

	<b>GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>	<b>Código</b>	FO-SB- 12/v0
	<b>ESQUEMA HOJA DE RESUMEN</b>	<b>Página</b>	<b>1/1</b>

### RESUMEN TRABAJO DE GRADO

**AUTOR(ES):**

**NOMBRE(S):** JENIFER      **APELLIDOS:** CASTRO ESTRADA

**NOMBRE(S):** \_\_\_\_\_      **APELLIDOS:** \_\_\_\_\_

**FACULTAD:** CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**DIRECTOR:**

**NOMBRE(S):** ADRIAN ÁNGEL      **APELLIDOS:** MUTTO

**TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS):** ANÁLISIS DEL EFECTO INDUCTOR SOBRE LA CAPACITACIÓN CON DISTINTOS AGENTES EN ESPERMATOZOIDES BOVINOS CRIOPRESERVADOS Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD FECUNDANTE

### RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo tratamientos con distintos agentes sobre espermatozoides bovinos criopreservados con el fin de inducir la capacitación espermática. Seguidamente se evaluó dicho parámetro mediante la técnica de clortetraciclina (CTC), inducción de la reacción acrosomal con Lisofosfatidilcolina (LPC) y viabilidad espermática. Por otra parte, se evaluó la capacidad fecundante de los espermatozoides tratados, mediante maniobras de fecundación *in vitro* FIV y se estudió el porcentaje de fecundación mediante la evaluación de pronúcleos y el clivaje embrionario. En los resultados, el ATP estaría induciendo eventos tempranos asociados a la capacitación. Los espermatozoides tratados con procaína adquirieron un cambio en el patrón de motilidad, siendo este un batido asimétrico de la cola con motilidad progresiva. La cafeína presentó un efecto significativo sobre el porcentaje de fecundación. Por último, las drogas no tuvieron efecto en las tasas de clivaje embrionario en comparación al control.

**PALABRAS CLAVE:** capacitación *in vitro*, producción *in vitro* de embriones, capacidad fecundante, clivaje embrionario.

### CARACTERÍSTICAS:

**PÁGINAS:** 107      **PLANOS:** \_\_\_\_\_      **ILUSTRACIONES:** 2      **CD ROOM:** 1

<b>Elaboró</b>		<b>Revisó</b>		<b>Aprobó</b>	
Equipo Operativo del Proceso		Comité de Calidad		Comité de Calidad	
<b>Fecha</b>	24/10/2014	<b>Fecha</b>	05/12/2014	<b>Fecha</b>	05/12/2014

COPIA NO CONTROLADA

ANÁLISIS DEL EFECTO INDUCTOR SOBRE LA CAPACITACIÓN CON DISTINTOS  
AGENTES EN ESPERMATOZOIDES BOVINOS CRIOPRESERVADOS Y EVALUACIÓN  
DE SU CAPACIDAD FECUNDANTE

JENIFER CASTRO ESTRADA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2017

ANÁLISIS DEL EFECTO INDUCTOR SOBRE LA CAPACITACIÓN CON DISTINTOS  
AGENTES EN ESPERMATOZOIDES BOVINOS CRIOPRESERVADOS Y EVALUACIÓN  
DE SU CAPACIDAD FECUNDANTE

JENIFER CASTRO ESTRADA

Director:

Adrián Ángel Mutto, Bs.C., Ms.C., Ph.D

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2017

**ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO**

**FECHA:** 19 DE OCTUBRE DE 2017

**HORA:** 8:30 AM

**LUGAR:** SALA 4 CREAD

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO:** "ANÁLISIS DEL EFECTO INDUCTOR SOBRE LA CAPACITACIÓN CON DISTINTOS AGENTES EN ESPERMATOZOIDEOS BOVINOS CRIOPRESERVADOS Y EVALUACION DE SU CAPACIDAD FECUNDANTE"

**MODALIDAD:** INVESTIGACIÓN

**JURADO:** YANETH AMPARO MUÑOZ PEÑALOZA  
NELSON ALFONSO VEGA CONTRERAS  
JUAN CARLOS RAMIREZ BERMUDEZ

**ENTIDAD:** UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN - ARGENTINA

**DIRECTOR:** ADRIAN ANGEL MUTTO

<b>NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE</b>	<b>CODIGO</b>	<b>CALIFICACION</b>
JENIFER CASTRO ESTRADA	1610757	4.7

**OBSERVACIONES:** MERITORIO

**FIRMA DE LOS JURADOS**



Nelson Alfonso Vega Contreras



Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza



Juan Carlos Ramírez Bermúdez

**Vo. Bo Coordinador Comité Curricular**



## Resumen

Los espermatozoides de mamíferos son incapaces de fecundar a un oocito al momento de ser eyaculados, por lo que necesitan desencadenar el proceso de capacitación espermática previo a la fecundación en donde sufren una serie de cambios a nivel molecular y metabólico (Ferramosca y Vincenzo, 2014). Estas modificaciones pueden ser emuladas en condiciones *in vitro* mediante la técnica de fecundación *in vitro*. Una de las etapas críticas de la técnica de fecundación *in vitro* radica en el éxito de la inducción de la capacitación espermática. Por esta razón, es imprescindible profundizar el estudio de la capacitación espermática a nivel molecular, es decir, los eventos de señalización que involucra este proceso con el fin de elevar las tasas de producción embrionaria *in vitro* (Waremkraut, 2017).

Se llevó a cabo tratamientos con pentoxifilina (10 mM), procaína (5 mM), cafeína (10 mM) y ATP (0.25 mM) sobre espermatozoides bovinos criopreservados con el fin de inducir la capacitación espermática, como control positivo se utilizó heparina (50 µg/ml) y albumina de suero bovino BSA (6mg/ml) como control negativo. Seguidamente se evaluó dicho parámetro mediante la técnica de clortetraciclina (CTC), inducción de la reacción acrosomal con Lisofosfatidilcolina (LPC) y viabilidad espermática. Por otra parte, se quiso evaluar la capacidad fecundante de aquellos espermatozoides tratados, para lo cual se realizaron maniobras de fecundación *in vitro* FIV, siguiendo la técnica de producción *in vitro* de embriones. Además, se estudió el porcentaje de fecundación mediante la evaluación de pronúcleos y el clivaje embrionario. Según los resultados obtenidos el ATP estaría induciendo eventos tempranos asociados a la capacitación. Por otro lado, los espermatozoides tratados con procaína adquirieron un cambio en el patrón de motilidad, siendo este un batido asimétrico de la cola con motilidad progresiva. Por su parte, la cafeína resultó tener un efecto significativo sobre el porcentaje de

fecundación mediante la evaluación de los pronúcleos. Por lo que, se sugiere la cafeína, le confiere al espermatozoide la motilidad necesaria para desprenderse de las células del cumulus que rodean al oocito y pasar por la zona pelúcida, llegando al espacio perivitelino, pero no logra penetrar el oocito. Por último los tratamientos con las diferentes drogas no tuvieron efecto en las tasas de clivaje embrionario en comparación al control.

**Palabras claves:** *capacidad fecundante, capacitación in vitro, clivaje embrionario, producción in vitro de embriones, pronúcleos, reacción acrosomal.*

A mi **Familia**,  
Mi más grande tesoro...

## **Agradecimientos**

Siempre pensaba en cómo lograr culminar esta parte de mi vida, tuve miedos e intrigas a lo largo de mi formación y afortunadamente puedo decir que siempre estuve rodeada de personas que de una u otra manera ayudaron a enfrentar mis miedos y a esclarecer mis dudas, por eso espero no olvidarme de mencionar a alguien...

Primero quiero agradecer a Dios por permitirme vivir y darme la fuerza para luchar por las cosas que deseo y disfrutar cada una de ellas. Por mis buenos y malos tiempos.

A Adrián, mi director, nunca voy a olvidar cuando me dijiste que podía ir a tu laboratorio, fue de mis mejores días. Gracias por permitirme conocerte, por enseñarme a tu manera, que no tengo que bajar la guardia y que siempre se tiene que intentar de todas las formas posibles, para llegar a un objetivo. Te tomé mucho cariño así que te voy a extrañar un montón, espero encontrarte de nuevo más adelante.

A mi familia, quien no solo me ha venido dando su amor y su apoyo incondicional, sino también la fuerza para impulsarme a volar y seguir adelante con mis ocurrencias. Por acompañarme en toda esta etapa de formación y por animarme a seguir, mil gracias. A mi mami (la mejor mujer del mundo y la más linda) que nunca me deja sola, la mujer con la que me identifico y la que me enseñó a ponerle la frente al mundo, las veces que fuesen necesarias. A papi (quien es mucho mayor que yo, pero es el amor de mi vida) nunca me falta su apoyo incondicional, en esta etapa y durante toda mi vida siempre lo demostró, estoy grandemente agradecida y no me va alcanzar la vida para pagarte todo lo que has hecho por mí, muchas gracias papi por ser tantas veces mi cómplice. A Quimby y tatita, mis bebés, gracias por seguir mí paso a paso y alentarme a concluir.

A mis chicas... Clauchi y Mic, gracias por enseñarme tanto, no solo en lo laboral, sino como personas, son unas divinas. Clauchi eres mi imagen a seguir te admiro mucho y siento orgullo de ti y lo que logras día a día. Mic, PARCE eres única me gustan todas tus facetas, incluso cuando se te sale lo romántica. Bren, Carito, Clari, Maga, Vicki, Vivi, MicavM y Calu, fue un placer conocerlas y poder trabajar a su lado, gracias por todo. Las quiero mucho.

También quiero agradecer a mis amigos y personas cercanas, quienes con una palabra o un hecho me tocaron significativamente y a todas aquellas increíbles personas que conocí durante esta linda y gran experiencia.

Se hace inmensa la lista cuando pienso en las personas a las que debo agradecer, y con las que quiero compartir este logro. De igual manera, no podía dejar fuera a aquellos compañeros con los que compartí todos estos años de universidad, los profesores que hicieron parte de mi aprendizaje y mi desarrollo personal de forma peculiar, a la universidad misma y algunos de mis familiares. Sin nada más que decir, infinitas gracias...

## Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	13
1. El problema	15
1.1. Título	15
1.2. Planteamiento del problema	15
1.3. Formulación del problema	15
1.4. Justificación	16
1.5. Objetivos	18
1.5.1. Objetivo general	18
1.5.2. Objetivos específicos	18
1.6. Delimitaciones	18
1.6.1. Espacial	18
1.6.2. Temporal	18
1.6.3. Conceptual	18
2. Marco referencial	20
2.1. Antecedentes	20
2.2. Marco teórico	26
2.2.1. El espermatozoide de mamíferos	26
2.2.2. Cambios funcionales del espermatozoide	27
2.2.3. Adquisición de la capacidad fecundante	28
2.2.4. Vías de señalización implicadas en la capacitación espermática	30
2.2.5. Agentes capacitantes	38

2.2.6	Producción <i>in vitro</i> de embriones	42
2.3	Marco conceptual	46
2.4	Marco legal	48
2.5	Marco contextual	50
3.	Metodología	51
3.1.	Tipo de investigación	51
3.2.	Población y muestra	51
3.2.1.	Población	51
3.2.2.	Muestra	51
3.3.	Hipótesis	51
3.4.	Variables	51
3.4.1.	Dependientes	51
3.4.2.	Independientes	51
3.4.3.	Intervinientes	51
3.5.	Fases de la investigación	51
3.5.1.	Reactivos	51
3.5.2.	Procesamiento del semen	52
3.5.3.	Tratamiento con las distintas drogas	52
3.5.4.	Determinación del estado de la capacitación espermática por la técnica de clortetraciclina (CTC)	53
3.5.5.	Análisis de la viabilidad espermática	55
3.5.6.	Inducción de la reacción acrosomal por lisofosfatidilcolina (LPC)	55
3.5.7.	Producción <i>in vitro</i> de embriones	57
3.5.8.	Tinción de pronúcleos para evaluar porcentaje de fecundación	61

3.5.9. Análisis Estadístico	63
4. Resultados	64
4.1. Evaluación del efecto de la procaína, pentoxifilina, cafeína y el ATP sobre la motilidad espermática	64
4.2. Estudio del efecto de los distintos tratamientos en la inducción de la capacitación espermática	65
4.2.1. Evaluación de la capacitación espermática	65
4.2.2. Estudio del efecto del tratamiento con ATP y cafeína sobre la viabilidad espermática	70
4.3. Efecto de los tratamientos sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides bovinos criopreservados	70
4.3.1. Efecto de los tratamientos con ATP y cafeína sobre el porcentaje de fecundación mediante la evaluación de pronúcleos	71
4.3.2. Clivaje embrionario	72
5. Discusión	75
6. Conclusiones	84
7. Recomendaciones	85
Bibliografía	86
Anexos	103