

## COMPARACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE SWIM-UP Y CAPACITACIÓN EN LOS ESPERMATOZOIDES DE CONEJO

Gimeno-Martos<sup>1,2\*</sup>, S., Quiroga<sup>1</sup>, A.C., Rebollar<sup>3</sup>, P.G., Lorenzo<sup>1</sup>, P.L., García-García<sup>1</sup>, R.M. y Arias-Álvarez<sup>4</sup>, M.

<sup>1</sup>Dpto. Fisiología, <sup>4</sup>Dpto. Producción Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid; <sup>2</sup>Universidad de Zaragoza; <sup>3</sup>Dept. Producción Agraria, E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid  
\*silvigim@ucm.es

### INTRODUCCIÓN

El proceso de fecundación *in vitro* (FIV) en conejo representa una técnica de gran utilidad tanto en investigación como en producción animal. Sin embargo, los resultados no son tan satisfactorios como en otras especies debido, en parte, a la falta de optimización en la capacitación de los espermatozoides. Los estudios sobre la capacitación espermática en el conejo son escasos y contradictorios. El objetivo de este estudio fue comparar dos protocolos de selección y capacitación espermática de conejo descritos en la bibliografía para seleccionar el protocolo óptimo para la FIV.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El semen se obtuvo mediante vagina artificial en conejos New Zealand x California (n = 3) y se utilizó una mezcla de eyaculados. En el protocolo (A), modificado de Giojalas *et al.* (2004), se realizó un *swim-up* directo con una proporción 1:3 del medio Biggers Whitten and Whittingham (BWW) suplementado con 4 mg/mL de BSA durante 2 h en condiciones capacitantes (38,5 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad). Después, se recogió la mitad de volumen del medio de la parte superior de la muestra y se incubó durante 4 h más para capacitar los espermatozoides. En el protocolo B, de acuerdo con Arias-Álvarez *et al.* (2018), se realizó una dilución del semen 1:50 en medio Tyrode, una doble centrifugación a 1000g, 5 min y se incubó la muestra inclinada 20 min en 2 mL del medio Tyrode con 10 g/mL de heparina en condiciones capacitantes. Se recogieron 800 l de la parte superior de la muestra y se incubaron durante 4 h más en las mismas condiciones. En ambos protocolos, se evaluó la viabilidad espermática (tinción de eosina-nigrosina) y la motilidad y parámetros cinéticos mediante el software ISAS (1.04, Proiser SL, Valencia, España). Para evaluar la capacitación, las muestras se tiñeron con clorotetraciclina (CTC) y se diferenciaron tres subtipos de espermatozoides en el microscopio de fluorescencia: no capacitados, capacitados y con reacción acrosómica. Estos parámetros se evaluaron en la mezcla de eyaculados, tras el *swim-up* y tras la capacitación (4 replicados/protocolo). El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad InStat (5.01, San Diego, CA, EEUU).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El protocolo A no provocó cambios en la viabilidad, en los parámetros cinéticos ni en la capacitación, pero disminuyó la motilidad progresiva de la muestra capacitada respecto a la muestra después del *swim-up* (11,7 ± 2,3 % vs. 21,7 ± 5,2 %;  $P < 0,001$ ). Este protocolo se ha probado previamente durante 16 h (Giojalas *et al.*, 2004), observando mejores resultados por lo que parece que acortar el proceso a 6 h no sería suficiente para conseguir la capacitación *in vitro*. Por otro lado, al final del *swim-up* del protocolo B, la muestra se mantuvo en un estado óptimo (alta motilidad y bajo porcentaje de capacitación). Tras la capacitación, el protocolo B no provocó cambios en los parámetros cinéticos de los espermatozoides, observándose una disminución de la motilidad total y progresiva respecto a la muestra de *swim-up* (64,8 ± 5,1 % y 24,6 ± 7,4 % vs. 82,0 ± 4,5 % y 42,5 ± 4,4 %, respectivamente;  $P < 0,0001$ ) y un aumento del porcentaje de espermatozoides capacitados y reaccionados respecto a la muestra *swim-up* (23,5 ± 11,0 % y 13,0 ± 2,0 % vs. 6,5 ± 1,5 % y 0,5 ± 0,5 %, respectivamente;  $P < 0,0001$ ).

### CONCLUSIÓN

La selección espermática mediante centrifugaciones e incubación en condiciones capacitantes tras 6 horas con el protocolo B parece provocar más cambios asociados a la capacitación que el medio BWW. Sin embargo, son necesarios más estudios para optimizar este procedimiento y profundizar en los mecanismos implicados en el proceso de capacitación de espermatozoides de conejo.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias-Álvarez, M., *et al.* 2018. Rep Fert Dev 30: 12. • Giojalas, L.C., *et al.* 2004. Fertil. Steril. 82: 247-9.

**Agradecimientos:** RTI-2018-094404-B-C-21y22. Gimeno-Martos, S. disfruta de un Contrato Margarita-Salas financiado por el MICIU y UE-NextGenerationEU.