
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



**FORMACIÓN DE PRONÚCLEOS MEDIANTE LA INYECCIÓN
INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI) SELECCIONADOS
POR UNIÓN A LA ZONA PELÚCIDA EN OVOCITOS DE OVINO ACTIVADOS
QUÍMICAMENTE.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

MPA. JOSÉ ERNESTO HERNÁNDEZ PICHARDO

DIRECTOR

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

ASESORES:

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

DR. SALVADOR ROMO GARCÍA

México, Cd. de México, Abril de 2017.

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-20031DPTNNN0020.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

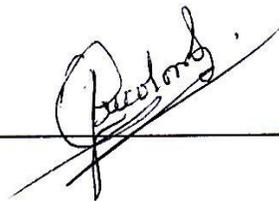
FORMACIÓN DE PRONÚCLEOS MEDIANTE LA INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI) SELECCIONADOS POR UNIÓN A LA ZONA PELÚCIDA EN OVOCITOS DE OVINO ACTIVADOS QUÍMICAMENTE, que presentó:

MPA. JOSÉ ERNESTO HERNÁNDEZ PICHARDO

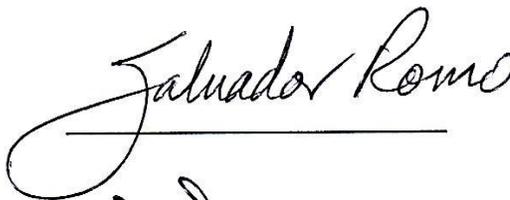
El día 26 de abril del 2017.

Sinodales:

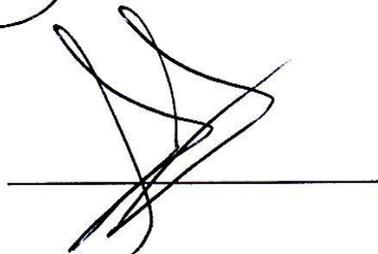
DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ.
PRESIDENTA.



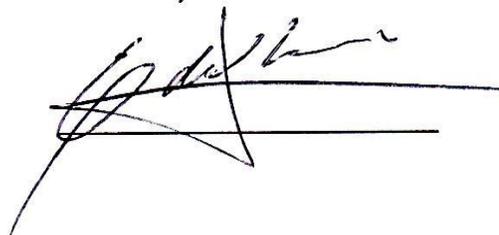
DR. SALVADOR ROMO GARCÍA.
SECRETARIO.



DR. DEMETRIO AMBRÍZ GARCÍA
VOCAL.



DR. EDUARDO CASAS HERNÁNDEZ.
VOCAL



COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

ASESORES

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DR. SALVADOR ROMO GARCÍA
Departamento de Ciencias Pecuarias
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México

SINODALES

DR. DEMETRIO AMBRÍZ GARCÍA
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DR. EDUARDO CASAS HERNÁNDEZ
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DEDICATORIA

A mi amada esposa Lupita que juntos iniciamos la aventura de crear vida *in vitro* hasta obtener crías vivas, éste es tu posgrado.

A mis seres queridos que están en otra dimensión, siempre los recuerdos y cada día los admiro más.

A mis familiares con los que convivo y comparto las vicisitudes de esta vida.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento sincero a mi Comité Tutoral, por su asesoría en este trabajo.

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Dr. Salvador Romo García

Mi reconocimiento por su tiempo dedicado para la culminación de este trabajo al:

Dr. Demetrio Ambriz García

Dr. Eduardo Casas Hernández

Mi gratitud a mi alumno, amigo, colega y padre de mi ahijado Emiliano

Maestro José Luis Rodríguez Suástegui

RESUMEN

El éxito de la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) está restringido por falta de activación del ovocito y falla en la descondensación de la cabeza espermática, ocasionando baja formación del pronúcleo (PN) masculino. Para mejorar los resultados obtenidos por la ICSI, es necesaria una adecuada activación del ovocito y selección espermática. El objetivo del presente estudio fue determinar la eficiencia de la fertilización usando ICSI con activación química en ovocitos de ovino y seleccionando el espermatozoide por “swim-up” o “swim-up” más la unión a la zona pelúcida (ZP). Tres experimentos fueron realizados. En el experimento 1, un total de 821 ovocitos madurados *in vitro*, fueron activados químicamente con etanol (EtOH), ionóforo de calcio (Ica) o ionomicina (Io), para determinar la formación del PN femenino. Los tratamientos mostraron resultados similares (54, 47 y 42%, respectivamente), siendo más alta ($P < 0.05$) que la activación mecánica de los ovocitos por medio de: sólo el manejo del ovocito, ICSI o falsa inyección (13, 25, 32%, respectivamente) ($n = 429$). El experimento 2, fue para determinar el estado acrosomal y la viabilidad de espermatozoides de semen fresco y congelado-descongelado. Un total de 12 eyaculados y 28 pajillas con semen congelado-descongelado fueron usadas. Los espermatozoides fueron seleccionados mediante “swim-up” o “swim-up” más la unión a la ZP. Un total de 2294 espermatozoides de semen fresco y 2760 espermatozoides de semen congelado-descongelado fueron analizados después de realizadas ambas técnicas. Los espermatozoides de semen fresco seleccionados por “swim-up” mostraron un 59% de reacción acrosomal (RA), mientras que en los seleccionados por medio de la unión a la ZP se incrementó a

91%. En comparación, la RA de los espermatozoides de semen congelado-descongelado usando “swim-up” o “swim-up” más la unión a la ZP fue de 77 y 86%, respectivamente. Se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los dos procedimientos de selección espermática. En el experimento 3, la fertilización fue evaluada con base en la formación de los dos PN sin la presencia de la cabeza espermática. El porcentaje de fertilización en 200 ovocitos activados mecánicamente fue de 4%, pero la fertilización se incrementó en ovocitos activados con EtOH después de la ICSI (12-28%). Cuando espermatozoides de semen fresco y seleccionado mediante “swim-up” fueron inyectados a 123 ovocitos, el porcentaje de fertilización fue de 28%; mientras que los espermatozoides seleccionados por “swim-up” más la unión a la ZP, el porcentaje de fertilización de 73 ovocitos fue de 25%. En comparación con los espermatozoides congelados-descongelados y seleccionados por “swim-up”, la fertilización fue de 13% (70 ovocitos), mientras que usando espermatozoides seleccionados por “swim-up” más su unión a la ZP resultó en un 12% de fertilización (51 ovocitos). No se observó diferencia significativa entre las dos técnicas de selección. Conclusiones: La activación química con EtOH incrementó la activación en ovocitos de ovino, además después de la ICSI incrementó el porcentaje de fertilización. La selección de espermatozoides mediante “swim-up” o “swim-up” más su unión a la ZP no aumentó el porcentaje de fertilización con ICSI, aunque “swim-up” más su unión a la ZP, indujo un alto porcentaje de RA, lo que sugiere que no es esencial para la fertilización en ovocitos de ovino. El uso de espermatozoides de semen fresco fue más eficiente que los espermatozoides congelados-descongelados en términos de capacidad de fertilización usando ICSI.

Palabras clave: etanol, ICSI, activación de ovocitos, ovino, pronúcleos, zona pelúcida.

ABSTRACT

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) success is restricted by failure in oocyte activation and in sperm head decondensation with low male pronuclei (PN) formation. In order to improve ICSI, appropriate sperm selection and oocyte activation are necessary. The objective of the present study was to determine the efficiency of fertilization using ICSI with chemically activated ovine oocytes and sperm selected by “swim-up” or “swim-up” plus ZP binding. Three experiments were performed. In experiment 1, a total 821 *in vitro* matured oocytes were chemically activated with ethanol (EtOH), calcium ionophore (Ica) or ionomycin (Io), to determine female PN formation. The treatments showed similar results (54, 47, and 42%, respectively) and were higher ($P < 0.05$) than mechanical (non-chemical) activated oocytes in the sham, ICSI, and sham injection (13, 25, 32%, respectively) ($n = 429$). Experiment 2 was conducted to determine the viability and acrosome status for fresh and frozen-thawed sperm. A total of 12 ejaculates and 28 straws of semen frozen-thawed were used. Sperm were selected by “swim-up” or “swim-up” plus ZP binding. A total of 2294 sperm from fresh semen and 2760 sperm from frozen-thawed semen were analyzed after either, “swim-up” or “swim-up” plus ZP binding. Sperm from fresh semen selected by “swim-up” showed an acrosome reaction (AR) of 59%, while the sperm selected by ZP binding had an increased of 91%. In comparison, the AR of frozen-thawed sperm using “swim-up” or “swim-up” plus ZP binding was 77 and 86%, respectively. A difference was observed between the two sperm selection procedures ($P < 0.05$). In experiment 3, fertility was evaluated based on the formation of two PN without the presence of a sperm head. The fertilization rate in 200 mechanical

activation oocytes was 4%, but the fertilization increased in EtOH activated oocytes after ICSI (12-28%). When fresh sperm selected only by “swim-up” were injected to 123 oocytes, a fertilization rate of 28% was achieved. In those sperm selected by “swim-up” plus ZP binding the fertilization rate of 73 oocytes was 25%. In comparison, for frozen-thawed sperm selected by “swim-up”, fertilization was 13% (70 oocytes), whereas using sperm from “swim-up” plus ZP binding resulted in 12% (51 oocytes) fertilization rate. No significant difference was observed between the two treatments. Conclusions: Chemical treatment with EtOH increased ovine oocyte activation. Besides, the fertilization rates increased after ICSI. Sperm selection with the “swim-up” or “swim-up” plus ZP did not increase the fertilization rate with ICSI, although “swim-up” plus ZP it did induce a high percentage of AR, suggesting that it is not essential for fertilization in ovine oocytes. The use of fresh sperm was more efficient than frozen-thawed in terms of fertilization capacity using ICSI.

Keywords: ethanol, ICSI, oocyte activation, ovine, pronuclei, zona pellucida.

ABREVIATURAS.

ADN.	Ácido Desoxirribonucleico.
ACs.	Adenil ciclasa soluble.
AH.	Ácido hialurónico.
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico 3' 5.
ASB.	Albúmina sérica bovina.
CB.	Citocalasina B.
Ca ²⁺ .	Calcio.
CGP.	Células germinales primordiales.
CHX.	Cicloheximida.
CIV.	Cultivo <i>in vitro</i> .
CO.	<i>cumulus oophorus</i> .
COC.	Complejo ovocito-células del cúmulo.
CP.	Cuerpo polar.
DMAP.	Dimetilaminopurina.
DTT.	Ditiotreitol.
EE.	Estímulos eléctricos.
EGF.	Factor de crecimiento epidérmico.
EtOH.	Etanol.
FITC-PNA.	Isotiocianato de fluoresceína con aglutinina de cacahuate.
FIV.	Fertilización <i>in vitro</i> .
FPM.	Factor promotor de la maduración.

FSC.	Factor citostático.
FSH.	Hormona folículo estimulante.
HCO ₃ ⁻ .	Bicarbonato.
HEPES.	N-2-hidroxietilpiperazina-ácido etanol sulfónico.
IA.	Inseminación artificial.
Ica.	Ionóforo de calcio.
ICSI.	Inyección intracitoplasmática del espermatozoide.
Io.	Ionomicina.
IP.	Ioduro de propidio.
IP3.	Inositol 1,4,5 trifosfato.
LH.	Hormona luteinizante.
MAE.	Membrana acrosómica externa.
MIV.	Maduración <i>in vitro</i> .
MSOME.	Espermatozoides móviles, examen morfológico de organelos.
mTBM.	Medio Tris–Buffer modificado.
PIP2.	Fosfatidil inositol di-fosfato.
PEIV.	Producción de embriones <i>in vitro</i> .
PKA.	Proteína cinasa A.
PKC.	Proteína cinasa C.
PLCζ.	Fosfolipasa C zeta.
PNf.	Pronúcleo femenino.
PNm.	Pronúcleo masculino.

PNs.	Pronúcleos.
TP.	Teca perinuclear.
PVA.	Alcohol polivinílico.
PVP.	Polivinil pirrolidona.
P ₄ .	Progesterona.
RA.	Reacción acrosomal.
REL.	Retículo endoplásmico liso.
SDS.	Dodecil sulfato de sodio.
SFB.	Suero fetal bovino.
SOAF.	Factor de activación del ovocito unido al espermatozoide.
Sr ²⁺ .	Estroncio.
TCM-199.	Medio de cultivo de tejidos 199.
TE.	Transferencia de embriones.
TRA.	Técnicas de reproducción asistida.
TX-100.	Triton X-100.
ZP.	Zona pelúcida.

ÍNDICE	PÁGINA
I.- INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Situación de la Ovinocultura en México.	1
1.2 Avances de la biotecnología en la reproducción de mamíferos.	2
1.3 Origen de los gametos.	3
1.4 Maduración de los espermatozoides.	5
1.5 Capacitación espermática.	5
1.6 Reacción acrosomal o exocitosis acrosómica.	8
1.7 Penetración del espermatozoide en el <i>cumulus oophorus</i> .	10
1.8 Penetración del espermatozoide en la Zona Pelúcida.	11
1.9 Fertilización.	13
1.10 Activación del ovocito.	15
II. ANTECEDENTES.	17
2.1 Importancia de la reproducción asistida.	17
2.2 Importancia de la ICSI en la reproducción asistida.	17
2.3 Producción de embriones <i>in vitro</i> .	18
2.4 Diferencia entre fertilización e ICSI.	20
2.5 Historia de la ICSI.	20
2.6 Tratamientos para la descondensación espermática.	22
2.7 Tratamientos para la activación del ovocito.	25
2.8 Nuevas formas de selección espermática para realizar ICSI.	35
III.- JUSTIFICACIÓN.	39

IV.- HIPÓTESIS GENERAL.	41
V.- OBJETIVO GENERAL.	42
VI.- OBJETIVOS PARTICULARES.	42
VII.- DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL.	43
VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS.	47
8.1 Colección y maduración de ovocitos <i>in vitro</i> .	47
8.2 Evaluación de la maduración <i>in vitro</i> .	50
8.3 Activación de los ovocitos.	51
8.4 Evaluación de la formación de pronúcleos.	52
8.5 Obtención y congelación de semen.	52
8.6 Preparación de los espermatozoides.	53
8.7 Unión de los espermatozoides a la zona Pelúcida.	54
8.8 Estado acrosomal y viabilidad de los espermatozoides que se procesaron mediante “swim-up” o “swim-up” más su unión a la Zona Pelúcida.	55
8.9 Técnica de la ICSI.	56
8.10 Activación y fertilización determinada mediante pronúcleos.	58
8.11 Análisis estadístico.	59
IX.- RESULTADOS.	61
X.- DISCUSIÓN.	66
XI. CONCLUSIONES.	75
XII.- BIBLIOGRAFÍA.	76

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Situación de la Ovinocultura en México.

Los ovinos al igual que otros animales domésticos, no son originarios del continente Americano. Estos animales llegaron de España con los navegantes y conquistadores, primero en calidad de alimento, y luego, como pie de cría con los primeros colonos y religiosos. Con el paso del tiempo, dichos ovinos dieron lugar a las denominadas razas criollas de América que persisten hoy en día en forma de pequeños núcleos, generalmente en zonas marginales (Vivas, 2013). La posterior introducción y adaptación de diferentes razas provenientes principalmente de Australia y Estados Unidos ha permitido incrementar el acervo genético. Actualmente se cuenta con razas especializadas en producción de carne, leche, lana y piel, algunas de las cuales pueden estar especializadas para una sola característica productiva, mientras que otras, pueden ser aptas para más de un fin y son denominadas de doble propósito. Desde el punto de vista productivo, la diversidad de razas es importante, ya que los productores pueden elegir aquellas que puedan satisfacer sus requerimientos de acuerdo con los objetivos de producción (López, 2004).

En México existen dos tipos de sistemas de producción, uno encaminado a la producción de animales de pie de cría, que se realiza principalmente en un sistema intensivo o estabulado, donde los animales se mantienen dentro de corrales y la alimentación la reciben en los comederos, y el de la producción de corderos para

engorda, siendo realizado en un sistema semiestabulado o de traspatio con pastoreo diurno y encierro nocturno, sistema que agrupa quizá el mayor número de explotaciones del país (Castañeda, 2015).

La productividad de las explotaciones ovinas en México es baja, y muchos son los factores causantes de ello, destacándose que esta actividad se encuentra en manos de pequeños productores rurales, con ingresos limitados, escaso acceso a insumos y tecnologías modernas, lo que limita la generación de estrategias de manejo que aumenten el potencial reproductivo y genético de los animales (Molina y Beltrán, 2014).

Con base en el panorama actual de la ovinocultura en México, se tienen como objetivos: aumentar el inventario nacional y/o hacer más eficiente el actual para cubrir las importaciones, elevar la productividad y eficiencia de las unidades de producción e incrementar la transferencia y adopción de tecnologías innovadoras entre ellas, las reproductivas (Partida *et al.*, 2013).

1.2 Avances de la biotecnología en la reproducción de mamíferos.

La biotecnología de la reproducción desde su origen tiene cinco generaciones: la primera, la inseminación artificial (IA); la segunda, control hormonal, transferencia de embriones (TE), congelación y bipartición de embriones; la tercera, corresponde al sexado de embriones y espermatozoides y producción de embriones *in vitro* (PEIV); la cuarta, se identifica con la clonación con células somáticas y la quinta con la transgénesis (Ugalde, 2014).

En el ganado ovino a nivel mundial, se están aplicando técnicas de reproducción para incrementar su eficiencia y consecuentemente su productividad. Actualmente, entre los países que utilizan la técnica de superovulación y la transferencia de embriones a fin de lograr objetivos específicos, se encuentran: el Reino Unido (disminución en la cantidad de grasa de la canal); Francia (aumento de la proteína en la leche); España (incremento de la prolificidad); Sudáfrica (aumento de la fecundidad); Nueva Zelanda (disminución del diámetro de la fibra de la lana); Australia y Nueva Zelanda (exportación de genética selecta) y México (multiplicación de animales de alto valor comercial) (Ugalde, 2014).

Entre las técnicas reproductivas que se están aplicando en el ganado ovino en México se encuentran: (IA) por vía cervical e intra-uterina, la inducción y sincronización de estros, la congelación y TE producidos *in vivo* e *in vitro*, lo anterior, con la finalidad de favorecer la multiplicación de reproductores con características productivas y reproductivas superiores, obteniendo con ello mayores beneficios económicos (Molina y Beltrán, 2014).

1.3 Origen de los gametos.

Las células germinales de la hembra y del macho se desarrollan a partir de las células germinales primordiales (CGP), que en embriones de desarrollo temprano, tienen una ubicación extraembrionaria. Después de proliferar las CGP migran, de modo ameboideo, a las crestas gonadales en desarrollo donde se transforman en ovogonias y en espermatogonias. En la hembra las ovogonias se multiplican por

mitosis, pero se detienen antes o inmediatamente después del nacimiento, dependiendo de la especie. Poco después de la última mitosis, en las ovogonias se duplica el ADN y entran a una larga profase de la primera división meiótica. Durante la etapa paquitena, los cromosomas homólogos se entrecruzan y los genes paternos y maternos se intercambian entre sí antes de que el ovocito entre a la etapa de diploteno que es de larga duración. Al inicio de la profase, la cromatina se encuentra difusa en el núcleo, en esta etapa los ovocitos presentan un núcleo grande llamado vesícula germinal; crecen y los organelos citoplásmicos se reproducen. Con la llegada a la pubertad la oleada de la hormona luteinizante (LH) de la hipófisis desencadena la reanudación de la meiosis, logrando que los ovocitos lleguen a la metafase de la segunda división meiótica y sean liberados de los folículos durante la ovulación. Los ovocitos ovulados rodeados por miles de células del cúmulo, son transportados rápidamente a la región superior de los oviductos donde son fecundados, por lo que la fertilización en los mamíferos se produce en la metafase de la segunda división meiótica del ovocito (Yanagimachi, 2005).

En los machos los gonocitos migran a la membrana basal de los túbulos seminíferos transformándose en espermatogonias. En los adultos, las espermatogonias mantienen su capa germinal produciendo cíclicamente los espermatocitos primarios que experimentan meiosis para producir espermatocitos secundarios y después espermátidas que son células haploides y redondas, diferenciándose posteriormente en espermatozoides flagelados (Yanagimachi, 2005).

1.4 Maduración de los espermatozoides.

Los espermatozoides que salen de los testículos son inmóviles y no son capaces de realizar la fertilización. Adquieren la capacidad de movilidad, realizándose en ellos cambios estructurales y bioquímicos mientras pasan a través del epidídimo, a este proceso se le denomina maduración. Éste incluye alteraciones en la composición de glicoproteínas y esteroides de la membrana plasmática y un extenso entrecruzamiento de protaminas nucleares por puentes disulfuro. Algunas proteínas epididimarias que se integran a la membrana plasmática de los espermatozoides pueden tener un papel fundamental en la interacción espermatozoide-ovocito. Mientras que en la eyaculación algunos componentes del plasma seminal son absorbidos en la membrana plasmática de los espermatozoides para regular su función durante la fertilización (Yanagimachi, 2005).

1.5 Capacitación espermática.

Hace más de 50 años que Austin y Chang definieron la capacitación espermática de mamíferos como el periodo en que los espermatozoides deben permanecer en el aparato reproductor de la hembra para adquirir la capacidad de fertilizar a los ovocitos. La capacitación involucra una serie de modificaciones estructurales y funcionales que ocurren en los espermatozoides mediante: (1) el retiro de factores estabilizadores adquiridos mientras permanecían en el plasma seminal, (2) cambios que suceden durante el trayecto por el tracto reproductor femenino y (3) se considera completa la capacitación cuando los espermatozoides

son capaces de responder a ligandos de la zona pelúcida (ZP), y experimentan la reacción acrosomal (RA) (De Jonge, 2005).

El proceso de capacitación implica varios cambios secuenciales, algunos de estos cambios son rápidos y tienen lugar en el momento en que los espermatozoides son eyaculados, mientras que otros cambios necesitan de un periodo más largo y se desarrollan en el tracto reproductor femenino (*in vivo*) o en un medio capaz de sustentar este proceso *in vitro*, pero ambos cambios son regulados principalmente por la proteína cinasa A (PKA), bicarbonato (HCO_3^-), adenilciclase soluble (ACs) y adenosin monofosfato cíclico 3' 5 (AMPc) (Visconti, 2009).

Un evento rápido de la capacitación es la activación de la movilidad espermática que se caracteriza por el movimiento flagelar de los espermatozoides inmediatamente después de entrar en contacto con altas concentraciones de HCO_3^- y Calcio (Ca^{2+}) presentes en el fluido seminal, asociándose también el movimiento transmembranal del HCO_3^- con el incremento del pH intracelular (Visconti, 2009).

Durante la capacitación los espermatozoides adquieren la capacidad de fertilizar, la cual está precedida de la preparación para experimentar la RA y cambiar el patrón de movilidad conocido como hiperactivación. Los componentes del fluido oviductal, tales como proteínas de alto peso molecular como la albúmina y lipoproteínas de alta densidad (HDL) promueven la salida de colesterol de la membrana plasmática, dando como resultado un incremento de la capacitación y en la fosforilación de la tirosina a través de la vía de señalización AMPc/PKA. Los

medios de capacitación *in vitro* contienen una fuente de proteínas que generalmente es la albúmina sérica bovina (ASB) y diferentes iones, incluyendo al HCO_3^- y Ca^{2+} (López-Úbeda y Matás, 2015).

En el proceso de capacitación se encuentran involucradas diversas moléculas. El HCO_3^- interviene en la hiperpolarización de la membrana y remodelación de sus fosfolípidos, lo que permite reubicar al colesterol para su posterior salida, lo anterior incrementa la fluidez de la membrana, ocasionando la entrada masiva de Ca^{2+} extracelular cuya función es activar las vías de señalización de ACs/AMPC/PKA, dando como resultado la fosforilación de proteínas y alcalinización del pH intracelular. La ACs cuya función es la elevación de los niveles de AMPC produciendo la activación de la PKA. La PKA tiene como funciones la fosforilación de la serina y treonina, que conduce a la fosforilación de la tirosina, ésta última regula la hiperactivación de la motilidad e induce la RA. La albúmina tiene la función de regular el flujo de colesterol que da como resultado una redistribución de los fosfolípidos membranales, incrementando su fluidez y transporte iónico. El óxido nítrico es una pequeña molécula lipofílica que se difunde rápidamente a través de la membrana, actuando como mensajero intracelular y extracelular, entre sus funciones se encuentra la activación de la guanilato ciclasa soluble que produce un incremento intracelular del guanosin monofosfato cíclico que ha sido implicado en procesos como capacitación, RA e interacción óvulo-espermatozoide (López-Úbeda y Matás, 2015).

1.6 Reacción acrosomal o exocitosis acrosómica.

El proceso por el cual los espermatozoides responden a los receptores de la ZP se ha referido como RA, aunque lo más apropiado es llamarle exocitosis acrosómica, ya que la exocitosis es un proceso mediante el cual las vesículas se fusionan a la cara interna de la membrana plasmática, descargando su contenido en el espacio extracelular, siendo un proceso irreversible (Tosti y Boni, 2011). Normalmente la RA se lleva a cabo al entrar en contacto con la ZP y hace que los espermatozoides sean capaces de penetrarla para fusionarse con la membrana plasmática de los ovocitos (Yanagimachi, 2005).

El acrosoma es un organelo con forma de capucha, ubicado en la región apical del espermatozoide, sobre el segmento anterior del núcleo, con una gran cantidad de enzimas hidrolíticas, que se derivan del aparato de Golgi durante la espermatogénesis (Del Río *et al.*, 2007). Durante la RA, se fusiona la membrana acrosomal externa (MAE) con la membrana plasmática, dando lugar dicho evento a la vesiculización. La matriz acrosómica queda expuesta y se dispersa parcialmente, mientras que la membrana acrosómica interna con algunos componentes de la matriz acrosómica adheridos, permanece intacta durante todo el proceso de unión y penetración del espermatozoide a la ZP (Tosti y Boni, 2011). La señalización durante la RA está mediada por moléculas de segundos mensajeros como Inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), AMPc e iones de Ca^{2+} . Dos vías distintas han sido propuestas para la activación de la RA, en ambos casos, el acontecimiento central es el aumento del contenido de iones de Ca^{2+} dentro del acrosoma. Una vía puede ser el flujo de iones

externos al interior del acrosoma controlado por válvulas en los canales de Ca^{2+} mediante la activación de PKA dependientes de AMPc que es una consecuencia de la unión de la glicoproteína ZP3 con la membrana plasmática espermática. Otra vía que puede causar aumento de Ca^{2+} citosólico dentro del acrosoma es a través de la activación de la fosfolipasa C zeta (PLC ζ) por una tirosina cinasa asociada con el receptor espermático en la ZP. La PLC ζ hidrolisa el fosfatidil inositol 4-5 bi-fosfato (PIP2) a IP3 que puede desencadenar la liberación Ca^{2+} intra-acrosomal y de diacilglicerol que activa la proteína cinasa C (PKC), provocando la apertura de canales de Ca^{2+} . En ambos escenarios, el flujo de iones activa la despolimerización de microfilamentos en el acrosoma para favorecer la fusión y vesiculación de la MAE (Tosti y Boni, 2011).

La progesterona (P_4) y la ZP_3 son inductoras a través de un mecanismo de receptores específicos presentes en la membrana plasmática de la región acrosomal, causando un transporte de Ca^{2+} hacia el interior y en consecuencia elevando considerablemente su concentración; aunado a lo anterior se encuentran agentes fusogénicos como la lisofosfatidilcolina que en presencia de Ca^{2+} son capaces de acelerar la RA (Del Río *et al.*, 2007), además, algunos componentes o enzimas acrosómicas sufren proteólisis y modificaciones post-transicionales, por ejemplo la división proteolítica de pro-acrosina a acrosina una enzima activa (Tosti y Boni, 2011). Aunque múltiples agonistas pueden inducir la RA, sólo la unión o penetración de la ZP durante la fertilización es 100% efectiva para producirla (Baibakov *et al.*, 2007), siendo importante mencionar que si la RA se realiza antes de la unión con la

ZP, el espermatozoide no va a ser capaz de llevar a cabo la fertilización (Gadella *et al.*, 2001).

1.7 Penetración del espermatozoide en el *cumulus oophorus*.

Los espermatozoides capacitados que alcanzan la porción ampular del oviducto deben contactar con las células del cúmulo o *cumulus oophorus* (CO). El CO está formado por células de la granulosa, una matriz extracelular de ácido hialurónico (AH) polimerizado y algunas proteínas, como la Hay 15 (Cánovas y Coy 2008; Parmegiani *et al.*, 2012). Durante el crecimiento del ovocito, el CO tienen un papel importante en el mantenimiento del arresto meiótico, así como en la activación del ovocito a través de uniones comunicantes con las células del CO. Por medio de estas uniones se transfieren sustancias de bajo peso molecular como iones, segundos mensajeros, nucleótidos y aminoácidos, necesarios para el metabolismo del ovocito (Zhang *et al.*, 2012). Tras la oleada preovulatoria de LH, el CO transmite la señal de la reanudación meiótica, maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos. Es esencial la capacitación de los espermatozoides con su acrosoma intacto para que pasen a través del CO (Tosti y Boni, 2011). Entre las funciones del CO están: estimular la movilidad espermática, promover la RA y controlar el acceso de los espermatozoides a la ZP del ovocito inmovilizada por la red fibrosa de la matriz del CO (Kim *et al.*, 2008). Los espermatozoides atraviesan el CO por medio de su movilidad y la presencia de la hialuronidasa de origen acrosomal; así como de otras proteínas cuya función es la de digerir la matriz del AH (Cánovas y Coy 2008), encontrándose entre estas últimas a la PH-20 y la Hay 15 (Cánovas y Coy 2008; Kim

et al., 2008) que se encuentran unidas a un glicolípido membranal, el glicosilfosfatidilinositol (Kim *et al.*, 2008). Estas dos hialuronidasas difieren en su localización subcelular, la PH-20 está presente en la membrana plasmática de los espermatozoides con el acrosoma intacto y su localización aparece sin cambios después de la RA, asignándole dos funciones, la hidrolización del AH y la unión a la ZP. La Hay 15 está localizada en un 60% del total de la membrana plasmática y un 40% en la membrana acrosomal, siendo liberada casi toda durante la RA, por lo que se piensa que funciona en la penetración espermática a través del CO permitiendo el libre movimiento del espermatozoide (Kim *et al.*, 2008). Aunado a lo anterior, el CO secreta P₄, un atrayente espermático, que actúa a través de un receptor no genómico que activa la PLC ζ elevándose el Ca²⁺ y regulando algunos aspectos del funcionamiento celular, como es inducir la hiperactivación flagelar y la RA (Tosti y Boni, 2011).

1.8 Penetración del espermatozoide en la Zona Pelúcida.

Una vez que los espermatozoides penetran el CO tienen que unirse y penetrar la ZP. Ésta es una estructura extracelular, que rodea al ovocito y al embrión previo a la implantación, compuesta por glicoproteínas, cuyas funciones principales son el reconocimiento espermático especie-específico y la prevención de la polispermia. Aunque los mecanismos que permiten interactuar al espermatozoide con la ZP del ovocito no están totalmente caracterizados, se sugiere que una glicoproteína compleja en la ZP interactúa con otra proteína enlazada al carbohidrato de la superficie espermática (Velázquez, 2009). La ZP contiene tres glicoproteínas: ZP₁,

ZP₂ y ZP₃. La ZP₂ y ZP₃ tienen estructura filamentososa, y la ZP₁ parece unirse a ZP₂ y ZP₃ en un arreglo tridimensional complejo (Velázquez, 2009). La ZP₃ es el receptor espermático de la ZP, induciendo la RA. Después de completarse la RA el espermatozoide pierde su afinidad a la ZP₃ y entonces la unión del espermatozoide al ovocito parece ser dependiente de la ZP₂. Entre las proteínas que presentan los espermatozoides en su membrana plasmática para unirse a la ZP₃ se encuentran: la fertilina, 4-galactosiltransferasa, ciritestina (Velázquez, 2009), SP56ZP3, zona adhesinas (ZAN), arilsulfatasa A (ASA), P43H, proacrosina, SP38IAM38ZPBP12 y PH20SPAM1 (Tosti y Boni, 2011), siendo la β 1 y la 4-galactosiltransferasa importantes para llevar a cabo la RA por la ZP₃ (Velázquez, 2009).

Aunque los mecanismos del paso de los espermatozoides a través de la ZP no están claros se considera que dependen de la combinación de procesos mecánicos y enzimáticos (Kim *et al.*, 2008). La acción mecánica es por medio de la movilidad flagelar del espermatozoide, mientras que la enzimática ocurre por la hidrólisis proteolítica de la ZP con la ayuda de proteasas acrosomales y/o membranales de los espermatozoides (Kim *et al.*, 2008). En general, los espermatozoides sólo penetran la ZP una vez que han sido sometidos a la RA. Este cambio morfológico y bioquímico activa y expone las enzimas proteolíticas presentes en la matriz acrosómica. La proteasa acrosómica más estudiada es la acrosina, que tiene propiedades similares a la tripsina, ambas eliminan la ZP de los ovocitos; otras proteasas acrosómicas de los espermatozoides de mamíferos incluyen: una peptidasa similar a una colagenasa,

catepsina D proteasa, tripsina proteasa, serina proteasa, peptidasa dipeptidil, TESP proteasa y el proteasoma 26S (Tosti y Boni, 2011).

1.9 Fertilización.

Después de que los espermatozoides penetran la ZP, alcanzan el espacio perivitelino, se adhieren y fusionan con la membrana plasmática de los ovocitos, (el oolema) (Tosti y Boni, 2011). La unión y fusión del espermatozoide con el oolema, son mediadas por las integrinas, proteínas de unión, de la familia ADAM (una desintegrina y una metaloproteasa) presentes en la superficie de la cabeza espermática, así como integrinas en la membrana plasmática del ovocito. La fertilina (α y β) y ciritestina, proteínas de la familia ADAM que se encuentran en la membrana plasmática de los espermatozoides interactúan con las integrinas $\alpha 6\beta 1$ o $\alpha v\beta 1$ del oolema durante la fertilización. La Fertilina- β (ADAM-2) participa en la unión del espermatozoide con el oolema a través de su dominio desintegrina, y la fertilina- α (ADAM-1) induce la fusión espermatozoide-oolema a través de un dominio de fusión similar al de algunos virus (Tosti y Boni, 2011). El proceso de fusión de membranas puede ser dividido en tres eventos claves. El primero consiste en el reconocimiento de membranas y se trata de un contacto inicial entre las dos membranas mediadas por uniones proteína-proteína o por uniones proteína-carbohidrato. El segundo consiste en la aposición de las membranas; la actividad fusogénica de las proteínas conlleva a que las dos membranas tengan un contacto íntimo y se produzca la adhesión uniéndose físicamente las dos (a través de interacciones proteína-lípido o proteína-proteína), lo cual induce un cambio de conformación irreversible, de modo

que las proteínas se doblan sobre sí mismas. El tercer evento corresponde a la mezcla de lípidos; una vez que las membranas están en contacto, se produce la mezcla de lípidos dando como resultado una bicapa que permite la continuidad citoplasmática entre las dos células. La fusión del espermatozoide al oolema del ovocito se lleva a cabo en la porción de la membrana plasmática, denominada teca perinuclear (TP) o segmento ecuatorial, que cubre parte del acrosoma, pero no se fusiona con la MAE durante la RA (Cánovas y Coy 2008).

Una vez realizada la fusión espermatozoide-oolema cesa la movilidad de la cola espermática, incorporándose la cabeza y posteriormente el flagelo al ooplasma cortical del ovocito, a través de los microfilamentos de actina que cubren la mayoría de la superficie del ovocito (Tosti y Boni, 2011).

La fusión espermatozoide-ovocito provoca una abrupta liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático liso (REL) de los ovocitos, el Ca^{2+} liberado vuelve a entrar al REL lo que hace que de nuevo se libere Ca^{2+} a intervalos regulares durante varias horas. La primera subida de Ca^{2+} intracelular desencadena la reanudación de la meiosis del ovocito, así como la exocitosis de los gránulos corticales que hacen a la ZP impenetrable a más espermatozoides (reacción zonal) (Yanagimachi, 2005).

Es importante indicar que el Ca^{2+} es citotóxico si sus niveles intracelulares se mantienen elevados durante largos períodos, por lo que la liberación de Ca^{2+} se realiza de manera pulsátil, lo anterior envía a la célula las señales iónicas y al mismo tiempo evita los efectos tóxicos (Loi *et al.*, 1998). El intervalo entre los aumentos de

Ca^{2+} en los ovocitos de mamíferos es específico de la especie, por ejemplo en los ovocitos de bovinos, se observan cada 20 minutos (Hosseini *et al.*, 2008).

1.10 Activación del ovocito.

Los cambios estructurales y bioquímicos producidos en los ovocitos por el espermatozoide fecundante se denominan activación (Yanagimachi, 2005). Entre los cambios más ampliamente observados en los ovocitos activados de mamíferos se encuentran: la terminación de la meiosis, la exocitosis de los gránulos corticales, cambios en el patrón de síntesis de proteínas y la formación de los pronúcleos (PNs). No existen suficientes evidencias sobre si la activación es debida a las interacciones entre los ligandos superficiales de los espermatozoides y los receptores de la superficie de los ovocitos o a través de la introducción de un factor de activación del ovocito unido al espermatozoide (SOAF), que no es específico de especie (Yanagimachi, 2005). Este factor se encuentra localizado en la TP de la región post-acrosómica, debajo de la membrana plasmática sobre el segmento ecuatorial del acrosoma (García-Roselló *et al.*, 2009). Este factor ha sido identificado como PLC ζ . Se cree que después de la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, la proteína PLC ζ derivada del espermatozoide se difunde dentro del citoplasma del ovocito, produciendo la hidrólisis del PIP2 para generar el IP3. El incremento de Ca^{2+} intracelular libre inactiva el factor citostático (FSC), promoviendo la destrucción de la ciclina B1 que ocasiona la inactivación del factor promotor de la maduración (FPM), un dímero formado por la ciclina B1 (subunidad regulatoria) y la proteína p34cdc2 (subunidad catalítica) (Barbosa *et al.*, 2013). Esto causa la

producción de receptores de IP3 a través de la proteína G y la tirosina cinasa. El bloqueo de la activación del FPM permite los primeros eventos de la activación del ovocito, tales como la reanudación de la meiosis (transición de la anafase/telofase), extrusión del segundo cuerpo polar y la exocitosis de los gránulos corticales (Barbosa *et al.*, 2013), así como la formación del PN femenino (PNf), descondensación del núcleo compacto del espermatozoide y su transformación en el PN masculino (PNm) (Yanagimachi, 2005). Durante la etapa intermedia del desarrollo pronuclear ocurre la síntesis de ADN. En la mayoría de las especies, el centrosoma espermático que entró en el ovocito forma el áster microtubular que atrae a los PNm y PNf al centro del ovocito y la unión de ambos (singamia) completa el proceso de fertilización; finalmente se forma el cigoto, lo que señala el principio de la vida de un nuevo individuo (Yanagimachi, 2005).

II. ANTECEDENTES.

2.1 Importancia de la reproducción asistida.

La biotecnología de la reproducción es un conjunto de técnicas que van desde la IA hasta la clonación, todas ellas encaminadas a aumentar la eficiencia reproductiva de los animales (Ugalde, 2014). El uso de técnicas de reproducción asistida (TRA) ha sido de gran importancia en la producción ganadera. En términos generales las principales TRA para este fin incluyen la IA, congelación de gametos y embriones, sincronización e inducción del estro, superovulación, sexado de semen y embriones, TE producidos *in vivo* e *in vitro*, y la PEIV. Dichas técnicas han incrementado la producción animal a través de la genética, reducción del intervalo generacional, control de enfermedades y reducción de costos de producción (Bertolini y Bertolini, 2009).

2.2 Importancia de la ICSI en la reproducción asistida.

La Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI por sus siglas en inglés) es una importante TRA cuando la fertilización *in vivo* o *in vitro* no es posible (Ortega *et al.*, 2011). Se puede utilizar para la conservación de especies en peligro de extinción (Comizzoli *et al.*, 2000), en la producción de crías de determinado sexo (Jo *et al.*, 2014) y para el uso de espermatozoides que han perdido su movilidad debido al tipo de conservación, como es el caso de espermatozoides congelados-desecados (Muneto y Horiuchi, 2011) o desecados por calor (Lee *et al.*, 2013) que

pierden su capacidad natural para penetrar al ovocito pero no su habilidad para contribuir en el desarrollo embrionario.

En ovinos, la ICSI es de gran valor en la investigación para estudiar aspectos fundamentales como: la calidad del ovocito sobre el desarrollo embrionario (Catalá *et al.*, 2012), la formación de los PNs (Shirazi *et al.*, 2011) y el desarrollo embrionario temprano (Gómez *et al.*, 1998b). Además se ha usado la ICSI con semen sexado (Catt *et al.*, 1996a), y se está utilizando para obtener animales con una característica genética específica, y en la producción de animales transgénicos para obtener productos biológicos de aplicación terapéutica (Pereyra-Bonnet *et al.*, 2011; López-Saucedo *et al.*, 2012). Actualmente, no hay una investigación intensiva acerca de la ICSI en pequeños rumiantes, sin embargo, es potencialmente importante, ya que en un futuro se podrá aplicar en sistemas de producción animal como es el uso con semen de animales de alto valor genético o con espermatozoides de epidídimo (López-Saucedo *et al.*, 2012).

2.3 Producción de embriones *in vitro*.

La PEIV involucra cuatro pasos: a) la recuperación de ovocitos de folículos antrales; b) la maduración *in vitro* (MIV) de estos ovocitos; c) la fertilización *in vitro* (FIV) de los ovocitos madurados y d) el cultivo *in vitro* (CIV) de los embriones resultantes (Traldi, 2009; Freitas y Melo, 2010).

La PEIV se define como un proceso por el cual la interacción de los espermatozoides y ovocitos, se produce fuera del cuerpo en condiciones de

laboratorio. El procedimiento de PEIV comienza con la colección de ovocitos, ya sea de animales vivos (Gou *et al.*, 2009; Grazul-Bilska *et al.*, 2006), que generalmente son estimulados hormonalmente para inducir el desarrollo de múltiples folículos preovulatorios, u ovocitos obtenidos de animales muertos (Shirazi *et al.*, 2008). Los ovocitos obtenidos de animales vivos pueden estar maduros y someterse a la FIV, mientras que los ovocitos obtenidos de folículos de 3-8 mm de animales muertos son madurados *in vitro* antes de la FIV. La FIV se ha realizado con semen fresco (Shirazi *et al.*, 2008), descongelado (Grazul-Bilska *et al.*, 2006) o usando espermatozoides sexados, seleccionando aquellos con cromosoma “X” o “Y” (Hollinshead *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2004). Los cigotos obtenidos después de la FIV generalmente se cultivan *in vitro* de 2 a 6 días (Walmsley *et al.*, 2004), para posteriormente realizar la TE que se define como la colocación de embriones en fase preimplantacional a nivel del oviducto o del cuerno uterino en hembras seleccionadas donde se desarrollará el feto hasta el nacimiento o se criopreservan los embriones para una posterior TE (Dattena *et al.*, 2000; Papadopoulos *et al.*, 2002; Morton *et al.*, 2004).

Otra forma de FIV es la ICSI, que es la inyección de un espermatozoide en el ovoplasma de un ovocito en metafase II (Patricio *et al.*, 2003). El ovocito maduro puede ser obtenido de folículos preovulatorios de una hembra *in vivo*, o puede ser obtenido por MIV de ovocitos colectados de folículos inmaduros, ya sea *in vivo* o postmortem (Hinrichs *et al.*, 2005).

2.4 Diferencia entre fertilización e ICSI.

Durante la fertilización, la membrana plasmática espermática y el contenido del acrosoma nunca entran en el ovocito. Durante la ICSI el espermatozoide entra completo al ovocito, además de una pequeña cantidad del medio extracelular en el que se mantienen los espermatozoides. Los ovocitos sometidos a ICSI deben hacer un trabajo extra en relación a los ovocitos fertilizados naturalmente, ya que se tienen que liberarse de: (I) la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide, (II) diversas macromoléculas agregadas a la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración en el epidídimo y eyaculación, (III) el contenido acrosomal con un espectro de enzimas hidrolíticas y glicoproteínas, y (IV) los componentes del medio durante la inyección de los espermatozoides, como por ejemplo la polivinil pirrolidona (PVP) (Yanagimachi, 2005).

2.5 Historia de la ICSI.

El primer investigador que reportó la inyección exitosa de un espermatozoide fue Hiramoto en 1962, utilizando ovocitos de erizo marino (Gómez *et al.*, 1997); posteriormente Uehara y Yanagimachi (1976) informaron sobre el primer éxito de ICSI en mamíferos, usando hámsters; para ello homogenizaron una suspensión de espermatozoides de epidídimo e inyectaron las cabezas espermáticas (sin acrosoma) en forma individual en ovocitos maduros, y 2 a 3 horas más tarde la mayoría de los ovocitos desarrollaron el PNm y el PNf (Catt y Rhodes, 1995; Lee *et al.*, 2003; Yanagimachi, 2005). La ICSI se ha realizado en diversas especies de

mamíferos. Entre las especies con nacimientos de crías vivas como resultado de embriones obtenidos por ICSI se encuentran: el bovino (Goto *et al.*, 1990), el humano (Palermo *et al.*, 1992), el conejo (Hosoi y Iritari, 1993), el ratón (Kimura y Yanagimachi, 1995), la oveja (Catt, 1996), la yegua (Squires *et al.*, 1996), el gato doméstico (Pope *et al.*, 1998), el cerdo (Kolbe y Holtz, 2000; Martin, 2000), el hámster (Yamauchi *et al.*, 2002), y la cabra (Wang *et al.*, 2003). También se ha logrado el nacimiento de crías vivas usando espermátidas redondas para realizar la ICSI en ratones (Oguna *et al.*, 2003) y hámsters (Haigo *et al.*, 2004).

Aunque la producción exitosa de crías viables por ICSI usando ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro* ha sido reportada en diversas especies de mamíferos, la eficiencia de ICSI es inferior al 10% (Yanagimachi, 2005).

Aunado a lo anterior, se reporta una fertilización de 30% cuando se usa ICSI en comparación a la FIV (57%) (Gómez *et al.*, 1997), considerando que es debido principalmente a la falla en la formación del PNm y a la falta de activación del ovocito (Cheng *et al.*, 2009). Una de las principales causas del bajo porcentaje de fertilización después de ICSI es la ausencia del PNm, debido a que no se realizó la descondensación de la cabeza espermática (Lee *et al.*, 2003). En humanos, conejos, hámsteres y ratones, el proceso de inyección ocasiona que la cabeza espermática se descondense y se forme el PNm. En contraste, la ICSI con espermatozoides de bovinos (Rho *et al.*, 1998), cerdos (Lee *et al.*, 2003) y ovinos (Gómez *et al.*, 1997) más del 70% no sufren descondensación espermática.

Como se observa en la Tabla 1, el porcentaje de blastocitos de ovinos producidos mediante ICSI es inferior a 20%, cuando no se da tratamiento a los espermatozoides ni activación artificial a los ovocitos.

Tabla 1.- Resultados de ICSI en ovocitos de ovino, sin tratamiento a los espermatozoides ni activación química de los ovocitos.

Autor y año	Semen	Porcentaje				
		Activación	Desarrollo de PNs	División	Mórulas	Blastocitos
Shirazi <i>et al.</i> , 2011.	Fresco	ND	37	78	ND	17
Shirazi <i>et al.</i> , 2009b.	Fresco.	5	5	24	ND	3
Pereyra – Bonnet <i>et al.</i> , 2008.	Descongelado.	ND	ND	52	38	0
Gómez <i>et al.</i> , 1998a.	Fresco.	ND	ND	31	43	9
Gómez <i>et al.</i> , 1998c.	Fresco-descongelado	38	88	ND	ND	ND
Catt, 1996.	Fresco.	3	50	ND	ND	ND
Catt y Rhodes, 1995.	Fresco.	52	63	48	ND	ND

ND= No determinado. PNs= Pronúcleos.

2.6 Tratamientos para la descondensación espermática.

En los mamíferos, durante las etapas finales de la maduración espermática la estructura nuclear se condensa progresivamente y se estabiliza por la formación de puentes disulfuro en las proteínas asociadas al ADN, las protaminas, proteínas

básicas específicas de los espermatozoides. Durante la espermatogénesis en el ADN de los espermatozoides, las histonas son sustituidas por protaminas, que son las responsables de formar una cromatina altamente condensada y bioquímicamente inerte (Rho *et al.*, 1998; Nakai *et al.*, 2006), que la hace más resistente a trastornos físicos y químicos (Rho *et al.*, 1998). El núcleo espermático inyectado tiene que ser remodelado a un estado somático típico con la reducción de puentes disulfuros regulados por el glutatión citoplásmico del ovocito y la sustitución de las protaminas por histonas, para que se lleve a cabo la descondensación nuclear y la formación del PNm (Nakai *et al.*, 2006). Se ha determinado que existen variaciones entre especies en cuanto a la estabilidad nuclear espermática, lo que facilita o dificulta la descondensación del núcleo y la formación del PNm después de la ICSI (Rho *et al.*, 1998).

Se ha reportado que los ovocitos inyectados con espermatozoides con acrosoma intacto retrasan el inicio de la descondensación y formación del PNm, esto no ocurre en la FIV, ya que únicamente los espermatozoides que han realizado la RA son capaces de fertilizar (Katayama *et al.*, 2002a). Por esto, la permeabilización o remoción de las membranas espermática y acrosomal es importante para facilitar la descondensación y formación del PNm después de la ICSI, ya que facilita la exposición del SOAF en el citoplasma del ovocito (García-Roselló *et al.*, 2009).

Para realizar lo anterior, se han usado medios físicos como es la remoción artificial del acrosoma y cola por sonicación (Lee y Niwa, 2006), daño de la membrana espermática por congelación y descongelación antes de la inyección

(Horiuchi *et al.*, 2002; Ock *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2006; Shirazi *et al.*, 2011) o mediante tratamientos químicos para inducir la RA con heparina, cafeína (Li *et al.*, 2004; Jiménez-Macedo *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2009), Ionóforo de calcio (Ica) (García-Roselló *et al.*, 2006; Jiménez-Macedo *et al.*, 2007) Ionomicina (Io) (Li *et al.*, 2001; Jiménez-Macedo *et al.*, 2005; Jiménez-Macedo *et al.*, 2006), y la P₄ (Katayama *et al.*, 2002b; Katayama *et al.*, 2007); también se ha aplicado el Triton X-100 (TX-100), un detergente no iónico que remueve las membranas acrosomal y plasmática del espermatozoide (Tian *et al.*, 2006; Pereyra-Bonnet *et al.*, 2007).

Se ha reportado que hay una relación significativa entre la reducción de los puentes disulfuro y la formación del PNm (Perreault *et al.*, 1987), por lo que se han usado agentes químicos para reducir los puentes disulfuro antes de la ICSI y promover la descondensación artificial *in vitro* en espermatozoides de mamíferos; entre éstos está el ditioneitol (DTT) (Chung *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2000; Suttner *et al.*, 2000; Galli *et al.*, 2003; Ock *et al.*, 2003; Taka *et al.*, 2005; Nakai *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2009; Shirazi *et al.*, 2011), así como los detergentes aniónicos como el dodecil sulfato de sodio (SDS) que rompe puentes no-covalentes (Ock *et al.*, 2003; Shirazi *et al.*, 2011).

En la Tabla 2, se observan los resultados obtenidos cuando los espermatozoides se expusieron a diferentes tratamientos antes de inyectarlos a ovocitos de ovino.

Tabla 2.- Resultados obtenidos después de la ICSI con espermatozoides expuestos a diferentes tratamientos antes de inyectarlos a ovocitos de ovino.

Autor/ año	Tratamiento Ovocitos.	Tratamiento espermatozoide	Desarrollo de PNs	Porcentaje		
				División	Mórulas	Blastocitos
Shirazi <i>et al.</i> , 2011.	Io 5 μ M + 1% SFB X 5 min, después de 3 h, 6- DMAP 1.9 mM ,3 h.	DTT 5 mM, 5 min.	60	86	ND	17
		DTT 5 mM + 0.1% SDS, 20 min.	59	87	ND	13
		SDS 0.1%, 20 min.	38	83	ND	14
		Congelado/des- congelado 2 veces sin crioprotector.	45	75	ND	18
Pereyra- Bonnet <i>et al.</i> , 2007.	Sin activación	Triton X-100 .5%, 30 seg. a 0 $^{\circ}$ C.	ND	55	47	2
Gómez <i>et al.</i> , 1997.	Sin activación	ICSI + RA.	22	ND	ND	ND

Io= Ionomicina; SFB= Suero fetal Bovino; DMAP= Dimetilaminopurina; DTT= Ditiotreitolo; SDS= Dodecil sulfato de sodio; RA= Reacción acrosomal. ND= No determinado.

2. 7 Tratamientos para la activación del ovocito.

Existen diferencias entre especies en la habilidad de los ovocitos para activarse después de la ICSI. En el ratón (Kuretake *et al.*, 1996), el humano (Tesarik y Sousa, 1995) y el conejo (Keefer, 1989), la ICSI es suficiente para activar a los ovocitos y lograr el desarrollo embrionario, mientras que en otras especies como los

porcinos (Nakai *et al.*, 2006) y los bovinos (Goto *et al.*, 1996), es necesaria la activación artificial del ovocito. En ovocitos de ovinos, aparentemente, la activación es consecuencia del proceso de inyección (Catt y Rhodes, 1995), ya que el porcentaje de activación fue similar entre ICSI (43%) y falsa inyección (32%), pero inferior en comparación a la activación que se logró con la FIV (62%) (Gómez *et al.*, 1998a), siendo la producción de blastocitos, de 19, 8 y 0% para FIV, ICSI y falsa inyección, respectivamente. Esto sugiere que es posible inducir mecánicamente, la activación en ovocitos de ovinos por el proceso de inyección, pero esta activación es inadecuada para producir blastocitos (Kharche y Birade, 2013).

Se han usado diferentes métodos para inducir la activación de los ovocitos tratados mediante ICSI, y a continuación se describen los más empleados.

2.7.1 Estímulo Eléctrico.

El estímulo eléctrico (EE) promueve el flujo de Ca^{2+} del medio extracelular (Loi *et al.*, 1998; Shirazi *et al.*, 2009b; Barbosa *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el EE genera microporos temporales en la membrana celular de los gametos e induce la afluencia de Ca^{2+} a través de los poros para activar el citoplasma mediante mecanismos dependientes de Ca^{2+} siempre y cuando exista un gradiente positivo de Ca^{2+} extracelular (Loi *et al.*, 1998). Cuando los ovocitos son expuestos a un solo EE, se induce una elevación transitoria del Ca^{2+} intracelular, los niveles de histona cinasa bajan por poco tiempo, pero subsecuentemente retornan a concentraciones pre-estímulo. Por lo tanto, la activación de los ovocitos se debe realizar con múltiples EE,

o bien un EE seguido por 6- Dimetilaminopurina (6-DMAP), un inhibidor de la histona cinasa que evita la activación del FPM (Lee y Niwa, 2006), o la cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas (previene la síntesis de ciclina B), evitando la elevación de histona cinasa, la reacumulación del FPM y FSC (Lee *et al.*, 2003), lo que acelera la formación de los PNs y permite un mejor desarrollo sincrónico de ellos y el desarrollo de la mitosis en el cigoto (Loi *et al.*, 1998; Jiménez-Macedo *et al.*, 2005; Tasripoo *et al.*, 2012).

En ovinos se han aplicado EE (1.25 kV/cm por 80 μ seg) en un medio con manitol 3 M, MgSO₄ 0.1 mM, CaCl₂ 0.05 mM y ASB 4 mg/mL (Loi *et al.*, 1998). En bovinos se han aplicado EE como único tratamiento (0.8 kV/cm, 70 μ seg) 30-90 minutos antes de la ICSI, antes y después de la ICSI o sólo después de la ICSI (Hwang *et al.*, 2000), o bien el tratamiento de EE (30 kV/cm por 15 μ seg), más la aplicación de CHX 10 μ g/mL a 38.5 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ por 5 horas (Tasripoo *et al.*, 2012). En cerdas se ha aplicado un EE (1.5 kV/cm X 20 μ seg) (Hwang *et al.*, 2000; Nagashima *et al.*, 2003; Nakai *et al.*, 2006) solo o en combinación con 6-DMAP 2 mM (Tian *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2009) o CHX 10 μ g/mL (Lee *et al.*, 2003), aplicando estos tratamientos inmediatamente después de la ICSI, pero también se han aplicado antes de ésta (Hwang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Nagashima *et al.*, 2003).

2.7.2 Etanol.

El etanol (EtOH) promueve un sólo aumento intracelular de Ca^{2+} , siendo este mayor y de más amplitud que el incremento observado en la fertilización. Estas elevaciones de Ca^{2+} son originadas por el flujo de entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y la movilización de este ion de depósitos intracelulares como es el REL (Loi *et al.*, 1998; Hosseini *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009b; Barbosa *et al.*, 2013). El EtOH también activa a los ovocitos estimulando la formación de IP3 en la membrana plasmática (Kharche y Birade, 2013; Korkmaz *et al.*, 2013).

En ovocitos de ovino se ha aplicado EtOH al 7% por 7 minutos (Loi *et al.*, 1998), o la combinación de este tratamiento con 6-DMAP 1.9 mM por 3 horas (Loi *et al.*, 1998), así como EtOH al 7% por 4 minutos después de haberse aplicado Ionomicina (Io) 5 μM durante 4 minutos (Pereyra-Bonnet *et al.*, 2011). En bovinos se ha investigado la aplicación de EtOH al 7% por 5 min, aplicándose 1, 2 o 4 horas después de la ICSI (Emuta y Oriuchi, 2001; Fujinami *et al.*, 2004; Oikawa *et al.*, 2005; Horiuchi, 2006); se ha aplicado este tratamiento después de tratar a los ovocitos con Io 5 μM por 4 minutos (Bevacqua *et al.*, 2010). En ovocitos de yegua se ha usado EtOH al 1% por 5 minutos o 10 minutos (Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001), o en combinación con Io 10 μM por 10 minutos (Li *et al.*, 2001).

2.7.3 Ionomicina.

La Io es un antibiótico poliéter producido por la bacteria *Streptomyces conglobatus*, altamente específica para el transporte de cationes bivalentes como es

el Ca^{2+} (Sigma, 2006). Induce pequeños aumentos repetitivos transitorios de Ca^{2+} durante varias horas, debido a la movilización de Ca^{2+} de depósitos citoplasmáticos, por lo tanto es menos citotóxico (Kharche y Birade, 2013), aunque también se menciona que es debido al flujo de Ca^{2+} extracelular (Loi *et al.*, 1998; Barbosa *et al.*, 2013). La Io es un inhibidor de la histona cinasa y previene la reacumulación del FPM (Jiménez-Macedo *et al.*, 2005; Shirazi *et al.*, 2009b).

En ovocitos de ovino se ha usado Io sola en una concentración de 5 μM por 4 o 5 minutos (Shirazi *et al.*, 2009b; Catalá *et al.*, 2012), o incubando posteriormente los ovocitos con 6-DMAP 1.9 mM por 3 horas (Pereyra-Bonnet *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009b; Pereyra-Bonnet *et al.*, 2011; Shirazi *et al.*, 2011), siendo similar el tratamiento en ovocitos de cabra (Jiménez-Macedo *et al.*, 2005). Se ha aplicado la misma concentración de Io en ovocitos de bovino, una (Chung *et al.*, 2000; Ock *et al.*, 2003) o dos veces con intervalo de 3 horas (Bevacqua *et al.*, 2010), o en combinación con 6-DMAP 1.9 mM por 3 horas (Li *et al.*, 2004; Oikawa *et al.*, 2005; Lee y Niwa, 2006; Bevacqua *et al.*, 2010). En yeguas se ha usado la Io en concentraciones de 10 μM por 10 minutos (Li *et al.*, 2000).

2.7.4 Ionóforo de calcio.

El ionóforo de calcio (Ica) es un antibiótico poliéter pirrol producido por la bacteria *Streptomyces chartreusensis*, y se liga específicamente a cationes bivalentes, siendo altamente selectivo para el Ca^{2+} , por lo que se usa para aumentar sus niveles intracelulares (Sigma, 2006; Feitoza, 2015). El Ica produce un aumento

único de Ca^{2+} intracelular desde el REL, que ocasiona la activación de varias vías proteolíticas, que conduce a la destrucción de la ciclina B, reducción de la actividad del FPM y la reanudación de la meiosis (Hosseini *et al* 2008), aunque se reporta que también promueve el flujo de Ca^{2+} del medio extracelular (Loi *et al.*, 1998; Barbosa *et al.*, 2013). Se recomienda que se aplique en combinación con 6-DMAP que es un inhibidor de la proteína cinasa, ya que un solo aumento de Ca^{2+} intracelular no impide que se sinteticen de nuevo proteínas incluyendo la ciclina B y se active el FPM (Shirazi *et al.*, 2009b).

La aplicación de Ica se ha reportado en ovocitos de ovino en concentraciones de 10, 25 o 50 μM por 10 minutos (Gómez *et al.*, 1998b), mientras que en ovocitos de cabra se ha usado la concentración de 5 μM por 1 minuto (Keskintepe *et al.*, 1997), siendo diferente la concentración que se usa en ovocitos de bovino que es de 5 a 50 μM por 5 o 10 minutos (Chen y Seidel, 1997; Katayose *et al.*, 1999; Suttner *et al.*, 2000), también se ha aplicado este tratamiento en combinación con CHX 5 μM por 5 horas (Suttner *et al.*, 2000). Los ovocitos de cerda han sido activados con Ica 75 μM por 5 minutos (Lee *et al.*, 2003), solo o en combinación con CHX (Lee *et al.*, 2003).

2.7.5 6-Dimetilaminopurina.

La 6-DMAP inhibe la fosforilación de las proteínas (Barbosa *et al.*, 2013; Kharche y Birade, 2013), previniendo la activación del FPM y FSC (Tian *et al.*, 2006; Shirazi *et al.*, 2009b). Los efectos de la 6-DMAP en la estructura de la cromatina y microtúbulos durante la meiosis son mediados por la inhibición de las proteínas

cinastas y en consecuencia, la fosforilación de proteínas (Korkmaz *et al.*, 2013). La 6-DMAP puede inhibir la extrusión del segundo cuerpo polar, debido a la inhibición de la fosforilación necesaria para la organización del huso en ovocitos en metafase II (Tian *et al.*, 2006; Hosseini *et al.* 2008; Tasripoo *et al.*, 2012), esto produce que el huso de la segunda división meiótica se desintegre y el ovocito entre directamente a una interfase (con un único PN diploide) (Tian *et al.*, 2006). La 6-DMAP es un inhibidor de la cinasa serina-treonina que acelera la formación pronuclear, permitiendo un mayor desarrollo sincronizado de los PNs y promoviendo la mitosis (Jiménez-Macedo *et al.*, 2005; Shirazi *et al.*, 2009b). Se reportan concentraciones de 6-DMAP de 1.9 mM a 2.0 mM durante 3 a 4 horas para tratamientos en ovocitos de vacas (Tasripoo *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2013), y ovejas (Shirazi *et al.*, 2009b). Cuando los ovocitos son activados e inmediatamente incubados con 6-DMAP, la formación de un segundo PN se suprime y casi todos los ovocitos madurados *in vitro* tendrán un solo PN (Loi *et al.*, 1998), por lo tanto los ovocitos activados después de la ICSI deben ser incubados durante 3 horas antes del tratamiento con 6-DMAP para permitir la extrusión del segundo cuerpo polar (Jiménez-Macedo *et al.*, 2006).

2.7.6 Cicloheximida.

La CHX es un inhibidor de la síntesis de proteínas, evitando la síntesis de ciclinas (Shirazi *et al.*, 2009b; Barbosa *et al.*, 2013; Kharche y Birade, 2013). La CHX inhibe la síntesis de un grupo de proteínas altamente lábiles como el FSC, que mantiene alta la actividad del FPM en ovocitos maduros, la CHX induce la activación del ovocito sin ocasionar una elevación transitoria de Ca^{2+} , ya que al inhibirse la

síntesis de nuevas proteínas hay degradación de la ciclina B, y por lo tanto hay inactivación del FPM (Tian *et al.*, 2006; Tasripoo *et al.*, 2012).

En bovinos (Tasripoo *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2013), porcinos (Tian *et al.*, 2006) y equinos (Barbosa *et al.*, 2013) la dosis que se usa de CHX es de 10 µg/mL, aplicándose este tratamiento de 4 a 5 horas después de la activación de los ovocitos, para permitir la extrusión del segundo cuerpo polar.

La desventaja de usar los inhibidores de la proteína cinasa o inhibidores de síntesis de proteína es que estos fármacos no inhiben específicamente la actividad de una cinasa en particular o la síntesis de una proteína específica que controle la progresión del ciclo celular (Barbosa *et al.*, 2013). Inhiben la actividad de varias cinasas o la síntesis de varias proteínas que pueden estar involucradas en otras funciones de la célula, lo que puede tener un efecto perjudicial sobre los eventos celulares posteriores después de la activación de los ovocitos.

2.7.7 Estroncio.

El Estroncio (Sr^{2+}) es un catión divalente que promueve oscilaciones periódicas de Ca^{2+} libre similares a las que se observan en la fertilización (Bevacqua *et al.*, 2010; Kharche y Birade, 2013). El Sr^{2+} libera el Ca^{2+} de almacenes intracelulares, lo que promueve los pulsos de Ca^{2+} (Shirazi *et al.*, 2009b; Barbosa *et al.*, 2013), que son inferiores en frecuencia y amplitud, pero de mayor duración que los observados durante la fertilización (Hosseini *et al.*, 2008). En bovinos se reportan

tratamientos de 10 mM por 30 minutos (Hosseini *et al.*, 2008) o 20 mM por 5 horas (Bevacqua *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2013).

2.7.8 Citocalasina B.

La Citocalasina B (CB), una micotoxina, despolimeriza los microfilamentos corticales, inhibiendo la extrusión del segundo cuerpo polar. Los embriones producidos por ICSI y activados con CB más CHX o CB más DMAP ocasiona la formación de dos PNf, por lo que si se quiere mantener una diploidía normal, la CB no debe usarse para activar ovocitos fertilizados mediante ICSI (Tian *et al.*, 2006).

Pero aún con estos tratamientos el porcentaje de blastocitos obtenidos después de la ICSI y cultivados *in vitro* sigue siendo de alrededor del 20% y pueden ser partenogénéticos, ya que pocos estudios evalúan el desarrollo de PNs, como se observa en el Tabla 3, donde se ven los resultados de ovocitos de ovino sujetos a ICSI y activados químicamente.

Tabla 3.- Resultados de ovocitos de ovino sujetos a ICSI y activados químicamente.

Autor/ año	Semen	Tratamiento ovocitos	Activación	Desarrollo de PNs	Porcentaje División	Mórulas	Blastocitos
Catalá <i>et al.</i> , 2012	DE	Io 5 µM, 4 min.	44-48	38-43	77-79	ND	15-19
Hosseini <i>et al.</i> , 2012.	DE	Io 5 µM, 1 min.	ND	ND	69-76	ND	3-16
Pereyra-Bonnet <i>et al.</i> , 2011.	DE	Ovocitos vitrificados/No vitrificados. Io 5 µM, 4 min, 3 h después 6-DMAP 1.9 mM, 3 h.	ND	ND	74	36	13
		Io 5 µM con 6-DMAP 1.9 mM, 3 min.	ND	ND	94	34	18
		Io 5 µM, 4 min, luego EtOH 7%, 4 min.	ND	ND	90	17	14
Shirazi <i>et al.</i> , 2011.	FR	Io 5 µM con 1% SFB, 5 min, 3 h después 6-DMAP 1.9 mM, 3 h.	ND	ND	78	ND	17
		DTT 2 M, 20 min.	ND	ND	31	ND	ND
		DTT 2 M, 20 min + Io 5 µM, 5 min, 3 h después 6-DMAP 1.9 mM, 3 h.	ND	ND	89	10	ND
Shirazi <i>et al.</i> , 2009b.	FR	Io 5 µM con 3% SFB, 5 min.	88	56	81	ND	18
		Io 5 µM, 5 min, 3 h después 6-DMAP 1.9 mM, 3 h.	79	45	85	ND	23
Pereyra –Bonnet <i>et al.</i> , 2008.	DE	Io 5 µM, 4 min, 3 h después 6-DMAP 1.9 mM, 3 h.	ND	ND	85	28	4
Shin <i>et al.</i> , 2005.	DE	No específica	ND	ND	87	ND	17
Loi <i>et al.</i> , 1998.	DE	EtOH 7%, 7 min.	94	ND	ND	ND	ND
		Io 5 µM, 5 min.	94	ND	ND	ND	ND
		Io 5 µM con 6-DMAP 1.9 mM, 3 h.	89	ND	ND	ND	ND
		EtOH 7%, 7 min, más 6-DMAP 1.9 mM, 3 h.	92	ND	ND	ND	ND
Gómez <i>et al.</i> , 1998b.	FR-DE	Ica 10, 25 o 50 µM, 10 min.	92	ND	ND	ND	ND

DE= Semen descongelado; FR= Semen fresco; Io= Ionomicina; DMAP= Dimetilaminopurina; DTT= Ditiotreitolo; Ica= Ionóforo de Calcio. EtOH= Etanol. SFB= Suero fetal bovino. ND= No determinado.

Existe una alta probabilidad que los blastocitos producidos por ICSI sean partenogénéticos y no se desarrollen (Jiménez-Macedo *et al.*, 2006; Shirazi *et al.*, 2009b). Además, está claro que ninguno de los métodos experimentales actuales de activación de ovocitos es capaz de imitar el patrón de respuesta inducida por el espermatozoide en ovocitos de mamíferos. La mayoría de los protocolos de activación artificial inducen un aumento monotónico en la concentración de Ca^{2+} intracelular en el ovocito y la inhibición de la fosforilación o síntesis de proteínas (Hosseini *et al.*, 2008), siendo los resultados inconsistentes al activar los ovocitos entre las especies estudiadas (Rho *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2000; Galli *et al.* 2003; Tasripoo *et al.*, 2012).

Hay múltiples factores que influyen en la eficiencia de la activación de los ovocitos, entre los que se encuentran los siguientes: concentración de los agentes químicos, duración entre la ICSI y activación, medios de la activación, intensidad del EE, pos-tratamientos con CHX, DMAP o CB.

2.8 Nuevas formas de selección espermática para realizar la ICSI.

En la reproducción asistida, diferentes técnicas se han desarrollado para aislar espermatozoides viables y móviles, así tenemos las técnicas de swim-up (Lucio *et al.*, 2012), centrifugación de gradientes de densidad (Jayaraman *et al.*, 2012), filtración con fibra de vidrio (Sauer *et al.*, 2012) y con sephadex (Hae-Lee *et al.*, 2009). Desafortunadamente, estas técnicas no son fisiológicas por lo cual pueden ser deficientes en la identificación de los espermatozoides más capaces para fertilizar.

Por lo que se están investigando nuevas formas de selección espermática más fisiológicas, para obtener mejores resultados en la técnica de ICSI, y entre éstas se encuentran las siguientes:

a) Ácido hialurónico.

El CO está formado por células y una matriz extracelular de AH polimerizado y proteínas (Parmegiani *et al.*, 2012). El AH participa en la selección del espermatozoide, debido a que solo aquéllos que han extruido sus receptores específicos se unen a éste y son capaces de alcanzar al ovocito y fertilizarlo. El AH se utiliza *in vitro* para seleccionar fisiológicamente a espermatozoides, ya que se ha demostrado que los espermatozoides que se unen a él son aquéllos que han completado la remodelación de su membrana plasmática, maduración nuclear y pérdida citoplásmica. En la actualidad existen dos sistemas de selección de espermatozoides por medio de la unión al AH: a) Placas de cultivo de plástico, las cuales contienen micropuntos de AH unidos a un gel en la parte inferior de la placa (PICSI® Sperm Selection Device, Mid Atlantic Diagnostic-Origio, Måløv, Dinamarca). b) Medio viscoso que contiene AH (Sperm Slow™, Medicult-Origio) (Parmegiani *et al.*, 2012). Se ha reportado que los espermatozoides que son capaces de unirse al AH, tienen mejor morfología y menor daño en el ADN. La habilidad del espermatozoide para unirse a éste está basada principalmente en la actividad enzimática de la hialuronidasa que está en la superficie de los espermatozoides móviles, por lo que más del 85% son capaces de unirse al AH (De-Yi, 2011).

b) Uso de la zona pelúcida.

La ZP junto con las células de la granulosa del CO tiene que ser penetrada por los espermatozoides antes que se fusionen con el oolema (Parmegiani *et al.*, 2012). Estudios en humanos demostraron que los espermatozoides con morfología normal se unen a ella, y que más del 92% de los que se unieron presentaron cromatina de apariencia normal (De-Yi, 2011). En un estudio en el que se compararon los resultados obtenidos mediante una ICSI convencional y otra, en donde los espermatozoides inyectados previamente se habían unido a la ZP, se observó un incremento en el porcentaje de embriones de alta calidad cuando espermatozoides que se unieron a la ZP fueron inyectados (70% vs. 83.3%, respectivamente) (Paes *et al.*, 2009). Reportándose además, un mayor porcentaje de implantación cuando la ICSI se realizó con espermatozoides que se habían unido a la ZP, en comparación con el método convencional (29% vs 17%, respectivamente) (Liu *et al.*, 2011). A partir de este trabajo, y de varias investigaciones más, (De-Yi, 2011; Henkel, 2011; Parmegiani *et al.*, 2012), puede concluirse que a la ZP se unen espermatozoides funcionalmente normales y de una calidad superior a los de la población general de la muestra.

c) La inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI).

En una ICSI convencional, el aumento óptico para seleccionar a los espermatozoides es de 400X, y se ha demostrado que tiene poco valor predictivo,

por lo que se ha desarrollado un método sin tinción en tiempo real y con alta magnificación de evaluación de los espermatozoides (MSOME: espermatozoides móviles, examen morfológico de organelos). Para realizar lo anterior se utiliza un microscopio invertido, equipado con una alta potencia óptica de Nomarski para mejorar la imagen y lograr un aumento de hasta 6300X (Parmegiani *et al.*, 2012). Mediante la MSOME el estado morfológico del acrosoma, la lámina post-acrosomal, el cuello, las mitocondrias, el flagelo y la forma del núcleo espermático son examinados, así como la presencia y tamaño de vacuolas, que indican un empaquetamiento anormal de la cromatina. La combinación de MSOME e ICSI ha sido llamado inyección intracitoplasmática de espermatozoide seleccionado morfológicamente (IMSI) (Henkel, 2011). La desventaja de este método es el tiempo que se requiere para realizar esta técnica (60-120 min), así como el alto costo del equipo (Henkel, 2011; Parmegiani *et al.*, 2012).

d) Birrefringencia de la cabeza del espermatozoide.

Una nueva herramienta para la selección de los espermatozoides para ICSI es la aplicación de la microscopía de polarización. Este método se basa en la característica de birrefringencia de los espermatozoides. En el núcleo de los espermatozoides maduros, hay una alta birrefringencia intrínseca asociada con filamentos de nucleoproteínas que están orientados transversal y longitudinalmente. La birrefringencia localizada en la región post-acrosomal indica que ya se ha producido la RA, la ICSI con espermatozoides con RA, parece favorecer el desarrollo de embriones viable (Parmegiani *et al.*, 2012).

III. JUSTIFICACIÓN.

En ovinos, la ICSI es de gran valor en la investigación para estudiar aspectos fundamentales en investigación básica, obtener animales con características genéticas deseadas y producir animales transgénicos.

En ovinos se ha demostrado que los embriones obtenidos mediante ICSI son potencialmente viables, pero tienen una baja capacidad para desarrollarse *in vitro* en comparación con los embriones producidos por FIV, reportándose un mayor porcentaje de gestación cuando se transfieren embriones producidos por FIV que los obtenidos por ICSI.

Se considera que lo anterior es debido principalmente a la falla en la formación del PNm y a la falta de activación del ovocito, por lo que se han aplicado diversos tratamientos, tanto a los espermatozoides como a los ovocitos, pero aun así, el porcentaje de blastocitos desarrollados *in vitro*, sigue siendo bajo.

Al activar los ovocitos, los resultados son inconsistentes con una alta probabilidad de que los ovocitos sujetos a la ICSI y activados artificialmente produzcan embriones partenogénéticos, de ahí la importancia de evaluar el desarrollo de los PNs cuando se activan los ovocitos después de la ICSI.

Actualmente se están utilizando otros parámetros fisiológicos para seleccionar a los espermatozoides que se usan en la ICSI, ya que en la técnica convencional se selecciona al espermatozoide basándose únicamente en su movilidad y morfología, sin conocer si éste es competente para inyectarlo en el ovocito.

La técnica de selección espermática con ZP muestra varias ventajas, ya que no es invasiva, es segura, altamente selectiva, de fácil realización y económica, por lo que se está investigando y usando ampliamente en la reproducción humana; sin embargo en el ovino existe poca información.

Debido a lo anterior es necesario usar nuevas técnicas para seleccionar a los espermatozoides que se van a usar en la ICSI en ovocitos de ovino, como es el empleo de la ZP, siendo importante determinar el porcentaje de fertilización mediante el desarrollo de los PNs.

IV. HIPÓTESIS GENERAL.

La selección de espermatozoides que se unen a la ZP inyectados a ovocitos activados químicamente después de la ICSI, originará un mayor porcentaje de desarrollo de PNs, que los espermatozoides que no se unieron a la ZP e inyectados en ovocitos sin activación química.

V. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el porcentaje de fertilización mediante el desarrollo de PNs en ovocitos de ovino sujetos a ICSI y activados químicamente usando espermatozoides unidos previamente a la ZP.

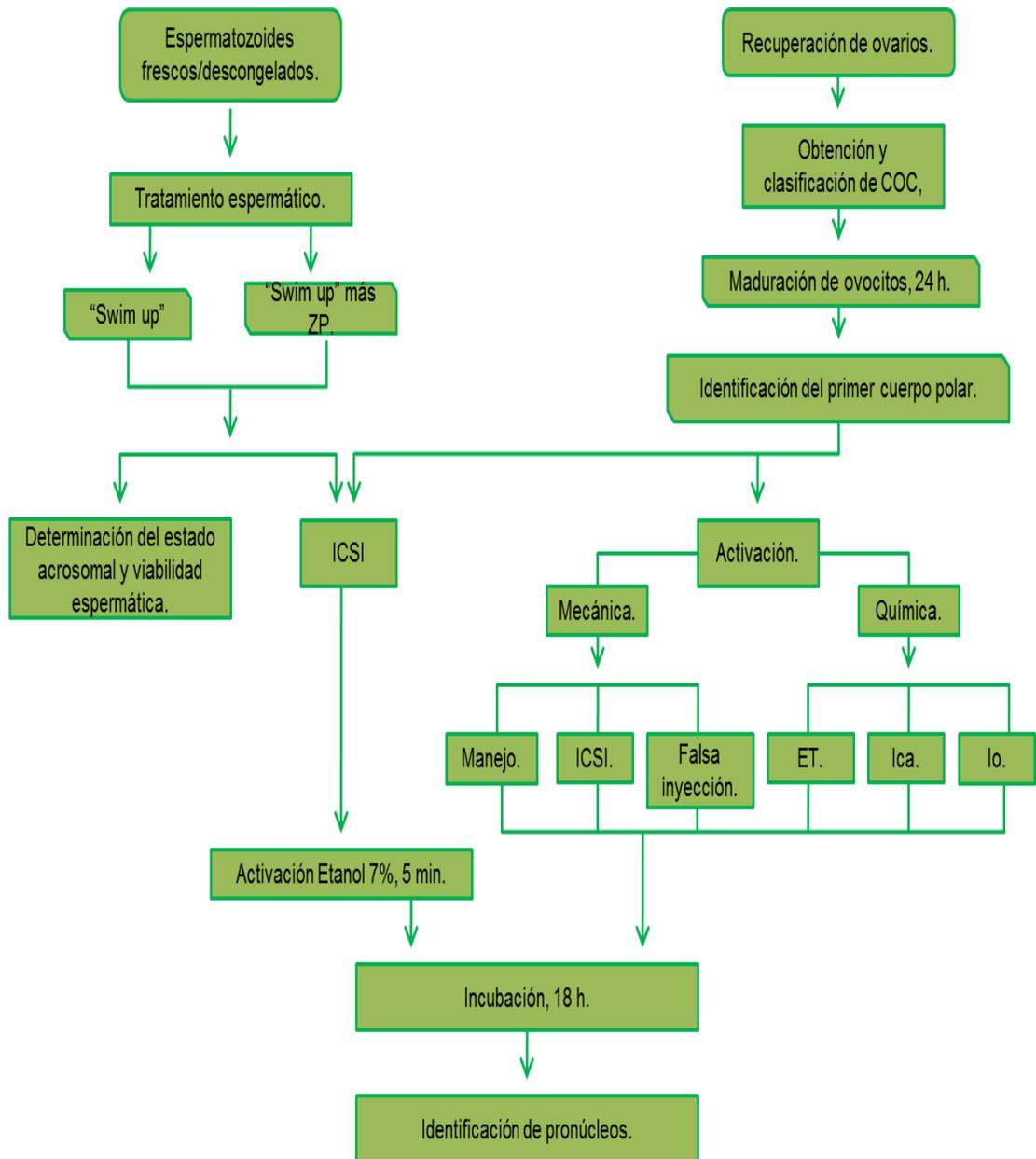
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar el porcentaje de activación en ovocitos de ovino madurados *in vitro*, identificada mediante la formación del PNf, expuestos a: solamente manejo, ICSI, falsa inyección o activación química (EtOH, Ica o Io).

Determinar el estado acrosomal y la viabilidad de espermatozoides en semen fresco y descongelado después de realizar técnica de “swim-up” o “swim-up” más la unión a la ZP.

Determinar el porcentaje de fertilización evaluada mediante la presencia del PNm y PNf en ovocitos activados químicamente con ET después de la ICSI, realizada con espermatozoides frescos o descongelados que fueron seleccionados mediante “swim-up” o “swim-up” más la unión a la ZP.

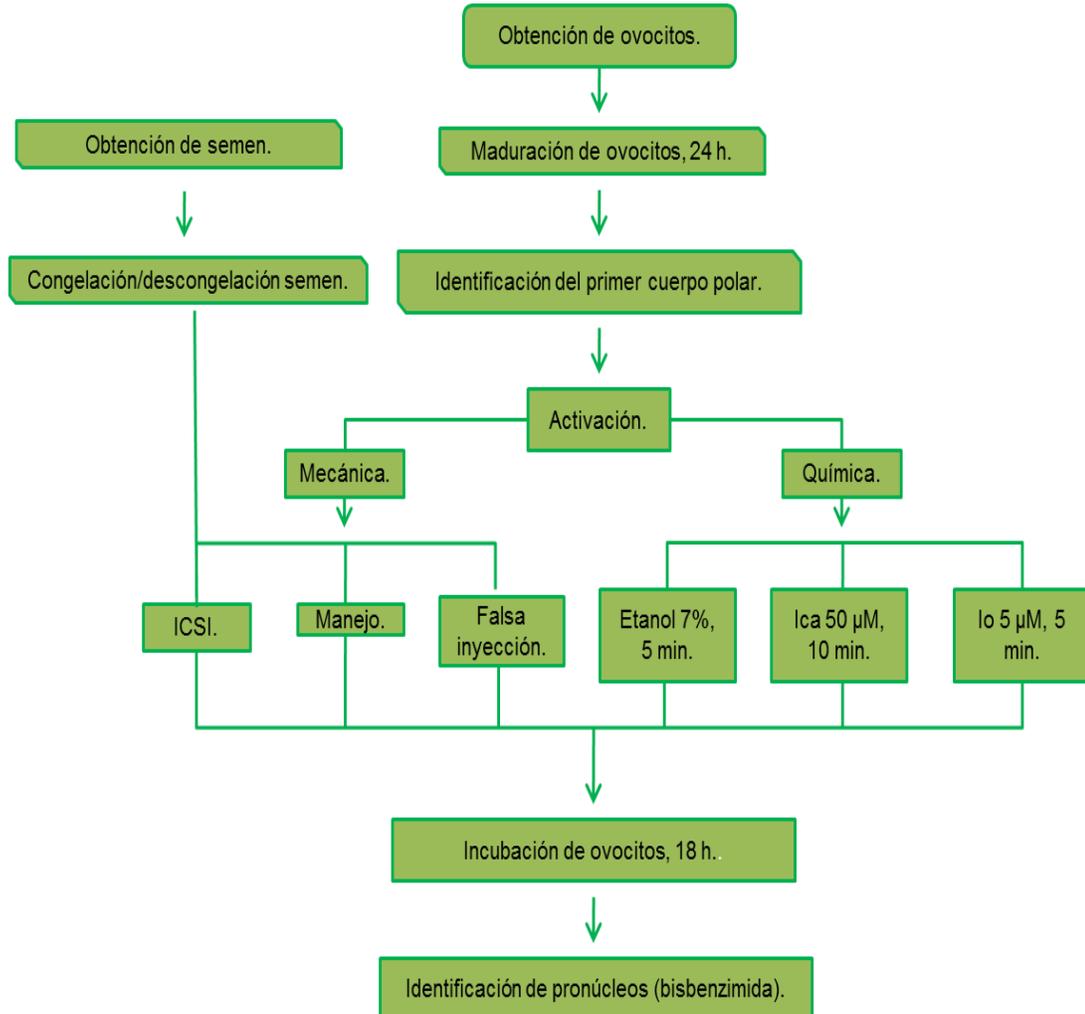
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL.



Para esta investigación se plantearon tres experimentos:

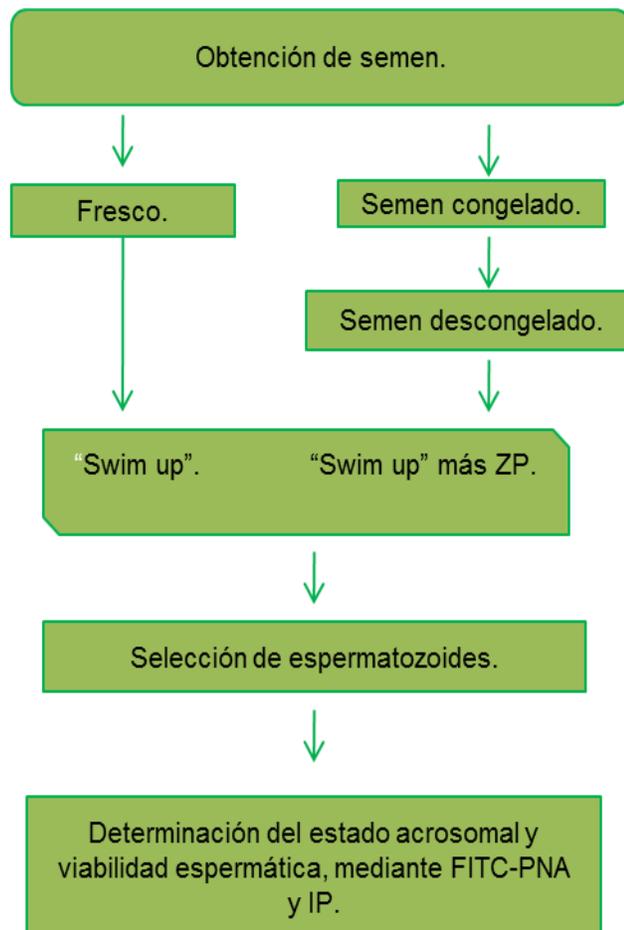
El experimento 1 fue realizado para determinar el porcentaje de activación del ovocito, evaluada mediante la formación del PNF en ovocitos de ovino madurados *in vitro* y activados por vía mecánica (manejo, ICSI o falsa inyección), o química (EtOH, Ica, o I_o).

Experimento 1. Determinar el porcentaje de pronúcleos femeninos en ovocitos de ovino, activados por vía mecánica o química.



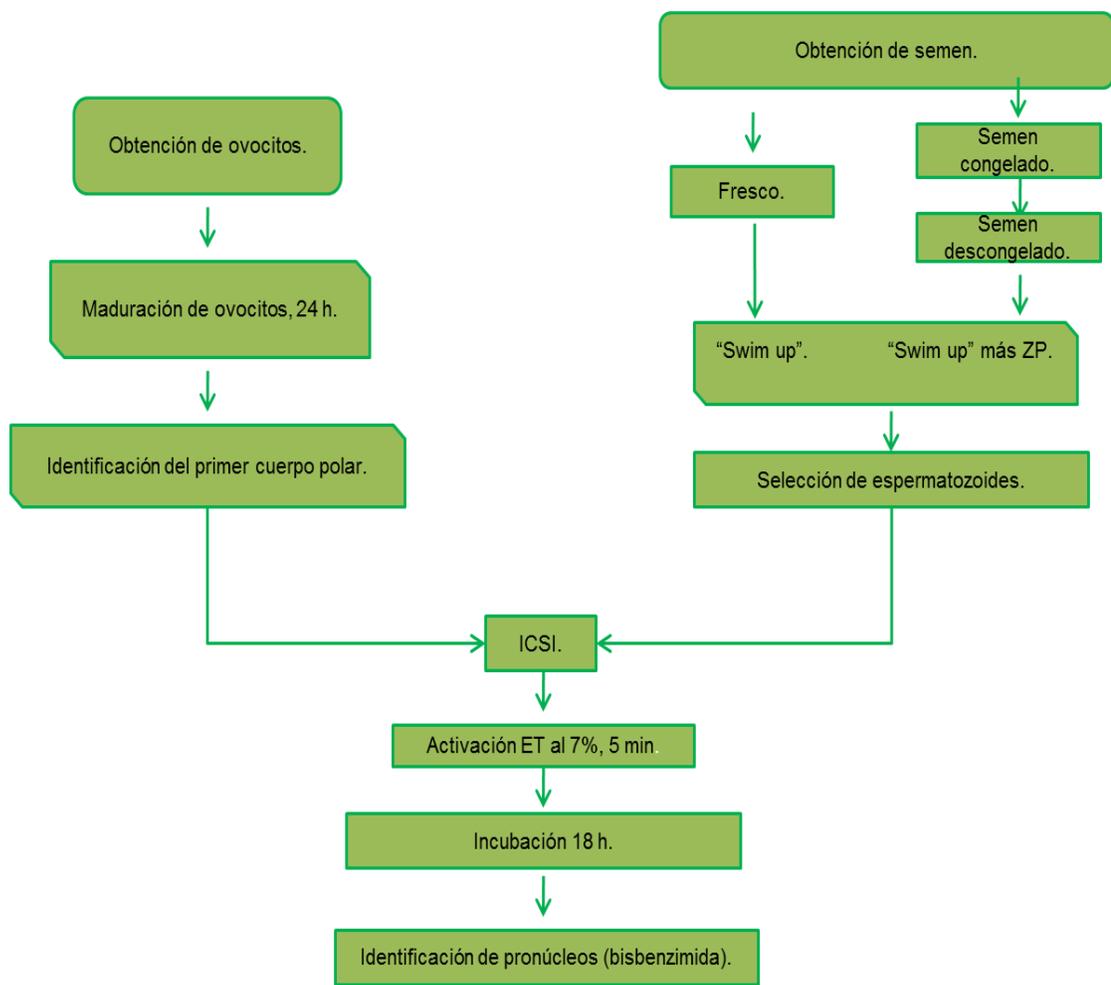
El experimento 2 fue desarrollado para determinar el estado acrosomal y la viabilidad de los espermatozoides de semen fresco o descongelado, recuperados mediante la técnica de “swim-up” o “swim-up más su unión a la ZP, evaluada mediante la tinción de Isotiocianato de fluoresceína con aglutinina de cacahuete (FITC-PNA) e Ioduro de propidio (IP).

Experimento 2. Determinar el estado acrosomal y viabilidad de espermatozoides, recuperados por la técnica de “swim-up” o “swim-up” más zona pelúcida.



El experimento 3 se efectuó para determinar el porcentaje de activación y de fertilización evaluada mediante la observación del PNf y PNm, sin la presencia de la cabeza espermática, después de la ICSI ya sea con espermatozoides de semen fresco o descongelado, seleccionados mediante “swim-up” o “swim-up” más ZP, y una vez realizada la ICSI, los ovocitos activados químicamente con EtOH al 7% por 5 min.

Experimento 3. Determinar el porcentaje de activación y fertilización en ovocitos de ovino, evaluada mediante la observación de pronúcleos.



VIII MATERIALES Y MÉTODOS.

Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Sigma (Sigma Chemical Company, ST Louis, MO EUA), a excepción de los medios de maduración y cultivo embrionario que se prepararon en un laboratorio comercial (In Vitro, México).

Todas las técnicas se llevaron a cabo en estrictas condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (Veco, México), las soluciones se esterilizaron mediante filtración con membranas de 0.22 μm (Millipore, México). Todos los procesos de incubación se realizaron en una incubadora (NUAIRE, EUA) a 38.5 $^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera con 5% de CO_2 , 95% de aire y humedad a saturación. Los procedimientos de maduración *in vitro* (MIV), FIV e ICSI se realizaron en medios cubiertos con aceite mineral (Fisher Scientific, EUA).

Una vez preparados, los medios de cultivo se conservaron a 4 $^{\circ}\text{C}$, durante no más de 3 semanas, siendo suplementados 24 o 48 h antes de su uso e incubados en las condiciones antes mencionadas.

8.1 Colección y maduración de ovocitos *in vitro*.

Se obtuvieron ovarios de ovejas recién sacrificadas en el rastro “El Rojo” ubicado en un población, del Estado de México, colocándolos inmediatamente en una solución salina que contenía NaCl 0.157 M, 10,000 UI/mL de ampicilina, 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina (In Vitro S.A., México) y se transportaron al Laboratorio “Manejo de la Reproducción” de la UAM-X, en menos de 2 h de su recuperación. Los ovarios se lavaron tres veces con la solución antes

mencionada (Figura 1). Posteriormente se realizó la punción de los folículos ováricos de 2 a 8 mm de diámetro, aspirando el fluido folicular (Gómez *et al.*, 1998c), usando una jeringa estéril de 10 mL con una aguja hipodérmica de calibre 18, que contenía 1 mL de medio modificado Tyrode suplementado con lactato de sodio 10 mM, N-2-hidroxietilpiperazina-ácido etanolsulfónico (HEPES) 0.50 mM y alcohol polivinílico (PVA) al 0.1% (TL-HEPES-PVA) a un pH de 7.3 a 7.4, con 200 UI/mL de heparina (PISA, México) (Fernández *et al.*, 2012) (Figura 2).



Figura 1. Ovarios de ovinos, en solución salina con antibióticos.



Figura 2. Punción de folículos ováricos de ovino de 2 a 8 mm de diámetro.

Obtenido el líquido folicular, y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (SMZ745T, Nikon, Japón), se realizó la búsqueda de los complejos ovocito-células del cúmulo (COC), seleccionándose aquellos ovocitos que presentaran un citoplasma uniforme, rodeado de por lo menos 4 capas de células del CO (Figura 3). Los COC seleccionados se lavaron tres veces en gotas de 500 μ L de medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199) con sales de Earle, y bicarbonato de sodio 26.2 mM (In Vitro, México), suplementado con PVA 0.1%, D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM y factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/mL (Ducolomb *et al.*, 2009).

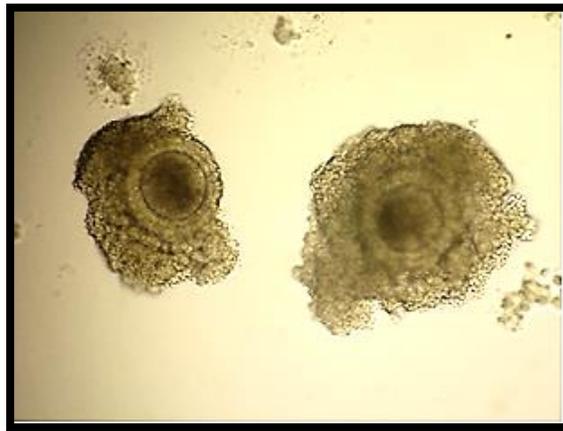


Figura 3.- COC de ovino recién colectados. Microscopio con campo claro (100X).

Para la maduración se usaron cajas estériles de 4 pozos (Thermo-Scientific Nunc, Rochester NY), colocando de 20 a 30 COC en cada pozo con 500 μ L de medio de maduración TCM-199 más la adición de hormona folículo estimulante (FSH) 0.5 μ g/mL, hormona luteinizante (LH) 0.5 μ g/mL, y suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v)

(US 1520 In Vitro, México) para su posterior incubación durante 24 h (Catalá *et al.*, 2012).

8.2 Evaluación de la maduración *in vitro*.

Una vez transcurrido el tiempo de maduración de los COC se eliminaron los CO (Figura 4), colocándolos en una gota de 500 μ L de TCM 199-HEPES (TCM 199-H) con 300 UI de hialuronidasa (Testículo de bovino, Tipo I-S), durante 3 min; posteriormente se lavaron tres veces en medio TCM 199-H (Gómez *et al.*, 1997). Para determinar la maduración, se colocaron de 20 a 30 ovocitos en gotas de 250 μ L de medio TCM 199-H, y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (SMZ745T, Nikon, Japón) se buscó el primer cuerpo polar (CP) (Figura 5). Los ovocitos con primer CP se depositaron en gotas de 100 μ L de medio Tris-Buffer modificado (mTBM) compuesto por NaCl 13.1 mM, KCl 3 mM, CaCl₂·2H₂O 7.5 mM, Tris 20 mM, glucosa 11 mM y piruvato de sodio 5 mM, suplementado con ASB fracción V 0.4% y benzoato de cafeína 2.5 mM, y se incubaron entre 1 y 4 h, mientras se realizaban los tratamientos.

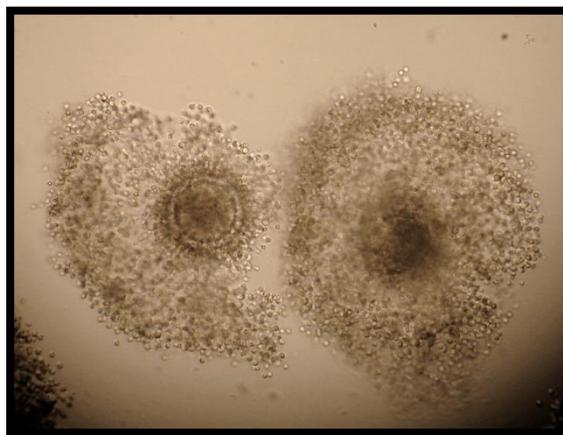


Figura 4.-COC de ovino madurados *in vitro* durante 24 h. Microscopio de campo claro (100X).

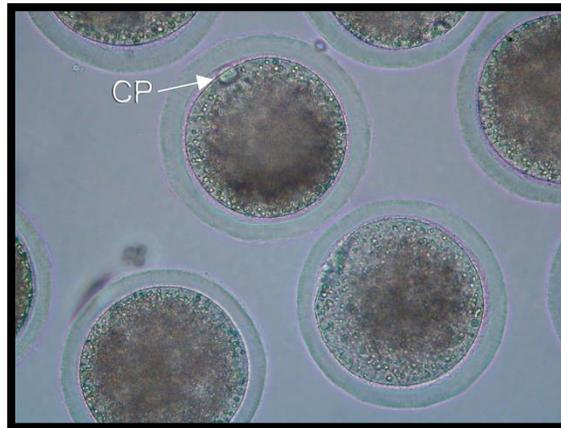


Figura 5.- Ovocitos desnudados de ovino madurados *in vitro*. CP: cuerpo polar. Microscopio de campo claro (200X).

8.3 Activación de los ovocitos.

De los ovocitos madurados *in vitro*, desnudados y con el primer CP se formaron dos grupos: Grupo de activación mecánica con uno de los siguientes tratamientos: 1) Control, solo manejo de los ovocitos, como si fuera a realizarse la ICSI, pero sin inyección. 2) ICSI, que se realizó con semen descongelado. 3) Falsa inyección, que es la inyección del ovocito, pero sin introducir el espermatozoide. Y grupo de activación química, a través de alguno de los siguientes tratamientos: 1) EtOH 7%, 5 min; 2) Ica 50 μ M, 10 min; 3) Io 5 μ M, 5 min. Una vez realizada la activación de los ovocitos, estos se colocaron en 200 μ L de mTBM, incubándose durante 18 h.

8.4 Evaluación de la formación de pronúcleos.

Después de la incubación, los ovocitos fueron teñidos con 10 µg/mL de bisbenzimidida (Hoechst 33258) (1 mg/mL) disuelto en EtOH frío por 15 min y protegidos de la luz. Finalmente, los ovocitos se colocaron sobre un portaobjetos dentro de una microgota de PBS-glicerina (1:9) (Shirazi *et al.*, 2011). Se procedió a evaluar las células, mediante un microscopio de fluorescencia (Eclipse E600, Nikon, Japón) con filtro UV-1A a 365 nm y a 200X aumentos. Se consideraron ovocitos no activados, aquellos que estaban en metafase II, y ovocitos activados cuando presentaban un PNf.

8.5 Obtención y congelación de semen.

La obtención y evaluación de semen se realizó según lo reportado por Jafaroghli *et al.*, (2011), obteniéndose los eyaculados con vagina artificial de un semental adulto con fertilidad probada. Las muestras se transportaron al laboratorio en un termo a 37.5 °C, en un tiempo no superior a 20 min después de la obtención. Las muestras fueron colocadas en un baño de agua a 37.5 °C, evaluándose las siguientes características: volumen, la movilidad progresiva se analizó mediante una gota de cada muestra, que se depositó en un portaobjetos, al que se le colocó un cubreobjetos para su análisis con un objetivo de 10X de un microscopio triocular de campo claro (Carl Zeiss, EUA) con una platina a 37.5 °C, la concentración fue calculada utilizando una cámara de Neubauer, previa dilución de 1:200 en una pipeta

de Thoma, con un objetivo de 40X. La viabilidad y morfología fueron determinadas mediante un frotis de espermatozoides con una tinción de eosina-nigrosina (1:1).

La congelación de los espermatozoides se llevó a cabo según lo descrito por Miclea *et al.*, (2011), usando un diluyente comercial (Triladyl, Minitübe, Alemania), que se diluyó a 1:1:3 de Triladyl, yema de huevo y agua bidestilada, respectivamente. La cantidad de diluyente que se adicionó al tubo que contenía el eyaculado fue para obtener una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente el semen diluido se enfrió lentamente durante 2 h hasta llegar a 5°C , manteniéndose a esta temperatura durante 2 h, para luego envasarlo en pajillas de 0.5 mL, las cuales se expusieron a vapores de nitrógeno líquido por 13 min a una distancia de 6 cm de la superficie, después las pajillas fueron colocadas en bastones y sumergidas en el nitrógeno líquido. El tiempo de almacenamiento fue de dos semanas. Por cada experimento se usaron dos pajillas de semen congelado, descongelándose a 37.5°C por 45 seg (Gómez *et al* 1997).

8.6 Preparación de los espermatozoides.

En el fondo de un tubo de 15 mL se colocaron 100 μL de semen fresco o semen descongelado y se agregaron lentamente sobre las paredes del tubo 2 mL de TCM 199-H suplementado con 3 mg/mL de ASB (TCM-199-H-ASB); para realizar la técnica de “swim-up” el tubo se colocó con una inclinación de 45° y se incubó por 1 h. Después de transcurrido ese tiempo se recuperaron 500 μL de la parte superior de la suspensión, adicionando 3 mL de TCM-199-H-ASB para después centrifugar a 200 x

g por 10 min (Shirazi *et al.*, 2011; Paramio e Izquierdo, 2014), el paquete celular se resuspendió en TCM 199-H hasta dar una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL. De la suspensión anterior se tomaron las muestras para realizar las evaluaciones de los espermatozoides con respecto a su estado acrosomal y su viabilidad una vez realizadas las pruebas de “swim-up” y la unión de los espermatozoides a la ZP, así como para realizar la ICSI.

8.7 Unión de los espermatozoides a la Zona Pelúcida.

Para seleccionar los espermatozoides más aptos para la fertilización se usaron en cada experimento, 4 ovocitos en metafase II, colocándolos en gotas de 400 μ L de medio TCM+H suplementado con 10% de SFB y gentamicina al 1%, adicionando 100 μ L de la suspensión de espermatozoides previamente procesados, e incubándose por 1 h. Después de la incubación los ovocitos fueron transferidos a una gota de 300 μ L de medio TCM+H y lavados por aspiraciones repetidas con una pipeta de vidrio de un diámetro aproximado de 250 μ m para quitar los espermatozoides que no se unieron a la ZP. Los ovocitos con los espermatozoides fuertemente unidos a la ZP fueron depositados en una gota de 20 μ L del mismo medio cubierto con aceite mineral. Todos los espermatozoides unidos a la ZP se removieron por aspiración repetida de los ovocitos a través de una fina pipeta de vidrio de diámetro interno aproximadamente de 140 μ m, los cuales se usaron para llevar a cabo la ICSI (Black *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011).

8.8 Estado acrosomal y viabilidad de los espermatozoides que se procesaron mediante “swim-up” o “swim-up” más su unión a la Zona Pelúcida.

Para determinar el estado funcional de los espermatozoides, se utilizó la doble tinción de FITC-PNA (Sigma, L7381) e IP (Sigma P4170) (Ortgies *et al.*, 2012; Varesi *et al.*, 2013), para lo cual se obtuvieron 100 μ L de cada muestra, adicionándole 5 μ L de FITC-PNA y 5 μ L de IP, dejándose incubar a 38.5 °C, por 5 min. De esta suspensión se tomaron 10 μ L y se añadieron 10 μ L de paraformaldehido al 1.6% para realizar el frotis, que se observó con un microscopio de fluorescencia (Eclipse E600, Nikon, Japón) a un aumento de 1000X. El estado funcional de los espermatozoides se clasificó de acuerdo a los siguientes patrones de tinción: (Figura 6).

1. Espermatozoides vivos con acrosoma intacto: células espermáticas con tinción de FITC-PNA a nivel acrosomal (verde), sin tinción de IP a nivel post-acrosomal.
2. Espermatozoides vivos con RA: células espermáticas sin tinción acrosomal (FITC-PNA) y sin IP.
3. Espermatozoides muertos con acrosoma intacto: células espermáticas con tinción de FITC-PNA a nivel acrosomal (verde), y con tinción nuclear (IP) (rojo).
4. Espermatozoides muertos con RA: células espermáticas sin tinción acrosomal (FITC-PNA) y con tinción nuclear (IP) (rojo).

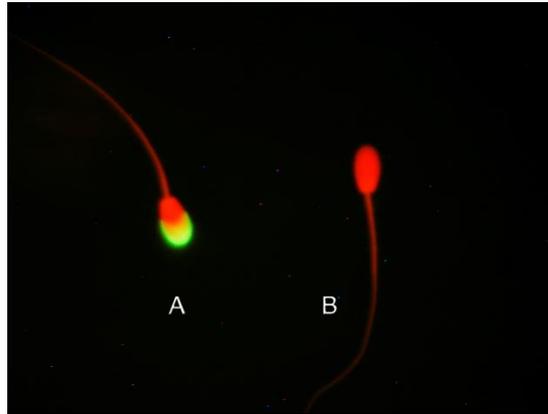


Foto 6. Evaluación con microscopía de fluorescencia de espermatozoides teñidos con FITC-PNA/IP. A) Espermatozoide muerto con acrosoma intacto. B) Espermatozoide muerto con RA. Aumento a 1000X.

8.9 Técnica de la ICSI.

La micromanipulación se llevó a cabo con dos manipuladores de control grueso impulsados por motor (MO-188NE Narishige, Japón) y dos micromanipuladores hidráulicos (MO-188NF, Narishige, Japón).

La elaboración de las micropipetas se realizó con capilares de vidrio de borosilicato (Sutter, Instrument, CA, EUA). Para elaborar las micropipetas de sujeción se utilizaron capilares de un diámetro externo de 1 mm y diámetro interno de 0.58 mm; para las micropipetas de inyección fueron capilares con diámetro externo de 1 mm y diámetro interno de 0.78 mm (Gómez *et al.*, 1997). Las micropipetas de inyección y sujeción fueron hechas usando un "Puller" (Modelo P 97; Sutter Instruments, CA, EUA), una microforja (MF-900; Narishige Co., Japón) y un aparato para realizar el biselado de la micropipeta de inyección (Micropipette Beveler BV-10

Sutter Instruments, CA, EUA). Las micropipetas de sujeción tenían un diámetro externo de 150-200 μm e interno de 30-80 μm , mientras que las de inyección presentaban un diámetro externo de 10-15 μm y un diámetro interno de 8-10 μm , teniendo ambas micropipetas en la punta un ángulo de 30° , para facilitar la manipulación de los gametos (Gómez *et al.*, 1998a).

Para realizar la microinyección se preparó una caja de Petri de 6 cm de diámetro conteniendo una gota de 10 μL de medio TCM-199-H, suplementado con SFB 2% y gentamicina 1% con cinco ovocitos madurados y desnudados, y una gota de 2 μL de la suspensión de espermatozoides con PVP al 5%, incubándose hasta el momento de la inyección (Gómez *et al.*, 1998a, 1998b).

La microinyección se realizó con base en lo reportado por Gómez *et al.*, (1997; 1998a, 1998b), usando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200, Japón) a 200X de aumento, la micropipeta de inyección se llevó dentro de la solución de PVP con espermatozoides y se inmovilizó un espermatozoide (basándose en la morfología y movilidad) para la ICSI. La inmovilización se produjo golpeando el flagelo hacia abajo con la micropipeta de inyección, aspirando el espermatozoide por la cola. Ambas micropipetas se movieron hacia la gota que contenía los ovocitos. Cada ovocito fue inmovilizado mediante una presión negativa a través de la micropipeta de sujeción, con el primer CP en la posición de las 6 o las 12 h del reloj. A continuación, en la posición de las 3 h del reloj, la micropipeta de inyección se insertó en el citoplasma con el espermatozoide en la punta, a fin de facilitar la activación del ovocito y confirmar que se rompió el oolema; se aspiró una pequeña

cantidad de citoplasma con la micropipeta de inyección e inmediatamente se inyectó otra vez el citoplasma junto con el espermatozoide dentro del ovocito (Figura 7). La micropipeta de inyección se retiró y el ovocito se liberó de la micropipeta de sostén. Los ovocitos inyectados se lavaron tres veces en medio mTBM. Un grupo de ovocitos fue incubado durante 18 h, mientras que otro grupo recibió una activación química. De 10 a 20 ovocitos que fueron activados químicamente después de la ICSI se colocaron en gotas de 100 μ L de TCM 199-H con EtOH al 7% durante 5 min (Baker) a temperatura ambiente (Vallejo *et al.*, 2003). Una vez realizada la activación, los ovocitos se lavaron tres veces con medio de TBM, para luego colocar de 10-20 ovocitos en gotas de 200 μ L del mismo medio e incubarlos por 18 h.

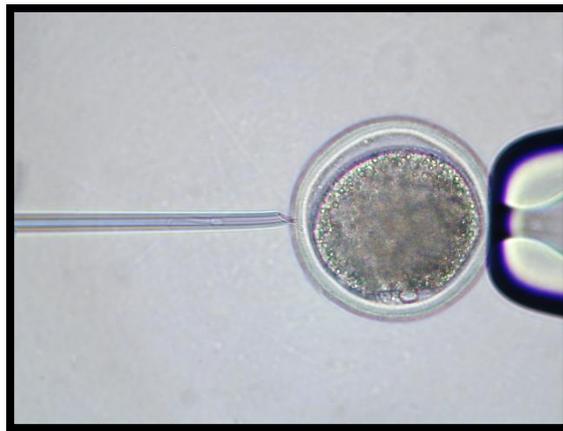


Figura 7. Realización de ICSI en ovocitos de ovino. Microscopio invertido con contraste de fases, aumento 200X.

8.10 Activación y fertilización determinada mediante pronúcleos.

Después de 18 h de la ICSI, los dos grupos de ovocitos fueron teñidos con 10 μ g/mL de bisbenzimidida y evaluados, siguiendo el mismo procedimiento que se describió para determinar la activación de los ovocitos, determinándose los

siguientes estadios (Figura 8) (Gómez *et al.*, 1998c; Shirazi *et al.*, 2011; Catalá *et al.*, 2012):

1. Ovocitos no activados: ovocitos en metafase II y sin descondensación de la cabeza espermática.
2. Ovocitos activados: ovocitos con formación de PNf y sin descondensación de la cabeza espermática.
3. Ovocitos fertilizados: ovocitos con PNf + PNm y ausencia de la cabeza espermática.

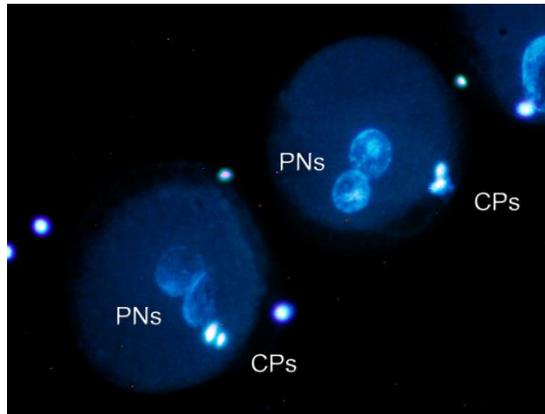


Figura 8. Ovocitos de ovino fertilizados mediante ICSI, usando espermatozoides de semen fresco, unidos a la zona pelúcida. Los ovocitos se activaron con EtOH al 7% 5 min, se tiñeron con bisbenzimidida y se evaluaron con microscopía de fluorescencia. 200X. PNs: pronúcleos. CPs: cuerpos polares.

8.11 Análisis estadístico.

Para comparar los resultados de las variables activación de ovocitos (4 a 20 repeticiones), estado acrosomal y viabilidad de los espermatozoides, frescos vs congelados (11 a 19 repeticiones) y proporción de fertilización (5 a 6 repeticiones), se

usó la prueba de dos proporciones con ajuste de probabilidad de Bonferroni (Wayne y Chad, 2013), considerando diferencias significativas entre los grupos cuando $P < 0.05$.

IX. RESULTADOS.

Experimento 1: Determinación de la activación mecánica y química del ovocito.

Los tres grupos de ovocitos que se activaron mecánicamente (sólo manejo, ICSI y falsa inyección) tuvieron menor proporción de PNs (13, 25 y 32%, respectivamente), con respecto a los ovocitos activados químicamente (EtOH, Ica y Io con 54, 47 y 42%, respectivamente), observándose una diferencia significativa ($P < 0.05$). Se determinó una proporción similar de PNs en los ovocitos activados químicamente ($P > 0.05$), lo que indica que cualquiera de estos agentes tuvo la capacidad de inducir la activación de los ovocitos de ovino. En la activación entre el grupo de ovocitos con ICSI y el de falsa inyección no se encontró una diferencia significativa ($P < 0.05$), lo que demuestra que fue el procedimiento y no el espermatozoide lo que activó al ovocito (Tabla 4).

Con base en los resultados obtenidos con la activación química de los ovocitos, los ovocitos sujetos a ICSI en el experimento 3 para determinar el porcentaje de activación y la formación de los PNs, los ovocitos se activaron con EtOH al 7% por 5 min.

Experimento 2: Determinación del estado acrosomal y viabilidad de los espermatozoides.

La proporción de espermatozoides con RA fue mayor, tanto en semen fresco como en semen descongelado, cuando la selección se realizó con ZP (91% y 86%, respectivamente), en comparación con los obtenidos mediante “swim-up” (59% y 77%, respectivamente), mostrando una diferencia significativa ($P < 0.05$). (Tabla 5).

Estos resultados indican que, si se realiza la ICSI con espermatozoides seleccionados mediante ZP, la probabilidad de inyectar aquellos con RA es muy alta independientemente de la viabilidad y estado del espermatozoide (fresco o descongelado).

Tabla 4.- Diferentes procedimientos de activación en ovocitos de ovinos madurados *in vitro*.

	Activación mecánica			Activación química		
	Solo manejo	ICSI	Falsa inyección	EtOH	Ica	Io
N	13	17	10	20	19	4
n	151	200	78	393	350	78
Ovocitos activados	20	49	25	211	164	33
%±DE	13±1.6 ^a	25±0.5 ^{ab}	32±3.4 ^b	54±1.3 ^c	47±1.3 ^c	42±5.0 ^c

EtOH: 7% de etanol, 5 min. Ica: Ionóforo de calcio 50 μ M, 10 min. Io: Ionomicina 5 μ M, 5 min. N: número de repeticiones. n: número de ovocitos examinados. Ovocitos activados: ovocitos con PN femenino. %±DE: porcentaje \pm desviación estándar. Valores con literales distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Independientemente del estado acrosomal de los espermatozoides, se determinó un mayor porcentaje de vivos en semen fresco seleccionados mediante la técnica de “swim-up” (72%), en comparación a los seleccionados con ZP (63%). Este resultado fue inverso cuando se usó semen descongelado en donde la viabilidad fue mayor cuando se seleccionaron los espermatozoides con la ZP, en comparación con el “swim-up” (79% vs 63%, respectivamente).

Tabla 5.- Estado acrosomal y viabilidad de espermatozoides de ovino provenientes de semen fresco y descongelado, seleccionados por “swim-up” o “swim-up” más ZP de ovocitos de ovino.

		Semen fresco (%)				Semen descongelado (%)				
		EV/R	EM/R	EV/SR	EM/SR		EV/R	EM/R	EV/SR	EM/SR
SU	N= 12 n= 1194	528	179	340	147	N=14 n= 1410	718	373	175	144
$\bar{X}\pm SD$		44 \pm 1.8 ^a	15 \pm 0.8 ^a	28 \pm 8.3 ^a	12 \pm 0.6 ^{a,1}		51 \pm 0.9 ^a	26 \pm 0.9 ^a	12 \pm 0.3 ^a	10 \pm 0.5 ^{a,1}
SU + ZP	N= 11 n= 1100	648	347	40	65	N= 19 n= 1350	922	237	143	48
$\bar{X}\pm SD$		59 \pm 0.9 ^b	32 \pm 1.1 ^b	4 \pm 0.3 ^b	6 \pm 0.2 ^b		68 \pm 1.8 ^b	18 \pm 0.9 ^b	11 \pm 0.5 ^a	4 \pm 0.2 ^b

SU: “swim-up”. ZP: Zona pelúcida. EV/R= espermatozoides vivos con reacción acrosomal. EM/R= espermatozoides muertos con reacción acrosomal. EV/SR: espermatozoides vivos sin reacción acrosomal. EM/SR: espermatozoides muertos sin reacción acrosomal. N: número de repeticiones. n: número de espermatozoides examinados. $\bar{X}\pm SD$: promedio \pm desviación estándar.

Diferentes literales en las columnas indican diferencia significativa (P < 0.05).

¹Entre las variables correspondientes de semen fresco con respecto a semen descongelado se observó una diferencia significativa (P < 0.05), a excepción de la EM/SR seleccionados por “swim-up” (P > 0.05).

Experimento 3: Determinación de la activación y el desarrollo de los pronúcleos.

Se determinó que el porcentaje de ovocitos activados fue mayor (25%-61%) que el porcentaje de fertilizados (presencia de dos PNs sin presencia de la cabeza espermática) (4%-28%), lo que indica que aun cuando los ovocitos están activados no se lleva a cabo la descondensación de la cabeza espermática. Se observó un incremento en el porcentaje de fertilización, entre el grupo de ovocitos activados con ET con relación a los ovocitos activados mecánicamente, existiendo una diferencia significativa ($P < 0.05$), excepto en el caso de los espermatozoides descongelados y unidos a ZP, aunque la tendencia de incremento en ellos fue clara (4% vs 12%, respectivamente). La frecuencia de la fertilización fue mayor cuando se usó semen fresco, independientemente de que los espermatozoides hayan sido seleccionados por medio de "swim-up" o "swim-up" más ZP (28% y 25%, respectivamente), en comparación a la fertilización obtenida con semen descongelado (13% y 12%, respectivamente), observándose una diferencia significativa ($P < 0.05$) (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la activación del ovocito, tipo de semen y técnica de selección espermática sobre el porcentaje de fertilización realizada mediante ICSI.

Tipo de semen.	Semen descongelado	Semen fresco		Semen descongelado	
Tratamiento a los ovocitos.	Activación mecánica	Activación química con EtOH al 7%			
Tratamiento espermático.	“Swim-up”	“Swim-up”	“Swim-up” más zona pelúcida	“Swim-up”	“Swim-up” más zona pelúcida
N	17	5	6	5	5
n	200	123	73	70	51
No. de ovocitos activados.	49	75	36	40	31
%± DE	25±2.7	61±1.3	49±1.6	57±3.2	61±6.3
No. de ovocitos fertilizados.	8	35	18	9	6
%± DE	4±0.2	28±1.7*	25±1.7*	13±1.2* [▲]	12±0.9 [▲]

N: número de repeticiones. n: número de ovocitos examinados. %±SD: porcentaje ± desviación estándar. Ovocitos activados: formación de PN femenino y cabeza espermática no descondensada. Ovocito fertilizado: PN femenino y PN masculino sin espermatozoide.

* Indica diferencia significativa con respecto a los ovocitos activados mecánicamente ($P<0.05$).

[▲] Indica diferencia significativa con respecto a semen fresco ($P<0.05$).

X. DISCUSIÓN.

La activación química de los ovocitos es un tema de actualidad, debido a su aplicación en diversos campos de la investigación como la ICSI, la clonación de células somáticas y la clonación por transferencia nuclear, sin embargo no se ha desarrollado un método general de activación para todas las especies, porque el proceso es altamente específico para cada una de éstas (Kharche y Birade, 2013).

Debido a los bajos porcentajes de activación del ovocito, formación de PNs y descondesación espermática después de la ICSI en ovinos, se considera esencial investigar acerca del mejor procedimiento para lograr la activación química. La activación implica el aumento de Ca^{2+} citosólico libre, que causa la degradación del FPM, el cual es esencial para la reanudación de la segunda división meiótica y la formación de ambos PNs (Tasripoo *et al.*, 2012; Kharche y Birade, 2013). Entre los activadores químicos más usados se encuentra el EtOH, que activa a los ovocitos mediante la formación de IP3 en la membrana plasmática y la unión a sus receptores en la membrana del REL para la liberación de Ca^{2+} , así como la afluencia de Ca^{2+} extracelular. Otros activadores químicos que se usan son el Ica y la Io, que inducen la liberación de Ca^{2+} intracelular, ocasionado por la activación de varias vías proteolíticas dependientes de Ca^{2+} , que conduce a la destrucción de la ciclina B, reduciendo la actividad del FPM (Hosseini *et al* 2008; Shirazi *et al.*, 2009a; Kharche y Birade, 2013).

En el experimento 1 de este estudio, al evaluar las activaciones mecánicas y químicas del ovocito, se demostró que la activación química por EtOH, Ica, o Io,

induce una mayor formación del PNf que la producida por: el manejo, ICSI o falsa inyección. El porcentaje de activación con EtOH fue de 54%, que es lo a similar a lo reportado por Shirazi *et al.*, (2009a) quienes al estudiar el efecto del tiempo de maduración de los ovocitos de ovino sobre el desarrollo partenogenético reportaron un 50% de división embrionaria en ovocitos madurados por 22 horas, que aumentó a 74% cuando la maduración fue de 27 horas, posiblemente debido a una disminución de la actividad del FPM, o a una mayor maduración citoplasmática.

En otras especies domésticas el tratamiento de los ovocitos con EtOH produjo un menor porcentaje de activación. Wang *et al.*, (2008) al trabajar con ovocitos de vacas reportaron 42% de formación de PNs, mientras que Yi y Park (2005), tratando ovocitos de cerda con EtOH a diferentes tiempos (5, 8 y 10 min) observaron un aumento de activación (24, 29 y 34% respectivamente).

Lo anterior indica que el EtOH por sí mismo es un buen inductor de la activación, aunque se ha tratado de asociar con otras moléculas involucradas en el reinicio de la meiosis como 6-DMAP y CHX (Grazul-Bilska, *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009a): sin embargo se ha cuestionado el uso de moléculas inhibitoras de la formación del FPM, ya que afectan a otras ciclinas que pueden alterar otras fases del ciclo celular (Abdalla *et al.*, 2009).

Se ha reportado un incremento en la división embrionaria cuando los ovocitos se activan químicamente, pero también se menciona que ésto conduce a una disminución en su calidad (Shirazi *et al.*, 2009a), ya que los blastocitos

partenogénéticos obtenidos por activación química presentan un menor número de células y un aumento en la apoptosis, indicando que son de menor calidad que los embriones obtenidos mediante FIV (Wang *et al.*, 2008).

En el presente estudio el tratamiento con Ica indujo la activación del 47% en los ovocitos; en la literatura no hay datos con este tratamiento en esta especie, pero este valor es superior a lo determinado en ovocitos de vaca activados con el mismo fármaco (22% de formación de PNs) (Wang *et al.*, 2008).

Con la Io, se obtuvo 42% de formación PNs, que es similar a lo reportado por Shirazi *et al.*, (2009a), quienes evaluando la activación de ovocitos en ovinos por medio de división embrionaria obtuvieron 47% de activación cuando los ovocitos se maduraron por 22 h, este porcentaje se incrementó cuando los ovocitos se maduraron por 27 horas (75%).

En el presente estudio, la eficiencia de la activación de los ovocitos, determinada por la presencia de los PNs cuando los ovocitos fueron sujetos a ICSI sin tratamiento químico, fue del 25%, este valor es inferior, pero cercano a lo encontrado por Gómez *et al.*, (1998a) con 31% determinado mediante la división embrionaria, y 38% por la observación de la anafase y telofase II y formación de los PNs respectivamente. El incremento reportado en estos estudios puede deberse a que en el primer caso pueden no haberse considerado que algunos de los embriones fueran partenogénéticos; y en el segundo porque además de los PNs consideraron los parámetros del progreso de la segunda división meiótica que ocurre después de

la activación del ovocito. En otro estudio, Shirazi *et al.*, (2009b) sólo observaron 5% de desarrollo de PNs.

El efecto de la falsa inyección produjo 32% de formación pronuclear, que es superior a lo reportado por Gómez *et al.*, (1997) con 22% de desarrollo de PNs. En otras investigaciones en las que se evaluó la activación mediante división embrionaria los porcentajes varían de 7 a 63% (Gómez *et al.*, 1998a; Pereyra-Bonnet *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009b; Catalá *et al.*, 2012). Sin embargo en estos últimos estudios no se descarta la posibilidad de que en algunos de ellos el desarrollo haya sido partenogenético.

En el grupo control, en el que únicamente se realizó el manejo, se observó 13% de ovocitos activados, similar a lo encontrado por Catt y Rhodes (1995) con 10% de activación determinada mediante la formación de PNs. Esto puede deberse, entre otras razones, al uso de la hialuronidasa durante la eliminación del CO, ya que existen reportes que indican que esta enzima es capaz de activar a los ovocitos de ratón, vaca y humano en un 60, 18 y 6%, respectivamente (Vallejo *et al.*, 2003).

Las diferencias entre los resultados de los estudios mencionados podrían explicarse por diversos factores que influyen en la sensibilidad de los ovocitos a la activación que pueden explicar las discrepancias entre los resultados obtenidos en este trabajo y los previamente reportados, entre los que se encuentran: diferencias entre las especies (Barbosa *et al.*, 2013), maduración *in vivo* o *in vitro*, presencia o

ausencia del CO (Vallejo *et al.*, 2003; Shirazi *et al.*, 2009a) y tipo de estímulo, mecánico o químico, para la activación de los ovocitos (Vallejo *et al.*, 2003).

Para incrementar la formación de PNs usando la técnica de ICSI, se están usando nuevas formas de selección espermática, una de ellas es inyectar los espermatozoides que se han unido a la ZP de ovocitos (Parmegiani *et al.*, 2012).

En el experimento 2 de este estudio en el que se evaluó el estado acrosomal y la viabilidad de los espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides de semen fresco y descongelado con RA después de unirse a la ZP fue de 90 y 86%, respectivamente, que es similar a lo reportado con semen fresco de caprino con 73% (Somnath *et al.*, 2000) y cerdos 80% (Fazeli *et al.*, 1995). En humanos se reporta un 84% de RA en los espermatozoides de semen fresco que se unieron a ZP, durante 1 hora de incubación, este porcentaje disminuyó cuando los espermatozoides se trataron con ZP solubilizada (32%) (Franken *et al.*, 2000) y 49% (Schuffner *et al.*, 2002). La variación de los reportes puede ser debida a que en algunas investigaciones se usa ZP intacta (Franken *et al.*, 2000), en otras solubilizada (Schuffner *et al.*, 2002; Guzmán *et al.*, 2007) o la mitad de la ZP (Fazeli *et al.*, 1995). Posiblemente se obtiene un mayor porcentaje de RA cuando se usa ZP intacta, debido a la configuración y mayor número de las proteínas que se encuentran en la matriz de la ZP intacta, en comparación con la ZP solubilizada a 68 °C por 1 horas (Franken *et al.*, 2000) o 72 °C por 30 minutos (Somnath *et al.*, 2000). Otro factor que afecta la inducción de la RA por medio de la ZP puede ser el estado de maduración del ovocito, ya que ovocitos inmaduros de cerda en contacto con semen fresco de la

misma especie durante 10 minutos indujo 34% de RA, pero al colocarlos con ovocitos en MII se incrementó a 42%; la misma tendencia se observó cuando se usó semen descongelado en ovocitos inmaduros y maduros (37 y 45% respectivamente) (Rath *et al.*, 2005). Esto indica que la condición fisiológica y el estado de maduración del ovocito se reflejan en la calidad de la ZP, por lo que los ovocitos inmaduros podrían no tener los receptores adecuados para el reconocimiento de los espermatozoides.

En nuestro conocimiento, el presente estudio, es el primero en el que se evalúa el estado acrosomal y la viabilidad de espermatozoides de semen fresco y descongelado de ovino después de estar en contacto con la ZP de ovocitos de la misma especie madurados *in vitro*.

En el experimento 3, en el que se evaluó el porcentaje de activación y fertilización, se determinó un incremento significativo en el porcentaje de ovocitos activados (presencia de PNf y espermatozoide) y fertilizados (PNf y PNm sin presencia de espermatozoide) cuando se estimularon con EtOH después de la ICSI; esto concuerda con lo reportado por Shirazi *et al.*, (2009b) quienes indican que la estimulación mecánica (ICSI o falsa inyección) es insuficiente para activar los ovocitos de ovino y formar los PNs, por lo que la activación química es esencial en el proceso de ICSI en ovejas.

El tratar a los ovocitos con EtOH después de la ICSI, ocasionó que se incrementara el porcentaje de activación en un rango de 49 a 61%, y de fertilización

de 12 a 28% en comparación con los ovocitos activados solo mecánicamente (25 y 4%, respectivamente).

Con semen fresco el porcentaje de ovocitos fertilizados fue solo el 50% de los ovocitos activados, y con semen descongelado no fue superior al 25%; por lo que se puede suponer que en caso de haber evaluado el desarrollo embrionario de estos ovocitos, más del 50% podrían ser partenogénicos. Resultados similares han sido reportados en ovocitos de vacas tratados con EtOH después de inyectar la cabeza de espermatozoides descongelados, con 52% de activación, pero solo 27% de fertilización, por lo que el 56% podrían ser embriones partenogénicos (Li *et al.*, 1999). Lo anterior se confirmó posteriormente en otro estudio en bovinos donde se menciona que una desventaja de la activación exógena es incrementar la posibilidad de desarrollo partenogénico (Abdalla *et al.*, 2009). En ovocitos de yeguas, con el mismo tratamiento, se reportan porcentajes de 56, 16 y 40% de activación, fertilización y partenogénesis, respectivamente, lo que indica que aun cuando los ovocitos son activados, no necesariamente se lleva a cabo la descondensación nuclear de los espermatozoides en el citoplasma, pero en el ovocito activado artificialmente después de la ICSI se puede inducir el desarrollo partenogénico (Li *et al.*, 2000), de ahí la importancia de evaluar la fertilización a través de la presencia de PNs en ovocitos fertilizados mediante ICSI y activados químicamente.

En el presente estudio, no se observó un incremento de la fertilización cuando se inyectaron espermatozoides que previamente se habían unido a la ZP y presentaban una RA superior al 85%, lo anterior concuerda con lo reportado por

Gómez *et al.*, (1997), quienes no observaron un aumento en la fertilización al realizar la ICSI con espermatozoides procedentes de muestras con 86% de RA, inducida con lisofosfatidilcolina y la obtenida con espermatozoides sin tratamiento (22 y 33% respectivamente), por lo que determinaron que no hay una correlación entre el porcentaje de espermatozoides con RA y los ovocitos fertilizados por medio de la ICSI. Estos resultados sugieren que no es necesario inducir la RA antes de la ICSI en ovocitos de ovino para obtener la formación de los PNs. En humanos, Black *et al.*, (2010) tampoco observaron una diferencia significativa en la fertilización entre la ICSI realizada con espermatozoides unidos a la ZP y la ICSI sin selección por unión a la ZP, sin embargo se obtuvieron embriones de mejor calidad que produjeron un mayor número de gestaciones.

En el presente estudio se observó una diferencia significativa en la tasa de fertilización entre los ovocitos fertilizados con semen fresco seleccionado por “swim-up” (28%) o swim-up más la unión a la ZP (25%) en comparación con el semen descongelado (13 y 12% respectivamente). Lo anterior concuerda con lo reportado por Gómez *et al* (1997), ya que el porcentaje de fertilización fue mayor después de la ICSI, cuando ésta se realizó con espermatozoides de ovino de semen fresco en comparación con espermatozoides de semen descongelado. Estos resultados pueden ser debidos al daño que ocurre en la membrana acrosomal durante el proceso de congelación-descongelación que predispone al espermatozoide a más cambios membranales u otros efectos deletéreos como puede ser el daño al ADN. En espermatozoides de humanos se ha reportado que el proceso de congelación-descongelación produce estrés oxidante debido a la generación de especies

reactivas de oxígeno y a la alteración del sistema antioxidante del espermatozoide (Gadea *et al.*, 2011), lo que ocasiona la peroxidación de los lípidos de la membrana, alteraciones de las proteínas y fragmentación del ADN (Thomson *et al.*, 2009), que dan como resultado una disminución en la capacidad de fertilización de los espermatozoides.

XI. CONCLUSIONES.

El tratamiento con EtOH, Ica e Io fue semejante para activar los ovocitos de ovino en términos de formación del PNf.

La formación de PNs mediante ICSI se incrementó cuando los ovocitos fueron activados con EtOH.

La selección de espermatozoides por medio de la unión a la ZP para realizar la ICSI, no incrementó el porcentaje de desarrollo de PNs, aún cuando se aumentó la proporción de espermatozoides con RA, sugiriendo que esto último no es esencial para la fertilización de ovocitos de ovino mediante ICSI.

El uso de semen fresco fue más eficiente que el semen descongelado en la capacidad de desarrollo de PNs mediante ICSI en ovocitos de ovino.

El porcentaje de fertilización de ovocitos ovinos mediante ICSI evaluado por la presencia de PNs fue menor que el porcentaje de activación de los ovocitos tratados con EtOH, por lo que se concluye que en este tipo de estudios es importante asegurarse de valorar la eficiencia de la ICSI por medio de la presencia de los PN para diferenciarla de los posibles embriones partenogénicos. Todos estos elementos en su conjunto contribuyen a mejorar la eficiencia de la técnica de ICSI.

Debido a que se logró incrementar la activación de los ovocitos, el problema que continúa para aumentar la eficiencia de la ICSI, es lograr la descondensación de los espermatozoides.

XII. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdalla, H., Shimoda, M., Hirabayashi, M., Hochi, S. 2009. A combined treatment of ionomycin with ethanol improves blastocyst development of bovine oocytes harvested from stored ovaries and micro injected with spermatozoa. *Theriogenology* 72: 453–460.
- Baibakov, B., Gauthier, L., Talbot, P., Rankin, T.L., Dean, J. 2007. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* 134: 933-943.
- Barbosa, F.C., Gasparini, D.L., Rigatto, M.L., Pria, B.I.D., De Lima, N.J.F., Myakawa, T.P., Pereria, G.C.G., Da Cruz, L.A.F. 2013. Artificial activation of bovine and equine oocytes with cycloheximide, roscovitine, strontium, or 6-dimethylaminopurine in low or high calcium concentrations. *Zygote* 22: 387–394.
- Bertolini, M., Bertolini, L.R. 2009. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 56: 184-194.
- Bevacqua, J.R., Pereyra-Bonnet, F., Fernández-Martin, R., Salamone, F.D. 2010. High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. *Theriogenology* 74: 922-931.
- Black, M., Liu, de Y., Bourne, H., Baker, H.W. 2010. Comparison of outcomes of conventional intracytoplasmic sperm injection and intracytoplasmic sperm

-
- injection using sperm bound to the zona pellucida of immature oocytes. *Fertil. Steril.* 93: 672-674.
- Cánovas, S., Coy, P. 2008. Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. *Rev. Invest. Clin.* 50: 403-413.
- Castañeda, M.E.E. 2015. Evaluación del impacto en la alimentación con forraje y concentrado en ovinos y caprinos del nacimiento al destete. Título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
- Catalá, M.G., Izquierdo, D., Rodríguez-Prado, M., Hammami, S., Paramio, M.T. 2012. Effect of oocyte quality on blastocyst development after *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fert. Steril.* 97: 1004-1008.
- Catt, J.W. 1996. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 239-250.
- Catt, S.L., Catt, J.W., Gómez, M.C., Maxwell, W.M., Evans, G. 1996a. Birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet. Rec.* 16: 494-495.
- Catt, J.W., Rhodes, S. 1995. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic animals. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 161-167.

-
- Comizzoli, P., Mermillod, P., Mauget, R. 2000. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod. Nutr. Dev.* 40: 493–504.
- Chen, S.H., Seidel, G.E. 1997. Effects of oocytes activation and treatment of spermatozoa on embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Theriogenology* 48: 1265-1273.
- Cheng, W-M., An, L., Wu, Z-H., Zhu, Y-B., Liu, J-H., Gao, H-M., Li, X-H., Zheng, S-J., Chen, D-B., Tian, J-H. 2009. Effects of disulfide bond reducing agents on sperm chromatin structural integrity and developmental competence of *in vitro* matured oocytes after intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Reproduction* 137: 633-643.
- Choi, Y.H., Love, C.C., Varner, D.D., Hinrichs, K. 2006. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology* 65: 808-819.
- Chung, J.T., Keefer, C.L., Downey, B.R. 2000. Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Theriogenology* 53: 1274-1284.
- Dattena, M., Ptak, G., Loi, P., Cappai, P. 2000. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology* 53: 1511-1519.
- De Jonge, C. 2005. Biological basis for human capacitation. *Hum. Reprod. Update* 11: 205–214.

-
- De-Yi, L. 2011. Could using the zona pellucida bound sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) enhance the outcome of ICSI? *Asian J. Androl.* 13: 197–198.
- Del Río, J.M., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M.E., Moreno, R.D., Vigil, P. 2007. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Rev. Int. Androl.* 5: 368-373.
- Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano-Lozano, M., Betancourt, M. 2009. *In vitro* effect of Malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biol. Toxicol.* 25: 623-633.
- Emuta, C., Oriuchi, T. 2001. Effects of timing of activation and aging of bovine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on cleavage and subsequent embryonic development *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 47: 399-405.
- Fazeli, A.R., Holt, C., Steenweg, W., Bevers, M.M., Holt, W.V., Colenbrander, B. 1995. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. *Theriogenology* 44: 17-27.
- Feitoza, P.R. 2015. Efeitos vasculares induzidos pelo ionóforo de cálcio A23187 em aorta de ratos hipertensos renais. Tesis de Maestría. Universidad de São Paulo. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirao Preto, Brasil.

-
- Fernández, R.F., Ducolomb, Y., Romo, S., Casas, E., Salazar, Z., Betancourt, M. 2012. Viability, maturation and embryo development *in vitro* of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology* 64: 261-266.
- Franken, D.R., Bastiaan, H.S., Oehninger, S.C. 2000. Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: Validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J. Assist. Reprod. Genet.* 17: 156-161.
- Freitas, F.V.J., Melo, M.L. 2010. *In vitro* embryo production in small ruminants. *R. Bras. Zootec.* 39: 409-413.
- Fujinami, N., Hosoi, Y., Kato, H., Matsumoto, K., Saeki, K., Iritani, A. 2004. Activation with ethanol improves embryo development of ICSI-derived oocytes by regulation of kinetics of MPF activity. *J. Reprod. Dev.* 50: 171-178.
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A., Gardon, J.C. 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 62: 40-46.
- Gadella, B.M., Rathi, R., Brouwers, J.F.H.M., Stout, T.A.E., Colenbrander, B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 249-265.

-
- Galli, C., Vassiliev, I., Lagutina, I., Galli, A., Lazzari, G. 2003. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology* 60: 1467-1480.
- García-Roselló, E., García-Mengual, E., Coy, P., Alfonso, J., Silvestre, M.A. 2009. Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reprod. Domest. Anim.* 44: 143-151.
- García-Roselló, E., Matás, C., Cánovas, S., Moreira, P.N., Gadea, J., Coy, P. 2006. Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *J. Androl.* 27: 268-275.
- Gómez, M.C., Catt, J.W., Evans, G., Maxwell, M.C. 1998a. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 49: 1143-1154.
- Gómez, M.C., Catt, J.W., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 1998b. Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 197-205.
- Gómez, M.C., Catt, S.L., Gillan, L., Catt, J.W., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 1998c. Time course of pronuclear formation and fertilisation after insemination *in vitro* and intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured sheep oocytes. *Zygote* 6: 261-270.

-
- Gómez, M.C., Catt, J.W., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 1997. Effect of culture, incubation and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 665-673.
- Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y., Ogawa, K. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet. Rec.* 127: 517-520.
- Goto, K., Kinoshita, A., Nakanishi, Y., Ogawa, K. 1996. Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of *in-vitro* derived spermatids into bovine oocytes. *Hum. Reprod.* 11: 824-829.
- Gou, K.M., Guan, H., Bai, J.H., Cui, X.H., Wu, Z.F., Yan, F.X., An, X.R. 2009. Field evaluation of juvenile *in vitro* embryo transfer (JIVET) in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 112: 316-324.
- Grazul-Bilska, A.T., Panta, D., Luther, J.S., Borowicz, P.P., Navanukraw, C., Caton, J.S., Ward, M.A., Redmer, D.A., Reynolds, L.P. 2006. Pregnancy rates and gravid uterine parameters in single, twin and triplet pregnancies in naturally bred ewes and ewes after transfer of *in vitro* produced embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 92: 268-283.
- Grazul-Bilska, A.T., Borowicz, P.P., Redmer, A.D., Bilski, J.J., Reynolds, P.L. 2008. Creation of parthenogenetic sheep embryos: Preliminary Study. *Sheep Res. Report.* : 15-18.

-
- Guzmán, L., Pérez, S., Valdivieso, M. 2007. Inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón mediante solubilizados de zona pelúcida de alpaca (*Lama pacos* L.) Rev. Perú. Biol. 13: 227-229.
- Hae-Lee, L., Sue-Hee, K., Dong-Beom, J., Yong-Jun, K.A. 2009. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. J. Vet. Sci. 10: 249-255.
- Haigo, K., Yamauchi, Y., Yazama, F., Yanagimachi, R., Horiuchi, T. 2004. Full-term development of hamster embryos produced by injection of round spermatids into oocytes. Biol. Reprod. 71: 194-198.
- Henkel, R. 2011. Sperm preparation: state-of-the art-physiological aspect and application of advanced sperm preparation methods. Asian J. Androl. 14: 260-269.
- Hinrichs, K., Choi, Y.H., Love, L.B., Varner, D.D., Love, C.C., Walckenaer, B.E. 2005. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: Changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. Biol. Reprod. 72: 1142-1150.
- Hollinshead, F.K., Evans, G., Evans, K.M., Catt, S.L., Maxwell, W.M.C., O' Brien, J.K. 2004. Birth of lambs of a pre-determined sex after *in vitro* production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and refrozed-thawed ram spermatozoa. Reproduction 127: 557-568.

-
- Horiuchi, T., Emuta, C., Yamauchi, Y., Oikawa, T., Numabe, T., Yanagimachi, R. 2002. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. *Theriogenology* 57: 1013-1024.
- Horiuchi, T. 2006. Application study of intracytoplasmic sperm injection for golden hamster and cattle production. *J. Reprod. Dev.* 52: 13-21.
- Hosoi, Y., Iritari, A. 1993. Rabbit microfertilisation. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 282-284.
- Hosseini, S.M., Asgari, V., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Piryaeei, A., Najarasi, M., Nasr-Esfahani, M.H. 2012. Potential applications of sheep oocytes as affected by vitrification and *in vitro* aging. *Theriogenology* 77: 1741-1753.
- Hosseini, S.M., Hajian, M., Moulavi, F., Shah-Verdi, A.H., Nasr-Esfahani, M.H. 2008. Optimized combined electrical–chemical parthenogenetic activation for *in vitro* matured bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 108: 122–133.
- Hwang, S., Lee, E., Yoon, B., Lee, J., Choi, D. 2000. Effects of electric stimulation on bovine oocyte activation and embryo development in intracytoplasmic sperm injection procedure. *J. Assist. Reprod. Genet.* 17: 310-314.
- Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., Zamiri, M.J. 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Rumin. Res.* 96: 58-63.

-
- Jayaraman, V., Upadhya, D., Narayan, P.K., Adiga, S.K. 2012. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29: 557-563.
- Jiménez-Macedo, A.R., Anguita, B., Izquierdo, D., Mogas, T., Paramio, M.T. 2006. Embryo development of prepubertal goats oocytes fertilised by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology* 66: 1065-1072.
- Jiménez-Macedo, A.R., Izquierdo, D.E., Anguita, B., Paramio, M.T. 2005. Comparison between intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilisation employing oocytes derived from prepubertal goats. *Theriogenology* 64: 1249-1262.
- Jiménez-Macedo, A.R., Paramio, M.T., Anguita, B., Morato, R., Romaguera, R., Mogas, T., Izquierdo, D. 2007. Effect of ICSI and embryo biopsy on embryo development and apoptosis according to oocyte diameter in prepubertal goats. *Theriogenology* 67: 1399-1408.
- Jo, H.T., Bang, J.I., Kim, S.S., Choi, B.H., Jin, J.I., Kim, H.L., Jung, I.S., Suh, T.K., Ghanem, N., Wang, Z., Kong, I.K. 2014. Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and *in vitro* developmental competence. *Theriogenology* 81: 675-682.

-
- Katayama, M., Koshida, M., Miyake, M. 2002a. Fate of the acrosome in ooplasm in pigs after IVF and ICSI. *Hum. Reprod.* 17: 2657-2664.
- Katayama, M., Miyano, T., Miyake, M., Kato, S. 2002b. Progesterone treatment of boar spermatozoa improves male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection into porcine oocytes. *Zygote* 10: 95-104.
- Katayama, M., Rieke, A., Cantley, T., Murphy, C., Dowell, L., Sutovsky, P., Day, B.N. 2007. Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* culture in a cysteine-supplemented medium. *Theriogenology* 67: 835-847.
- Katayose, H., Yanagida, K., Shinoki, T., Kawahara, T., Horiuchi, T., Sato, A. 1999. Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a Piezo-driven pipette. *Theriogenology* 52: 1215-1224.
- Keefer, L.C. 1989. Fertilization by sperm injection in the rabbit. *Gamete Res.* 22: 59-69.
- Keskintepe, L., Morton, P.C., Smith, S.E., Tucker, M.J., Simplicio, A.A., Brackett, B.G. 1997. Caprine blastocyst formation following intracytoplasmic sperm injection and defined culture. *Zygote* 5: 261-265.
- Kharche, S.D., Birade, H.S. 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for *in vitro* embryo production: A review. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 4: 170-182.

-
- Kim, E., Yamashita, M., Kimura, M., Honda, A., Kashiwabara, S-I., Baba, T. 2008. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 677-682.
- Kimura, Y., Yanagimachi, R. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 52: 709-720.
- Kolbe, T., Holtz, W. 2000. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Anim. Reprod. Sci.* 64: 97-101.
- Korkmaz, O., Küplülü, S., Ağca, Y., Polat, I.M. 2013. Effect of oocyte quality and activation protocols on bovine embryo development following intracytoplasmic sperm injection. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 37: 26-30.
- Kuretake, S., Kimura, Y., Hoshi, K., Yanagimachi, R. 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol. Reprod.* 55: 789-795.
- Lee, J.W., Tian, X.C., Yang, X. 2003. Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 68: 1341-1347.
- Lee, K.B., Niwa, K. 2006. Fertilization and development *in vitro* of bovine oocytes following intracytoplasmic injection of heat-dried sperm heads. *Biol. Reprod.* 74: 146-152.

-
- Lee, K-B., Park, K-E., Kwon, I-K., Tripurani, S.K., Kim, K.J. 2013. Develop to term rat oocytes injected with heat-dried sperm heads. PLoS ONE 8: e78260.
- Lee, Y-J., Kim, B-K., Cui, X.S., Kim, N-H. 2002. Male pronuclear formation and sperm mitochondria in porcine oocytes following intracytoplasmic injection of pig or mouse sperm. Zygote 10: 117-122.
- Li, G-P., Seidel, G.E., Squire, E.L. 2004. Improved cleavage of bovine ICSI ova cultured in heparin-containing medium. Theriogenology 61: 1077-1084.
- Li, X., Hamano, K., Qian, X., Funaguchi, K., Furudate, M., Minato, Y. 1999. Oocytes activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. Zygote 7: 233-237.
- Li, X., Morris, L.H.A., Allen, W.R. 2000. Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. J. Reprod. Fertil. 119: 253-260.
- Li, X., Morris, L.H.A., Allen, W.R. 2001. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Reproduction 121: 925-932.
- Liu, F., Qiu, Y., Zou, Y., Deng, Z-H-E., Yang, H., Liu, de Y. 2011. Use of zona pellucida-bound sperm for intracytoplasmic sperm injection produces higher embryo quality and implantation than conventional intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril. 95: 815-818.

-
- Loi, P., Ledda, S., Fulka, J., Cappai, P., Moor, R.M. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol. Reprod.* 58: 1177-1187.
- López, M.C.A. 2004. Evaluación de la diversidad genética de razas de ovinos en México mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Tampico, México.
- López-Saucedo, J., Paramio-Nieto, M.T., Fierro, R., Piña-Aguilar, R.E. 2012. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 133: 129-138.
- López-Úbeda, R., Matás, C. 2015. An Approach to the factors related to sperm capacitation process. *Andrology* 4:128. doi:10.4172/2167-0250.1000128.
- Lucio, A.C., Resende, M.V., Dernowseck-Meirelles, J.A., Perini, A.P., Oliveira, L.Z., Miguel, M.C.V. 2012. Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64: 525-532.
- Martin, M.J. 2000. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 63: 109-112.

-
- Miclea, V., Zăhan, M., Nagy, S., Miclea, I., Rusu, A., Varo-Ghiuru, F. 2011. Freezing of spermatozoa from Tigaie Rams belonging to the hill ecotype. *Anim. Sci. Biotechnol.* 44: 294-296.
- Molina, C.B.A., Beltrán, T.V.E. 2014. Evaluación de la aplicación de selenio y vitamina E, sobre la fertilidad en ovejas bajo un protocolo de sincronización corto. Tesis Ingeniero en Producción Animal. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Departamento Académico de Zootecnia. La Paz, B.C.S., México.
- Morton, K.M., Catt, S.L., Hollinshead, F.K., Maxwell, W.M.C., Evans, G. 2004. Production of lambs after the transfer of fresh and cryopreserved *in vitro* produced embryos from prepubertal lamb oocytes and unsorted and sex-sorted frozen-thawed spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 39: 454-461.
- Muneto, T., Horiuchi, T. 2011. Full-term development of Hamster embryos produced by injecting freeze-dried spermatozoa into oocytes. *J. Mamm. Ova. Res.* 28: 32-39.
- Nagashima, H., Fujimura, T., Takahagi, Y., Kurome, M., Wako, N., Ochiai, T., Esaki, R., Kano, K., Saito, S., Okabe, M., Murakami, H. 2003. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Theriogenology* 59: 95-106.

-
- Nakai, M., Kashiwazaki, N., Takizawa, A., Maedomari, N., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Shino, M., Kikuchi, K. 2006. Morphologic changes in boar sperm nuclei with reduced disulfide bonds in electrostimulated porcine oocytes. *Reproduction* 131: 603-611.
- Ock, S.A., Bhak, J.S., Balasubramanian, S., Lee, H.J., Choe, S.Y., Rho, G.J. 2003. Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 11: 69-76.
- Oguna, A., Ogonki, N., Inoue, K., Mochida, K. 2003. New microinsemination techniques for laboratory animals. *Theriogenology* 59: 87-94.
- Oikawa, T., Takada, N., Kikuchi, T., Numabe, T., Takenaka, M., Horiuchi, T. 2005. Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. *Anim. Reprod. Sci.* 86: 187-194.
- Ortega, C., Verheyen, G., Raick, D., Camus, M., Devroey, P., Tournaye, H. 2011. Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? *Hum.Reprod. Update* 17: 684-692.
- Ortgies, F., Klewitz, J., Görgens, A., Martinsson, G., Sieme, H. 2012. Effect of procaine, pentoxifylline and trolox on capacitation and hyperactivation of stallion spermatozoa. *Andrologia* 44: 130–138.

-
- Paes, A.F.B., Iaconelli, A., Cássia, S.F.R., Madaschi, C., Semião-Francisco, L., Borges, E. 2009. Outcome of ICSI using zona pellucida-bound spermatozoa and conventionally selected spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online* 19: 802-807.
- Palermo, G., Hubert, J., Devroey, P., Van Steirteghem, A. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340: 17-18.
- Papadopoulos, S., Rizos, D., Duffy, P., Wade, M., Quinn, K., Boland, M.P., Lonergan, P. 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced bovine blastocysts. *Anim. Prod. Sci.* 74: 35-44.
- Paramio, M.T., Izquierdo, D. 2014. Current status of *in vitro* embryo production in sheep and goats. *Reprod. Domest. Anim.* 49:37-38.
- Parmegiani, L., Cognigni, G.E., Filicori, M. 2012. New Advances in Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), *Advances in Embryo Transfer*. Edited by Dr. Bin Wu. InTech. [En línea], Consultado el 15 julio de 2015: <<http://www.intechopen.com/books/advances-in-embryo-transfer/new-advances-in-intracytoplasmic-sperm-injection-icsi>>.
- Partida, P.A.J.A., Braña, V.D., Jiménez, S.H., Rios, R.F.G., Buendía, R.G. Producción carne ovina. Libro Técnico No. 5. Centro Nacional de Investigación

Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Ajuchitlán, Qro., 2013.

Patricio, P., Tucker, M.J., Guelman, V. Atlas de reproducción asistida. Ed. McGraw Hill. México, Distrito Federal. 2003.

Pereyra-Bonnet, F., Fernández-Martín, R., Olivera, R., Jarazo, J., Vichera, G., Gibbons, A., Salamone, D. 2008. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 741-749.

Pereyra-Bonnet, F., Gibbons, A., Cueto, M., Naim, P., Fernández-Martín, F., Salamone, D. 2007. Transgénesis mediada por espermatozoides en ovejas prepúberes. VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. pp. 213.

Pereyra-Bonnet, F., Gibbons, A., Cueto, M., Sipowicz, P., Fernández-Martín, R., Salamone, D. 2011. Efficiency of sperm-mediated gene transfer in the ovine by laparoscopic insemination, *in vitro* fertilization and ICSI. *J. Reprod. Dev.* 57: 188-196.

Perreault, S.D., Naish, S.J., Zirkin, B.R. 1987. The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol. Reprod.* 36: 239-244.

-
- Pope, C.E., Johnston, C.A., McRae, M.A., Keller, G.L. 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 53: 221-236.
- Rahman, A.N.D., Abdullah, R.B., Wan-Khadijah, W.E. 2009. Effect of oocyte source on the developmental competence of *in vitro* matured goat oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection technique. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33: 323-331.
- Rath, D., Töpfer-Peterson, E., Michelmann, H-W., Schwartz, P., Ebeling, S. 2005. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of *in vivo* and *in vitro* produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* 63: 352-362.
- Rho, G.J., Kawarsky, S., Jhonson, W.H., Kochlar, K., Betteridge, K.J. 1998. Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 59: 918-924.
- Sauer, R., Coulam, C.B., Jeyendran, R.S. 2012. Chromatin intact human sperm recovery is higher following glass wool column filtration as compared with density gradient centrifugation. *Andrologia* 44: 248-251.
- Schuffner, A.A., Bastiaan, H.S., Duran, H.E., Lin, Z., Morshedi, M., Franken, D.R., Oehninger, S. 2002. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human

-
- sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive Gi protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol. Hum. Reprod.* 8: 722-728.
- Shimada, A., Kikuchi, K., Noguchi, J., Afama, K., Nakano, M., Kaneko, H. 2000. Protamine dissociation before decondensation of sperm nuclei during *in vitro* fertilization of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.* 120: 247-256.
- Shin, T., Long, C., Foxworth, G., Hanna, C., Menges, S., Bormann, C., Almeida-Porada, G., Porada, C., Glimph, H., Millsap, L., Westhusin, M., Kraemer, D. 2005. A simple modified ICSI technique resulting in high pregnancy rates in merino sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* 73 (Suppl.1): 234.
- Shirazi, A.L., Shams-Esfand, A.N., Ahmadi, E., Jadidi, M., Heidari, B. 2008. Pregnancy rate following transfer of *in vitro* produced lamb derived embryos in two embryonic stages. *Pak. J. Biol. Sci.* 11: 938-941.
- Shirazi, A., Bahiraee, A., Ahmadi, E., Nazari, H., Heidari, B., Borjian, S. 2009a. The effect of the duration of *in vitro* maturation (IVM) on parthenogenetic development of ovine oocytes. *Avicenna J. Medl. Biotech.* 1: 181-191.
- Shirazi, A., Ostad-Hosseini, S., Ahmadi, E., Heidari, B., Shams-Esfand, A.N. 2009b. *In vitro* developmental competence of ICSI-derived activated ovine embryos. *Theriogenology* 71: 342-348.

-
- Shirazi, A., Derakhshan-Horeh, M., Pilvarian, A.A., Nazari, H., Heidari, B. 2011. Effect of pre-treatment of ovine sperm on male pronuclear formation and subsequent embryo development following intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Domest. Anim.* 46: 87-94.
- Sigma. 2006. Bioquímicos, reactivos y kits, para Investigación en Ciencias de la Vida. México.
- Somnath, P.R., Suraj, K., Gandhi, K.K. 2000. Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *Small Rumin. Res.* 37: 279-86.
- Squires, E.L., Wilson, J.M., Kato, H., Blaszczyk, A. 1996. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 45: 306 (Abstract).
- Suttner, R., Zakhartchenko, V., Stojkovic, P., Muller, S., Alberio, R., Medjugorac, I., Brem, G., Wolf, E., Stojkovic, M. 2000. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology* 54: 935-948.
- Taka, M., Iwayama, H., Fukui, Y. 2005. Effect of the well of the well (WOW) system on *in vitro* culture for porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection. *J. Reprod. Dev.* 51: 533-537.

-
- Tasripoo, K., Srisakwattana, K., Nualchuen, W., Sophon, S. 2012. Effects of various activators on bovine embryonic development following intracytoplasmic sperm injection. *Iranian J. Appl. Anim. Sci.* 2: 167-173.
- Tesarik, J., Sousa, M. 1995. Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca^{2+} fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil. Steril.* 64: 770-776.
- Thomson, L., Fleming, S., Aitken, R., De Iullis, G., Zieschang, J.A., Clark, A. 2009. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum. Reprod.* 24: 2061-2070.
- Tian, J-H., Wu, Z-H., Liu, L., Cai, Y., Zeng, S-M., Zhu, S-E., Liu, G-S., Li, Y., Wu, C-X. 2006. Effects of oocyte activation and sperm preparation on the development of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 66: 439-448.
- Tosti, E., Boni, R. 2011. Oocyte Maturation and Fertilization: A Long History for a Short Event. Tosti, E. and Boni R. Eds. Bentham Books. Merck. Italia. pp. 1-175.
- Traldi, A.S. 2009. *In vitro* embryo production in ovine: critical vision of the method and of the field results. *Bras. Zootec.* 38: 301-306.

-
- Ugalde, J.R. 2014. Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 48: 33-34.
- Vallejo, J., Gómez-Piquer, V., Tarín, J.J. 2003. Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos. Rev. Iberoam. Fertil. Reprod. Hum. 20: 177-187.
- Varesi, S., Vernocchi, V., Faustini, M., Luvoni, G.C. 2013. Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. Acta Vet. Scand. 55: 17.
- Velázquez, C.G. 2009. Fisiología de la reproducción humana. Rev. Mex. Med. Reprod. 1: 115-130.
- Visconti, P.E. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. Proc. Natl. Acad. Sci. 106: 667-668.
- Vivas, A.N.J. 2013. Diversidad genética de ovinos criollos colombianos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, Colombia.
- Walmsley, S.E., Buckrell, B.C., Buschbeck, C., Rumph, N., Pollard, J.W. 2004. Rate of abnormalities in lambs from *in vitro* produced embryos transferred on day 2 compared with day 6 postfertilization. Theriogenology 62: 195-206.

-
- Wang, B., Baldassarre, H., Pierson, J., Cote, F., Rao, K.M., Karatzas, C.N. 2003. The *in vitro* and *in vivo* development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa. *Zygote* 11: 219-227.
- Wang, Z-H., Wang, W., Yu, S-D., Xu, Z-X. 2008. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 105: 292-301.
- Wayne, W.D., Chad, L.C. *Biostatistics. A foundation for Analysis in the Health Sciences.* Tenth Edition. Ed. Wiley. USA. 2013.
- Yamauchi, Y., Yanagimachi, R., Horiuchi, T. 2002. Full term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biol. Reprod.* 67: 534-539.
- Yanagimachi, R. 2005. Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals. *Reprod. Biomed.* 10: 247-288.
- Yi, Y.J., Park, C.S. 2005. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. *Anim. Reprod. Sci.* 86: 297-304.
- Yong, H.Y., Hong, J.H., Kang, S.K., Lee, B.C., Lee, E.S., Hwang, W.S. 2005. Sperm movement in the plasma, dithiothreitol pretreatment and sperm freezing are not

required for the development of porcine embryos derived from injection of head membrana-damaged sperm. *Theriogenology* 63: 783-794.

Zhang, A., Xu, B., Sun, X., Lu, X., Niu, Z., Chen, Q., Feng, Y., Xu, C. 2012. The effect of human cumulus cells on the maturation and developmental potential of immature oocytes in ICSI cycles. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29: 313-319.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00091

Matrícula: 207381988

FORMACIÓN DE PRONÚCLEOS
MEDIANTE LA INYECCIÓN
INTRACITOPLASMÁTICA DE
ESPERMATOZOIDES (ICSI)
SELECCIONADOS POR UNIÓN A LA
ZONA PELÚCIDA EN OVOCITOS DE
OVINO ACTIVADOS QUÍMICAMENTE

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 26 del mes de abril del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMIREZ
DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ
DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA
DR. SALVADOR ROMO GARCIA



JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO

ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB
RAMIREZ

VOCAL

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

VOCAL

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

SECRETARIO

DR. SALVADOR ROMO GARCIA