, 2002.

La formación del pronúcleo masculino no sólo depende de la naturaleza del ovocito, sino también de las características estructurales de la cromatina nuclear de los espermatozoides. En espermatozoides maduros, el embalaje cromosómico normal de ADN característico de las células somáticas se transforma en una forma muy condensada de la cromatina, basada en nucleoprotaminas, que facilitan la inactivación transitoria del ADN, así como su protección (Oliva, 2006). Este proceso de condensación se inicia en el testículo. Durante la espermatogénesis, las histonas somáticas -ricas en lisina- son sustituidas por pequeñas proteínas fuertemente básicas conocidas como protaminas que contienen un gran número de residuos de arginina y cisteína, los últimos unidos a través de  $Zn^{2+}$  en sus grupos tiol. A medida que los espermatozoides migran a través del epidídimo, los grupos tiol de cisteína presentes inicialmente se van oxidando parcialmente para formar enlaces disulfuro (Bedford y Calvin, 1974; Marushige y Marushige, 1975). Este proceso se completa después de la eyaculación, cuando el zinc presente en el plasma seminal se retira gradualmente durante la capacitación, facilitando la formación de enlaces disulfuro adicionales y con ello, aumentado la estabilidad de la cromatina (Oliva, 2006).

Es necesario cierto grado de compactación para asegurar la protección y la inactivación transitoria del ADN. Sin embargo, una estabilidad excesiva puede conducir a un retraso en la formación pronuclear y muerte embrionaria precoz (Córdova *et al.*, 2002; Oliva, 2006). Este problema es especialmente importante en los delfines, ya que poseen testículos intra-abdominales. La condensación de la cromatina puede representar un mecanismo para atenuar el efecto del estrés oxidativo que es la mayor causa de daño del ADN en los espermatozoides de los testículos que no están expuestos a la temperatura ambiente.

La posibilidad de llevar a cabo la FIV heteróloga utilizando ovocitos con zona pelúcida intacta, la influencia de las células del *cumulus oophorus* en la división de los embriones híbridos, o el estado estructural de la cromatina nuclear espermática no se han explorado en el delfín. El objetivo de este capítulo es proporcionar información sobre estas cuestiones que pueden contribuir a desarrollar un modelo para estudiar los espermatozoides de delfín. Se plantearon tres objetivos específicos:

- 1) Estudiar la interacción y los parámetros de FIV heteróloga utilizando espermatozoides de delfín y ovocitos bovinos y murinos con la ZP intacta; 2) estudiar la influencia de las células del *cumulus oophorus* en la FIV heteróloga utilizando espermatozoides de delfín y ovocitos íntegros murinos; 3) determinar el grado de madurez, la condensación y la estabilidad de la cromatina nuclear del espermatozoide de delfín mular.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo con animales fueron revisados y aprobados por el Comité institucional del Cuidado animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) así como por el Comité Institucional para el Cuidado de los Animales del Zoo de Madrid y Sea World Gold Coast (Australia). Además, se realizaron de acuerdo a la Guía para cuidado y Uso de Animales de Laboratorio aprobado por la Sociedad para el Estudio de la Reproducción y de la Ley de Bienestar Animal para el cuidado de los Mamíferos Marinos (Universidad de Queensland, Departamento de Bienestar Animal SAFS/133/11).

### 2.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este estudio se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) a menos que se especifique otra procedencia.

### 2.2. Diseño experimental

Se realizaron tres experimentos con el fin de evaluar la capacidad fecundante *in vitro* (FIV) heteróloga y el estado de la cromatina nuclear de los espermatozoides de delfín mular. Cada uno de los experimentos se describe por separado en los apartados siguientes.

#### **Experimento 1: Fecundación *in vitro* heteróloga empleando ovocitos bovinos con la zona pelúcida intacta y espermatozoides de delfín.**

##### ***Animales***

En este experimento, se realizó la FIV empleando ovocitos de bovino con zona pelúcida intacta y espermatozoides descongelados de delfín o de bovino. Se realizaron doce réplicas. Las muestras seminales de delfín mular se obtuvieron de un macho adulto de fertilidad probada en cautividad, de 38 años de edad y 220 kg de peso. Las condiciones de alojamiento se describen previamente en el *Capítulo I* de este trabajo.

Las muestras seminales de especie bovina se obtuvieron de un toro sexualmente maduro y de fertilidad probada, alojado en un centro de inseminación (ASEAVA, España).

#### **Diseño experimental**

Tras el proceso de congelación y descongelación, los espermatozoides se capacitaron, y se sometieron al proceso de la FIV homóloga y heteróloga. Se utilizaron un total de 2.698 ovocitos maduros con la zona pelúcida intacta de especie bovina. Se realizaron tres grupos diferentes. El primer grupo se sometió a la FIV homóloga, el segundo grupo a la FIV heteróloga y en el tercer grupo se emplearon ovocitos sin fecundar y se utilizó como control para la evaluación de la partenogénesis. La incubación de los ovocitos con o sin espermatozoides se llevó a cabo durante 48 horas. A diferentes tiempos de incubación, se analizaron un número determinado de ovocitos (o presuntos cigotos) mientras que el resto permaneció en incubación.

El diseño experimental está detallado en la *Figura 33*. Tras la maduración *in vitro*, se realizó la FIV en el día 0 (D0). La interacción espermatozoide-ovocito se evaluó a las 2,5 horas post-inseminación (hpi) y la penetración de los espermatozoides se evaluó a las 12 hpi. Los presuntos cigotos restantes se dejaron en co-incubación y, a las 18 hpi, se dividieron en dos grupos. En un grupo, integrado por aproximadamente la mitad de los presuntos cigotos, se evaluó la formación pronuclear a diferentes tiempos (18, 20, 22 y 24 h en el grupo de FIV homóloga y 18, 20, 22, 24, 26 y 28 en el grupo de FIV heteróloga). La otra mitad de los presuntos cigotos se lavaron y se dejaron en medio de cultivo. En el día 2 (D2), se evaluó la tasa de división en los presuntos cigotos, así como en los ovocitos de control de partenogénesis. Finalmente, la identidad genética de los embriones híbridos se confirmó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### **Colecta seminal y crioconservación**

##### *Delfín mular*

La colecta seminal se realizó de forma voluntaria en un macho adulto tal y como se describe en el *Capítulo I* (Keller, 1986; Robeck y O'Brien, 2004). Se realizaron de una a tres colectas sucesivas cada día, y se realizó una colecta por semana. Se seleccionaron 12 eyaculados obtenidos en diferentes sesiones. Para el estudio, se utilizaron sólo las muestras seminales con una motilidad total superior al 80%, una morfología normal superior al 85% y una concentración superior a  $400 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Inmediatamente después de la colecta, las muestras seminales se mantuvieron a 37°C durante todo el proceso y se procedió a su análisis por medio de un método estándar de evaluación seminal. La congelación se llevó a cabo siguiendo el método de crioconservación descrito originalmente por Robeck y O'Brien (2004) con algunas modificaciones que se detallan en el *Capítulo I*. En primer lugar, se ajustó la concentración espermática a aproximadamente  $400 \times 10^6$  espermatozoides/mL utilizando eyaculados individuales o combinados obtenidos en la misma sesión de la colecta seminal. A continuación, se realizó una dilución 1:1 (v/v) durante 5 min con un diluyente basado en un tampón TRIS a base de yema de huevo conteniendo un 1,5% de glicerol. A continuación, la muestra se refrigeró durante 1h (-0,27°C/min.) a 5°C y se realizó un periodo de equilibrado de 15 min. Seguidamente, se realizó una nueva dilución de la muestra 1:1 (v/v) con el mismo diluyente durante 5 min, tal que la concentración final de la muestra alcanzó un 3% de glicerol. Finalmente, se cargó la muestra en pajuelas de 0,25 mL y se realizó el sellado. La congelación se realizó en vapores de nitrógeno líquido a una distancia de 4,5 cm por encima del nitrógeno líquido (LN<sub>2</sub>), durante un periodo de 10 min. Tras este periodo, se sumergieron las pajuelas en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta la descongelación.

#### *Bovino*

Las colectas se realizaron utilizando una vagina artificial a intervalos de 15 días. Se obtuvieron 12 muestras seminales de tres eyaculados, que se procesaron siguiendo una metodología estándar. La congelación se realizó con un diluyente comercial (Triladyl®, Minitüb, Alemania) y los espermatozoides se almacenaron en pajuelas de 0,25 mL a una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/pajuela. Para el *Experimento 1*, se utilizaron doce pajuelas de tres eyaculados diferentes.

#### ***Fecundación in vitro***

Se realizaron un total de doce réplicas en este experimento, y la producción *in vitro* de embriones se realizó siguiendo la técnica descrita previamente por Rizos *et al.* (2002). Brevemente, se obtuvieron complejos *cumulus oophorus*-ovocito (COCs), a partir de ovarios de vaca que se obtuvieron en un matadero y se transportaron al laboratorio en solución salina al 0,9% a 37°C antes de que transcurrieran dos horas del momento del sacrificio. Los ovocitos se recuperaron mediante la aspiración de los folículos de 2-8 mm de diámetro. Sólo se seleccionaron los COCs con un *cumulus oophorus* completo y denso. Los COCs se maduraron en grupos de 50 por pocillo en placas de cuatro pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), en 500 µL de medio de

maduración, TCM-199 (nº de catálogo M4530) suplementado con 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF, nº de catálogo. E4127) y 10% de suero fetal bovino (v/v) (número de catálogo F2442) durante 24 h a 38,5°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> con una humedad ambiente máxima. Después de 24 h, los ovocitos madurados *in vitro* se lavaron dos veces en medio FERT [medios FERT-TALP (catálogo de Merck nº MR-020P5F)] suplementado con bicarbonato 25 mM, 22 mM de lactato de sodio, piruvato de sodio 1 mM, 6 mg/mL de BSA sin ácidos grasos y 10 mg/mL de heparina] y se transfirieron los grupos de 50 COCs por pocillo a placas de cuatro pocillos que contenían 250 µL de medio de FERT sin aceite mineral (Parrish *et al.*, 1988).

Las pajuelas de espermatozoides tanto de delfín como de bovino se descongelaron a 37°C durante 50s. Inmediatamente después, se separaron los espermatozoides móviles por gradiente de densidad (BoviPure, Nidacon Internacional, Suecia). Para ello, se añadió el contenido de la pajueta en la parte superior de las dos capas de BoviPure de 1 mL cada una, mantenidas a 37°C, y se realizó un centrifugado durante 10 min a 250 g. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó en 3 mL de PBS. Tras el centrifugado (5 min a 250 g), se añadieron  $2 \times 10^6$  espermatozoides a un medio FERT y 250 µL de esta suspensión se añadieron a cada pocillo que, previamente, contenían 250 µL de medio de FERT cada uno, obteniendo una concentración final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL en cada pocillo.

Los gametos se co-incubaron a 38,5°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> con una humedad ambiente máxima. Además, en cada una de las réplicas se incluyó un pocillo como control de partenogénesis que contenía sólo COC madurados (n =50). Las condiciones de este grupo fueron las mismas que la de los grupos experimentales.

#### ***Evaluación de la interacción espermatozoide-zona pelúcida***

El experimento de interacción espermatozoide-zona pelúcida se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente por Canovas *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Se evaluó el número de espermatozoides anclados y unidos a la zona pelúcida de los grupos de FIV homóloga y heteróloga a las 2,5 hpi. En el grupo de FIV homóloga, se evaluaron 24 y 23 ovocitos para determinar el número de espermatozoides anclados y unidos respectivamente, mientras que, en el grupo de la FIV heteróloga, se evaluaron 62 ovocitos para cada una de las dos variables.

El número de espermatozoides anclados a la ZP se evaluó en los ovocitos tras un pipeteado intenso, que consistió en diez aspiraciones repetidas con una pipeta

Pasteur de diámetro estrecho, mientras que el número de espermatozoides unidos a la ZP se realizó tras agitar con un vórtex a baja intensidad durante 3 min. A continuación, se fijaron los ovocitos y se sometieron a la tinción con Hoechst 33342.

Tanto la fijación como el proceso de tinción con Hoechst 33342 se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente por Coy *et al.* (2008b). Brevemente, los ovocitos se lavaron tres veces en PBS, se fijaron en 0,5% de glutaraldehído en PBS, se lavaron de nuevo en PBS durante 5 min, y a continuación, se sometieron a una solución de 1% (w/v) de Hoechst 33342 en PBS durante 15 min. Finalmente, se lavaron de nuevo en PBS durante 5 min. Seguidamente, se depositaron 10 ovocitos en cada uno de los portaobjetos, cada uno de los ovocitos en una gota de 5  $\mu$ L de medio de montaje [PBS y glicerol 1:1 (v/v), y 0,1% de 1% w/v de Hoechst] y se cubrió cuidadosamente con un cubreobjetos. Por último, los espermatozoides anclados o unidos se contaron bajo microscopio de contraste de fase y empleando una óptica de epifluorescencia (Eclipse E400, Nikon, Japón) con un filtro de excitación de 361 nm a 400X aumentos.

### ***Evaluación de la fecundación in vitro***

La fecundación *in vitro* se evaluó en un total de 2.326 presuntos cigotos. La penetración se evaluó a las 12 hpi. La evaluación de la formación pronuclear se evaluó mediante el análisis de la mitad de los cigotos a diferentes tiempos de incubación (18-24 hpi en el grupo de FIV homóloga y 18-28 hpi en el grupo de FIV heteróloga), mientras que la otra mitad se examinaron en el D2 con el fin de determinar la tasa de división.

A los diferentes tiempos de co-incubación (*Figura 33*), los presuntos cigotos de cada grupo de FIV homóloga y heteróloga se transfirieron a un tubo de centrífuga de 15 mL que contenía 2 mL de PBS; se realizó una agitación con un vórtex a baja intensidad durante 2 minutos para eliminar las células del cúmulo, se lavaron dos veces en PBS, se fijaron y se tiñeron con Hoechst como se ha descrito anteriormente (Latt, 1976).

Tras la tinción, se evaluaron bajo microscopio de contraste de fases con epifluorescencia los presuntos cigotos para determinar la penetración del espermatozoide, la polispermia y la formación pronuclear. Diez presuntos cigotos híbridos de cada grupo (tiempo de incubación) fueron examinados en detalle (n=60) mediante microscopía confocal (MRC 1024, Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) a 488 nm

de excitación láser de argón y a 515-530 nm detección. Se seccionaron digitalmente los presuntos cigotos (2  $\mu\text{m}$ ) y las imágenes se capturaron utilizando el software de imágenes Bio Rad láser de Sharp 2000 4.3 y se visualizaron utilizando el paquete de software Confocal Asistente 4.02 (Bio Rad) (Oliva-Hernández y Pérez-Gutiérrez, 2008).

Los presuntos cigotos restantes se lavaron tres veces en PBS y dos veces en fluido oviductal sintético (*Synthetic oviductal fluid*, SOF) suplementado con 5% de suero fetal bovino (*fetal calf serum*, FCS). A continuación, se transfirieron en grupos de 25 a gotas de medio de cultivo SOF de 25  $\mu\text{L}$  (1 embrión por  $\mu\text{L}$ ) y la incubación se reanudó a 38,5°C, en una atmósfera saturada de humedad y con 5% de  $\text{CO}_2$ , 5% de  $\text{O}_2$  y 90%  $\text{N}_2$ . Trascurridas 48 hpi, se evaluó la tasa de división en los diferentes grupos bajo estereoscopio (Nikon SMZ 645, Japón).

#### ***Evaluación de la fecundación heteróloga por PCR***

Tras la evaluación de la tasa de división, los embriones se lavaron en PBS y, con el fin de eliminar los espermatozoides que pudieran haber quedado unidos, se eliminó la zona pelúcida mediante la transferencia de los presuntos cigotos a una solución de 5 mg/mL de pronasa (nº de catálogo. P5147). La digestión de la zona pelúcida se observó de manera continua bajo lupa y, una vez que la zona pelúcida ya no era visible, los embriones se lavaron 3 veces en PBS de forma individual, se congelaron en nitrógeno líquido por *snap-freezing* en tubos de 0,2 mL y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Para confirmar la fecundación heteróloga, se realizó un análisis por PCR del gen de referencia (*gen housekeeping*) que codifica para la proteína ribosomal 18S de delfín (DQ404537.1). Los presuntos cigotos se descongelaron a 4°C durante 30 min y posteriormente se digirieron con una solución de 100 mg/mL de proteinasa K (nº de catálogo. P8044-1G), añadiendo a cada tubo 8  $\mu\text{L}$  y se mantuvieron durante toda la noche a 55°C.

A continuación, se inactivó la proteinasa K a una temperatura de 95°C durante 10 min. Los cebadores de PCR para el gen 18S ribosomal de delfín (DQ404537.1) fueron los siguientes: R1: TTGGACACACCCACGGTGCGG y F2: CAGAAGGACGTGAAGGATGGA. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$  que contenía 8  $\mu\text{L}$  de la muestra previamente digerida con proteinasa K, 5  $\mu\text{L}$  de tampón 1X de GoTaq Flexi (Promega, Madison, WI, EE.UU.), 0,25  $\mu\text{L}$  de dNTP, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada cebador (R1 y F2), 0,25  $\mu\text{L}$  de polimerasa Taq y 2 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ . La PCR se llevó a

cabo empleando 40 ciclos de desnaturalización (94°C, 15 segundos), hibridación (59°C, 25 segundos) y extensión (72°C, 20 segundos). Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% de bromuro de etidio bajo iluminación ultravioleta. Las muestras que presentaban una banda a 486 pb se consideraron como portadoras de ADN de delfín.

Se utilizaron seis controles en cada PCR: un control positivo que correspondía a diluciones de ADN de esperma de delfín (la muestra más diluida correspondía a 0,4 ng/mL de ADN, que, de acuerdo a estudios preliminares, es una cantidad de ADN 10 veces menor a la contenida en un solo espermatozoide) y tres controles negativos que correspondían a diluciones de ADN de esperma bovino (4 y 40 ng/mL de ADN), embriones de 2 células de bovino y un control negativo.

Los estudios preliminares para determinar la cantidad mínima de ADN necesaria para la detección de gen 18S en un espermatozoide de delfín o en un espermatozoide bovino, se realizaron como se describe a continuación. Brevemente, las muestras de esperma se descongelaron y se centrifugaron durante 10 min (250 x g). A continuación, las muestras de esperma de delfín o de bovino se digirieron con 30 µL de proteinasa K (Sigma, P8044-1G) y 5 µL de ditioneitol (DTT) durante toda la noche a 55°C. A continuación, se añadieron 200 µL de agua ultrapurificada, la muestra se centrifugó brevemente y se conservó el sobrenadante. La concentración de ADN se determinó con un espectrofotómetro (Eppendorf, Hambourg, Germany). Se realizó la PCR utilizando diluciones seriadas de cada muestra hasta obtener una cantidad de ADN de 0,4 ng/mL. Se realizó la PCR en diversas diluciones para probar si una sola dotación de ADN genómico de delfín se podía detectar sin interferencias y por lo tanto si estas condiciones de la PCR podrían aplicarse para detectar el ADN de delfín en un solo embrión híbrido.

### Capítulo III. Material y métodos

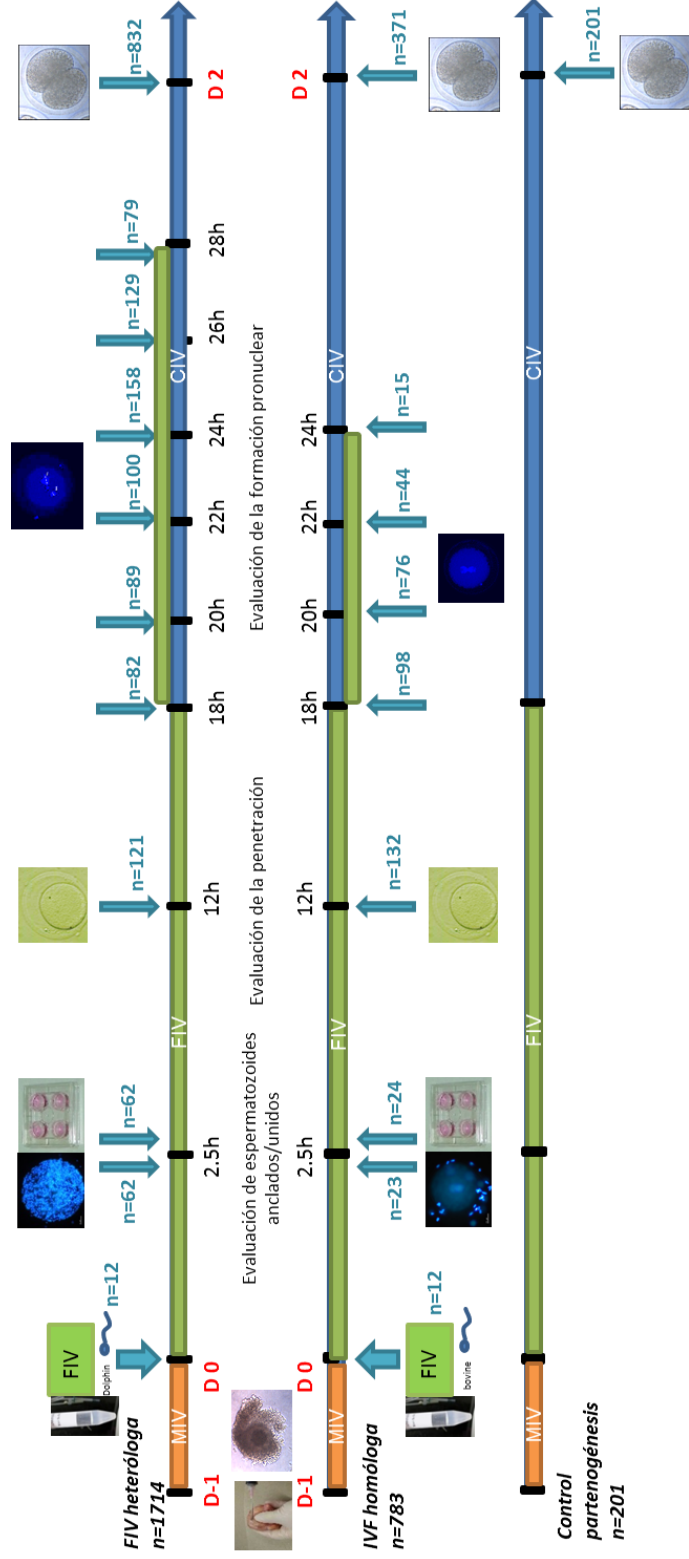


Figura 33. Diseño del Experimento 1 del Capítulo III. Ovocitos bovinos con zona intacta se co-incubaron con espermatozoides descongelados de delfín mular (FIV heteróloga) o de toro (FIV homóloga) en el día 0 (D0); se incluyó un tercer grupo constituido por ovocitos bovinos incubados en las mismas condiciones pero en ausencia de espermatozoides (control de partenogénesis). Las flechas representan un período de tiempo de tres días (desde D-1 a D2). Se consideró el día de la fecundación *in vitro* (D0) como la referencia a todos los tiempos de incubación que se indican en la flecha, así como de los medios de incubación. A diferentes momentos, se evaluaron los parámetros descritos en la línea (barra de color negro) en un número de presuntos cigotos (n). Tras 18 h de co-incubación, los presuntos cigotos se dividieron en dos grupos (línea doble): la mitad de los cigotos se evaluaron a diversos momentos de la co-incubación [(18-24 en la FIV homóloga o 18-28 en el grupo de FIV heteróloga para la evaluación de la formación pronuclear (línea superior)]; mientras que la otra mitad se examinaron a los dos días de cultivo para determinar la tasa de división (línea inferior). Los medios de incubación se detallan en la sección de material y métodos, medio MIV= medio de *maduración in vitro*, medio de fecundación *in vitro* FERT y medio IVC= medio de cultivo *in vitro* (SOF).

**Experimento 2: Fecundación *in vitro* heteróloga empleando ovocitos murinos con la zona pelúcida intacta y espermatozoides de delfín**

***Animales***

Las muestras seminales de delfín mular se obtuvieron del macho descrito en el *Experimento 1* y los cinco eyaculados utilizados en las diferentes réplicas se obtuvieron en cinco sesiones de colecta diferentes.

Las muestras seminales de murino se obtuvieron de cinco machos adultos B6D2F1 de 9 meses de edad, un macho por réplica. Los ratones se alimentaron *ad libitum* con una dieta estándar (Harlan Ibérica) y se mantuvieron en una sala con temperatura y luz controlada (23°C, 14 horas de luz: 10 horas de oscuridad). Los ovocitos murinos se obtuvieron de hembras adultas híbridas C57BL/6J X CBA de 6 a 8 semanas de edad (Harlan Ibérica). Las condiciones de alojamiento eran las mismas que en el caso de los machos.

***Diseño experimental***

En este experimento, se realizó la FIV empleando para ello ovocitos murinos con la ZP intacta y espermatozoides murinos o de delfín mular. Se realizaron cinco réplicas. Se obtuvieron para ello cinco muestras de semen *post mortem* de cinco ratones machos adultos así como 5 muestras de eyaculados diferentes de delfín mular.

Para realizar la FIV heteróloga, se emplearon muestras de delfín descongeladas el día del experimento, mientras que para realizar la FIV homóloga se utilizaron muestras de semen fresco de ratón. Se utilizaron un total de 998 ovocitos de ratón con la zona pelúcida intacta y se realizaron cuatro grupos. Un primer grupo fue sometido a FIV homóloga, un segundo y tercer grupo a FIV heteróloga usando ovocitos con la zona pelúcida intacta con o sin células del cúmulo respectivamente. El cuarto grupo correspondía al grupo control para la evaluación de la partenogénesis. La *Figura 34* ilustra el diseño experimental. A diversos tiempos de incubación, se utilizaron un número específico de ovocitos (o presuntos cigotos) para su posterior análisis, dejando el resto en incubación hasta las 24h. La interacción esperma-ovocito se evaluó a las 2,5 hpi. La capacidad fecundante *in vitro* se evaluó a las 6 y a las 22 hpi en el grupo de FIV homóloga y FIV heteróloga respectivamente para la evaluación de la formación pronuclear. Tras 22 hpi, se evaluó la tasa de división en los presuntos cigotos, así como

los ovocitos del grupo control para la evaluación de la partenogénesis. Por último, se confirmó la naturaleza híbrida de los embriones mediante PCR.

#### ***Colecta seminal, crioconservación***

##### *Semen de delfín mular*

La colecta y la crioconservación de las muestras seminales, así como las dosis seminales empleadas en este experimento se seleccionaron entre las mismas empleadas en el *Experimento 1*. Se realizaron un total de 5 réplicas. Los cinco eyaculados utilizados en las diferentes réplicas se obtuvieron del mismo delfín mular en cinco sesiones de colecta diferentes.

##### *Semen murino*

Los ratones machos se sacrificaron mediante dislocación cervical. Cada epidídimo se mantuvo en 500  $\mu$ L de medio M2 (n<sup>o</sup> de catálogo M7167). A continuación, se disecaron cuidadosamente los vasos sanguíneos y el tejido adiposo en cada uno de los epidídimos. Una vez realizado este proceso, se transfirió cada epidídimo a una gota de 500  $\mu$ L de medio de fluido tubárico humano (HTF, n<sup>o</sup> de catálogo Irvine 90.125) suplementado con 2 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA n<sup>o</sup> de catálogo A9647).

#### ***Fecundación in vitro***

Para realizar este experimento se utilizaron un total de 998 complejos cúmulo ovocito (COCs). Los COCs se obtuvieron mediante un tratamiento de superovulación y se recuperaron de la región del ámpula del oviducto. Para inducir la superovulación, las hembras se trataron con 7 UI de PMSG (*pregnant mare's serum gonadotropin*)/gonadotropina coriónica equina (eCG, 500 Folligon, Intervet, Países Bajos) seguido, 48h de 5UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Veterin Corion, Equinvest, España), que se aplicaron vía intraperitoneal. A las 13-15h de la aplicación de hCG, los individuos se sacrificaron mediante dislocación cervical y se recuperaron los ovocitos de la región del ámpula del oviducto (Nagy *et al.*, 2002).

Se realizaron cuatro grupos experimentales: un grupo control de partenogénesis que contenía sólo COCs maduros al que no se añadió espermatozoides con el fin de evaluar el porcentaje de partenogénesis, un grupo de FIV homóloga y dos

grupos de FIV heterólogos, con ovocitos con y sin células del cúmulo. En este último grupo, las células del cúmulo se eliminaron mediante un suave pipeteo tras 20 s de incubación con 300 g/mL de hialuronidasa (nº de catálogo H-3506) (Nagy *et al.*, 2002).

Se añadieron de 35 a 40 COCs en cada pocillo de una placa NUNC al que previamente se añadieron o bien 500 µL de HTF suplementado con BSA y cubierto con aceite mineral, para los grupos de control de partenogénesis y de FIV homóloga, o bien 500µL de medio FERT bovino sin aceite mineral para el grupo de FIV heteróloga.

Con el fin de realizar el *swim-up* y la capacitación, los espermatozoides murinos se incubaron en una gota de 500 µL de HTF suplementado con BSA durante 15 min a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, mientras que los espermatozoides de delfín se descongelaron, se separaron a continuación los espermatozoides móviles empleando para ello el sistema de gradiente Bovi-pure (Nidacon International, Suecia) como se ha descrito en el *Experimento 1*.

Por último, los ovocitos se incubaron durante 6 y 22h en presencia de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL de espermatozoides murinos y de delfín respectivamente, excluyendo el grupo de control de partenogénesis, al que no se añadieron espermatozoides.

Los presuntos cigotos u ovocitos (control de partenogénesis) se transfirieron y se incubaron en gotas de cultivo de 25 µL de KSOMaa (medio optimizado con potasio y suplementado con amino ácidos) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> con humedad ambiente máxima durante 22h.

### ***Evaluación de los espermatozoides anclados a la zona pelúcida***

El protocolo de evaluación de los espermatozoides anclados a la ZP se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en el *Experimento 1*. Se evaluó el número de espermatozoides anclados en un total de 80 presuntos ovocitos a las 2,5 hpi. Los presuntos cigotos se evaluaron tras un pipeteo intenso (un total de 10 veces con una pipeta Pasteur de diámetro reducido, como se ha descrito anteriormente).

Después de recuperar los ovocitos con espermatozoides anclados a la zona pelúcida, en el grupo de FIV homóloga (n=35) y en el grupo de FIV heteróloga (n=45) con células del *cumulus oophorus* (n=45), los ovocitos se fijaron y se tiñeron con Hoechst 33342 como se ha descrito previamente. Se contaron, a continuación, el

número de espermatozoides anclados a la ZP bajo microscopio de contraste de fases y epifluorescencia.

El número de espermatozoides unidos no se pudo evaluar en este experimento, a diferencia de *Experimento 1*, debido a que los ovocitos murinos presentaron daños estructurales después de agitación en vórtex, incluso cuando se realizó a baja intensidad.

#### ***Evaluación de la fecundación in vitro***

La capacidad fecundante de los espermatozoides *in vitro* en este experimento se llevó a cabo mediante la evaluación de la formación pronuclear y la evaluación de la división a dos células bajo microscopio de contraste de fases. Tras el análisis de los presuntos cigotos, se procedió a su congelación. El día del análisis se realizó la descongelación de las muestras tal como se describe en el *Experimento 1*, con el fin de confirmar los embriones híbridos por PCR.

#### ***Evaluación de la fecundación heteróloga por PCR***

Se realizó un análisis de PCR con el fin de confirmar la formación de embriones híbridos.

Después de la evaluación de la FIV, los embriones se lavaron en medio M2 (nº de catálogo. M7167) y se procedió a la digestión de la zona pelúcida en una solución de Tyrode (nº de catálogo. T1788) con el fin de eliminar los espermatozoides que podrían haber permanecido unidos a la zona pelúcida. Como se ha descrito anteriormente, la digestión de la zona se observó de manera continua bajo estereomicroscopio (SMZ 645, Nikon, Japón) y, cuando la zona ya no era visible, los embriones se lavaron 3 veces en M2 y se congelaron de forma individual directamente en nitrógeno líquido (*snap-freezing*) tal como se describe en el *Experimento 1* y se mantuvieron congelados a -80°C hasta su análisis.

Se prepararon muestras espermáticas murino y de delfín así como las diluciones para los estudios preliminares y se llevaron a cabo como se describe en el *Experimento 1*, con el fin de determinar si las condiciones de PCR fueron apropiadas para detectar un sólo espermatozoide de delfín.

Los embriones se digirieron con proteinasa K a una concentración de 100ng/mL (catálogo no. P8044-1G) a razón de 8 µL por embrión y se mantuvo a 55°C

durante toda la noche. A continuación, se inactivó la proteinasa K a 95°C durante 10 min. Las PCRs se llevaron a cabo utilizando los mismos cebadores y las condiciones descritas en el *Experimento 1*. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% de bromuro de etidio bajo iluminación ultravioleta.

Las muestras en las que se observó una banda a 486 pb se consideraron como portadoras de ADN de delfín. En este experimento, se emplearon siete controles en cada PCR: tres controles positivos correspondientes a diluciones seriadas de ADN de esperma de delfines (la muestra más diluida correspondía a 0,4 ng/mL de ADN), y tres controles negativos correspondientes a diluciones seriadas de ADN de esperma murinos (4 y 40 ng/mL de ADN), un embrión murino de 2 células y un control en blanco.

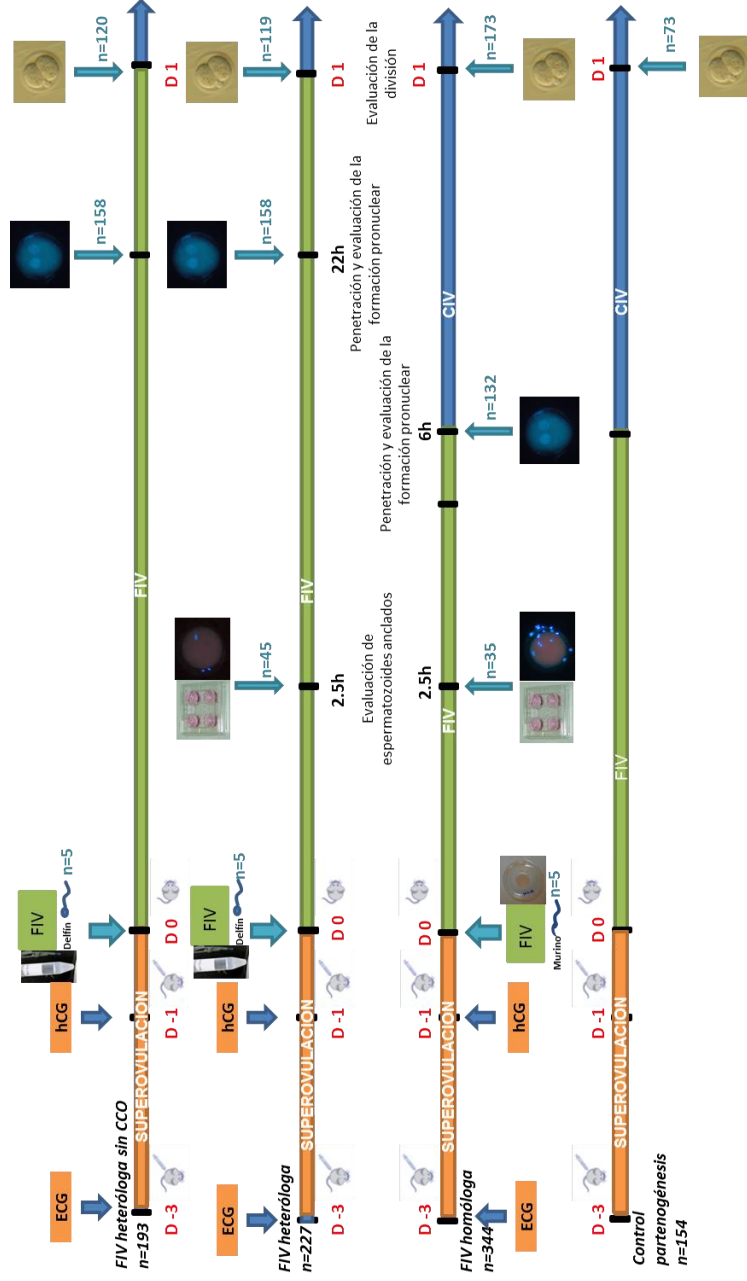


Figura 34. Diseño del Experimento 2 del Capítulo III. Fecundación *in vitro* homóloga y heteróloga utilizando espermatozoides de delfin mular o espermatozoides murinos co-incubados con ovocitos con la zona pelúcida intacta, en ausencia (FIV heteróloga sin COC) o en presencia de células del *cumulus oophorus* (FIV heteróloga). La flecha representa un período de tiempo de cuatro días (a partir de D-3 a D1). Los ovocitos se obtuvieron mediante la aplicación de un tratamiento de superovulación que comenzó el D-3. El día de la fecundación *in vitro* (D0) se consideró la referencia para el tratamiento de superovulación y para los tiempos de incubación que se indican en la flecha así como los medios de incubación. A diferentes momentos (barra de color negro), se evaluaron los parámetros descritos en la flecha en una serie de presuntos cigotos. El tratamiento de superovulación así como los medios de incubación se detallan en la sección de material y métodos: eCG= gonadotropina coriónica equina, HCG= gonadotropina coriónica humana, medio FIV= medio de fecundación *in vitro* FERT y medio IV = medio de cultivo *in vitro* HTF o FERT, optimizado con aminoácidos.

**Experimento 3: Evaluación de la madurez, condensación y estabilidad de la cromatina nuclear espermática.**

***Animales***

Para realizar el *Experimento 3*, se utilizaron muestras seminales procedentes de cuatro delfines adultos, maduros sexualmente y de fertilidad probada cuyas condiciones de alojamiento y dieta han sido descritas previamente el *Capítulo I* de esta tesis. Los machos 1, 2, 3 y 4 tenían 33, 9, 16 y 19 años de edad y un peso de 220, 196, 209 y 203 Kg, respectivamente.

***Diseño experimental***

En este experimento, se estudió el estado de la cromatina nuclear espermática de delfín mular mediante la evaluación de la presencia de histonas, así como la condensación de la cromatina nuclear espermática y su susceptibilidad a la descondensación tras el tratamiento con EDTA y SDS (estabilidad).

***Colecta seminal y crioconservación***

Se utilizaron de dos a tres eyaculados de cada uno de los individuos. La colecta seminal, la selección espermática, así como el proceso de congelación y descongelación se llevó a cabo tal y como se describe en el *Experimento 1*. Las dosis seminales del macho 1 se seleccionaron entre las utilizadas en el *Experimento 1*.

***Tinción con azul de anilina***

La presencia de las histonas se evaluó mediante la tinción con azul de anilina en espermatozoides bovinos y delfines descongelados. Se utilizaron para ello 2 pajuelas diferentes de dos eyaculados diferentes de cada uno de los delfines.

Tras la descongelación a 37°C durante 1 min, se añadieron 5 µL de la muestra seminal a un portaobjetos y realizó una extensión de la muestra, y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se fijó con glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,2 M (pH 7,2) durante 30 min a temperatura ambiente y se procedió, a su tinción con azul de anilina al 5% con ácido acético al 4% (pH 3,5) durante 5 min. Se evaluaron 1000 espermatozoides por animal, 250 espermatozoides por muestra. Las muestras se evaluaron bajo microscopio de campo claro con objetivo de 400X. Los

espermatozoides que muestran una tinción azul intensa o muy intensa se consideraron como positivos a la tinción, mientras que los espermatozoides sin teñir o débilmente teñidos se consideraron como negativos. Se calculó el porcentaje de cabezas de espermatozoides teñidos (Dadoune *et al.*, 1988).

#### **Análisis de condensación de la cromatina y la estabilidad**

En este experimento, se analizaron dos eyaculados diferentes del mismo delfín (macho 1) y dos eyaculados diferentes de un mismo toro, ambos utilizados en el *Experimento 1*. La colecta seminal, la evaluación espermática, la congelación y la descongelación de las muestras se realizaron siguiendo los mismos protocolos que en *Experimento 1*. El grado de condensación de la cromatina se evaluó mediante la valoración de la absorción de yoduro de propidio (IP), compuesto que se intercala en el ADN y emite fluorescencia, utilizando el Kit DNA Cycle Test (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.), de acuerdo con Molina *et al.* (1995). La fluorescencia emitida se valoró con la ayuda de un citometría de flujo. La estabilidad de la cromatina se evaluó mediante la valoración de la resistencia a la descondensación de la cromatina, por tratamiento con EDTA y SDS y posterior determinación del grado de condensación de la misma.

Para la determinación de condensación de la cromatina, la muestra seminal se resuspendió en un medio de capacitación durante 5 min a una concentración de  $1-2 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Después de realizar una centrifugación a 150 g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se permeabilizó la membrana de los espermatozoides al transferir la muestra a una solución de tripsina (0,5%) en un tampón de espermina-tetrahidrocloruro durante 10 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, con el fin de detener la acción de tripsina y eliminar ADN de doble cadena, se añadió proteinasa K (12 mg/mL). La muestra se homogenizó golpeando suavemente cada tubo con la mano y se procedió a la incubación de la misma durante 10 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron IP a 4°C (50 mg/mL) y espermina-tetrahidrocloruro en tampón citrato. Por último, la muestra se incubó durante 1h en la oscuridad a 4°C hasta que se realizó el análisis por citometría de flujo.

#### **Análisis de estabilidad de la cromatina espermática**

La estabilidad de la cromatina se determinó como se ha descrito previamente con algunas modificaciones (Huret, 1983; Madrid-Bury *et al.*, 2005). Brevemente, se

ajustó la concentración de cada muestra a  $2 \times 10^6$  espermatozoides en una solución de EDTA y SDS en tampón de borato (0,05 M, pH 9,0). Las muestras se incubaron a continuación durante 5 min a temperatura ambiente. Se evaluaron diez soluciones diferentes con distintas concentraciones de EDTA y SDS: (1) 0,0469 mM y 0,0078%, (2) 0,0938 mM y 0,0156%, (3) 0,1875 mM y 0,0313%, (4) 0,375 mM y 0,0625%, (5) 0,75 mM y 0,125%, (6) 1,5 mM y 0,25%, (7) 3 mM y 0,5%, (8) 6 mM y 1%, (9) 12 mM y 1,5% y (10) 18 mM y 3% respectivamente. A continuación, las muestras se tiñeron con IP y se analizaron por citometría de flujo.

### **Análisis por citometría de flujo**

Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, SA, CA, EE.UU.). El IP se excitó por emisión de láser de iones de argón a 488 nm y la fluorescencia del IP se detectó a 605 nm, utilizando un filtro de paso de banda 600/40. Para cada muestra, se contaron un total de 10.000 espermatozoides. Los datos se analizaron utilizando el software Cell Quest de Becton Dickinson y la intensidad de fluorescencia se expresó como unidades de intensidad de fluorescencia media (UMIF), relacionados con la captación de IP por el ADN.

### **Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. En el experimento de evaluación de espermatozoides anclados y unidos, las variables se analizaron por medio de un ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis y el test Mann-Whitney). El porcentaje de penetración de ovocitos, la formación de pronuclear, el porcentaje de polispermia, el porcentaje de partenogénesis y la tasa de escisión se analizaron utilizando un ANOVA paramétrico unifactorial, *z-test* y *t-test*. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores se compararon mediante el test Mann-Whitney. Un valor de  $P < 0,001$  se consideró significativo. Todos los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS (v.18.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 3. RESULTADOS

#### Experimento 1: Fecundación *in vitro* heteróloga empleando ovocitos con zona intacta de especie bovina y espermatozoides de delfín.

##### *Evaluación de la interacción espermatozoide-zona pelúcida*

La interacción del espermatozoide con la zona pelúcida se evaluó a las 2,5 hpi. Este tiempo de incubación se eligió de acuerdo a un estudio preliminar realizado en el laboratorio (resultados no mostrados) en el que los espermatozoides de delfín o de bovino se co-incubaron y se evaluaron a diferentes tiempos (1, 2, 2,5 y 3 hpi) con ovocitos bovinos con la ZP intacta. Los valores más altos de unión para ambas especies se obtuvieron para un tiempo de incubación de 2,5 hpi.

El número de espermatozoides anclados después de 2,5 hpi, fue mayor en el grupo de FIV heteróloga ( $P < 0,001$ ) (Figuras 35 y 36). Por otra parte, el número de espermatozoides unidos ( $P < 0,001$ ) a la zona pelúcida tras de agitación con vórtex también fue mayor en el caso de la co-incubación con espermatozoides de delfín.

Número de espermatozoides por ovocito (Media  $\pm$  SEM)

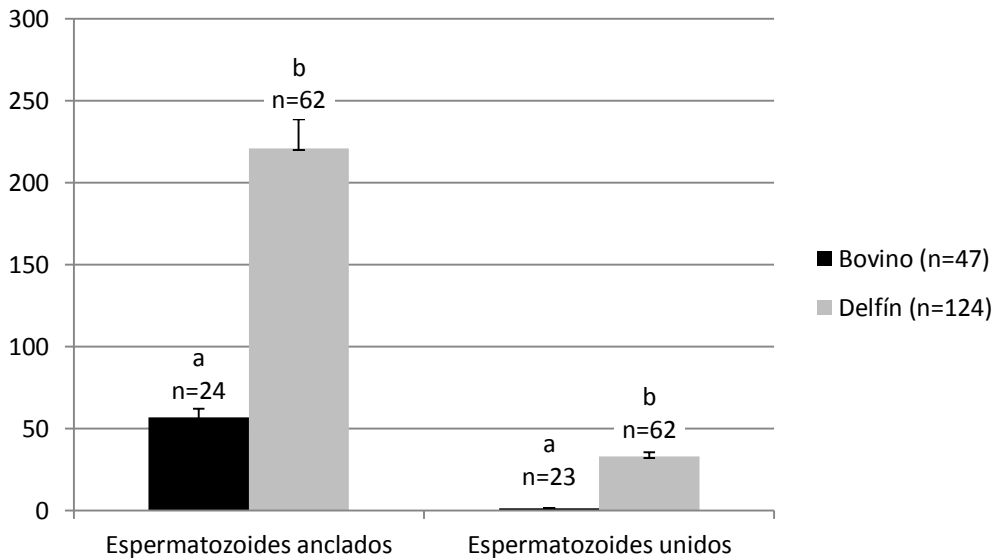


Figura 35. Número de espermatozoides bovinos (FIV homóloga) y de delfín (FIV heteróloga) anclados y unidos a la ZP de un ovocito bovino a las 2,5 hpi. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de doce réplicas. a vs b: diferencias significativas entre los grupos con la misma variable ( $P < 0.001$ , ANOVA). n= número de ovocitos examinados.

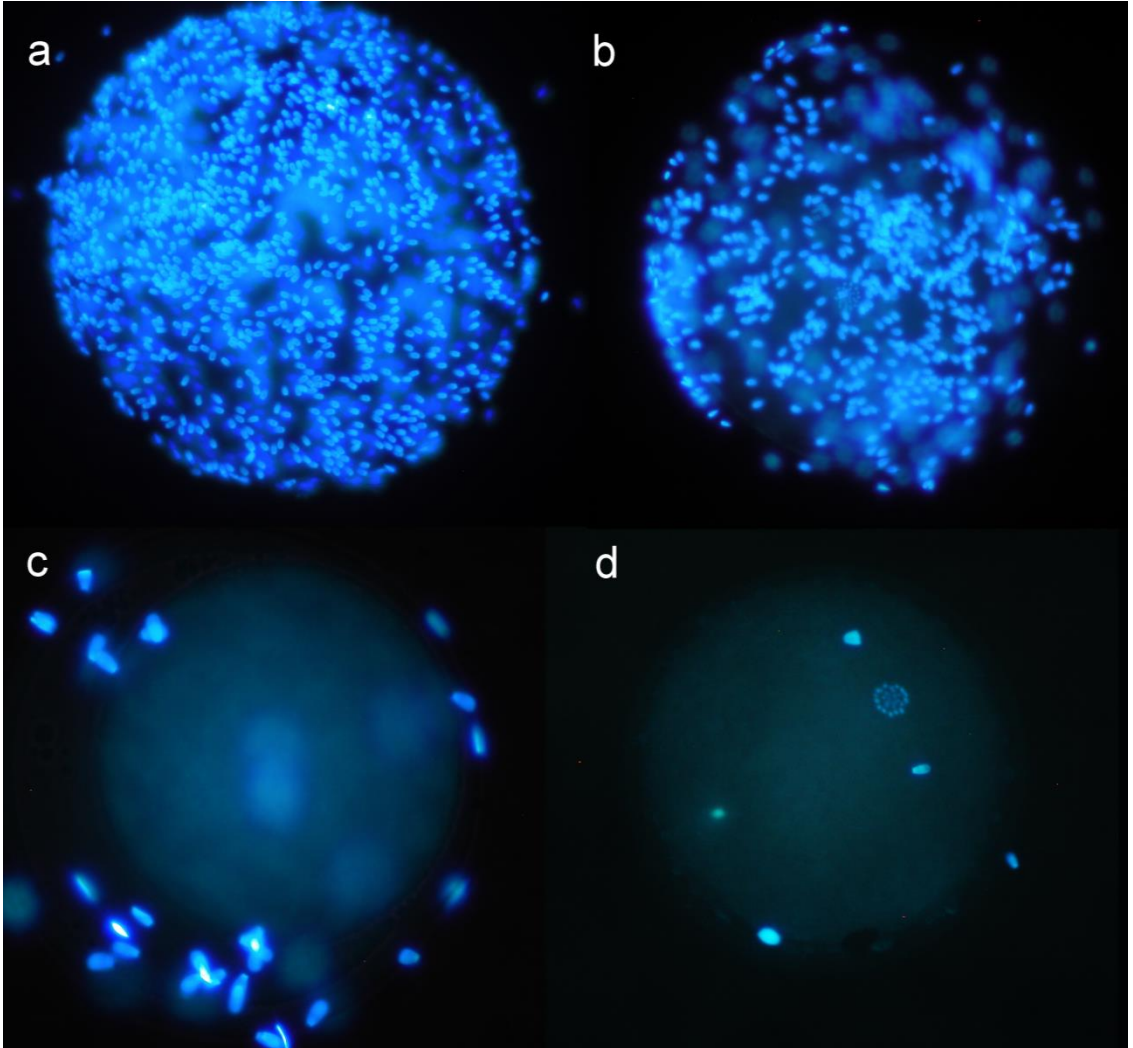


Figura 36. Espermatozoides de delfín (a, b) y de bovino (c, d) anclados (a, c) y unidos (b, d) a la ZP de ovocitos de bovino a las 2,5 horas post-inseminación. Los gametos se tiñeron con Hoechst 33342 y se visualizaron bajo microscopio de contraste de fases (400X).

### ***Evaluación de la fecundación in vitro***

Los experimentos de FIV heteróloga mostraron que los espermatozoides de delfín mular son capaces de penetrar ovocitos de bovino, dando lugar a la formación pronuclear y a la formación del embrión híbrido (*Tabla 10, Figuras 37-39*).

La fecundación y división se evaluó bajo microscopio de contraste de fases con epifluorescencia y se confirmó por microscopía confocal. El porcentaje de penetración

y división fue más alto en el grupo de FIV homóloga con respecto a la FIV heteróloga (*Tabla 10*). El grupo de la FIV homóloga mostró un porcentaje más elevado de formación pronuclear a las 18 hpi que disminuyó paulatinamente en las siguientes horas de incubación, llegando a ser significativamente menor ( $P < 0,05$ ) que el grupo de la FIV heteróloga a las 24 hpi. Los estudios preliminares mostraron que transcurrido este tiempo de incubación (26 y 28 hpi), no se observaron dos pronúcleos ya que en ese momento se estaba produciendo la singamia. En el grupo de FIV heteróloga el porcentaje de ovocitos que mostró pronúcleos fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) y la formación pronuclear se observó en todos los tiempos evaluados (18-28 hpi). El porcentaje más alto de formación pronuclear se observó a las 24 hpi. Este resultado indica que la formación pronuclear se produce más lentamente en la FIV heteróloga delfín/bovina que en la FIV homóloga bovina.

El porcentaje de polispermia, evaluado a las 12 hpi fue de  $11,0 \pm 1,2$  en el grupo de FIV homóloga, mientras que, curiosamente, no se observaron ovocitos polispermicos en el grupo de la FIV heteróloga.

La tasa de división en el D2 en el grupo de FIV heteróloga fue de 34% ( $P > 0,001$ ) mientras que en el grupo de FIV homóloga se obtuvo una tasa de división del 89,3% (*Tabla 10*). En el grupo de evaluación de la partenogénesis en el D2 se observó una tasa de activación partenogenética espontánea del 8,0% (*Tabla 10*).

Tabla 10. Evaluación de la FIV homóloga (HM) y heteróloga (HT) realizada tras la co-incubación de ovocitos bovinos con la ZP intacta con espermatozoides bovinos o de delfín. Se incluyó un control de partenotes (PART) que contenía únicamente COCs madurados *in vitro*. Se evaluó el porcentaje de penetración a las 12 hpi. El porcentaje de formación pronuclear se evaluó a diferentes tiempos (18-28 hpi) y el porcentaje de división se evaluó en el día 2 (D2).

	Penetración			Polispermia						Formación pronuclear						Tasa de división	
	n	%	n	12h	18h	20h	22h	24h	26h	28h	D2	n	%	n	%	n	%
HM	132	80±5,3 <sup>a</sup>	98	75,9±12,9 <sup>a</sup>	76	73,8±18,5 <sup>a</sup>	44	43,2±16,9 <sup>a</sup>	15	14,1±1,2 <sup>a</sup>		371	89,3±5,9 <sup>c</sup>				
HT	121	24±6,6 <sup>b</sup>	82	3,4±2,6 <sup>b</sup>	89	3,4±0,6 <sup>b</sup>	100	5,2±3,3 <sup>b</sup>	158	25,2±7,4 <sup>b</sup>	129	12,4±5,5	79	8,9±8,6	832	34,8±18,5 <sup>d</sup>	
PART												201	8,0				

a vs b, P<0,05; c vs d, P<0,001; ANOVA.

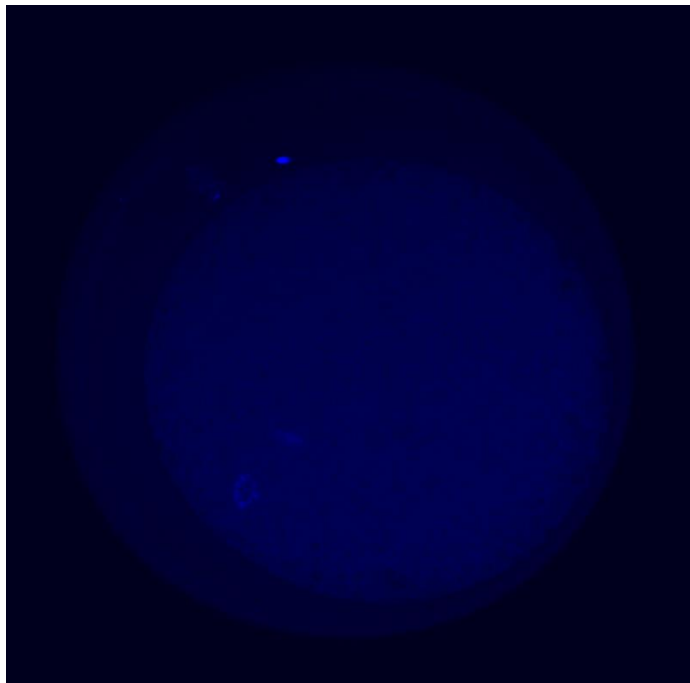


Figura 37. Imagen correspondiente al plano ecuatorial del presunto cigoto visualizado mediante microscopía confocal en la que se aprecia un espermatozoide de delfín mular en el espacio perivitelino de un ovocito bovino. La cromatina está teñida con Hoechst 33342.

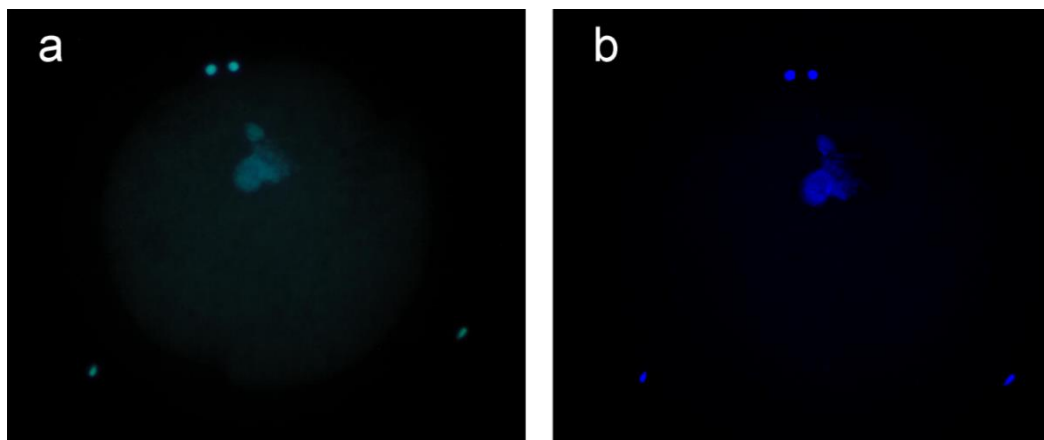
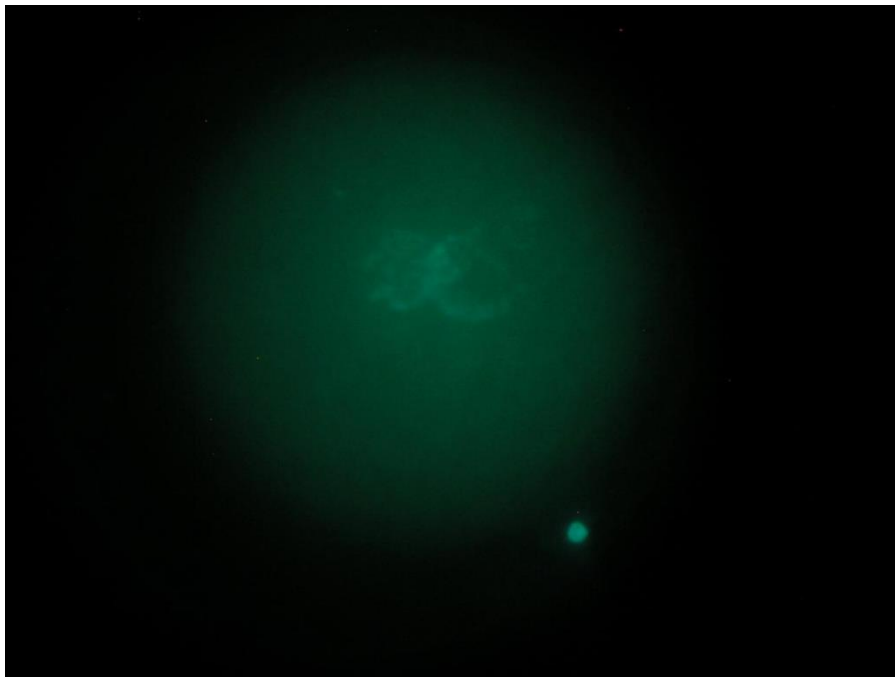


Figura 38. Imagen correspondiente a la cabeza de un espermatozoide de delfín descondensándose en el citoplasma de un ovocito bovino visualizado bajo microscopía de contraste de fases (a) y mediante microscopía confocal (b); plano ecuatorial del presunto cigoto (b). La cromatina está teñida con Hoechst 33342) (400X).

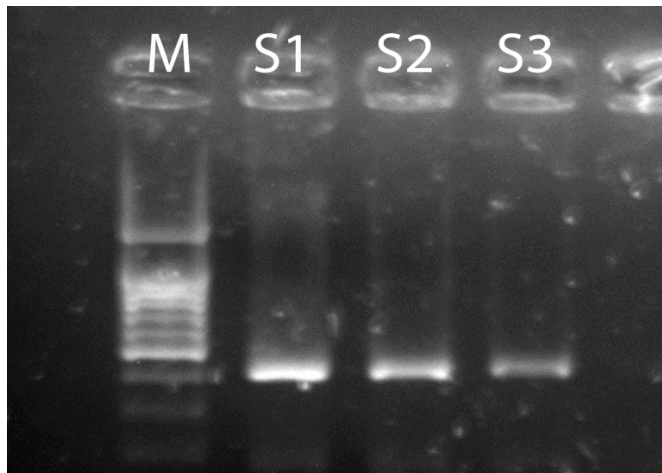


*Figura 39.* Imagen correspondiente a dos pronúcleos visualizados bajo microscopía de contraste de fases tras realizar la FIV heteróloga (24 horas post-inseminación) utilizando espermatozoides de delfín mular y ovocitos bovinos con la ZP intacta (tinción Hoechst 33342), (400X).

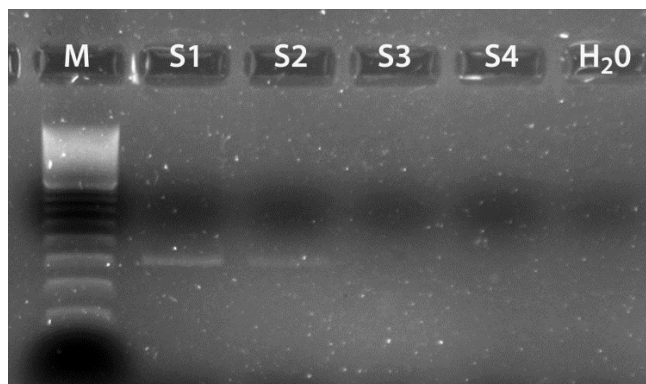
#### ***Evaluación de la fecundación heteróloga por PCR***

La presencia de material genético de delfín mular en los embriones híbridos se confirmó por PCR mediante la evaluación de la presencia de un gen de referencia del delfín que codifica para la proteína ribosómica 18S y que dio lugar a una banda electroforética de 486 pb. En un estudio preliminar, se realizaron diluciones seriadas de ADN de espermatozoides de delfín y se realizó la PCR, a fin de verificar si dicha PCR era capaz de detectar el ADN de delfín presente en una sola célula espermática, equivalente al ADN presente en un embrión híbrido (*Figura 40*). Las concentraciones de ADN de espermatozoide de delfín que se testaron fueron de 40 ng/mL, 4 ng/mL y 0,4 ng/mL. La concentración más baja correspondía a la cantidad de ADN en una sola célula espermática. Todas las PCRs realizadas a partir de muestras con dichas diluciones mostraron una banda de 486 pb (*Figura 40*). Las diluciones seriadas de ADN de espermatozoides de bovino mostraron una banda de 486 pb a concentraciones de 4000 ng/mL y 400 ng/mL. Sin embargo, la banda no se observaba empleando concentraciones más bajas (40, 4 o 0,4 ng/mL), (*Figura 41*). Esto indica que las condiciones de PCR utilizadas son las apropiadas para detectar el material genético

presente en un solo espermatozoide de delfín o en un solo embrión híbrido de dos células).



*Figura 40.* Electroforesis (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra los resultados de amplificación de la PCR para el gen 18S específico de delfín a diferentes concentraciones de DNA espermático de delfín mular. M: Marcador de tamaño molecular (100bp), S1: 40 ng/mL, S2: 4 ng/mL, S3: 0,4 ng/mL de DNA espermático de delfín y control negativo (H<sub>2</sub>O). Las muestras S1, S2 y S3 presentaron una banda a 486 bp y se consideraron positivas para el producto de PCR específico.



*Figura 41.* Electroforesis representativa (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra los resultados de amplificación de la PCR para el gen 18S específico de delfín a diferentes concentraciones de ADN espermático bovino. M: Marcador de tamaño molecular (100bp), S1: 4000 ng/mL, S2: 400 ng/mL, S3: 40 ng/mL, D4: 4 ng/mL y D5: 0,4 ng/mL de DNA espermático bovino y H<sub>2</sub>O (control negativo). Las muestras S1 y S2 mostraron una banda a 486 bp y se consideraron positivas para el producto de PCR específico.

Los embriones de 2 células de los grupos experimentales que presentaron una banda de 486 pb se consideraron positivos para el producto específico de PCR. Entre los 30 embriones de FIV heteróloga utilizados, 17 fueron positivos, lo que representa un 59,3 % de todos los embriones evaluados. Ninguno de los embriones de 2 células del grupo de FIV homóloga mostró banda de electroforesis de 486 pb, (Figura 42).

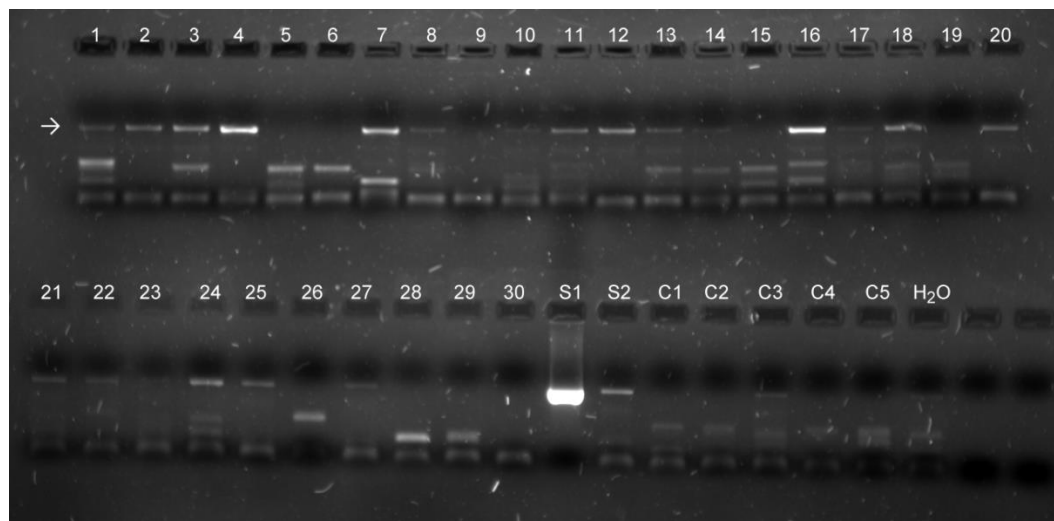


Figura 42. Electroforesis representativa (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra resultados de amplificación de la PCR para el gen 18S específico de delfín. Columnas 1 a 30: presuntos embriones híbridos bovino-delfín, columnas S1 y S2: 4ng /mL y 0.4 ng/mL de ADN espermático de delfín, columnas C1 a C5: embriones de dos células bovinos y H<sub>2</sub>O (control negativo). Flecha: Indica la banda a 486 pb correspondiente al gen amplificado 18S.

### **Experimento 2: Fecundación *in vitro* heteróloga empleando ovocitos con zona intacta de especie murino y espermatozoides de delfín**

#### ***Evaluación de los espermatozoides anclados a la zona pelúcida***

El número (media  $\pm$  SEM) de espermatozoides murinos o de delfín anclados a la zona pelúcida a las 2,5 hpi con ovocitos murinos fueron similares ( $0,69 \pm 0,68$  y  $0,66 \pm 0,74$ , respectivamente) ( $P > 0,05$ ). El SEM mostró una gran dispersión de la media (Figura 43). El número de espermatozoides unidos no se pudo evaluar en este experimento ya que la agitación provocada por el vórtex causa grandes daños estructurales en el ovocito murino que haciendo imposible una evaluación precisa.

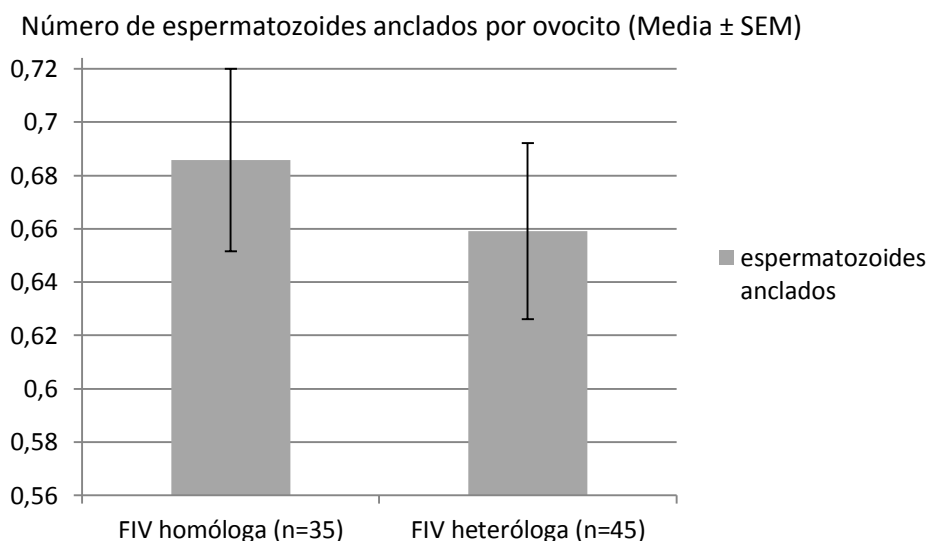


Figura 43. Número de espermatozoides murinos (FIV homóloga) o de delfín mular (FIV heteróloga) anclados a la ZP de un ovocito murino a las 2,5 horas post-inseminación. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de 5 réplicas. n= número de ovocitos examinados. ( $P<0,05$ , ANOVA).

### Evaluación de la fecundación in vitro

La formación de pronúcleos se evaluó en los presuntos cigotos a las 6 hpi cuando la fecundación se realizó con espermatozoides murinos y a las 22 hpi, cuando se realizó con espermatozoides de delfín. La tasa de división se evaluó a las 24 hpi (Figura 44). Los resultados se muestran en la Tabla 11. La tasa de formación pronuclear no mostró diferencias entre los grupos de partenogénesis y fue significativamente mayor ( $P<0,001$ ) en el grupo de FIV homóloga. La tasa de división en el grupo de la FIV heteróloga ( $P<0,05$ ) fue mayor que en el grupo de evaluación de la partenogénesis, pero mucho más baja que en el grupo de FIV homóloga ( $P<0,001$ ). Cuando la FIV heteróloga se realizó con ovocitos que presentaban células del cúmulo. La tasa de división fue menor que cuando la FIV heteróloga se realizó empleando ovocitos que conservaban las células del *cumulus oophorus* (3,3% frente a 9,6 %).

Tabla 11. Evaluación de la formación pronuclear a las 22 horas post-inseminación de los espermatozoides de delfín con ovocitos murinos con la zona pelúcida intacta (FIV heteróloga) o sin células del cúmulo [(FIV heteróloga (sin células del *cumulus oophorus*)], 6 hpi (FIV homóloga) y 6 hpi (grupo control partenogénesis)

	Formación pronuclear		Polispermia		División D1	
	n	%	%	N	%	
FIV heteróloga ( <i>sin células del cumulus oophorus</i> )	73	7,57 ± 1.67 <sup>b</sup>	1.37	120	3,33 ± 0.03 <sup>bc</sup>	
FIV heteróloga	108	6,43 ± 2.09 <sup>b</sup>	0.92	119	9,62 ± 3.06 <sup>c</sup>	
FIV homóloga	173	82±5,1 <sup>a</sup>	0	173	77,11 ± 3.87 <sup>a</sup>	
Grupo control de partenogénesis	81	1,72 ± 0.67 <sup>b</sup>	0	73	0 <sup>b</sup>	

a vs b, P<0,001 c vs d, P<0,05; ANOVA.

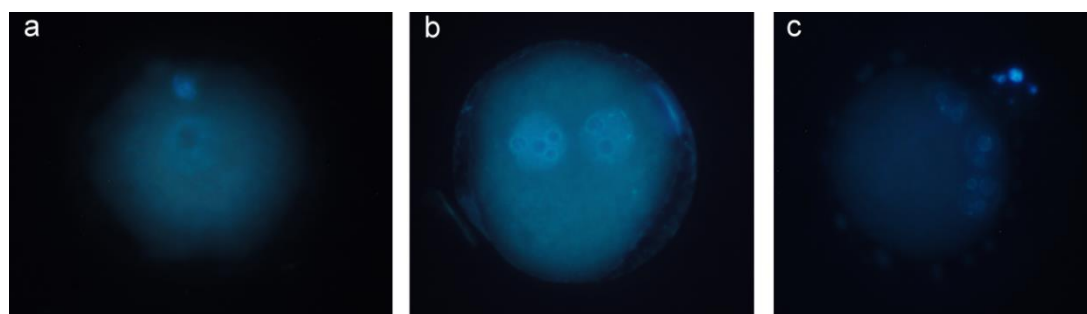
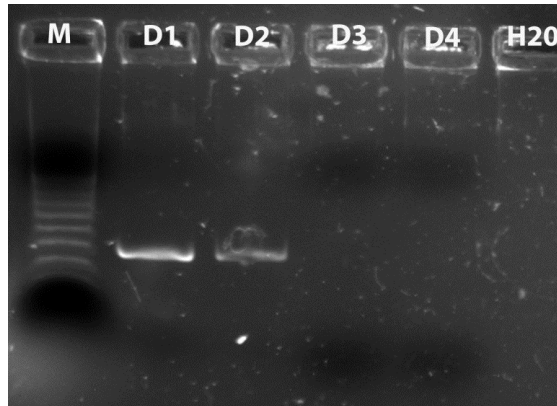


Figura 44. Evaluación de la formación pronuclear a las 22 horas post-inseminación de espermatozoides de delfín mular con ovocitos murinos con la ZP intacta (a) Cromatina de la cabeza de espermatozoide descondensándose (b) dos pronúcleos y (c) tres pronúcleos en diferentes ovocitos murinos teñidos con Hoechst 3342 y visualizados bajo microscopio de contraste de fases (400x).

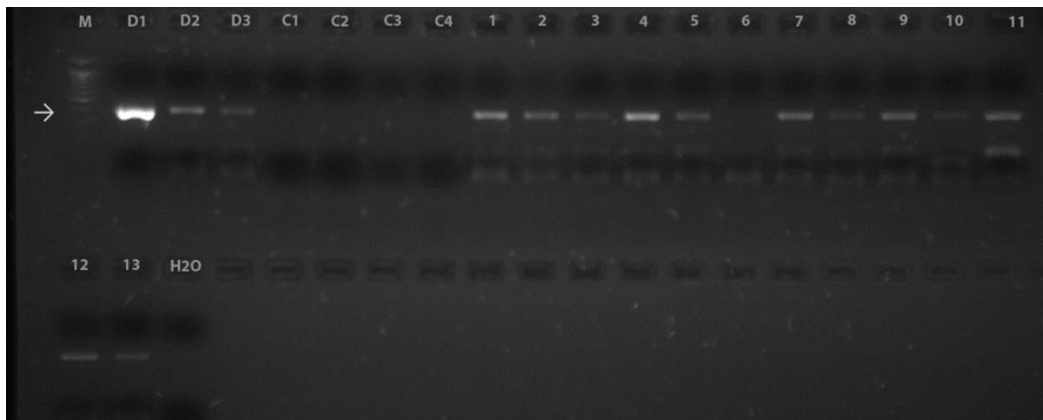
### Evaluación de la fecundación heteróloga por PCR

La presencia de material genético de delfín en los embriones híbridos se confirmó por PCR. Como se ha descrito para la FIV heteróloga empleando ovocitos bovinos y espermatozoides de delfín (*Experimento 1*), se prepararon diluciones de ADN espermático murino con el fin de determinar si el ADN murino para este producto de PCR específico podría ser detectado. El ADN espermático de delfín mostró una banda positiva de 486 pb a 0,4 ng/mL (*Experimento 1*). Por lo tanto, en la amplificación por PCR de embriones híbridos de 2 células, la presencia de una banda de 486 pb se correspondía con la presencia de ADN de delfín. Los resultados mostraron que el producto de la PCR no pudo detectar ADN en ratones a concentraciones de 4 y 0,4 ng/mL (*Figura 45*). La *Figura 46* muestra el producto de

PCR de embriones de 2 células en los grupos experimentales que presentan una banda positiva de 486 pb y se consideraron positivos para el producto específico de PCR; 92,3% de los embriones de 2 células evaluados mostraron una banda de 486 pb positivo (n=13). Por lo tanto, se confirmó la presencia de embriones híbridos de 2 células. Los embriones de la FIV homóloga murina no mostraron banda de 486 pb.



*Figura 45.* PCR representativa (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra los resultados de amplificación de la PCR para el gen 18S específico de delfín para diferentes concentraciones de ADN espermático murino. M: Marcador de tamaño molecular (100bp), D1: 400 ng/mL, D2: 40 ng/mL, D3: 4 ng/mL, D4: 0,4 ng/mL H<sub>2</sub>O (control negativo). Las muestras D1 y D2 que presentan una banda a 486 bp se consideraron positivas.

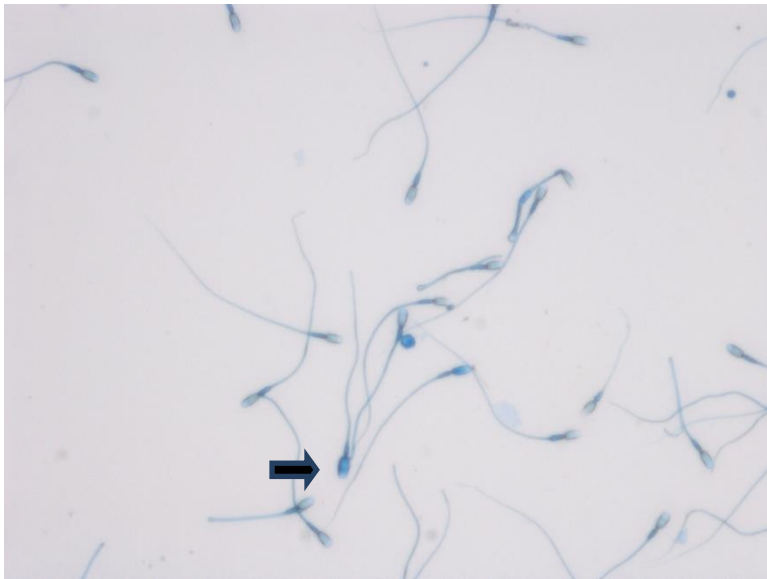


*Figura 46.* Electroforesis representativa (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra los resultados de amplificación de la PCR para el gen 18S específico de delfín. M: Marcador de tamaño molecular (100bp). Columnas D1 a D3: diluciones seriadas de ADN espermático de delfín (D1: 40 ng/mL, D2: 4 ng/mL, D3: 0,4 ng/mL); columnas C1 y C2: diluciones seriadas de ADN espermático murino (40 ng/mL y 4 ng/mL respectivamente); C3: embrión de 2 células murino y C4: blastocisto murino; columnas 1 a 13: presuntos embriones

delfín/murino; H<sub>2</sub>O (control negativo). Todos los embriones se consideraron positivos excepto el embrión correspondiente a la columna 6 ya que la banda a 486pb no se detectó.

**Experimento 3: Evaluación de la madurez, condensación y estabilidad de la cromatina nuclear espermática.**

Los espermatozoides de bovino no se tiñeron con el azul de anilina; mientras que entre un 0 y un 4% de los espermatozoides de delfín mostraron patrones de tinción positivos (*Figura 47, Tabla 12*).



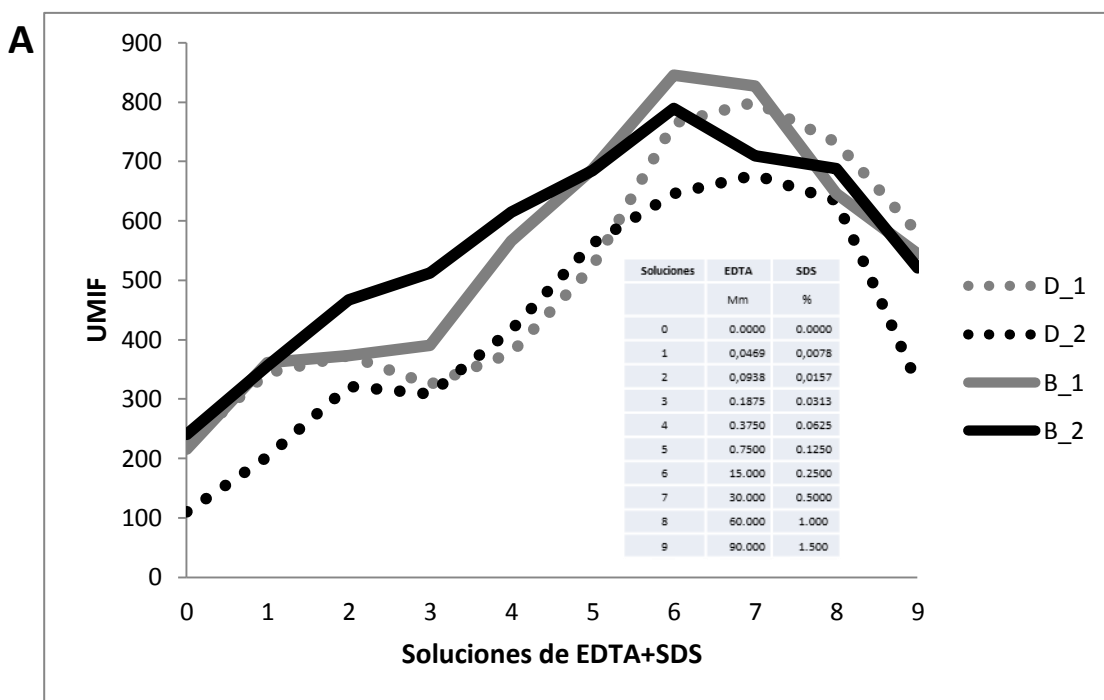
*Figura 47.* Espermatozoides de delfín teñidos con azul de anilina (flecha), que tiene gran afinidad por los residuos de lisina presentes en las histonas, las cuales mostraron un intenso color azul (microscopía de campo claro, 400X).

*Tabla 12.* Media ( $\pm$  SD) de espermatozoides de delfín mular (D) teñidos con azul de anilina (AA) de 4 delfines.

Delfín	Edad	N	Media ( $\pm$ SD)
D1	38	1000	1,7 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
D2	16	1500	0,7 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>
D3	9	1200	3,7 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>
D4	19	1500	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup>

a vs b vs c vs d, P<0,001; ANOVA.

La estabilidad de la cromatina mostró la misma tendencia y fue similar entre los eyaculados de la misma especie, la tasa de absorción de IP aumentó hasta un máximo y, a continuación, a concentraciones más elevadas de EDTA y SDS, la captación de IP disminuyó. Los resultados de la evaluación de la estabilidad de cromatina de los espermatozoides mostraron que a las mismas concentraciones de EDTA y de SDS, existía un grado de descondensación mayor en los espermatozoides bovinos ( $P < 0,05$ ) (Figura 48). Además, fueron necesarias concentraciones más altas de EDTA y SDS para inducir un máximo grado de descondensación de la cromatina en los espermatozoides de delfín (Figura 48).



**B**

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
D1	215,52	324,695	377,745	523,34	645,945	677,48	633,485	579,92	361,72
D2	284,25				644,41	795,43			
D3	315,42				886,85	897,37			
D4	302,25				839,88	874,97			

Figura 48. Estabilidad de la cromatina nuclear del espermatozoide de delfín mular (D), (n=2) y de bovino (B), (n=2) después de haber sido tratados con diferentes concentraciones de EDTA+SDS. UMIF: unidad de intensidad de fluorescencia media.

#### 4. DISCUSIÓN

En este estudio, se pone de manifiesto la capacidad que tienen los espermatozoides descongelados de delfín para penetrar tanto ovocitos bovinos como murinos con la zona pelúcida intacta y producir embriones híbridos. Los procesos implicados en la FIV heteróloga se observaron al microscopio y la naturaleza híbrida de los embriones se confirmó por PCR. Los resultados obtenidos fueron inesperados teniendo en cuenta que no se ha descrito previamente una FIV heteróloga empleando ovocitos de mamíferos con la ZP intacta y espermatozoides de una especie de diferentes familia y orden.

Estudios anteriores han descrito la FIV heteróloga entre especies empleando ovocitos con la ZP intacta, pero éstos se realizaron entre especies filogenéticamente relacionadas, como son los felinos domésticos y salvajes (Andrews *et al.*, 1992; Donoghue *et al.*, 1992; Gañán *et al.*, 2009a; Gañán *et al.*, 2009b), o los artiodáctilos (Cox *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1999; Kouba *et al.*, 2001; Soler *et al.*, 2008; García-Alvarez *et al.*, 2009). Otro estudio describió la penetración de espermatozoides equinos en ovocitos bovinos con la ZP intacta, sin embargo, se observó un fallo en el bloqueo de la polispermia que se atribuyó a la falta de madurez de los ovocitos, lo que podría alterar la especificidad y facilitar el proceso (Sinowitz *et al.*, 2003). El éxito de la FIV heteróloga entre especies filogenéticamente alejadas, tal como se describe en este estudio, cuestiona la especificidad de la fecundación en condiciones *in vitro*.

##### ***Los espermatozoides de delfín se unen y penetran tanto los ovocitos con la ZP intacta de bovino como los de murino***

En un estudio preliminar de nuestro trabajo, se observó que los espermatozoides delfín requieren 2,5h para experimentar los cambios funcionales necesarios para anclarse y unirse a la ZP con la máxima eficacia. Este resultado coincide con el único estudio en el que se describe la FIV heteróloga utilizando espermatozoides criopreservados de delfín y ovocitos de hámster sin ZP, en el que los valores máximos de unión entre los gametos se adquirieron a las 2 hpi (Fleming *et al.*, 1981). Este tiempo de co-incubación es similar al empleado en estudios de interacción re (Naz *et al.*, 1991; Sinowitz *et al.*, 2003; Canovas *et al.*, 2007; Clulow *et al.*, 2010).

En este estudio, se observó la presencia de espermatozoides de delfín en el espacio perivitelino bovino y murino (Figura 37), confirmando que la ZP de ambas especies fue capaz de reconocer a los espermatozoides de delfín. También sugiere que

la se indujo la RA, que la ZP de ambas especies fue sensible a las enzimas del acrosoma de delfín y que se produjo una unión efectiva. Estos resultados están en consonancia con estudios anteriores que indican que el sistema lítico del acrosoma se encuentra conservado desde un punto de vista evolutivo en los mamíferos (Adham *et al.*, 1996). Además, los resultados de la FIV heteróloga bovina mostraron un promedio de 33 espermatozoides unidos por ovocito mientras que sólo uno se observó en el espacio perivitelino (*Figuras 35-37*). Estos resultados apoyan a los descritos en un estudio previo (Papi *et al.*, 2012) en el que se observó un endurecimiento significativo de la ZP bovina tras la penetración, lo que permitiría retener a los espermatozoides unidos a la ZP. Estudios anteriores utilizando ovocitos sin ZP demostraron que la membrana vitelina puede actuar como una barrera en algunos casos, tales como la fecundación *in vitro* heteróloga de esperma humano y ovocitos porcinos (Canovas *et al.*, 2007), o puede ser más permisiva, como es el caso de los ovocitos de hámster (Yanagimachi *et al.*, 1976; Liu y Baker, 1992).

Curiosamente, los resultados obtenidos mostraron que la interacción espermatozoide-ovocito fue similar o mayor en el grupo heterólogo con respecto al homólogo (*Figuras 35 y 43*). Estos resultados son inesperados, ya que pensábamos que el reconocimiento entre los gametos procedentes de la misma especie aumentaría la interacción. Sin embargo, estos resultados apoyan la idea planteada por Bedford *et al.* (2004 y 2014) que sugiere que la interacción y el éxito de la fecundación no sólo dependen de reconocimiento entre los receptores de los gametos con regiones conservadas, lo que parece ser poco probable en especies filogenéticamente distantes, como las que participan en el presente estudio. Estos autores sugieren que otros factores pueden facilitar la interacción, como el empuje físico u otros elementos capaces de reducir la especificidad de la zona pelúcida.

Entre los factores relacionados con los espermatozoides que podrían facilitar la interacción y la penetración, probablemente el empuje físico es el más obvio (Bedford, 2004). Este factor está relacionado con la motilidad espermática (Stauss *et al.*, 1995). En el transcurso de la realización de los experimentos de interacción, se observó que la motilidad de los espermatozoides de delfín era más alta que la de los espermatozoides bovinos, e incluso que la de los espermatozoides murinos en fresco. Esto podría explicarse por la gran longitud del flagelo del espermatozoide de delfín así como su elevada actividad mitocondrial (Fleming *et al.*, 1981). Otra característica interesante de los espermatozoides de delfín descrito por Fleming *et al.* (1981) que pueden ayudar a explicar los altos valores de interacción obtenidos en la fecundación heteróloga bovina, es la pequeña cabeza fusiforme y la presencia de 14 a 16 aristas

dispuestas en paralelo al eje longitudinal de la cabeza. Estas aristas aumentan la superficie de contacto, proporcionando interacciones estables y podrían participar en la penetración de la membrana así como en la fusión pronuclear (Fleming *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 2002b; Bedford, 2014).

Finalmente, el presente estudio reveló otra característica interesante que podría explicar los valores de interacción más elevados observados en la FIV heteróloga, el estado de la cromatina. Los espermatozoides descongelaos de delfín, que mostraron valores de interacción más altos que los espermatozoides bovinos descongelaos al incubarlos con ovocitos bovinos (*Figura 35*), también mostraron una cromatina más estable (*Figura 48*). Esta observación está en acuerdo con estudios previos que sugieren que el estado de la cromatina espermática puede influir en la interacción del espermatozoide e incluso en la penetración. En este sentido, se ha descrito previamente (Liu y Baker, 2007; Hourcade *et al.*, 2010) que los espermatozoides unidos a la ZP presentaban niveles más bajos en la fragmentación del ADN y Bedford (Bedford, 1998; 2014) propuso que una estructura estable de la cromatina proporciona rigidez a los espermatozoides, lo que facilita la interacción y la penetración de la ZP.

Por consiguiente, la capacidad de los espermatozoides de delfín para interactuar y penetrar ovocitos de otras especies podría estar relacionada con sus características físicas. El delfín es una especie promiscua y es posible que la presión evolutiva haya llevado al espermatozoide a desarrollar una serie de características como la longitud del flagelo, la forma fusiforme de la cabeza así como una motilidad elevada que podrían proporcionar ventajas en especies competitivas (Gomendio *et al.*, 2006; Tourmente *et al.*, 2011) pero también facilitar la fecundación heteróloga.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la interacción no sólo depende de los espermatozoides, sino también de factores del ovocito. El presente estudio mostró que los ovocitos murinos eran más restrictivos con los espermatozoides de delfín que los ovocitos bovinos (*Figuras 35 y 43; Tablas 9 y 10*). Esto podría explicarse por las diferencias existentes en los receptores de la ZP (Nakano *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen, 1999; Goudet *et al.*, 2008) que pueden verse influidos por el procedimiento de maduración de los ovocitos (Sinowatz *et al.*, 2003; Coy *et al.*, 2008a). En el presente estudio, los ovocitos murinos se obtuvieron del oviducto, mientras que los ovocitos bovinos se maduraron *in vitro*. Los componentes oviductales podrían modificar tanto el espermatozoide como las glicoproteínas de la ZP y el complejo heparina-glicoproteína específico del oviducto que limita la interacción del espermatozoide y

evita la polispermia (Sinowatz *et al.*, 2003; Coy *et al.*, 2008a). Los ovocitos bovinos no se expusieron al ambiente del oviducto, lo que podría ayudar a explicar los valores más altos de interacción y la naturaleza menos restrictiva de los ovocitos de éstos. Por otro lado, las diferencias en los patrones de enmascaramiento de los receptores de la ZP por las proteínas del oviducto (Coy *et al.*, 2008a) pueden contribuir a explicar la reducida y alta variabilidad de la tasa de unión observados en los ovocitos murinos (Figura 43).

#### ***Los espermatozoides de delfín podrían inducir el bloqueo de la polispermia en ovocitos bovinos y murinos***

El presente estudio reveló la eficacia del espermatozoide de delfín a la hora de inducir el bloqueo de la polispermia tanto en ovocitos bovinos (Tabla 10) como en murinos (Tabla 11). Estas especies presentan diferencias relevantes en el desarrollo del bloqueo de la polispermia; mientras que en el ovocito murino la exocitosis de gránulos corticales coincide con una mayor resistencia a las proteasas ("endurecimiento de la ZP"), los ovocitos bovinos experimentan un proceso de endurecimiento previo a la fecundación (Coy *et al.*, 2008a). Sin embargo, a pesar de estas diferencias, los espermatozoides delfín parecen ser extraordinariamente eficaces para inducir el bloqueo de la polispermia en ovocitos de ambas especies. No se observó polispermia al co-incubar espermatozoides de delfín con ovocitos bovinos y sólo se encontró un 1% al realizar la FIV heteróloga con ovocitos murinos; la tasa de polispermia después de la fecundación *in vitro* homóloga se encuentra dentro de los valores esperados, de un 5 a 45% en bovino (Wang *et al.*, 1997; Coy *et al.*, 2005; Iwata *et al.*, 2008) y de 0 a 4% en murino (Depypere *et al.*, 1988). Estos resultados confirman la penetración del espermatozoide y reveló la extraordinaria capacidad de los espermatozoides de delfín para inducir el bloqueo de la polispermia y superando condiciones incluso favorables a la polispermia, tales como la falta de maduración oviductal del ovocito (Wang *et al.*, 1997; Bagis *et al.*, 2001; Coy *et al.*, 2008a).

El desarrollo de un mecanismo eficiente de bloqueo de la polispermia en el delfín podría tener un significado evolutivo. Se ha sugerido que el aumento de la competitividad de los espermatozoides puede aumentar el riesgo de polispermia (Gomendio *et al.*, 2006). Así, es posible que la presión evolutiva en los espermatozoides de una especie competidora como el delfín se haya dirigido hacia el desarrollo de un mecanismo extremadamente eficaz a la hora de inducir el bloqueo de la polispermia.

***Los espermatozoides de delfín son capaces de fecundar ovocitos bovinos y murinos***

En el presente estudio, se evidenció la fecundación heteróloga por varios procesos: la penetración de la membrana vitelina, la descondensación de la cabeza del espermatozoide en el citoplasma de los ovocitos, la presencia de dos cuerpos polares extruidos así como la presencia de dos pronúcleos en el citoplasma del ovocito (*Figuras 38, 39 y 44*). La presencia de pronúcleos y cuerpos polares sugieren que los espermatozoides de delfín son capaces de desencadenar los eventos relacionados con la activación del ovocito, que incluyen la reactivación de la metafase II, la finalización de meiosis y la formación pronuclear. Finalmente, la fecundación se confirmó mediante la evaluación de la formación del embrión híbrido.

La tasa máxima de la formación pronuclear homóloga se observó a las 6 y 18 hpi, mientras que la tasa máxima formación pronuclear heteróloga se observó a las 22 y 24 hpi en murino y en bovino respectivamente (*Tablas 10 y 9*). Estos resultados indican que los delfines requieren más tiempo que las especies murina y bovina para completar la formación pronuclear masculina. Uno de los pasos limitantes en este proceso es la descondensación de la cromatina nuclear espermática, por tanto es posible que la mayor estabilidad observada en la cromatina de los espermatozoides de delfín pueda contribuir a un retraso en la formación pronuclear.

En cuanto a la estructura de la cromatina espermática, los valores de condensación y estabilidad en la especie bovina obtenidos en el presente estudio (*Figura 48*) fueron similares a los descritos por Madrid-Bury *et al.* (2005) usando las mismas condiciones. Se observó una mayor estabilidad, es decir, una mayor resistencia al EDTA y SDS, en todas las muestras seminales de los cuatro delfines analizados. Desde el punto de vista evolutivo, una mayor estabilidad de la cromatina puede representar un mecanismo de preservación de la integridad de la cromatina frente a la formación de ROS generados por las altas temperaturas del testículo en las especie endóricas como es el caso del delfín (Pabst *et al.*, 1995). La elevada estabilidad que presentó la cromatina de los espermatozoides de delfín se encuentra acorde con el bajo porcentaje (0-4%) de espermatozoides de esta especie que presentaron una protaminación defectuosa (espermatozoides inmaduros), determinada por tinción con azul de anilina (*Figura 47 y Tabla 12*). Se ha descrito previamente la existencia de una correlación significativa entre la protaminación defectuosa de la cromatina espermática y la subfertilidad masculina (Bach *et al.*, 1990; Foresta *et al.*, 1992; Hammadeh *et al.*, 2001). La relación entre la estabilidad de la

cromatina, la protaminación y la fertilidad aportaría información fundamental sobre el estado de la cromatina, lo que supondría un valor pronóstico importante de la función espermática (Lewis y Aitken, 2005; Madrid-Bury *et al.*, 2005).

Los embriones híbridos se evaluaron bajo microscopio y se confirmaron, además, determinando la presencia de material genético de delfín por PCR (*Figuras 40-42, 45 y 46*). Se observó una activación de la partenogénesis (*Tablas 9 y 10*) dentro de los niveles esperados (Downs, 1990; Kouba *et al.*, 2001; Méo *et al.*, 2004). La producción de embriones híbridos entre bóvidos se ha descrito previamente. Los ovocitos bovinos heredan el centrosoma por vía paterna mientras que los ovocitos murinos lo realizan por vía materna. Por lo tanto, los resultados obtenidos son sorprendentes, ya que en este estudio se demuestra que el esperma de delfín fue capaz de dar lugar a la formación embrionaria en ambos casos.

En general, los resultados de producción embrionaria fueron mejores al realizar la fecundación *in vitro* heteróloga con ovocitos bovinos con respecto a la realizada con ovocitos murinos. Se requieren más estudios para encontrar una explicación, pero podrían estar relacionados con el hecho de que la especie bovina se encuentra filogenéticamente más cerca del delfín que de la murina (Mc Donald, 2006). Por otro lado, los centrosomas murinos heredados por vía materna pueden conferir mayor estabilidad en detrimento de la formación del embrión híbrido.

La presencia de células del *cumulus oophorus* no tuvo efecto sobre el modelo heterólogo murino en cuanto al bloqueo de la polispermia o la formación embrionaria. Estos resultados difieren de los descritos previamente, que han demostrado que las células del cúmulo juegan un papel importante en el bloqueo de la polispermia y aumentan la formación embrionaria ya que son capaces de transferir nutrientes y señales reguladoras al ovocito (Bagis *et al.*, 2001; Tanghe *et al.*, 2002).

Este estudio reveló propiedades sobresalientes de los espermatozoides de delfín, ya que presenta una cromatina altamente estable y es capaz de fertilizar tanto ovocitos bovinos como murinos dando lugar en ambos casos a la formación de embriones híbridos. Dado que el delfín es una especie promiscua, es posible que la competencia espermática favorezca la presión selectiva hacia una morfología dinámica mejorando las características funcionales así como la estabilidad de la cromatina. Este último puede conferir protección contra los altos niveles de ROS a los que las especies endóricas están sometidas. Estas características en conjunto pueden ayudar a explicar la capacidad fecundante de los espermatozoides de delfín en los estudios de

FIV heteróloga descritos. Los resultados de este estudio abren una nueva ventana para futuras pruebas de funcionalidad de espermatozoides de delfín y plantea preguntas acerca de los mecanismos de fecundación que siguen siendo, en gran medida desconocidos en estos mamíferos.



## **DISCUSIÓN GENERAL**



Los proyectos de investigación destinados a la conservación de animales en peligro de extinción juegan un papel muy importante en la actualidad, debido al alarmante número de especies que se encuentran amenazadas. Los parques zoológicos participan en estos proyectos y desempeñan un papel fundamental en la conservación de las especies, fomentando la cría en cautividad, así como en la creación de bancos de germoplasma, de células y de tejidos de dichos animales. El objetivo de los programas de cría en cautividad de especies en peligro de extinción es establecer, a largo plazo, poblaciones estables y genéticamente sanas. Uno de los principales problemas asociados a la cría en cautividad es la creciente consanguinidad de las poblaciones, siendo la criopreservación una herramienta que permite aumentar la diversidad genética ya que facilita el transporte y la distribución del material genético procedente de animales alejados geográficamente y sin relación de parentesco. Además, para mantener poblaciones saludables genéticamente, es necesario un número elevado de individuos difícil de alcanzar en los parques zoológicos debido a las limitaciones de espacio y a impedimentos sociales entre animales dominantes. Un caso especialmente particular es el que representa el delfín mular por sus específicas condiciones de vida dentro de los zoológicos. En cautividad, de forma general, sólo se introduce un macho por instalación, ya que de este modo se evitan posibles enfrentamientos entre los diferentes sementales al entrar en competición por las hembras (Connor et al., 2010). Por todas estas razones, el uso de tecnologías reproductivas constituye una alternativa de especial interés para la conservación de especies protegidas.

Los programas de cría en cautividad han permitido y permiten mejorar el conocimiento de la biología y fisiología reproductiva de las distintas especies, ya que, en muchas de ellas, hay aspectos que aún se desconocen. Esto supone un reto en cuanto a la aplicación de técnicas de reproducción como la criopreservación de espermatozoides, la sincronización de la ovulación, o la inseminación artificial. Así, el uso de especies modelo, es una herramienta interesante que facilita la elaboración de protocolos de reproducción asistida en especies silvestres cuyo material genético es difícil de obtener. En el *Capítulo 1* de este trabajo, se trató en primer lugar, de optimizar las técnicas de congelación espermática en el delfín mular. Partiendo de los buenos resultados que se obtienen con las actuales técnicas de criopreservación en esta especie (Robeck y O'Brien, 2004), se trató de mejorar la composición de los diluyentes seminales evitando la presencia de productos de origen animal como los provenientes de la yema de huevo o de la leche. Así, se describe por primera vez el uso de un diluyente libre de componentes de origen animal en la congelación seminal de mamíferos marinos. El diluyente de composición vegetal utilizado protegió al

espermatozoide de un modo similar o incluso superior a los diluyentes convencionales y no afectó negativamente a la fragmentación del ADN. El uso de este tipo de diluyentes constituye un avance importante en la conservación de germoplasma de animales salvajes o en peligro de extinción debido al número limitado de individuos y al riesgo del envío de muestras por la posible transmisión de patógenos entre países de distinto entorno sanitario.

Asimismo, en el *Capítulo 1* de este trabajo se describe por primera vez y de manera objetiva la motilidad espermática y la actividad mitocondrial del espermatozoide de una especie de mamífero marino. Los parámetros de motilidad se evaluaron utilizando un sistema computerizado de la evaluación de la motilidad, mientras que la función mitocondrial se evaluó empleando el fluorocromo Mitotracker Deep Red 633 (M-22426) con la ayuda de un citómetro de flujo. Esta técnica permite evaluar un gran número de células de manera rápida y precisa y ofrece la posibilidad de combinar diferentes fluorocromos y realizar ensayos multiparamétricos. Por lo tanto, en el *Capítulo 1*, se sientan las bases para la utilización de técnicas novedosas y objetivas de evaluación de parámetros espermáticos directamente relacionados con la fertilidad en el delfín mular. Estas técnicas resultan interesantes no solo para el delfín, sino para otros animales de difícil acceso o con un número limitado de individuos, lo que resulta especialmente interesante en especies en peligro de extinción. Finalmente, el uso de técnicas objetivas para evaluar los parámetros seminales permitirá unificar criterios, establecer comparaciones válidas entre diferentes estudios y poner a punto protocolos estándar de reproducción asistida.

El estudio de la motilidad y de la actividad mitocondrial realizados en el *Capítulo 1* nos permitió confirmar que tanto la morfología del espermatozoide de delfín mular como su elevada calidad espermática, son acordes al tipo de cópula en dicha especie. En efecto, numerosos estudios han puesto en evidencia cómo las estrategias de cópula, de animales competidores y no competidores, están relacionadas con las características espermáticas. En las especies de mamíferos polígamos, como es el caso del delfín mular, la competencia espermática implica una producción espermática de alta calidad, con un gran volumen de eyaculado, una motilidad elevada así como un mínimo porcentaje de morfoanomalías. Por el contrario, en las especies monógamas, los espermatozoides muestran una mayor tasa de morfoanomalías (Birkhead, 2000). En especies polígamas, también se ha observado que la motilidad espermática así como la viabilidad en el eyaculado es mayor que en especies no competitivas (Hunter y Birkhead, 2002). El delfín mular no sólo produce un

gran volumen de eyaculado, sino que es capaz de producir más de 10 eyaculados en una misma sesión de colecta seminal (Schroeder y Keller, 1989).

El volumen, la concentración y la elevada motilidad de los espermatozoides se encuentran relacionados con la velocidad de liberación de los espermatozoides en los lugares de almacenamiento en el tracto genital femenino (Froman et al., 2002). Asimismo, se ha demostrado en estudios de competición espermática que la proporción de espermatozoides viables determina el éxito de la fecundación (García-González y Simmons, 2005). Al realizar estudios interespecíficos, se ha demostrado que la competencia espermática se ve favorecida por un aumento del tamaño de los testículos así como un aumento en la producción de espermatozoides con el fin de asegurar la descendencia (Hosken et al., 2001; Pitnick et al., 2001; Gomendio et al., 2006). Los testículos de delfín mular, tal y como se describe en la revisión bibliográfica de este trabajo, tienen en promedio un tamaño 1,5 veces mayor que las especies monógamas (Turner et al., 2006).

En el *Capítulo I* se ha podido constatar cómo las características morfológicas descritas previamente por Fleming et al., (1981) se encuentran en consonancia con los parámetros seminales descritos en el presente estudio. Los elevados índices de motilidad y de actividad mitocondrial se corresponden con la prolongada longitud del flagelo, con la presencia de dos tipos de mitocondrias en la parte intermedia y un diseño extremadamente aerodinámico. Además Fleming et al., (1981) describen otras características morfológicas del espermatozoide del delfín mular que resultan muy llamativas con la presencia de aristas paralelas al eje longitudinal de la cabeza en la región postacrosómica y una cabeza de reducidas dimensiones fusiforme que sugiere diferencias en la organización y / o compactación de la cromatina nuclear con respecto a lo descrito en el espermatozoide de otras especies no competitivas cuyos espermatozoides presentan una cabeza más globosa (Barth y Oko, 1989).

Considerando estas observaciones en el *Capítulo II* se estudió la cromatina nuclear del espermatozoide de delfín mular y, concretamente, la fragmentación del ADN espermático. Se trata de un parámetro de gran interés aplicativo ya que en otras especies permite predecir el éxito de la IVF o de la ICSI (Anifyis et al., 2014).

Por lo tanto, en este capítulo, se determinaron los índices de fragmentación del ADN espermático, así como, su resistencia al proceso de congelación y al tiempo de incubación. Para ello fue necesaria la puesta a punto de una técnica de evaluación de la fragmentación del ADN como el ensayo de dispersión de la cromatina

espermática (SCD) que permite evaluar de manera fiable el índice de fragmentación de los espermatozoides en el parque zoológico o incluso en hábitats naturales, donde no se dispone de citometría de flujo o de un equipo laboratorial sofisticado. La puesta a punto se realizó mediante la contrastación con otras técnicas como es el ensayo Cometa (Hughes et al., 1996; Aravindan et al., 1997; Singh et al., 1998; Gwo et al., 2003; Fraser y Strzezek, 2004).

Las imágenes obtenidas con el ensayo SCD en delfín mular poseían características similares a las obtenidas en otras especies de mamíferos no humanos, obteniendo dos morfotipos principales (Fraser y Strzezek, 2004; Johnston *et al.*, 2007; Zee *et al.*, 2009). La identificación de estos morfotipos así como los resultados obtenidos en el delfín mular facilitarán la aplicación de ensayo SCD en otros mamíferos marinos.

Los resultados obtenidos indican que el índice de fragmentación del ADN en esta especie es basal y se mantiene inalterado durante un periodo de al menos 24h, tanto en muestras de semen fresco como después de su congelación y descongelación. Se observó que el segundo eyaculado de una misma sesión de colecta seminal muestra menor fragmentación de ADN espermático. Este fenómeno se ha descrito en otras especies como la especie humana (Gosálvez et al., 2011). Además, puesto que no se encontraron diferencias entre las características seminales convencionales entre eyaculados del mismo individuo, se pone de relieve la importancia que puede tener la detección de la fragmentación del ADN espermático a la hora de detectar diferencias en muestras aparentemente similares. De hecho la evaluación de la fragmentación del ADN espermático se incluye como técnica rutinaria en las clínicas de fertilidad humana, y se ha descrito en una gran variedad de mamíferos (Fraser y Strzezek, 2004; Johnston et al., 2007; Zee et al., 2009).

Los bajos índices de fragmentación del espermatozoide de delfín podrían estar relacionados con una mayor estabilidad de su cromatina y una mayor capacidad fecundante. En este sentido se ha observado como una mayor estabilidad entendida como una mayor formación de puentes disulfuro entre las cisteínas de las protaminas confiere mayor protección al material genético (Oliva, 2006) y en el caso del delfín, puede suponer un mecanismo de protección frente a las elevadas temperaturas a las que se encuentran sometidos los gametos de estos animales, al tratarse de una especie endórguida. Por otro lado, la integridad y estabilidad del material genético podría ser un elemento que interviene en la competición espermática ya que se trata de un parámetro que podría ser crucial para el éxito de la fecundación y podría influir en la evolución del espermatozoide. De hecho, estudios previos revelan que el

organismo, al menos en murino, posee varios mecanismos orientados a discriminar a aquellos espermatozoides que presentan baja motilidad y /o el ADN fragmentado y uno de ellos reside en la ZP, cuya penetrabilidad está inversamente relacionada con el grado de fragmentación del ADN (Hourcade et al., 2010).

Atendiendo a anteriormente descrito y considerando las características superiores del espermatozoide de delfín, en el *Capítulo III*, se procedió a estudiar la condensación y estabilidad de su cromatina nuclear, así como, su capacidad para fecundar ovocitos íntegros de otras especies, fecundación heteróloga.

Efectivamente, en este capítulo se observó que el material genético de delfín mular se encuentra más condensado y es más estable que el de la especie bovina especie exórcida y no competitiva. Sin embargo, lo más llamativo, sin duda, fue la capacidad del espermatozoide de delfín mular no sólo de unirse a la ZP de especies alejadas filogenéticamente como la bovina y la murina, sino de penetrar la ZP y completar la formación pronuclear y la primera división embrionaria. Se observaron todas las etapas, desde la unión espermatozoide-ZP hasta la formación de embriones híbridos, cuya identidad genética fue confirmada mediante PCR. Los resultados obtenidos en el *Capítulo III* plantean interrogantes sobre la especificidad del proceso de la fecundación, como se ha descrito anteriormente (Yanagimachi, 1994b; Yanagimachi, 1994a, Sinowatz et al., 2003; Canovas, 2007; Canovas et al., 2007)).

En un principio el éxito de la FIV heteróloga podría estar relacionado con las extraordinarias características de este espermatozoide de delfín mular. No obstante, también hay de tener en cuenta que la interacción no sólo depende de los espermatozoides, sino también de los ovocitos. El presente estudio sugiere que la ZP de los ovocitos murinos es más restrictiva frente a los espermatozoides de delfín que los ovocitos bovinos. Este fenómeno podría explicarse en parte por las diferencias que afectan directamente a la especificidad como las diferencias en los receptores de ZP (Goudet et al., 2008) o en la estructura de los oligosacáridos que pueden estar influidos por el proceso de maduración de los ovocitos (Nakano et al., 1996; Töpfer-Petersen et al., 2000). El hecho de que se observen mejores resultados al realizar la FIV heteróloga con ovocitos bovinos puede estar relacionado con la existencia de una relación filogenética más próxima entre esta especie y el delfín, que con la murina (Mc Donald, 2006).

En resumen, en este trabajo, se presentan avances relevantes en el estudio de la fisiología reproductiva del delfín mular. Se ponen de manifiesto características

sobresalientes de los espermatozoides de delfín que presentan unos buenos parámetros de calidad espermática, una cromatina altamente estable, una fragmentación basal después de la congelación, y la capacidad de fertilizar tanto ovocitos bovinos como murinos y dar lugar a la formación del embrión híbrido. Dado que el delfín forma parte de las especies competidoras como se ha descrito a lo largo de este trabajo, es posible que la competitividad espermática favorezca la presión selectiva hacia una morfología dinámica, la mejora de las características funcionales y la estabilidad de la cromatina. Estas características pueden conferir protección frente a los altos niveles de ROS a los que se enfrentan las especies endóricas, como es el caso del delfín, y pueden ayudar a explicar la capacidad fecundante de los espermatozoides de delfín en los estudios de FIV heteróloga.

Los resultados de este estudio abren una nueva ventana para futuras pruebas de funcionalidad de espermatozoides en los delfines y plantea preguntas acerca de los mecanismos de fecundación que continúan siendo en gran medida enigmáticos en los mamíferos. Se necesitan más estudios para dar una explicación completa del proceso de fecundación heteróloga y definir sus posibles aplicaciones biológicas.

Por otro lado, el desarrollo de técnicas de reproducción asistida en animales domésticos es sumamente complejo y requiere mucho esfuerzo para llevarse a cabo. La aplicación de estas técnicas a la fauna salvaje, especialmente en las especies en peligro de extinción, tiene la limitación adicional de la poca accesibilidad a los animales, la baja disponibilidad de los mismos para la colecta seminal, la larga distancia hasta el laboratorio, así como la baja frecuencia de muestreo. Estas dificultades explican por qué los procedimientos como la criopreservación de gametos y embriones, la producción de embriones, y su transferencia están lejos de ser óptimas en muchas especies no domésticas.

El uso de una especie modelo “doméstica” marina, como el delfín mular, puede ser de gran utilidad para comprender los procesos básicos y desarrollar protocolos de reproducción asistida para su uso en las especies en peligro de extinción (Leibo y Songsasen, 2002). Utilizar como modelo el delfín mular, que no se encuentra todavía en la lista roja de animales en peligro de extinción, nos permite “ganar tiempo” al poder realizar estudios de conservación de gametos e incrementar el conocimiento sobre la fisiología reproductiva de esta especie. Tenemos la responsabilidad ética para detener y revertir la alarmante disminución de la biodiversidad a nivel mundial, y tenemos a nuestro alcance las herramientas para lograrlo. El trabajo en equipo, la participación de científicos e instituciones zoológicas, puede ayudar al avance del conocimiento sobre las especies de fauna silvestre en

peligro de extinción. No hay duda de que se necesitan más esfuerzos, pero afortunadamente, en los últimos años, han aumentado los programas de investigación sobre la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción, una tendencia que esperamos continúe.



## **CONCLUSIONES**



1. Los eyaculados de delfín mular (*Tursiops truncatus*) analizados tienen una buena calidad espermática que se mantiene tras la descongelación.
2. La motilidad espermática se evaluó por primera vez en el delfín mular de manera objetiva. Se obtuvo una correlación positiva entre la actividad mitocondrial y la motilidad total, la motilidad progresiva y la viabilidad.
3. Una concentración de glicerol del 3% es suficiente para asegurar la crioprotección seminal del delfín mular en los diluyentes seminales evaluados.
4. Durante el proceso de criopreservación, el diluyente de origen vegetal protege la membrana y el ADN del espermatozoide del delfín mular, por lo que en esta especie constituye una excelente alternativa, desde el punto de vista sanitario, a los diluyentes de origen animal.
5. El ensayo de dispersión de la cromatina constituye una metodología eficaz para la detección de la fragmentación del ADN espermático en el delfín mular y puede llevarse a cabo en condiciones de campo.
6. La cromatina nuclear del espermatozoide del delfín mular, especie competitiva, es más estable que la cromatina nuclear del espermatozoide de bovino, especie no competitiva.
7. Los espermatozoides descongelados del delfín mular son capaces de fecundar ovocitos con la zona pelúcida intacta tanto de la especie bovina como de la murina y dar lugar a la formación de embriones híbridos.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Adham, I.M., Kremling, H., Nieter, S., Zimmermann, S., Hummel, M., Schroeter, U., Engel, W., 1996. The structures of the bovine and porcine proacrosin genes and their conservation among mammals. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377, 261-265.
- Agarwal, A., Allamaneni, S.S., 2005. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 84, 850-853.
- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R., 2007. Review Article: Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. *Amer J Reprod Immunol* 200, 2-11.
- Agarwal, A., Said, T.M., 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9, 331-345.
- Aleem, M., Padwal, V., Choudhari, J., Balasinor, N., Gill-Sharma, M.K., 2008. Sperm protamine levels as indicators of fertilising potential in sexually mature male rats. *Andrologia* 40, 29-37.
- Alkmin, D.V., Martinez-Alborcia, M.J., Parrilla, I., Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Roca, J., 2013. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. *Theriogenology* 79, 1294-1300.
- Ambriz, D., Rosales, A.M., Sotelo, R., Mora, J.A., Rosado, A., García, A.R., 2002. Changes in the quality of rabbit semen in 14 consecutive ejaculates obtained every 15 minutes. *Arch Androl* 48, 389-395.
- Andrews, B., 2000. Bottlenose dolphin management past, present and future., In: Duffield D, R.T. (Ed.), *The Bottlenose Dolphin Breeding Workshop*. AZA Marine Mammal Taxon Advisory Group, Duffield D, Robeck TR pp. 7-15.
- Andrews, J.C., Howard, J.G., Bavister, B.D., Wildt, D.E., 1992. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona pellucida penetration assay. *Mol Reprod Dev* 31, 200-207.
- Anifandis, G., Bounartzi, T., Messini, C.I., Dafopoulos, K., Markandona, R., Sotiriou, S., Tzavella, A., Messinis, I.E., 2014. Sperm DNA fragmentation measured by Halosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ICSI treatments. *Andrologia*.
- Aravindan, G.R., Bjordahl, J., Jost, L.K., Evenson, D.P., 1997. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res* 236, 231-237.
- Austin, C.R., 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B* 4, 581-596.
- Austin, C.R., 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326.
- Bach, O., Glander, H.J., Scholz, G., Schwarz, J., 1990. Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (NP) in fertile men and infertility patients and comparison with NP of somatic cells. *Andrologia* 22, 217-224.
- Bagis, H., Keskin-tepe, L., Sagirkaya, H., Odaman, H., Cetin, S., 2001. Influences of cumulus cells during *in vitro* fertilization of mouse oocytes in different mouse strains. *Turk J Vet Anim Sci*, 777-782

- Bahmanpour, S., Namavar, M.R., Talaei-Khozani, T., Mazaheri, Z., 2012. The effect of the follicular fluid on sperm chromatin quality in comparison with conventional media. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16, 1840-1846.
- Bailey, J.L., Buhr, M.M., 1995. Regulation of internal Ca<sup>2+</sup> by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology* 32, 259-269.
- Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa.
- Bearzi, G., 2006. Endangered Mediterranean common dolphins: the story so far., Paper submitted to the 58th Annual Meeting of the International Whaling Commission, St. Kitts and Nevis, West Indies, 23 May – 20 June 2006, p. 3.
- Bedford, J.M., 1983. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod* 28, 108-120.
- Bedford, J.M., 1998. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod* 59, 1275-1287.
- Bedford, J.M., 2004. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79, 429-460.
- Bedford, J.M., 2014. Singular features of fertilization and their impact on the male reproductive system in eutherian mammals. *Reproduction* 147, R43-52.
- Bedford, J.M., Calvin, H.I., 1974. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 188, 137-155.
- Ben-Yosef, D., Shalgi, R., 2001. Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends Mol Med* 7, 163-169.
- Berger, T., 1996. Fertilization in ungulates. *Animal Reproduction Science* 42, 351-360.
- Berger, T., Drobnis, E.Z., Foley, L., Metzler, J.K., Horton, M., 1994. Evaluation of relative fertility of cryopreserved goat sperm. *Theriogenology* 41, 711-717.
- Berger, T., Horton, M.B., 1988. Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. *Gamete Res* 19, 101-111.
- Berger, T., Turner, K.O., Meizel, S., Hedrick, J.L., 1989. Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol Reprod* 40, 525-530.
- Berkovits, B.D., Wolgemuth, D.J., 2013. The role of the double bromodomain-containing BET genes during mammalian spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* 102, 293-326.
- Berzin, A.A., Yablokov, A.V., 1978. Quantity and population structure of the most exploited world ocean's cetacean species. *Zool. Zh.* 57, 1771-1785.
- Biancani, B., Da Dalt, L., Lacave, G., Romagnoli, S., Gabai, G., 2009. Measuring fecal progesterone as a tool to monitor reproductive activity in captive female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Theriogenology* 72, 1282-1292.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., Wright, G.J., 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508, 483-487.
- Birkhead, T., 2000. Promiscuity: An evolutionary history of sperm competition., Harvard University Press, London, UK, 272 pp.

- Birkhead, T.R., Martínez, J.G., Burke, T., Froman, D.P., 1999. Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proc Biol Sci* 266, 1759-1764.
- Bleil, J.D., Wassarman, P.M., 1980. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20, 873-882.
- Boe-Hansen, G.B., Ersbøll, A.K., Greve, T., Christensen, P., 2005. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 63, 2006-2019.
- Boerke, A., Dieleman, S.J., Gadella, B.M., 2007. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S147-155.
- Bousquet, D., Brackett, B.G., 1982. Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. *Theriogenology* 17, 199-213.
- Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., Dressel, M.A., 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27, 147-158.
- Brahmkshtri, B.P., Edwin, M.J., John, M.C., Nainar, A.M., Krishnan, A.R., 1999. Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 54, 159-168.
- Breitbart, H., Cohen, G., Rubinstein, S., 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 129, 263-268.
- Brook, F., 1997. The use of diagnostic ultrasound in assessment of the reproductive status of the bottlenose dolphin, *Tursiops aduncus*, in captivity and applications in management of a controlled breeding programme., Hong Kong Polytechnic University, Kowloon.
- Brook, F.M., Kinoshita, R., Brown, B., Metreweli, C., 2000. Ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus aduncas*. *J Reprod Fertil.* 119, 233-240.
- Brook, F.M., Kinoshita, R.E., 2005. Controlled unassisted breeding of captive Indo-Pacific bottlenose dolphin, *Tursiops aduncus*, using ultrasonography. *Aquat Mamm* 31, 89-95.
- Brouwers, J.F., Silva, P.F., Gadella, B.M., 2005. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology* 63, 458-469.
- Budworth, P.R., Amann, R.P., Chapman, P.L., 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 9, 41-54.
- Bwanga, C.O., 1991. Cryopreservation of boar semen. I: A literature review. *Acta Vet Scand* 32, 431-453.
- Bwanga, C.O., Hofmo, P.O., Grevle, I.S., Einarsson, S., Rodriguez-Martinez, 1991. *In vivo* fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in plastic bags and maxi-straws. *Zentralbl Veterinarmed A* 38, 281-286.

- Calvin, H.I., Bedford, J.M., 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 13, Suppl 13:65-75.
- Calvin, H.I., Grosshans, K., Blake, E.J., 1986. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res* 14, 265-275.
- Canovas, S., 2007. Interacciones homólogas and heterólogas *in vitro* de gametos porcinos, bovinos y humanos and sus aplicaciones en el estudio de la fecundación, Universidad de Murcia. Departamento de Fisiología y Farmacología, Murcia, Spain.
- Canovas, S., Coy, P., Gomez, E., 2007b. First steps in the development of a functional assay for human sperm using pig oocytes. *J Androl* 28, 273-281.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25, 244-255.
- Centola, G.M., Mattox, J.H., Burde, S., Leary, J.F., 1990. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Mol Reprod Dev* 27, 130-135.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T.M., 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121, 395-401.
- Chan, P.J., Corselli, J.U., Jacobson, J.D., Patton, W.C., King, A., 1996. Correlation between intact sperm acrosome assessed using the Spermac stain and sperm fertilizing capacity. *Arch Androl* 36, 25-27.
- Chohan, K.R., Griffin, J.T., Lafromboise, M., De Jonge, C.J., Carrell, D.T., 2006. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 27, 53-59.
- Choudhry, T.M., Berger, T., Dally, M., 1995. *In vitro* fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative *in vivo* fertility. *Theriogenology* 43, 1195-1200.
- Christensen, P., Whitfield, C.H., Parkinson, T.J., 1994. The use of bright-field microscopy in evaluating bovine acrosome reaction. *Theriogenology* 42, 655-662.
- Clulow, J.R., Evans, G., Maxwell, W.M., Morris, L.H., 2010. Evaluation of the function of fresh and frozen-thawed sex-sorted and non-sorted stallion spermatozoa using a heterologous oocyte binding assay. *Reprod Fertil Dev* 22, 710-717.
- Codde, J.M., Berger, T., 1995. *In vivo* fertility of rams in relation to sperm-zona pellucida binding and sperm-zona pellucida penetration of ovine oocytes. *Theriogenology* 44, 901-906.
- Coetzee, K., Kruger, T.F., Lombard, C.J., 1999. Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia* 31, 163-168.

- Comizzoli, P., Mauget, R., Mermillod, P., 2001. Assessment of *in vitro* fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology* 56, 261-274.
- Connor, R.C., Heithaus, M.R., L.M., B., 2010. Complex social structure alliance stability and mating access in a bottlenose dolphin "super-alliance". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268, 263-267.
- Córdova, A., Pérez-Gutiérrez, J.F., Lleó, B., García-Artiga, C., Alvarez, A., Drobchak, V., Martín-Rillo, S., 2002. *In vitro* fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology* 57, 2119-2128.
- Cornell, L.H., Antrim, J.E., Osborn, K., Gurevich, V.S., 1977. Experiences of Sea World from 1963 to present with *Tursiops* species reproduction and some plans for the future, Washington, DC, USA: US Dept of Commerce.
- Correa, J.R., Zavos, P.M., 1994. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42, 351-360.
- Cortés-Gutiérrez, E.I., Crespo, F., Gosálvez, A., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C., Gosalvez, J., 2008a. DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leonés, a breed at risk of extinction. *Theriogenology* 69, 1022-1032.
- Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gosálvez, J., 2007. Assessing sperm DNA damage. *Acta Urol Esp* 31, 120-131.
- Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gosálvez, J., 2008b. Alkali-labile sites in sperm cells from *Sus* and *Ovis* species. *Int J Androl* 31, 354-363.
- Coulter, G.H., Foote, R.H., 1979. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. *Theriogenology* 11, 297-311.
- Cox, J.F., Avila, J., Saravia, F., Santa Maria, A., 1994. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by *in vitro* fertilization of cattle and sheep intact oocytes. *Theriogenology USA* 41, 1621-1629.
- Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M.D., Romar, R., Grullón, L., Matás, C., Avilés, M., 2008a. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15809-15814.
- Coy, P., Grullon, L., Canovas, S., Romar, R., Matas, C., Aviles, M., 2008b. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* 135, 19-27.
- Coy, P., Romar, R., Payton, R.R., McCann, L., Saxton, A.M., Edwards, J.L., 2005. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Reproduction* 129, 19-26.

- Curry, M.R., 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 5, 46-52.
- Dadoune, J., Mayaux, M., Guihard-Moscato, M., 1988. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*. 20, 211-217.
- Darwin, C., 1859. *The Origin of Species by means of Natural Selection*. John Murray, London.
- De Jonge, C., 2005. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11, 205-214.
- De Jonge, C., Barratt C. (ed.) 2006. *The Sperm Cell*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge Books Online, 359 pp.
- de la Torre, J., Lopez-Fernandez, C., Pita, M., Fernandez, J.L., Johnston, S.D., Gosalvez, J., 2007. Simultaneous observation of DNA fragmentation and protein loss in the boar spermatozoon following application of the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *J Androl* 28, 533-540.
- de Lamirande, E., Gagnon, C., 1993. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med* 14, 157-166.
- De Leeuw, F.E., Chen, H.C., Colenbrander, B., Verkleij, A.J., 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27, 171-183.
- de Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F., Martinez, A.G., Matkovic, M., 1996. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 45, 451-457.
- de Oliveira, R.V., Dogan, S., Belser, L.E., Kaya, A., Topper, E., Moura, A., Thibaudeau, G., Memili, E., 2013. Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. *Reproduction* 146, 263-272.
- de Paz, P., Alvarez-Rodriguez, M., Nicolas, M., Alvarez, M., Chamorro, C., Borragán, S., Martinez-Pastor, F., Anel, L., 2012. Optimization of glycerol concentration and freezing rate in the cryopreservation of ejaculate from brown bear (*Ursus arctos*). *Reprod Domest Anim* 47, 105-112.
- Depypere, H.T., McLaughlin, K.J., Seamark, R.F., Warnes, G.M., Matthews, C.D., 1988. Comparison of zona cutting and zona drilling as techniques for assisted fertilization in the mouse. *J Reprod Fertil* 84, 205-211.
- Donoghue, A.M., Johnston, L.A., Seal, U.S., Armstrong, D.L., Simmons, L.G., Gross, T., Tilson, R.L., Wildt, D.E., 1992. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs *in vitro*. *J Reprod Fertil* 96, 555-564.
- Dott, H.M., Foster, G.C., 1979. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. *J Reprod Fertil* 55, 161-166.
- Downs, S.M., 1990. Stimulation of parthenogenesis in mouse ovarian follicles by inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase. *Biol Reprod* 43, 427-436.

- Duffield, D.A., Shell, E.D., Dudley, M., 2000. Demographic analysis of breeding bottlenose dolphins in North American zoological facilities: 1976-1998. The Bottlenose Dolphin Breeding Workshop., 139-155.
- Duru, N.K., Morshedi, M.S., Schuffner, A., Oehninger, S., 2001. Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl* 22, 646-651.
- Eberhard, W.G., Cordero, C., 1995. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *Trends Ecol Evol* 10, 493-496.
- Enciso, M., Lopez-Fernandez, C., Fernandez, J.L., Garcia, P., Gosalbez, A., Gosálvez, J., 2006a. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology* 65, 308-316.
- Enciso, M., Muriel, L., Fernandez, J.L., Goyanes, V., Segrelles, E., Marcos, M., Montejo, J.M., Ardoy, M., Pacheco, A., Gosálvez, J., 2006b. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Yrol* 27, 106-111.
- Enciso, M., Sarasa, J., Agarwal, A., Fernandez, J.L., Gosálvez, J., 2009. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 18, 609-616.
- England, G.C., 1999. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology* 52, 981-986.
- Erenpreisa, J., Erenpreiss, J., Freivalds, T., Slaidina, M., Krampe, R., Butikova, J., Ivanov, A., Pjanova, D., 2003. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry A* 52, 19-27.
- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Thomas, C.A., Downing, T.W., Marshall, C.E., 1993. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 39, 1009-1024.
- Eriksson, B.M., Rodriguez-Martinez, H., 2000a. Deep-freezing of boar semen in plastic film 'cochettes'. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 47, 89-97.
- Eriksson, B.M., Rodriguez-Martinez, H., 2000b. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim Reprod Sci* 63, 205-220.
- Esponda, P., 1985. Spermiogenesis and spermatozoa in mammals. *Revis Biol Celular* 6, 1-99.
- Evenson, D.P., 1999. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev* 11, 1-15.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R., 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131-1133.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R., 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem* 30, 279-280.

- Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., Claussen, O.P., 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14, 1039-1049.
- Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K., 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 23, 25-43.
- Evenson, D.P., Thompson, L., Jost, L., 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41, 637-651.
- Farrell, P., Trouern-Trend, V., Foote, R.H., Douglas-Hamilton, D., 1995. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil Steril* 64, 208-210.
- Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., Foote, R.H., 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49, 871-879.
- Fazeli, A.R., Steenweg, W., Bevers, M.M., van den Broek, J., Bracher, V., Parlevliet, J., Colenbrander, B., 1995. Relation between stallion sperm binding to homologous hemizonae and fertility. *Theriogenology* 44, 751-760.
- Fernández, J.L., Gosálvez, J., 2002. Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol Biol* 203, 203-216.
- Fernández, J.L., Goyanes, V.J., Ramiro-Díaz, J., Gosálvez, J., 1998. Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet* 82, 251-256.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., LaFromboise, M., De Jonge, C., 2005a. Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 84, 860.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., LaFromboise, M., De Jonge, C., 2005b. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 84, 833-842.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vazquez, R., Alvarez, J.G., 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24, 59-66.
- Fiser, P.S., Fairfull, R.W., 1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* 21, 542-551.
- Fleming, A.D., Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., 1981. Spermatozoa of the Atlantic bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. *J Reprod Fertil* 63, 509-514.

- Florman, H.M., Storey, B.T., 1982. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. *Dev Biol* 91, 121-130.
- Foote, R.H., 1978. Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *J Anim Sci* 47 Suppl 2, 1-11.
- Foresta, C., Zorzi, M., Rossato, M., Varotto, A., 1992. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 15, 330-337.
- Fraser, L., Strzerek, J., 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochem Cytobiol* 42, 49-55.
- Froman, D.P., Pizzari, T., Feltmann, A.J., Castillo-Juarez, H., Birkhead, T.R., 2002. Sperm mobility: mechanisms of fertilizing efficiency, genetic variation and phenotypic relationship with male status in the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*. *Proc Biol Sci* 269, 607-612.
- Gañán, N., González, R., Garde, J.J., Martínez, F., Vargas, A., Gomendio, M., Roldan, E.R., 2009a. Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reprod Fertil Dev* 21, 848-859.
- Gañán, N., González, R., Sestelo, A., Garde, J.J., Sánchez, I., Aguilar, J.M., Gomendio, M., Roldan, E.R., 2009b. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous *in vitro* fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology* 72, 341-352.
- Gao, D., Critser, J.K., 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J* 41, 187-196.
- García-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M.R., Estesó, M.C., Pérez-Guzmán, M.D., Soler, A.J., 2009. Heterologous *in vitro* fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 71, 643-650.
- García-González, F., Simmons, L.W., 2005. Sperm viability matters in insect sperm competition. *Curr Biol* 15, 271-275.
- García-Peiró, A., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Abad, C., Guitart, M., Amengual, M.J., Gosálvez, J., Benet, J., 2011. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl* 34, e546-553.
- Garde López-Brea, J., 1992. Congelación de semen en la especie ovina: Características biológicas de las dosis descongeladas., Departamento de Reproducción, INIA, Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid.
- Garner, D.L., Pinkel, D., Johnson, L.A., Pace, M.M., 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod* 34, 127-138.
- Garner, D.L., Thomas, C.A., Joerg, H.W., DeJarnette, J.M., Marshall, C.E., 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 57, 1401-1406.

- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M., 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63, 445-457.
- Gill-Sharma, M.K., Choudhuri, J., D'Souza, S., 2011. Sperm chromatin protamination: an endocrine perspective. *Protein Pept Lett* 18, 786-801.
- Goericke-Pesch, S., Failing, K., 2013. Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac<sup>®</sup>. *Reprod Domest Anim* 48, 213-217.
- Gomendio, M., Martin-Coello, J., Crespo, C., Magaña, C., Roldan, E.R., 2006. Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15113-15117.
- González-Urdiales, R., 2010. Valoración de la capacidad de criopreservación del semen de porcino mediante técnicas de choque *a frigore* and termorresistencia., Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía veterinaria, Facultad de Veterinaria de León, León, Spain.
- Gorczyca, W., Gong, J., Darzynkiewicz, Z., 1993a. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53, 1945-1951.
- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., Darzynkiewicz, Z., 1993b. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 207, 202-205.
- Gosálvez, J., Cortés-Gutiérrez, E.I., Nuñez, R., Fernández, J.L., Caballero, P., López-Fernández, C., Holt, W.V., 2009. A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril* 92, 1915-1919.
- Gosálvez, J., González-Martínez, M., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Sánchez-Martín, P., 2011a. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* 96, 1083-1086.
- Gosálvez, J., Gosálbez, A., Arroyo, F., Fernández, J.L., López-Fernández, C., 2008. Assessing sperm DNA fragmentation in the field: an adaptation of sperm chromatin dispersion technology. *Biotech Histochem* 83, 247-252.
- Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gouraud, A., Holt, W.V., 2011b. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev* 78, 951-961.
- Goudet, G., Mugnier, S., Callebaut, I., Monget, P., 2008. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biol Reprod* 78, 796-806.
- Graham, J.K., 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 68, 239-247.

- Gravance, C.G., Garner, D.L., Miller, M.G., Berger, T., 2001. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicol* 15, 5-10.
- Gregory, J., 2002. Handbook of fluorescent probes and research products. Molecular Probes, Eugene OR, USA
- Guraya, S.S., 1995. The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. *Int Rev Cytol* 160, 163-220.
- Gwo, J.C., Wu, C.Y., Chang, W.S., Cheng, H.Y., 2003. Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryo Letters* 24, 171-180.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H., 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology* 63, 2311-2322.
- Hammadeh, M.E., Al-Hasani, S., Gauss, C., Rosenbaum, P., Georg, T., Diedrich, K., Schmidt, W., 2001. Predictive value of chromatin decondensation *in vitro* on fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Int J Androl* 24, 311-316.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11, 73-88.
- Hanada, A., Chang, M.C., 1972. Penetration of zone-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol Reprod* 6, 300-309.
- Hanada, A., Chang, M.C., 1976. Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J Reprod Fertil* 46, 239-241.
- Hanada, A., Chang, M.C., 1978. Penetration of the zona-free or intact eggs by foreign spermatozoa and the fertilization of deer mouse eggs *in vitro*. *J Exp Zool* 203, 277-285.
- Hancock, J.L., 1951. A staining technique for the study of temperature-shock in semen. *Nature* 167, 323-324.
- Harcourt, A.H., Harvey, P.H., Larson, S.G., Short, R.V., 1981. Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature* 293, 55-57.
- Harrison, R.A., Gadella, B.M., 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63, 342-351.
- Harrison, R.A., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 88, 343-352.
- Harrison, R.G., 1949. The comparative anatomy of the blood supply of the mammalian testis. *Proc. Zool. Soc. (London)* 119, 325-344.
- Harrison, R.J., 1969. Reproduction and reproductive organs, In: Yersen, H.T. (Ed.), *The Biology of Marine Mammals*, Academic Press, New York, pp 253-348.
- Hickman, C.P., Roberts, L.S., Larson, A., 2002. Principios Integrales de Zoología, In: McGraw-Hill Interamericana (Ed.), S.A. España.

- Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D., Reed, H.C., Curnock, R.M., 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl* 18, 312-323.
- Holt, W., Abaigar, T., Watson, P., Wildt, D., 2003. Genetic resource banks for species conservation, In: Holt WV, P.A., Rodger JC, Wildt DE, editors (Ed.), *Reproductive science and integrated conservation*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 267–280.
- Holt, W.V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62, 3-22.
- Holt, W.V., Abaigar, T., Jabbour, H.N., 1996. Oestrous synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reprod Fertil Dev* 8, 1215-1222.
- Holt, W.V., Head, M.F., North, R.D., 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod* 46, 1086-1094.
- Holt, W.V., Lloyd, R.E., 2009. Artificial insemination for the propagation of CYTES: the reality! *Theriogenology* 71, 228-235.
- Holt, W.V., North, R.D., 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J Exp Zool* 230, 473-483.
- Holt, W.V., Penfold, L.M., Johnston, S.D., Temple-Smith, P., McCallum, C., Shaw, J., Lindemans, W., Blyde, D., 1999. Cryopreservation of macropodid spermatozoa: new insights from the cryomicroscope. *Reprod Fertil Dev* 11, 345-353.
- Hoodbhoy, T., Joshi, S., Boja, E.S., Williams, S.A., Stanley, P., Dean, J., 2005. Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J Biol Chem* 280, 12721-12731.
- Hosken, D.J., Garner, T.W., Ward, P.I., 2001. Sexual conflict selects for male and female reproductive characters. *Curr Biol* 11, 489-493.
- Hourcade, J.D., Pérez-Crespo, M., Fernández-González, R., Pintado, B., Gutiérrez-Adán, A., 2010. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol* 8, 9.
- Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W., 1996. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 2, 613-619.
- Hunter, F.M., Birkhead, T.R., 2002. Sperm viability and sperm competition in insects. *Curr Biol* 12, 121-123.
- Huret, J.L., 1983. Variability of the chromatin decondensation ability test on human sperm. *Arch Androl* 11, 1-7.
- Hussain, S.A., Lessard, C., Anzar, M., 2011. Quantification of damage at different stages of cryopreservation of endangered North American bison (*Bison bison*) semen and the effects of extender and freeze rate on post-thaw sperm quality. *Anim Reprod Sci* 129, 171-179.

- Imai, H., Niwa, K., Iritani, A., 1977. Penetration *in vitro* of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 51, 495-497.
- Imai, H., Niwa, K., Iritani, A., 1980. Ultrastructural observations of boar spermatozoa penetrating zona-free hamster eggs. *Biol Reprod* 23, 481-486.
- Imrat P, H.M., Rittem S, Thongtip N, Mahasawangkul S, Gosálvez J, Holt WV., 2012. The dynamics of sperm DNA stability in Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa before and after cryopreservation. *Theriogenology* 77, 998-1007.
- Irvine, D.S., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J., 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 21, 33-44.
- Iwata, H., Shiono, H., Kon, Y., Matsubara, K., Kimura, K., Kuwayama, T., Monji, Y., 2008. Effects of modification of *in vitro* fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 105, 234-244.
- Jenkins, J.A., Eilts, B.E., Guitreau, A.M., Figiel, C.R., Draugelis-Dale, R.O., Tiersch, T.R., 2011. Sperm quality assessments for endangered razorback suckers *Xyrauchen texanus*. *Reproduction* 141, 55-65.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70, 219-228.
- Johnson, L.A., Flook, J.P., Hawk, H.W., 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 41, 199-203.
- Johnston, S.D., López-Fernández, C., Gosálbez, A., Holt, W.V., Gosálvez, J., 2009. Directional mapping of DNA nicking in ejaculated and cauda epididymidal spermatozoa of the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus: Monotremata*). *Reproduction, Fertility and Development* 21, 1008-1014.
- Johnston, S.D., López-Fernández, C., Gosálbez, A., Zee, Y., Holt, W.V., Allen, C., Gosálvez, J., 2007. The relationship between sperm morphology and chromatin integrity in the koala (*Phascolarctos cinereus*) as assessed by the sperm chromatin dispersion test (SCDt). *Journal of Andrology* 28, 891-899.
- Johnston, S.D., Zee, Y.P., López-Fernández, C., Gosálvez, J., 2012. The Effect of Chilled Storage and Cryopreservation on the Sperm DNA Fragmentation Dynamics of a Captive Population of Koalas. *J Androl* 33, 1007-1015.
- Katsumata, E., 2010. Study on reproduction of captive marine mammals. *J Reprod Dev* 56, 1-8.
- Keller, K.V., 1986. Training of the Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) for artificial insemination. *International Association of Aquatic Animal Medicine* 14, 22-24.
- Kenergy, G.J., Trombulak, S.C., 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J Mamm.* 67, 1-22.

- Kim, E., Baba, D., Kimura, M., Yamashita, M., Kashiwabara, S., Baba, T., 2005. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 18028-18033.
- Kim, N.H., Jun, S.H., Do, J.T., Uhm, S.J., Lee, H.T., Chung, K.S., 1999. Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse, or human spermatozoon into porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 53, 84-91.
- Kirby, V.L., Ridgway, S.H., 1984. Hormonal evidence of spontaneous ovulation in captive dolphins (*Tursiops truncatus* and *Delphinus delphis*). *International Whale Commission Special Issue* 6, 459-464
- Kouba, A.J., Atkinson, M.W., Gyolf, 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. *Biol Reprod* 65, 1246-1251.
- Lacy, R., 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection and population subdivision. *Conserv Biol* 1, 143-158.
- Lacy, R., 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *J Mammal* 78, 320-335.
- Larson, K.L., DeJonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K., Evenson, D.P., 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15, 1717-1722.
- Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl* 15, 255-265.
- Latt, S.A., 1976. Analysis of human chromosome structure, replication of repair using BrdU-33258 Hoechst techniques. *J Reprod Med* 17, 41-52.
- Lee, J., Richburg, J.H., Shipp, E.B., Meistrich, M.L., Boekelheide, K., 1999. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 140, 852-858.
- Leibo, S.P., Songsasen, N., 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 57, 303-326.
- Lenton, T.M., Held, H., Kriegler, E., Hall, J.W., Lucht, W., Rahmstorf, S., Schellnhuber, H.J., 2008. Tipping elements in the Earth's climate system. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 1786-1793.
- Lewis, S.E., Aitken, R.J., 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 322, 33-41.
- Liu, D.Y., Baker, H.W., 1992. Tests of human sperm function and fertilization *in vitro*. *Fertil Steril* 58, 465-483.
- Liu, D.Y., Clarke, G.N., Baker, H.W., 1991. Inhibition of human sperm-zona pellucida and sperm-oolemma binding by antisperm antibodies. *Fertil Steril* 55, 440-442.
- Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G., Casper, R.F., 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13, 896-900.

- López-Fernández, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernández, J.L., Arana, P., Johnston, S.D., Gosálvez, J., 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 68, 1240-1250.
- López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gosálvez, A., Arroyo, F., Vázquez, J.M., Holt, W.V., Gosálvez, J., 2008. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. Ram. *Theriogenology* 70, 898-908.
- López-Fernández, C., Johnston, S.D., Fernández, J.L., Wilson, R.J., Gosálvez, J., 2010. Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. *Theriogenology* 74, 1362-1370.
- Loskutoff, N., 1998. Biology, technology and strategy of genetic resource banking in conservation programs for wildlife. In: Lauria, A., Gyolffi, F., Enne, G., Gianaroli, L. (Eds.). *Gametes: Development and Function*. Serono Symposia, Roma, pp. 275-286.
- Lynham, J.A., Harrison, R.A., 1998. Use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions *in vitro*. *Biol Reprod* 58, 539-550.
- Madrid Bury, N. 2003. Relación entre los métodos de valoración seminal *in vitro* and la fertilidad *in vivo* del semen descongelado de toros de raza Frisona. Tesis Doctoral. INIA-UCM.
- Madrid-Bury, N., Perez-Gutierrez, J.F., Perez-Garnelo, S., Moreira, P., Pintado Sanjuanbenito, B., Gutierrez-Adan, A., de la Fuente Martinez, J., 2005. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 64, 232-241.
- Mahadevan, M., Trounson, A.O., 1983. Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. *Andrologia* 15, 355-366.
- Manicardi, G.C., Bianchi, P.G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U., Sakkas, D., 1995. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 52, 864-867.
- Marushige, Y., Marushige, K., 1975. Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin. *Biochim Biophys Acta* 403, 180-191.
- Maxwell, W.M., Johnson, L.A., 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48, 209-219.
- Mazur, P., 1966. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology* 2, 181-192.
- Mazur, P., Cole, K.W., 1985. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Cryobiology* 22, 509-536.
- Mazur, P., Leibo, S.P., Seidel, G.E., 2008. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod* 78, 2-12.
- Mc Donald, D.W., 2006. *The encyclopedia of mammals*, University of Oxford
- McHugh, J.A., Rutledge, J.J., 1998. Heterologous fertilization to characterize spermatozoa of the genus *Bos*. *Theriogenology* 50, 185-193.

- McPherson, S., Longo, F.J., 1993. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 37, 109-128.
- Ménézo, Y., Dale, B., Cohen, M., 2010. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote* 18, 357-365.
- Mengual, L., Ballescá, J.L., Ascaso, C., Oliva, R., 2003. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl* 24, 438-447.
- Méo, S.C., Leal, C.L., Garcia, J.M., 2004. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. *Anim Reprod Sci* 81, 35-46.
- Meyers, S.A., Liu, I.K., Overstreet, J.W., Vadas, S., Drobnis, E.Z., 1996. Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 46, 1277-1288.
- Meyers, S.A., Overstreet, J.W., Liu, I.K., Drobnis, E.Z., 1995. Capacitation *in vitro* of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J Androl* 16, 47-54.
- Michaut, M., Tomes, C.N., De Blas, G., Yunes, R., Mayorga, L.S., 2000. Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9996-10001.
- Miller, D.J., Shi, X., Burkin, H., 2002a. Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog Horm Res* 57, 37-73.
- Miller, D.L., Styer, E.L., Decker, S.J., Robeck, T., 2002b. Ultrastructure of the spermatozoa from three odontocetes: a killer whale (*Orcinus orca*), a Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*) and a beluga (*Delphinapterus leucas*). *Anat Histol Embryol* 31, 158-168.
- Molina, J., Castilla, J.A., Gil, T., Hortas, M.L., Vergara, F., Herruzo, A., 1995. Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Hum Reprod* 10, 1280-1286.
- Moller, C.C., Bleil, J.D., Kinloch, R.A., Wassarman, P.M., 1990. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol* 137, 276-286.
- Montano, G.A., Kraemer, D.C., Love, C.C., Robeck, T.R., O'Brien, J.K., 2012. Evaluation of motility, membrane status and DNA integrity of frozen-thawed bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa after sex-sorting and recryopreservation. *Reproduction* 143, 799-813.
- Mylonis, I., Drosou, V., Brancorsini, S., Nikolakaki, E., Sassone-Corsi, P., Giannakouros, T., 2004. Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *J Biol Chem* 279, 11626-11631.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., R., B.R., 2002. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 764, USA.

- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E.K., Gadella, B.M., 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod* 68, 1828-1835.
- Nakano, M., Yonezawa, N., Hatanaka, Y., Noguchi, S., 1996. Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl* 50, 25-34.
- Navara, C.S., First, N.L., Schatten, G., 1994. Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: the role of the sperm aster. *Dev Biol* 162, 29-40.
- Naz, R.K., Sacco, A.G., Yurewicz, E.C., 1991. Human spermatozoal FA-1 binds with ZP3 of porcine zona pellucida. *J Reprod Immunol* 20, 43-58.
- Nebel, R.L., Saacke, R.G., 1994. Technology and applications for encapsulated spermatozoa. *Biotechnol Adv* 12, 41-48.
- Notter, D., Foote, T., 1985. Concepts and Strategies to Maintain Domestic and Wild Animal Germplasm, Government Printing Office. Commissioned paper, Office of Technology Assessment. Washington, D.C.
- O'Brien, J.K., Robeck, T.R., 2006. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Reprod Fertil Dev* 18, 319-329.
- O'Brien, J.K., Roth, T.L., 2000. Functional capacity and fertilizing longevity of frozen-thawed scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa in a heterologous *in vitro* fertilization system. *Reprod Fertil Dev* 12, 413-421.
- O'Brien, J.K., Steinman, K.J., Robeck, T.R., 2009. Application of sperm sorting and associated reproductive technology for wildlife management and conservation. *Theriogenology* 71, 98-107.
- O'Brien, J.K., Steinman, K.J., Schmitt, T., Robeck, T.R., 2008. Semen collection, characterisation and artificial insemination in the beluga (*Delphinapterus leucas*) using liquid-stored spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 20, 770-783.
- Oehninger, S., Franken, D.R., Sayed, E., Barroso, G., Kolm, P., 2000. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 6, 160-168.
- Oettlé, E., 1986. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science* 12, 145-150.
- Okuwaki, M., Sumi, A., Hisaoka, M., Saotome-Nakamura, A., Akashi, S., Nishimura, Y., Nagata, K., 2012. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplamin/nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2 and NPM3 during sperm chromatin remodeling. *Nucleic Acids Res* 40, 4861-4878.
- Oliva, R., 2006. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12, 417-435.
- Oliva-Hernández, J., Pérez-Gutiérrez, J.F., 2008. Localization of the epidermal growth factor (EGF) in the epididymis and accessory genital glands of the boar and functional effects on spermatozoa. *Theriogenology* 70, 1159-1169.

- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas, A.J., Alvarez, J.G., 2001. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 16, 1912-1921.
- Osman, R.A., Yria, M.L., Jones, A.D., Meizel, S., 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 828-833.
- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 291-298.
- Pabst, D.A., Rommel, S.A., McLellan, W.A., Williams, T.M., Rowles, T.K., 1995. Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during exercise. *J Exp Biol* 198, 221-226.
- Padilla, A.W., Tobback, C., Foote, R.H., 1991. Penetration of frozen-thawed, zona-free hamster oocytes by fresh and slow-cooled stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 44, 207-212.
- Palasz, A.T., 2007. Cryopreservation of embryos and semen in mammalian species XXX *Curso Internacional de Reproducción Animal*, Madrid, Spain, pp. 425-436.
- Palasz, A.T., Del Campo M.. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Recent advances. In: *Sem. Int. de Transferencia de embriones. Biotecnologías y técnicas avanzadas*. Montevideo, Uruguay, pp. 78-85.
- Palasz, A.T., Pérez-Garnelo, S.S., Borque, C., Talavera, C., Delclaux, M., Martínez, E., De la Fuente, J., 2003. Cryopreservation of European bison (*Bison bonansus*) semen. *Theriogenology* 59, 402 (Abstract)
- Papadopoulos, S., Hanrahan, J.P., Donovan, A., Duffy, P., Boly, M.P., Lonergan, P., 2005. *In vitro* fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination of sheep. *Theriogenology* 63, 150-159.
- Papi, M., Brunelli, R., Familiari, G., Frassanito, M.C., Lamberti, L., Maulucci, G., Monaci, M., Pappalettere, C., Parasassi, T., Relucenti, M., Sylla, L., Ursini, F., De Spirito, M., 2012. Whole-depth change in bovine zona pellucida biomechanics after fertilization: how relevant in hindering polyspermy? *PLoS One* 7, e45696.
- Parks, J., 1997. Hypothermian and mammalian gametes, In: Press, A. (Ed.), San Diego, USA, pp. 229-261.
- Parks, J.E., Arion, J.W., Foote, R.H., 1987. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 37, 1249-1258.
- Parks, J.E., Lynch, D.V., 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, 255-266.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A., First, N.L., 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38, 1171-1180.
- Peña, J.F., Johannisson, A., Wallgren, M., H., R.-m., 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 60, 677-689.

- Pereira, H.M., Leadley, P.W., Proença, V., Alkemade, R., Scharlemann, J.P., Fernandez-Manjarrés, J.F., Araújo, M.B., Balvanera, P., Biggs, R., Cheung, W.W., Chini, L., Cooper, H.D., Gilman, E.L., Guénette, S., Hurtt, G.C., Huntington, H.P., Mace, G.M., Oberdorff, T., Revenga, C., Rodrigues, P., Scholes, R.J., Sumaila, U.R., Walpole, M., 2010. Scenarios for global biodiversity in the 21st century. *Science* 330, 1496-1501.
- Pérez-Garnelo, S., 2011. Utilización de bancos de recursos zoogenéticos en la conservación de razas autóctonas y especies en peligro de extinción, XXXIV Curso Internacional de Reproducción Animal, Madrid, Spain, pp. 39-52.
- Perez-Garnelo, S.S., Oter, M., Borque, C., Talavera, C., Delclaux, M., Martínez-Navado, E., Palasz, A.T., De la Fuente, J., 2006. Post-thaw viability of european bison (*Bison bonasus*) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous *in vitro* fertilization assay. *J Zoo Wildl Med* 37, 116-125.
- Pérez-Llano, B., Enciso, M., García-Casado, P., Sala, R., Gosálvez, J., 2006. Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology* 66, 2137-2143.
- Pérez-Llano, B., López-Fernández, C., García-Casado, P., Arroyo, F., Gosálvez, J., 2010. Dynamics of sperm DNA fragmentation in the swine: ejaculate and temperature effects. *Anim Reprod Sci* 119, 235-243.
- Phillips, P.H., 1939. Preservation on bull semen. *J. Biol. Chem.*, 130-415.
- Pimm, S.L., Russell, G.J., Gittleman, J.L., Brooks, T.M., 1995. The future of biodiversity. *Science* 269, 347-350.
- Pintado B., De la Fuente J., Roldan E.R.S. 2000. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acids stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal Reprod. Fertil.* 118, 145-152
- Pintado Sanjuanbenito, B., Pérez Llano, B., 1992. Effect of glutaraldehyde concentration and fixative temperature on the number of spermatozoa with normal acrosomes in goat semen. *Theriogenology* 38, 527-533.
- Pitnick, S., Miller, G.T., Reagan, J., Holly, B., 2001. Males' evolutionary responses to experimental removal of sexual selection. *Proc Biol Sci* 268, 1071-1080.
- Polge, C., 1951. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -9 degrees C. *Nature* 167, 949-950.
- Polge, C., 1977. The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. *Ciba Found Symp*, 3-18.
- Polge, C., Smith, A., Parkes, A., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 169, 626-627.
- Portas, T., Johnston, S.D., Hermes, R., Arroyo, F., López-Fernández, C., Bryant, B., Hildebrandt, T.B., Göritz, F., Gosálvez, J., 2009. Frozen-thawed rhinoceros sperm exhibit DNA damage shortly after thawing when assessed by the sperm chromatin dispersion assay. *Theriogenology* 72, 711-720.

- Rajender, S., Avery, K., Agarwal, A., 2011. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res* 727, 62-71.
- Rath, D., Töpfer-Petersen, E., Michelmann, H.W., Schwartz, P., von Witzendorff, D., Ebeling, S., Ekhlesi-Hundrieser, M., Piehler, E., Petrunkina, A., Romar, R., 2006. Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs. *Soc Reprod Fertil Suppl* 62, 317-330.
- Reid, W., Miller, K., 1989. Keeping Options Alive: The scientific basis for the conservation of biodiversity., World Resources Institute, Washington, DC.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P., 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61, 234-248.
- Robeck, T., Jensen, E., Brook, F., Rouke, N., Rayner, C., Kinoshita, R., 2000. Preliminary investigations into ovulation manipulation techniques in delphinids., American Association of Zoo Animal Veterinarians and International Association of Aquatic Mammals Medicine, pp. 222-225.
- Robeck, T.R., McBain, J.F., Mathey, S., Kraemer, D.C., 1998. Ultrasonographic evaluation of the effects of exogenous gonadotropins on follicular recruitment and ovulation induction in the Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 29, 6-13.
- Robeck, T.R., Monfort, S.L., 2006. Characterization of male killer whale (*Orcinus orca*) sexual maturation and reproductive seasonality. *Theriogenology* 66, 242-250.
- Robeck, T.R., O'Brien, J.K., 2004. Effect of cryopreservation methods and precryopreservation storage on bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa. *Biol Reprod* 70, 1340-1348.
- Robeck, T.R., Schneyer, A.L., McBain, J.F., Dalton, L.M., Walsh, M.T., Czekala, N., Kraemer, D.C., 1993. Analysis of urinary immunoreactive steroid metabolites and gonadotropins for characterization of the estrous cycle, breeding period, and seasonal estrous activity of captive killer whales (*Orcinus orca*). *Zoo Biol* 12, 173-188.
- Robeck, T.R., Steinman, K.J., Gearhart, S., Reidarson, T.R., McBain, J.F., Monfort, S.L., 2004. Reproductive physiology and development of artificial insemination technology in killer whales (*Orcinus orca*). *Biol Reprod* 71, 650-660.
- Robeck, T.R., Steinman, K.J., Greenwell, M., Ramirez, K., Van Bonn, W., Yoshioka, M., Katsumata, E., Dalton, L., Osborn, S., O'Brien, J.K., 2009. Seasonality, estrous cycle characterization, estrus synchronization, semen cryopreservation, and artificial insemination in the Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *Reproduction* 138, 391-405.
- Robeck, T.R., Steinman, K.J., Montano, G.A., Katsumata, E., Osborn, S., Dalton, L., Dunn, J.L., Schmitt, T., Reidarson, T., O'Brien, J.K., 2010. Deep intra-uterine artificial inseminations using cryopreserved spermatozoa in beluga (*Delphinapterus leucas*). *Theriogenology* 74, 989-1001.

- Robeck, T.R., Steinman, K.J., Yoshioka, M., Jensen, E., O'Brien, J.K., Katsumata, E., Gili, C., McBain, J.F., Sweeney, J., Monfort, S.L., 2005. Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen-thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reproduction* 129, 659-674.
- Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, A., Chapin, F.S., Lambin, E.F., Lenton, T.M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H.J., Nykvist, B., de Wit, C.A., Hughes, T., van der Leeuw, S., Rodhe, H., Sörlin, S., Snyder, P.K., Costanza, R., Svedin, U., Falkenmark, M., Karlberg, L., Corell, R.W., Fabry, V.J., Hansen, J., Walker, B., Liverman, D., Richardson, K., Crutzen, P., Foley, J.A., 2009. A safe operating space for humanity. *Nature* 461, 472-475.
- Rogers, B.J., 1985. The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated. *Fertil Steril* 43, 821-840.
- Rommel, S.A., Pabst, D.A., McLellan, W.A., 2007. Functional anatomy of the cetacean reproductive system, with comparisons to the domestic Dog, In: Miller, D.L. (Ed.), *Reproductive biology and phylogeny of cetacea. Whales, Dolphins and Porpoises*, Science, Enfield, NH, USA, pp. 127-146.
- Rommel, S.A., Pabst, D.A., McLellan, W.A., Mead, J.G., Potter, C.W., 1992. Anatomical evidence for a countercurrent heat exchanger associated with dolphin testes. *Anat Rec* 232, 150-156.
- Rota, A., Peña, A.I., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H., 1999. *In vitro* capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci* 57, 199-215.
- Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C., 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 degrees C. *Theriogenology* 44, 885-900.
- Roth, T.L., Bush, L.M., Wildt, D.E., Weiss, R.B., 1999. Scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine *in vitro* fertilization system after cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen vapor. *Biol Reprod* 60, 493-498.
- Royere, D., Hamamah, S., Nicolle, J.C., Lansac, J., 1991. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *Int J Androl* 14, 328-332.
- Sakkas, D., Manicardi, G.C., Bizzaro, D., 2003. Sperm nuclear DNA damage in the human. *Adv Exp Med Biol* 518, 73-84.
- Salustri, A., Yanagishita, M., Underhill, C.B., Laurent, T.C., Hascall, V.C., 1992. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 151, 541-551.
- Sánchez-Calabuig, M., 2010. Valoración and criopreservación de esperma en la especie delfín mular (*Tursiops truncatus*)-Estudio Preliminar. Máster. Universidad Complutense de Madrid, España.

- Sánchez-Calabuig, M., Beltran-Breña, P., Martínez-Nevado, E., de las Parras, C., de la Fuente, J., 2011. CASA analysis of chilled and thawed dolphin sperm, European Association for Aquatic Mammals, Barcelona.
- Sánchez-Calabuig, M.J., López-Fernández, Martínez-Nevado, E., Pérez-Gutiérrez, J.F., de la Fuente, J., Johnston, S., Blyde, D., Harrison, K., Gosálvez, J. 2014. Validation of a field based chromatin dispersion assay to assess sperm DNA fragmentation in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reprod Dom Anim* (accepted).
- Sánchez-Martín, P., Sánchez-Martín, F., González-Martínez, M., Gosálvez, J., 2013. Increased pregnancy after reduced male abstinence. *Syst Biol Reprod Med* 59, 256-260.
- Saragusty, J. 2006. Genome Banking for Vertebrates Wildlife Conservation. In: Katkov, I. (Eds.). *Current Frontiers in Cryobiology*, Intech, Ch. 11, pp. 293-368.
- Satoh, K., Satoh, S., Maehara, I., Orikasa, S., 1989. Studies on human spermatozoal acrosome using spermac stain in fertile and infertile men including two cases of round-headed spermatozoa. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 80, 562-568.
- Sawyer-Steffan, J.E., Kirby, V.L., Gilmartin, W.G., 1983. Progesterone and estrogens in the pregnant and nonpregnant dolphin, *Tursiops truncatus*, and the effects of induced ovulation. *Biol Reprod* 28, 897-901.
- Schatten, G., Simerly, C., Schatten, H., 1991. Maternal inheritance of centrosomes in mammals? Studies on parthenogenesis and polyspermy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6785-6789.
- Schatten, H., Sun, Q.Y., 2009. The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI. *Mol Hum Reprod* 15, 531-538.
- Scheffer, M., Carpenter, S., Foley, J.A., Folke, C., Walker, B., 2001. Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature* 413, 591-596.
- Schneider, C.S., Ellington, J.E., Wright, R.W., 1999. Relationship between bull field fertility and *in vitro* embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. *Theriogenology* 51, 1085-1098.
- Schroeder, J.P., 1990. Breeding Bottlenose Dolphins in captivity, In: Leaderwood, S., Reeves, R.R. (Eds.), *The Bottlenose dolphin* Academic Press, San Diego, pp. 447-460.
- Schroeder, J.P., Keller, K.V., 1989. Seasonality of serum testosterone levels and sperm density in *Tursiops truncatus*. *J Exp Zool* 249, 316-321.
- Seager, S., Gilmartin, W., Moore, L., Platz, C., Kirby, V., 1981. Semen collection (electroejaculation), evaluation and freezing in the Atlantic bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*
- Simerly, C., Wu, G.J., Zoran, S., Ord, T., Rawlins, R., Jones, J., Navara, C., Gerrity, M., Rinehart, J., Binor, Z., Asch, R., Schatten, G., 1995. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat Med* 1, 47-52.

- Singh, J., Rao, M.R., 1988. Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle. *Biochem Int* 17, 701-710.
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R., Schneider, E., 1998. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184–191.
- Singh, N.P., Danner, D.B., Tice, R.R., McCoy, M.T., Collins, G.D., Schneider, E.L., 1989. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res* 184, 461-470.
- Sinowatz, F., Amselgruber, W., Töpfer-Petersen, E., Totzauer, I., Calvete, J., Plendl, J., 1995. Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anat Embryol (Berl)* 191, 41-46.
- Sinowatz, F., Plendl, J., Kölle, S., 1998. Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat (Basel)* 161, 196-205.
- Sinowatz, F., Töpfer-Petersen, E., Kölle, S., Palma, G., 2001. Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histol Embryol* 30, 257-263.
- Sinowatz, F., Wessa, E., Neumüller, C., Palma, G., 2003. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod Domest Anim* 38, 141-146.
- Soler, A.J., Poulin, N., Fernández-Santos, M.R., Cognie, Y., Estes, M.C., Garde, J.J., Mermillod, P., 2008. Heterologous *in vitro* fertility evaluation of cryopreserved Iberian red deer epididymal spermatozoa with zona-intact sheep oocytes and its relationship with the characteristics of thawed spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 43, 293-298.
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Estes, M.C., Núñez, J., Moreira, P.N., Núñez, M., Gutiérrez, R., Sancho, M., Garde, J.J., 2005. Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology* 64, 1236-1243.
- Squires, E.L., Heesemann, C.P., Webel, S.K., Shideler, R.K., Voss, J.L., 1983. Relationship of altrenogest to ovarian activity, hormone concentrations and fertility of mares. *J Anim Sci* 56, 901-910.
- Squires, E.L., Pickett, B.W., Amann, R.P., 1979. Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics. *J Reprod Fertil Suppl*, 7-12.
- St. Aubinand, D., Dierauf, L., 2001. Stress and Marine Mammals, In: Dierauf, L.F., Gulland, M.D. (Ed.), *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, CRC Press, pp. 253–269.
- Stauss, C.R., Votta, T.J., Suarez, S.S., 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 53, 1280-1285.
- Steinholt, H.C., Chandler, J.E., Tirado, V., 1991. Evaluating acrosome reaction steps with brightfield and differential interference contrast microscopy techniques. *J Dairy Sci* 74, 3822-3826.

- Stewart, R.E.A., Stewart, B.E., 2008. Female Reproductive Systems, In: Perrin, W.F., Wursig, B., Thewissen, J.G.M. (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals*, Academic Press, pp. 423-428.
- Szczesniak-Fabianczyk B, B.M., Palasz AT, De la Fuente J, Smorag Z, 2008. Efficacy of 5 different semen extenders for the cryopreservation of bull semen. *Reproduction Fertility and Development* 20, 128 (Abstract).
- Swain, J.E., Pool, T.B., 2008. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Hum Reprod Update* 14, 431-446.
- Szollosi, D., Hunter, R.H., 1973. Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig: sperm penetration and pronucleus formation. *J Anat* 116, 181-206.
- Tamargo, M.C., Pérez-Garnelo, S.S., Beltrán-Breña, P., Palasz, A.T., De la Fuente, J., Hidalgo, C.O., 2008. Freezing of semen from endangered Asturiana de la Montaña bulls in zwitteronic lipids based buffers. *Reproduction Fertility and development* 20, 161 (Abstract)
- Tanaka, A., Kuwabara, S., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M., Tsutsui, T., 2000. Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats. *J Vet Med Sci* 62, 1157-1161.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A., 2002. Minireview: Functions of the *cumulus oophorus* during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61, 414-424.
- Tanihara, F., Nakai, M., Kaneko, H., Noguchi, J., Otoi, T., Kikuchi, K., 2013. Evaluation of zona pellucida function for sperm penetration during *in vitro* fertilization in pigs. *J Reprod Dev* 59, 385-392.
- Tasseron, F., Amir, D., Schindler, H., 1977. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J Reprod Fertil* 51, 461-462.
- Terada, Y., Simerly, C.R., Hewitson, L., Schatten, G., 2000. Sperm aster formation and pronuclear decondensation during rabbit fertilization and development of a functional assay for human sperm. *Biol Reprod* 62, 557-563.
- Thomas, A.D., Meyers, S.A., Ball, B.A., 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65, 1531-1550.
- Thundathil, J., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R.J., 2002. Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology* 58, 87-102.
- Töpfer-Petersen, E., 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum Reprod Update* 5, 314-329.
- Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., 1995. Molecular mechanisms of the interaction between sperm and the zona pellucida in mammals: studies on the pig. *Int J Androl* 18 Suppl 2, 20-26.
- Töpfer-Petersen, E., Cechová, D., 1990. Zona pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin. *Int J Androl* 13, 190-196.
- Töpfer-Petersen, E., Petrounkina, A.M., Ekhlasi-Hundrieser, M., 2000. Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* 60-61, 653-662.

- Tourmente, M., Gomendio, M., Roldan, E.R., 2011. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evol Biol* 11, 12.
- Turner, J.P., Clark, L.S., Haubold, E.M., Worthy, G.A.J., Cowan, D.F., 2006. Organ weights and growth profiles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the northwestern Gulf of Mexico. *Aquat Mamm* 32, 48-57.
- Urch, U.A., Patel, H., 1991. The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida, and with polysulfated polysaccharides. *Development* 111, 1165-1172.
- Urian, K., Duffield, D., AJ, R., Wells, R., Shell, E., 1996. Seasonality of Reproduction in Bottlenose Dolphins, *Tursiops truncatus*. *Journal of Mammalogy* 77, 394-403.
- van der Schans, G.P., Haring, R., van Dijk-Knijnenburg, H.C., Bruijnzeel, P.L., den Daas, N.H., 2000. An immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm. *J Androl* 21, 250-257.
- Van Duijn, C., 1954. Fluorochroming of human spermatozoa with acridine-orange. *Mikroskopie* 9, 324-333.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.
- Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Fantova, E., Quintín-Casorrán, F.J., Sevilla-Mur, E., Yániz, J.L., 2014. *In vitro* assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Anim Reprod Sci* 146, 15-20.
- Visconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., Diekman, A.B., 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53, 133-150.
- Wakayama, T., Uehara, T., Hayashi, Y., Yanagimachi, R., 1997. The response of mouse oocytes injected with sea urchin spermatozoa. *Zygote* 5, 229-234.
- Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Prather, R.S., Day, B.N., 1998. Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev* 49, 308-316.
- Wang, W.H., Hosoe, M., Shioya, Y., 1997. Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. *J Reprod Fertil* 109, 247-255.
- Ward, W.S., Coffey, D.S., 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44, 569-574.
- Wassarman, P.M., 1999. Fertilization in animals. *Dev Genet* 25, 83-86.
- Wassarman, P.M., Litscher, E.S., 2001. Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 168, 36-45.
- Watson, P., 1990. Marshall's physiology of reproduction, In: Livingston, C. (Ed.), *Reproduction in the male*, New York, USA, pp. 747-869.
- Watson, P., 2001. Toward an understanding of cryo-injury in spermatozoa and its influence on subsequent fertilizing ability., 5th Annual Conf. European Soc. Dom Anim. Reprod. ESDAR newsletter, pp. 24-25.
- Watson, P.F., 1975. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec* 97, 12-15.

- Watson, P.F., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7, 871-891.
- Webel, S.K., Squires, E.L., 1982. Control of the oestrous cycle in mares with altrenogest. *J Reprod Fertil Suppl* 32, 193-198.
- Wells, R., 2000. Reproduction in wild bottlenose dolphins: overview of patterns observed during long-term study, In: Duffield D., R.T.R. (Ed.), *The Bottlenose Dolphin Breeding Workshop*. AZA Marine Mammal Taxon Advisory Group, Silver Springs, MD Silver Springs, MD, pp. 57-73.
- White, I.G., 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5, 639-658.
- Wildt, D., 1990. Potential applications of IVF technology for species conservation. In: Bavister, B., Roldan, E., Cummins, J. (Eds.). *Fertilization in Mammals*, Seroon Symposia, Norwell, MA, pp. 349-364.
- Wildt, D., 1992. Genetic resource banking for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Animal Reproduction Science* 28, 247-257.
- Wildt, D., Howard, J., Brown, J., 2001. Reproductive sciences in carnivore conservation. In: Gittleman, J.L. Funk, S.M., Macdonald, D., Wyane, R.K. (Eds.), *Carnivore conservation*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 359-371.
- Wildt, D., Pukazhenti, B., Brown, J., Monfort, S., Howard, J., Roth, T., 1995. Spermatology for understying, managing and conserving rare species. *Reprod Fertil Dev* 7, 811-824.
- Wildt, D., Rall, W., Critser, J., Monfort, S., Seal, U., 1997. Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation. *Bioscience* 47, 689-698.
- Williams, C.J., 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod Update* 8, 313-321.
- Woelders, H., 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet Q* 19, 135-138.
- Yanagida, K., Yanagimachi, R., Perreault, S.D., Kleinfeld, R.G., 1991. Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol Reprod* 44, 440-447.
- Yanagimachi, R., 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 23, 193-196.
- Yanagimachi, R., 1972. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs *in vitro*. *J Reprod Fertil* 28, 477-480.
- Yanagimachi, R., 1978. Sperm-egg association in animals. *Curr Top Dev Biol* 12, 83-105.
- Yanagimachi, R., 1994a. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371-372.
- Yanagimachi, R., 1994b. Mammalian fertilization, In: Knobil E, N.J., eds. (Ed.), *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, pp. 189-317.

- Yanagimachi, R., Bhattacharyya, A., 1988. Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J Exp Zool* 248, 354-360.
- Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., Rogers, B.J., 1976. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15, 471-476.
- Yoshida, M., 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci* 60-61, 349-355.
- Young, S., Huff, D., 1996. Fertility management in a female killer whale (*Orcinus orca*) with regumate (Regu-mate). *Proceedings. International Association for Aquatic Animal Medicine*, pp. 24-66.
- Yuen, Q.W., Brook, F.M., Kinoshita, R.E., Ying, M.T., 2009. Semen collection and ejaculate characteristics in the Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*). *J Androl* 30, 432-439.
- Yuen, Q.W.H., 1997. An assessment of reproductive development of the male Indo-Pacific bottlenose dolphin, *Tursiops aduncus*, in captivity. Department of Health Technology and Informatics, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong.
- Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C., Mayorga, L.S., 2000. Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biol Reprod* 62, 1084-1089.
- Zalensky, A.O., Allen, M.J., Kobayashi, A., Zalenskaya, I.A., Balhórn, R., Bradbury, E.M., 1995. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 103, 577-590.
- Zee, Y.P., López-Fernández, C., Arroyo, F., Johnston, S.D., Holt, W.V., Gosalvez, J., 2009. Evidence that single-stranded DNA breaks are a normal feature of koala sperm chromatin, while double-stranded DNA breaks are indicative of DNA damage. *Reproduction* 138, 267-278.
- Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., 1997. Relationship between embryo development *in vitro* and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology* 48, 221-231.
- Zhang, L.H., Qiu, Y., Wang, K.H., Wang, Q., Tao, G., Wang, L.G., 2010. Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick-end labeling assay. *Fertil Steril* 94, 1027-1032.
- Zhao, X.M., Songa, X.X., Kawai, Y., Niwa, K., 2002. Penetration *in vitro* of zona-free pig oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. *Theriogenology* 58, 995-1006.
- Zini, A., Libman, J., 2006. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 175, 495-500.
- Zribi, N., Feki Chakroun, N., El Euch, H., Gargouri, J., Bahloul, A., Ammar Keskes, L., 2010. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 93, 159-166

## ***Referencias bibliográficas***

---

Zubkova, E.V., Wade, M., Robaire, B., 2005. Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil Steril* 84 Suppl 2, 1191-1198.

**ANEXOS**



**Anexo I. Composición del diluyente LP1<sup>®</sup>.**

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
TRIS	30,28
Ac cítrico	16,75
Fructosa	12,50
Estreptomicina	0,50

pH =7,3; Osmolalidad= 310 mOsm/Kg. Se añadió la solución lipídica (v/v)

**Anexo II. Composición del diluyente EYB.**

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Tris	30,28
Ácido cítrico	16,75
Fructosa	12,5
Estreptomicina	0,5

pH=7,3. Osmolalidad= 310 mOsm/Kg. Se añadió un 20% de yema de huevo (v/v)

**Anexo III. Composición del diluyente EYB-TT.**

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
TES	40,35
TRIS	9,69
Fructosa	1,62
Gentamicina	0.05

pH=7,4. Osmolalidad= 320 mOsm/Kg. Se añadió un 20% de yema de huevo (v/v)

**Anexo IV. Parámetros ajustados en el sistema ISAS para el delfín mular  
(Integrated Sperm Analysis System).**

Número de imágenes	25
Imágenes por Segundo	25
Área de las partículas ( $\mu^2$ )	17<n<30
Espermatozoide inmóvil (mm/s)	10
Restricciones (mm/s)	10<lentos<15<medios<35<rápidos
Porcentaje de rectitud (%)	85
Conectividad	12

**Anexo V. Composición del medio de cultivo FIV.**

Componentes	$\mu\text{g}/10 \text{ mL}$
NaHCO <sub>3</sub>	21500
Piruvato	1100
Lactato	30,65
Gentamicina	50
BSA	60000
MEMaa	100
BME	200
Heparina	50
Hipotaurina	100

pH=7,4, añadido a 20 mL de medio Tyrode (nº de catálogo 1788)

**Anexo VI. Composición del diluyente HSOM.**

Componente	g/L
NaCl	5.800
KCl	0.400
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.100
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.050
NaHCO <sub>3</sub>	2.600
Sacarosa	17.180
Glicina	10.000
Glucosa	1.000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.400

## **ABREVIATURAS**



- AA:** Azul de anilina
- AC:** acetilación
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ALH:** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza con respecto a la trayectoria promedio
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- ASEAVA:** Asociación Española de criadores de ganado vacuno selecto de la raza Asturiana de los Valles)
- BSA:** albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*)
- BCF:** Frecuencia de cruces
- BRDT:** proteína específica del testículo que posee dominios de bromo (bromodomain, testis-specific)
- BRZ:** Bancos de Recursos Zoogenéticos
- CASA:** *Computer Assisted Sperm Analysis*
- CITES:** Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
- COC:** Complejo *cumulus oophorus*-ovocito
- DM:** Delfín mular
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- dNTP:** desoxirribonucleótido trifosfato (*Deoxyribonucleotide tri-phosphate*)
- DBD-FISH:** detección mediante hibridación in situ de roturas del ADN (*DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization*)
- Ds-DNA:** daño en cadena doble del ADN (*Double-strand DNA damage*)
- DTT:** ditioneitol
- dUTP:** desoxiuridina trifosfato
- EC:** conjugado urinario estrogénico (*urinary estrogen conjugate*)
- EDTA:** Ácido dietileno-aminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- eCG:** gonadotropina coriónica equina (*equine chorionic gonadotropin*)
- EGF:** factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*)
- EE.UU.:** Estados Unidos de América
- EYB:** Diluyente a base de yema de huevo con buffer TRIS
- EYB-TT:** Diluyente a base de yema de huevo con buffer TES-TRIS
- FCS:** suero fetal bovino (*fetal calf serum*)
- FERT:** medio de fecundación
- FIV:** fecundación *in vitro*
- FSH:** hormona foliculoestimulante (*follicle stimulating hormone*)
- hCG:** gonadotropina coriónica humana (*human chorionic gonadotropin*)
- hpi:** horas post-inseminación
- HOST:** test de endósmosis positiva (*Hypo-Osmotic Swelling Test*)

- HTF:** fluido tubárico humano (*Human tubaric fluid*)
- HSPM:** Human sperm preservation method
- ICSI:** inyección intra citoplasmática de espermatozoides (*Intracytoplasmatic Sperm Injection*)
- IP:** yoduro de propidio
- ISAS:** *Integrated Sperm Analysis System*
- ISNT:** Marcaje interno mediante desplazamiento de mella (*In Situ Nick Translation*)
- KSOMaa:** medio optimizado con potasio y suplementado con amino ácidos (*Kalium Simplex Optimized Medium*)
- LH:** hormona luteinizante (*Luteinizing hormone*)
- LIN:** Linearidad de la trayectoria curvilínea
- LN<sub>2</sub>:** nitrógeno líquido
- LP1<sup>®</sup>:** Diluyente a base de vesículas lipídicas
- M2:** medio de maduración M2
- MT:** Motilidad total
- MP:** Motilidad progresiva
- P1:** protamina 1
- P2:** protamina 2
- PBS:** buffer fosfato (*Phosphate buffered saline*)
- PHC:** Fosfatidilcolina (*Phosphatidylcholine*)
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
- PKA:** protein kinasa A
- RA:** reacción acrosómica
- ROS:** especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
- SCD:** ensayo de dispersión de la cromatina espermática (*Sperm Chromatin Dispersion test*)
- SCGE:** electroforesis de células individuales para el análisis del ADN (*Single Cell Gel Electrophoresis*)
- SCSA:** análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (*Sperm Chromatin Structure Assay*)
- SDS:** dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
- SOF:** fluido oviductal sintético (*Synthetic Oviduct Fluid*)
- STR:** rectitud del movimiento del espermatozoide
- SS:** puentes disulfuro
- Ss-DNA<sub>d</sub>:** daño de cadena sencilla del ADN (*Single-strand DNA damage*)
- SY:** Sybr-14
- TBE:** Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA
- TCM-199:** Medio de cultivo tisular 199 (*Tisular Culture Medium 199*)

**TE:** transferencia embrionaria

**TOPII  $\beta$ :** topoisomerasa II  $\beta$

**TP-1:** proteína de transición 1

**TP-2:** proteína de transición 2

**TUNEL:** marcaje del ADN en el extremo 3' terminal mediado por la enzima deoxinucleotidil transferasa (*Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP Nick-End Labeling*)

**Ub:** ubiquitina

**UI:** Unidades Internacionales

**UICN:** Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

**UMIF:** Unidad de intensidad de fluorescencia media

**UP:** metabolito urinario de la progesterona (*Urinary Progestagen metabolites*)

**VR:** Velocidad rápida

**VAP:** Velocidad media

**VSL:** velocidad rectilínea

**v/v:** volumen/volumen

**w/v:** peso/volumen

**WOB:** Oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio

**ZP:** zona pelúcida



## ÍNDICE DE FIGURAS



<b>Figura 1.</b> Representación de los sistemas planetarios y sus límites propuesto por Rockström <i>et al</i> , 2009.....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema del aparato reproductor de la hembra de delfín mular. ....	14
<b>Figura 3.</b> Ciclo estral de la hembra de delfín mular.....	15
<b>Figura 4.</b> Esquema del aparato reproductor del macho de delfín mular.....	16
<b>Figura 5.</b> Representación de las estructuras vasculares que participan en el mecanismo de intercambio de calor a contracorriente vascular en el delfín mular macho. ....	18
<b>Figura 6.</b> Estructura del espermatozoide de delfín mular .....	23
<b>Figura 7.</b> Espermatozoide de delfín visualizado mediante microscopía electrónica.....	24
<b>Figura 8.</b> Representación de la espermatogénesis.....	25
<b>Figura 9.</b> A. Secuencia de los procesos que experimenta el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra. B. Señalización durante la capacitación: secuencias propuestas de capacitación espermática de los mamíferos.....	28
<b>Figura 10.</b> Diagrama de cascadas intracelulares que conducen a la reacción acrosómica.....	29
<b>Figura 11.</b> Modelo de compactación de la cromatina en las células somáticas y en los espermatozoides de mamífero.....	34
<b>Figura 12.</b> Formación de puentes disulfuro (SS) mediante la oxidación de los grupos tiol (SH) presentes en los residuos de cisteína que integran las protaminas.....	35
<b>Figura 13.</b> Curvas de supervivencia de las células según la velocidad de congelación. ....	47
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de los fenómenos físicos que acontecen en la célula en función de la velocidad de enfriamiento.....	48
<b>Figura 15.</b> Diagrama de los seis pasos necesarios una fecundación exitosa.....	72
<b>Figura 16.</b> Diseño experimental del <i>Experimento 1</i> del <i>Capítulo I</i> . ....	87
<b>Figura 17.</b> Diseño experimental del <i>Experimento 2</i> del <i>Capítulo I</i> . ....	88
<b>Figura 18.</b> Diseño experimental del <i>Experimento 3</i> del <i>Capítulo I</i> . ....	89
<b>Figura 19.</b> Trayectorias de espermatozoides descongelados y previamente congelados con diluyente LP1 <sup>®</sup> de DM1 visualizados con el sistema ISAS.....	92
<b>Figura 20.</b> Espermatozoides de delfín mular (DM1) fijados y teñidos con la tinción Spermac bajo microscopio de contraste de fases (X1000).....	98
<b>Figura 21.</b> Citometría de flujo de espermatozoides de delfín mular después de la colecta seminal teñidos con IP y Sybr-14. ....	99
<b>Figura 22.</b> Curva de descenso de la temperatura durante la congelación de espermatozoides de delfín mular empleando los diluyentes EYB y LP1 <sup>®</sup> . ....	101
<b>Figura 23.</b> Datos de motilidad (media ± SEM) obtenidos con el programa	

ISAS post- descongelación empleando dos diluyentes diferentes (EYB y LP1 <sup>®</sup> ) y dos concentraciones diferentes de crioprotector (3% y 6%) ..	105
<b>Figura 24.</b> Características post- descongelación de muestras seminales criopreservadas con dos diluyentes diferentes (LP1 <sup>®</sup> y EYB-TT) .....	107
<b>Figura 25.</b> Evaluación por citometría de flujo de espermatozoides de delfín mular tratados con Sybr-14 y Mitotracker Deep Red.....	108
<b>Figura 26.</b> Diseño experimental del <i>Experimento 1</i> del <i>Capítulo II</i> . .....	121
<b>Figura 27.</b> Diseño experimental del <i>Experimento 2</i> del <i>Capítulo II</i> . .....	123
<b>Figura 28.</b> Equipo básico para realizar el ensayo de dispersión de la cromatina espermática en condiciones de campo .....	127
<b>Figura 29.</b> Fragmentación del ADN espermático de delfín mular después del ensayo de dispersión de la cromatina nuclear espermática .....	132
<b>Figura 30.</b> Ensayo Cometa-2T de ADN espermático en el delfín mular.....	135
<b>Figura 31.</b> (a) Correlación entre la tasa de fragmentación del ADN espermático (SDF) entre el ensayo de dispersión de la cromatina (SCD) y el ensayo Cometa-2T en condiciones de laboratorio (b) Correlación entre la tasa de espermatozoides con ADN fragmentado después del ensayo SCD en condiciones de laboratorio y de campo (SCD-campo). ...	136
<b>Figura 32.</b> Cladograma de la subclase Euteria con las relaciones filogenéticas entre los Órdenes <i>Cetacea</i> , <i>Rodentia</i> y <i>Ruminantia</i> .....	151
<b>Figura 33.</b> Diseño del <i>Experimento 1</i> del <i>Capítulo III</i> . .....	160
<b>Figura 34.</b> Diseño del <i>Experimento 2</i> del <i>Capítulo III</i> . .....	166
<b>Figura 35.</b> Número de espermatozoides bovinos (FIV homóloga) y de delfín (FIV heteróloga) anclados y unidos a la ZP de un ovocito bovino a las 2,5 hpi.....	170
<b>Figura 36.</b> Espermatozoides de delfín y de bovino anclados y unidos a la ZP de ovocitos de bovino a las 2,5 horas post-inseminación.....	171
<b>Figura 37.</b> Imagen correspondiente al plano ecuatorial del presunto cigoto visualizado mediante microscopía confocal en la que se aprecia un espermatozoide de delfín mular en el espacio perivitelino de un ovocito bovino. La cromatina está teñida con Hoechst 33342.....	174
<b>Figura 38.</b> Imagen correspondiente a la cabeza de un espermatozoide de delfín descondensándose en el citoplasma de un ovocito bovino visualizado bajo microscopía de contraste de fases (a) y mediante microscopía confocal (b); plano ecuatorial del presunto cigoto (b). La cromatina está teñida con Hoechst 33342) (400X).....	174
<b>Figura 39.</b> Imagen correspondiente a dos pronúcleos visualizados bajo microscopía de contraste de fases tras realizar la FIV heteróloga (24 horas post-	

inseminación) utilizando espermatozoides de delfín mular y ovocitos bovinos con la ZP intacta (tinción Hoechst 33342), (400X). ..... 175

**Figura 40.** Electroforesis (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra los resultados de amplificación de la PCR para el gen 18S específico de delfín a diferentes concentraciones de DNA espermático de delfín ..... 176

**Figura 41.** Electroforesis representativa (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra los resultados de amplificación de la PCR para el gen 18S específico de delfín a diferentes concentraciones de ADN espermático bovino..... 176

**Figura 42.** Electroforesis representativa (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra los resultados de amplificación de la PCR para el gen 18S específico de delfín..... 177

**Figura 43.** Número de espermatozoides murinos (FIV homóloga) o de delfín mular (FIV heteróloga) anclados a la ZP de un ovocito murino a las 2,5 horas post-inseminación ..... 178

**Figura 44.** Evaluación de la formación pronuclear a las 22 horas post-inseminación de espermatozoides de delfín mular con ovocitos murinos con la ZP intacta ..... 179

**Figura 45.** PCR representativa (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra los resultados de amplificación de la PCR para el gen 18S específico de delfín para diferentes concentraciones de ADN espermático murino ..... 180

**Figura 46.** Electroforesis representativa (gel de agarosa con bromuro de etidio 2%) que muestra los resultados de amplificación de la PCR para el gen .....18S específico de delfín..... 180

**Figura 47.** Espermatozoides de delfín mular (D) teñidos con azul de anilina (flecha), que muestra un intenso color azul (microscopía de campo claro, 400X). ..... 181

**Figura 48.** Estabilidad de la cromatina nuclear del espermatozoide de delfín mular (D), (n=2) y de bovino (B), (n=2) después de haber sido tratados con diferentes concentraciones de EDTA+SDS..... 182



## **ÍNDICE DE TABLAS**



<b>Tabla 1.</b> Técnicas más comunes utilizadas para la detección del anomalías en el ADN espermático.....	<b>65</b>
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de motilidad durante la refrigeración (Refrigeración 1 y 2) empleando los diluyentes EYB y LP1 <sup>®</sup> con una concentración final de glicerol del 3% y del 6%.....	<b>102</b>
<b>Tabla 3.</b> Viabilidad e integridad del acrosoma (media ± DE) del espermatozoide del delfín mular en fresco y tras la descongelación.....	<b>104</b>
<b>Tabla 4.</b> Motilidad total y progresiva, actividad mitocondrial y viabilidad evaluadas en cuatro delfines .....	<b>109</b>
<b>Tabla 5.</b> Fragmentación del ADN espermático (%) empleando el ensayo Cometa-2T y el ensayo SCD a diferentes tiempos de incubación (T0, T0,5, T1, T4, T24 y T48) .....	<b>133</b>
<b>Tabla 6.</b> Características seminales tras la colecta de los eyaculados de delfín mular (n=5).....	<b>138</b>
<b>Tabla 7.</b> Media (±SEM) de las dinámicas de fragmentación del ADN espermático de cinco individuos de delfín mular tras la colecta y la incubación a 37°C durante 72h. ....	<b>139</b>
<b>Tabla 8.</b> Características seminales de delfín mular tras la descongelación .....	<b>139</b>
<b>Tabla 9.</b> Media (±SEM) de las dinámicas de fragmentación de ADN espermático de 4 individuos de delfín mular tras la criopreservación con 3 diluyentes diferentes y la incubación a 37°C durante un periodo de 48h .....	<b>140</b>
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de la FIV homóloga (HM) y heteróloga (HT) realizada tras la co-incubación de ovocitos bovinos con la ZP intacta con espermatozoides bovinos o de delfín .....	<b>173</b>
<b>Tabla 11.</b> Evaluación de la formación pronuclear a las 22 horas post-inseminación de los espermatozoides de delfín con ovocitos murinos con la zona pelúcida intacta (FIV heteróloga) o sin células del <i>cumulus oophorus</i> [(FIV heteróloga (sin células del <i>cumulus oophorus</i> )]. ....	<b>179</b>
<b>Tabla 12.</b> Media (± SD) de espermatozoides de delfín teñidos con azul de anilina (AA) de 4 delfines. ....	<b>181</b>