

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**“EL PAPEL DEL GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) EN LA  
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y SU RELACIÓN CON LA  
FERTILIZACIÓN *IN VITRO* EN ESPERMATOZOIDES DE  
CERDO *SUS SCROFA DOMESTICUS*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA DE  
LA  
REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

**BIOL. VICTOR MANUEL MONTESINOS FUENTES**

CODIRECTORAS:

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ †

ASESORA:

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA



Ciudad de México a 13 de mayo de 2019.

Codirectoras

Dra. Edith Arenas Ríos

Profesora Titular “C”

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida S - 234

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Correo electrónico: [editharenas2000@yahoo.com.mx](mailto:editharenas2000@yahoo.com.mx)

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez †

Profesora Titular “C”

Laboratorio de Biología Celular S – 252

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Correo electrónico: [duco@xanum.uam.mx](mailto:duco@xanum.uam.mx)

Asesora

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Profesora Titular “C”

Laboratorio de Andrología S-257

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Correo electrónico: [reyna@xanum.uam.mx](mailto:reyna@xanum.uam.mx)

Jurado de examen

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I.

reyna@xanum.uam.mx

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Departamento de Ciencias de la Salud

bet@xanum.uam.mx

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Departamento de Producción Agrícola y Animal

mvzjoseherrera@yahoo.com.mx

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

Departamento de Biología

ahiezer@xanum.uam.mx

## Jurado de examen

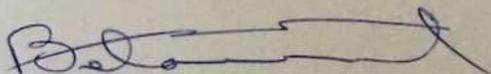
Los integrantes del jurado, designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis titulada "El papel del glutatión reducido (GSH) en la capacitación espermática y su relación con la fertilización in vitro en espermatozoides de cerdo *sus scrofa domesticus*". El examen se realizó el día 13 de mayo de 2019.



---

Presidente

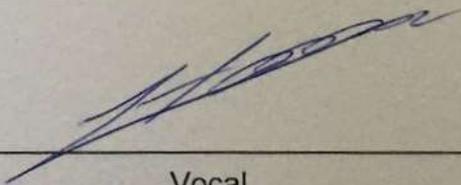
Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana



---

Secretario

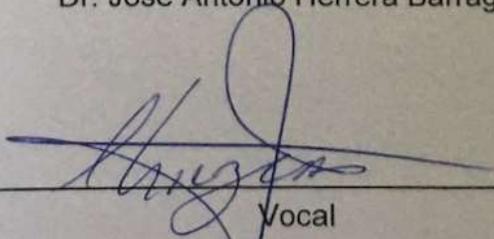
Dr. José Miguel Betancourt Rule



---

Vocal

Dr. José Antonio Herrera Barragán



---

Vocal

Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón

“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 003797”

El alumno Victor Manuel Montesinos Fuentes recibió apoyo del CONACyT, mediante el otorgamiento de una beca económica durante el periodo 01/10/2016 al 30/09/2018, tiempo de duración de los estudios en el posgrado, con número de registro CVU: 782619.

## Dedicatoria

***A mi madre: MGJFD***

Nuevamente insistes en estar presente en todos mis éxitos y te agradezco infinitamente por ello, porque sin ti esto sería imposible. Te amo.

A mi hermana Zaly, jamás admirare a nadie en esta vida como a ti, tu particular forma de pensar me motiva y me ha servido de guía para ser “diferente” a los demás.

A mi hermano Manuel, tu inocente forma ser me han ayudado a comprender que tengo que ser más tolerante y paciente, no todos vemos el mundo con los mismos ojos ni en igualdad de circunstancias, gracias por el gran aprendizaje.

A Amanda Ramírez Figueroa, siempre has estado presente y has sido crucial en esta aventura, tu amor y apoyo han sido determinantes en mi formación profesional y personal, gracias por todo.

A mi padre Victor, tu peculiar forma de quererme me ha forjado carácter y me ha hecho entender que no se nace con un “título”, éste se gana con acciones.

## Agradecimientos

A la Dra. Edith Arenas Ríos, gracias por creer en mí, usted fue a la primera persona que conocí en UAM-I y su recibimiento fue tan increíble que sabía que era la persona y el lugar indicado para trabajar. Su gran apoyo y compromiso fueron cruciales para concluir este trabajo. Fue para mí un gran honor pertenecer a su gran equipo de trabajo, muchas gracias por la oportunidad.

A la Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez †, gracias por su apoyo incondicional, conocerla fue una de las mejores cosas que me llevo de la universidad. Ha implantado en mí un gran sentimiento de responsabilidad y amor por la ciencia. La voy a recordar siempre.

A la Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana, gracias por ser una excelente guía en este proceso, le agradezco por todo el apoyo y la confianza que siempre mostro hacia mí para poder culminar este proyecto.

Al Dr. José Miguel Betancourt Rule, gracias por siempre mostrar gran interés a sus estudiantes, siempre inculcando un valor de respeto y responsabilidad en el laboratorio, le agradezco por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Ahiezer Rodríguez-Tobón, gracias por compartir su conocimiento y por generar en nosotros esa curiosidad por adquirirlo.

Al Dr. José Antonio Herrera Barragán, gracias por su gran apoyo en la revisión de este manuscrito.

A los doctores Mario Agustín Altamirano Lozano y Juan José Rodríguez Mercado del Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental en la UMIZ de la FESZ, UNAM, gracias por su apoyo incondicional después de lo acontecido el 19 de septiembre de 2017.

A Dr. Ernesto Hernández Pichardo del Laboratorio de Producción Agrícola y Animal de la UAM Xochimilco, gracias por brindarnos su apoyo total después del incidente del 19 de septiembre de 2017.

Al Agradezco al MVZ. Trinidad Sierra Guzmán, gracias por el apoyo brindado en las colectas de muestra en el rastro.

Al rastro "Los Arcos" Edo. de México, gracias por la donación de los ovarios.

A mi compañera de maestría y laboratorio Jimena Pérez Domínguez, gracias por brindarme tu amistad y por todo tu apoyo.

A todos los miembros del Laboratorio de Reproducción Animal Asistida, gracias a mis compañeros que han culminado y a los nuevos investigadores que se incorporaron, en especial a Edwin, Blanca, Jessica, Lorena, Ernesto, Landa y Ghio.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología Celular, gracias a todas las personas que conocí al inicio y al final de esta etapa, sobre todo a Mario, Alejandro, Araceli, Jessica, Samanta, Luisa y Carlos.

Gracias Jessy

A mis familiares y amigos por su motivación.

A todos mis compañeros de maestría generación 2016-2018.

A todas las personas que conocí en esta grandiosa universidad.

## Índice

Figuras .....	13
Tablas .....	14
Gráficas .....	15
Abreviaturas .....	16
1. Introducción .....	23
1.1 El espermatozoide y la espermatogénesis .....	23
1.2 Maduración espermática epididimaria .....	25
1.3 Eyaculación .....	26
1.4 Capacitación espermática .....	27
1.5 Reacción acrosomal .....	29
1.6 El ovocito y la ovogénesis .....	31
1.7 Foliculogénesis .....	32
1.8 Fertilización .....	32
1.8.1 Primer contacto: Interacción del espermatozoide con las células del cúmulo .....	33
1.8.2 Reconocimiento del espermatozoide con la zona pelúcida .....	33
1.8.3 Fusión de gametos .....	34
1.8.4 Bloqueo de la polispermia .....	35
1.8.5 Singamia .....	36
1.9 Radicales libres y especies reactivas de oxígeno .....	36
1.10 Sistema antioxidante enzimático y no enzimático .....	37
1.11 Estrés oxidante .....	38
1.12 La participación de las ERO y su relación en la CE. ....	38
1.13 Síntesis del GSH y su papel en la capacitación espermática. ....	39
1.14 Fertilización <i>in vitro</i> y el modelo porcino .....	40
2. Antecedentes .....	41
3. Justificación .....	42
4. Pregunta de investigación .....	43
5. Hipótesis .....	43

6. Objetivos.....	43
6.1 General .....	43
6.2 Específicos.....	43
7. Materiales y métodos.....	44
7.1 Material biológico .....	44
7.2 Análisis seminal .....	45
7.3 Obtención de ovocitos y maduración <i>in vitro</i> (MIV) .....	46
7.4 Capacitación espermática con TALP-HEPES.....	47
7.5 Capacitación espermática para comparar TALP-HEPES y TBMm para FIV	48
7.6 Denudación de ovocitos .....	49
7.7 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) de acuerdo con el protocolo de laboratorio de Biología celular .....	50
7.8 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) para comparar medios: TALP-HEPES y TBMm; y tiempo de co-incubación: 4 h + 2 h vs 2 h + 4 h.....	50
7.9 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) en espermatozoides con y sin centrifugados.....	51
7.10 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) para co-incubación .....	51
7.11 Lavado de ovocitos y transferencia al medio de desarrollo (NCSU-23)....	52
7.12 Tinción, fijado y montaje .....	52
7.13 Evaluación de la fertilización.....	53
8. Análisis estadístico .....	53
9. Resultados y discusión .....	54
9.1 Análisis seminal .....	54
9.2 Capacitación espermática .....	55
9.3 Capacitación espermática con GSH.....	58
9.4 Maduración de ovocitos y Fertilización <i>in vitro</i> . .....	60
9.5 MIV y FIV en otros laboratorios (UAM-I/FESZ) .....	62
9.6 Comparación de la FIV con espermatozoides capacitados a diferentes tiempos de CE y co-incubación (4 h + 2 h vs 2 h + 4 h).....	65
9.7 Comparación de la FIV con espermatozoides capacitados con dos diferentes medios capacitantes (TALP-HEPES vs TBMm).....	67
9.8 Capacitación espermática con TALP-HEPES y TBMm.....	70
9.9 FIV con espermatozoides capacitados y lavados para FIV.....	71

9.10	FIV con espermatozoides capacitados con diferentes concentraciones de GSH	73
9.11	FIV en coincubación de espermatozoides y ovocitos con diferentes concentraciones de GSH .....	76
10.	Conclusiones .....	79
11.	Bibliografía.....	80

## Figuras

Figura 1. El espermatozoide.....	24
Figura 2. Epidídimo y la maduración espermática.....	26
Figura 3. La CE y el cambio en el movimiento flagelar. ....	29
Figura 4. Reacción acrosomal.....	31
Figura 5. Parámetros evaluados durante la CE por tinción de CTC.....	48
Figura 6. Métodos. ....	53
Figura 7. Evaluación de la CE por tinción de CTC. ....	56
Figura 8. Evaluación de la etapa del ovocito en la FIV.....	61
Figura 9. Evaluación de la viabilidad de los ovocitos por tinción de MTT.....	62

## Tablas

Tabla 1. Composición del semen de cerdo. ....	27
Tabla 2. Especies Reactivas de Oxígeno .....	37
Tabla 3. Dilución espermática. ....	45
Tabla 4. Parámetros evaluados en el análisis seminal.....	55
Tabla 5. Capacitación espermática en diferentes días.....	57
Tabla 6. Porcentajes de MIV y FIV.....	62

## Gráficas

Gráfica 1. Evaluación de la CE en diferentes días..	58
Gráfica 2. Espermatozoides capacitados con diferentes concentraciones de GSH (0, 0.5, 1 y 5 mM)..	60
Gráfica 3. MIV en UAM-I y FESZ..	64
Gráfica 4. MIV y FIV en UAM-I y FESZ..	65
Gráfica 5. FIV a diferentes tiempos de CE y coincubación.	67
Gráfica 6. FIV con TALP-HEPES y TBMm.....	69
Gráfica 7. Evaluación de la CE en TALP-HEPES y TBMm.....	70
Gráfica 8. Evaluación del lavado de espermatozoides después de la CE para FIV..	73
Gráfica 9. FIV con espermatozoides capacitados con GSH.....	74
Gráfica 10. FIV en coincubación con GSH.....	77

## Abreviaturas

ACs = Adenilato ciclasa soluble

ATP = Trifosfato de adenosina

AMPC = Monofosfato de adenosina cíclico

ADN = Acido desoxirribonucleico

BSA = Albúmina de suero bovino

CGP = Células germinales primordiales

CE = Capacitación espermática

CTC = Clortetraciclina

CAT = Catalasa

Ca<sup>+2</sup> = Calcio

ERO = Especies reactivas de oxígeno

ERK = Cinasa extracelular regulada

EFG = Factor de crecimiento epidermal

FSH = Hormona folículo estimulante

FD = Factores descapacitantes

FIV = Fertilización *in vitro*

FESZ = Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

GPx = Glutación peroxidasa

GSH = Glutación

GSSG = Glutación oxidado

GR = Glutación reductasa

$\text{H}_2\text{O}_2$  = Peróxido de hidrógeno

$\text{H}_2\text{O}$  = Agua

LH = Hormona luteinizante

$\text{MgSO}_4$  = Sulfato de magnesio

MEK = Proteína quinasa activada por mitógenos

MIV = Maduración *in vitro*

MTT = bromuro de 3- 4,5-dimetiltiazol-2-il -2,5-difeniltetrazolio

mM = Milimolar

mL = Mililitro

Ms = Milisegundo

NaCl = Cloruro de sodio  $\text{NaHCO}_3$  = Bicarbonato de sodio

NADPH = Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NADH = Nicotinamida Adenina Dinucleótido

$\text{NO}\bullet$  = Óxido Nítrico

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\bullet\text{H}_2\text{O}$  = Fosfato de sodio hidratado

Ns = Nanosegundo

$\text{O}_2$  = Oxígeno

$\cdot\text{O}_2^-$  = Anión superóxido

$\cdot\text{OH}$  = Radical hidroxilo

OMS = Organización Mundial de la Salud

pHi = Potencial de hidrogeno intracelular

PKA = Proteína cinasa A

PAF = Paraformaldehido

PBS = Solución buffer de fosfatos

PN = Pronúcleo

PKC = Proteína cinasa C

RA = Reacción acrosomal

RL = Radical libre

SOD = Superóxido dismutasa

TL-HEPES-PVA = Tyrode lactato-HEPES-polivinil alcohol

TRA = Técnica de reproducción asistida

TBMm = Medio amortiguado con Tris modificado

TALP-HEPES = Medio de Tyrode suplementado con albúmina, lactato de sodio y piruvato-HEPES

μL = Microlitros

UAMI = Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

ZP = Zona pelúcida

## Resumen

En las TRA que buscan conservar la calidad espermática se ha utilizado el GSH como antioxidante, intentando alargar la vida útil del gameto masculino. A pesar de que las ERO generan un daño celular, también es claro que juegan un papel fisiológico importante en el espermatozoide durante la CE lo que a su vez afecta la fertilización. Por ello es necesario mantener un determinado balance tanto de antioxidantes como oxidantes para que la CE se lleva a cabo de forma correcta. El objetivo del siguiente trabajo fue determinar si al adicionar diferentes concentraciones de GSH durante la capacitación espermática se modifica la fertilización *in vitro* de ovocitos porcinos.

Durante la CE, se ha demostrado el papel relevante del GSH, reportando que a concentraciones de 1 mM se obtiene un porcentaje adecuado de espermatozoides capacitados, mientras que, a otras concentraciones, el proceso de capacitación se ve afectado; esto nos permite suponer que el GSH es un importante regulador de la CE, por lo que es importante analizar, si la concentración de GSH administrada durante la capacitación, puede modificar la FIV.

Para la metodología primero se realizó un análisis seminal de la muestra de semen evaluando viabilidad, concentración morfología y movilidad. posteriormente se realizó la CE, para ello se tomó 5 mL de muestra y fue diluida y lavada en DPBS, posteriormente fue colocada en medio capacitante e incubados por 2 y 4h con las diferentes concentraciones de GSH a evaluar (0, 0.5, 1 y 5 mM). Para la maduración de ovocitos, se puncionaron ovarios de cerdas pre-puberes colectando los ovocitos, estos fueron colocados en medio de maduración e incubados por 44h. Finalmente para la fertilización, los ovocitos madurados se desnudaron para su inseminación con espermatozoides previamente capacitados y determinando diferentes parámetros como: tiempo de CE y coincubación, medio de fertilización: TBMm y TALP-HEPES, evaluar la FIV con las diferentes concentraciones de GSH (0, 0.5, 1 y 5 mM) y finalmente la coincubación de ambos gametos en GSH lavado de espermatozoides.

Para la evaluación del tiempo de CE y coincubación se encontró que a 2h de CE más 4h de coincubación se obtiene un porcentaje entre el 50 al 60% de FIV a diferencia de 4 h de CE y 2h de coincubación donde el porcentaje fue del 0%. En la evaluación de medios se encontró que el TBMm tuvo un 53% de FIV mientras que en TALP-HEPES

se obtiene un 47% de FIV sin determinarse diferencias. Para el lavado de la muestra se obtuvo un 53% de FIV en espermatozoides sin un lavado adicional mientras que los que si fueron lavados el porcentaje de FIV fue del 0%. Para la evaluación de la FIV con las diferentes concentraciones de GSH se obtuvo en la concentración de 0.5, 1 y 5 mM un porcentaje del 42, 56 y 0% respectivamente de FIV obteniendo porcentajes más altos en la concentración de 1 mM. Y finalmente para la coincubación de gametos con las diferentes concentraciones de GSH se obtuvo en la concentración de 0.5, 1 y 5 mM un porcentaje del 54, 39 y 4% respectivamente de FIV obteniendo porcentajes más altos en 0.5 sin embargo la concentración de 1 mM no muestra diferencias. Este trabajo tuvo diversas dificultades sin embargo se obtuvieron resultados importantes que pueden conducir hacia estudios más minuciosos del proceso de oxidación-reducción durante la CE.

Palabras clave: glutatión, capacitación espermática, fertilización *in vitro*, especies reactivas del oxígeno.

## Abstract

In TRA that seek to preserve sperm quality, GSH has been used as an antioxidant, trying to extend the lifespan of the male gamete. Although ROS cause cell damage, it is also clear that they play an important physiological role in sperm during SC which in turn affects fertilization. Therefore it is necessary to maintain a certain balance of both antioxidants and oxidants so that the SC is carried out correctly. The purpose of this study was to add determining if different concentrations of GSH during sperm capacitation in vitro fertilization porcine oocyte is modified.

During SC, the relevant role of GSH has been demonstrated, reporting that at concentrations of 1 mM an adequate percentage of trained sperm is obtained, while at other concentrations, the training process is affected; this allows us to suppose that the GSH is an important SC regulator, For what is important to analyze, if the concentration of GSH administered during training, can modify IVF.

For the methodology, a seminal analysis of the semen sample was first performed, evaluating viability, morphology concentration and mobility. subsequently the SC was performed for it took 5 mL of sample and was diluted and washed in DPBS, then it was placed in the middle apacitante c and incubated for 2 and 4 h with different concentrations of GSH to be evaluated (0, 0.5, 1 and 5 mM). For oocyte maturation, and punctured s ovaries of prepubertal bristle collecting oocytes, these were placed in maturation medium and incubated for 44h. Finally for fertilization , the matured oocytes were stripped for insemination with previously trained spermatozoa and determining different parameters such as: SC time and coincubation, fertilization medium: TBMm and TALP-HEPES, evaluate the IVF with the different concentrations of GSH (0, 0.5, 1 and 5 mM) and finally the coincubation of both gametes in GSH washed sperm.

For the evaluation of SC time and coincubation it was found that at 2h of SC plus 4h of coincubation a percentage between 50 to 60% of IVF is obtained, unlike 4 h of SC and 2h of coincubation where the percentage was 0%. In the media evaluation, it was found that the TBMm had 53% IVF whereas in TALP-HEPES, 47% IVF was obtained without determining differences. For the washing of the sample, 53% of IVF were obtained in sperm without an additional wash, while those that were washed, the percentage of IVF

was 0%. For the evaluation of IVF with the different concentrations of GSH, it was obtained in the concentration of 0.5, 1 and 5 mM a percentage of 42, 56 and 0% respectively of IVF obtaining higher percentages in the concentration of 1 mM. And finally for the coincubation of gametes with the different concentrations of GSH, a percentage of 54, 39 and 4% respectively of IVF was obtained in the concentration of 0.5, 1 and 5 mM, obtaining higher percentages in 0.5 without the concentration of 1 mM. it does not show differences. This work had several difficulties, however, important results were obtained that can lead to more detailed studies of the oxidation-reduction process during SC.

Key words: glutathione, sperm capacitation, *in vitro* fertilization, reactive oxygen species.

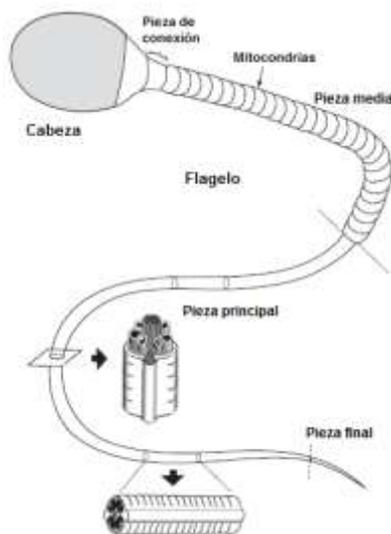
## 1. Introducción

La capacitación espermática es un proceso preparativo para la fertilización del ovocito. Durante este proceso se llevan a cabo una serie de eventos donde participan diversas moléculas que conducen a una adecuada capacitación espermática. Se ha determinado que el espermatozoide produce especies reactivas de oxígeno y las hace participes durante tal proceso, por ello es importante conocer la dualidad de estas moléculas ya que un exceso de ellas produce estrés oxidante, provocando daño y muerte lo que disminuye la capacidad fertilizante. El espermatozoide es capaz de equilibrar tal estrés a través de la participación de enzimas antioxidantes como el glutatión reducido. Por tal motivo, fue de nuestro interés determinar la concentración óptima para mejorar la capacitación espermática adicionando glutatión, para evitar un estrés oxidante, pero permitiendo que las especies reactivas del oxígeno participen en la capacitación espermática y así incrementar la posterior fertilización *in vitro* de ovocitos porcinos.

### 1.1 El espermatozoide y la espermatogénesis

El término espermatozoide, proviene de la raíz griega sperma “semilla” y zóo, “animal” y es el producto final de un proceso denominado: espermatogénesis [1], el cual, inicia en la pubertad, y en cerdos comienza entre 5 a 6 meses de nacido, tal proceso ocurre durante toda la etapa reproductiva de los machos y su producción es continua, tal proceso ocurre dentro de los túbulos seminíferos de los testículos, en un tiempo aproximado de 65 a 75 días en humano y de 35 a 45 días en cerdo (figura 1) [2, 3]. La producción de espermatozoides es regulada a través de diferentes órganos conocidos como eje hipotálamo-hipofisario-testicular; en el hipotálamo es segregada la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), estimulando a la adenohipófisis para la liberación de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH), tales hormonas regulan las funciones testiculares, donde la LH estimula a las células de Leydig para la síntesis de testosterona (T) y la FSH estimula a las células de Sertoli para la síntesis de proteína ligadora de andrógenos (ABP) que en conjunto activan un

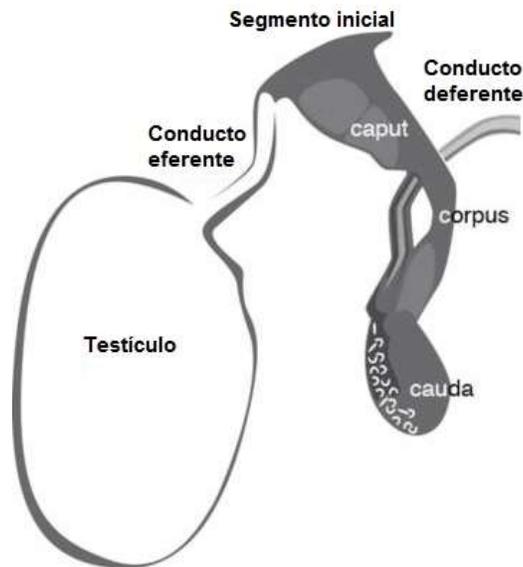
proceso de retroalimentación negativa que permite regular la producción de espermatozoides [4, 5]. Durante la espermatogénesis, el espermatozoide debe atravesar una serie de cambios para que logre su completa diferenciación morfológica, iniciando la transformación de las células germinales primordiales (CGP) a espermatogonias, las cuales comienzan a dividirse y diferenciarse en espermatogonias tipo A u oscuras produciendo el reservorio para la producción del siguiente tipo celular, espermatogonias tipo B o claras, las cuales, una vez diferenciadas se dividen y originan espermatocitos primarios, que experimentan una primera división meiótica (I) reduciendo su carga genética, dando lugar a los espermatocitos secundarios, que nuevamente experimentan una segunda división meiótica (II), produciendo células haploides redondas, conocidas como espermátidas. Finalmente, se identifica una fase de diferenciación en la que las espermátidas adquieren la forma característica alargada de un espermatozoide, donde podemos encontrar diversas estructuras: cabeza, cuello, pieza media, pieza principal y pieza final [3, 6]. Sin embargo, a pesar de estar morfológicamente diferenciado, el espermatozoide aún no tiene la capacidad para fertilizar al ovocito; para ello, tiene que sufrir una serie de modificaciones en su tránsito por el epidídimo, proceso conocido como maduración espermática epididimaria.



**Figura 1.** El espermatozoide. Esquema representativo de un espermatozoide, resultado final de la espermatogénesis. Tomada y modificada de Eddy y O'Brien, 2006 [3].

## 1.2 Maduración espermática epididimaria

Una vez que los espermatozoides son morfológicamente diferenciados en los testículos, son liberados al epidídimo, en donde presentan una serie de cambios fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, conocidos en su conjunto como maduración espermática epididimaria [7]. En el cerdo, el tránsito de los espermatozoides a través de este órgano es de aproximadamente 15 días, sin embargo, esto puede variar entre especies de mamíferos, con un promedio de dos semanas o el humano con una duración de hasta 21 días [8]. El epidídimo es un órgano formado por un túbulo altamente contorneado que inicia en los conductos eferentes y finaliza en el conducto deferente, y una característica distintiva del túbulo epididimario, es su gran longitud, ya que en humanos llega a medir 6 m, en cerdos 8 m y en equinos hasta 18 m [9]. Generalmente, en el epidídimo se pueden distinguir tres regiones principales: cabeza (caput), cuerpo (corpus) y cola (cauda) [10] sin embargo, algunos autores [11] lo han regionalizado en cuatro donde se incluye el segmento inicial. En cada región se pueden identificar, en su epitelio, diferentes tipos celulares: principales, apicales, estrechas, claras, basales y halo, las cuales se localizan en una región o distribuidas en las diferentes regiones del epidídimo [12]. Durante el tránsito por el epidídimo, el espermatozoide experimenta una serie de modificaciones que le permiten obtener su capacidad fertilizante, algunos de los cambios que sufre el espermatozoide son: adquieren la movilidad progresiva, desplazamiento de la gota citoplasmática, modificación de proteínas membranales, modificación en la composición de fosfolípidos de membrana, aumento o disminución del colesterol de membrana, compactación de ADN por protaminas y en algunas especies de mamíferos una remodelación acrosomal [8, 13, 14], esta serie de modificaciones permiten la estabilización y protección del espermatozoide para evitar una capacitación espermática (CE) y reacción acrosomal (RA) prematuras, a través de la adición de factores descapacitantes (FD) como el Factor Estabilizante del Acrosoma (ASF) [15]. Finalmente, en la región caudal, los espermatozoides son almacenados hasta su eyaculación y depositados en el tracto reproductor de la hembra.



**Figura 2.** Epidídimo y la maduración espermática. El espermatozoide una vez formado en el testículo transita por el epidídimo para su maduración por las diferentes regiones que lo conforman: segmento inicial, cabeza (caput), cuerpo (corpus) y cola (cauda). Tomado y modificado de Joseph, et al., 2011 [11].

### 1.3 Eyaculación

En el momento que los espermatozoides llegan a la parte distal de la cauda del epidídimo, se preparan para ser expulsados y depositados en el tracto reproductor de la hembra a través de un proceso llamado eyaculación [16]. El proceso eyaculatorio es mediado por el sistema nervioso central que, a partir de estimulaciones en el pene, y a través de movimientos peristálticos junto con contracciones musculares coordinadas, los espermatozoides son expulsados [16]; los espermatozoides viajan a través del conducto deferente llegando a la región ampular donde se integran secreciones de la vesícula seminal, posteriormente, viajan a través del conducto eyaculador pasando por la próstata y finalmente las glándulas de Cowper, agregan nuevos fluidos que conforman el semen *per se*; en la tabla 1 se especifica la composición de cada agregado de las glándulas accesorias, así como el porcentaje aportado al fluido seminal [17]. De los millones de espermatozoides depositados en el tracto reproductor femenino, solo el 10% entra al cuello uterino, el 1% al útero y el 0.1% en el oviducto,

y, finalmente, solo unos cuantos se encontrarán con el ovocito, e inclusive en el humano se ha encontrado que el porcentaje de ovocito-espermatozoide puede llegar a ser de 1:1; la mayoría de los espermatozoides que no logran hacer contacto con el ovocito se debe a diferentes factores como: el ambiente hostil del tracto reproductor femenino, fallas en la CE que limiten el aumento del movimiento flagelar así como anomalías como doble flagelo, que impidan un apropiado movimiento, este proceso de selección espermática es muy riguroso y permite la elección de los espermatozoides más aptos y mejor capacitados que logren llegar al ovocito y solo uno fertilice en la región ampular [17-19].

**Tabla 1.** Composición del semen de cerdo.

Composición y porcentaje que aportan las glándulas accesorias a los espermatozoides al momento de la eyaculación. Tomado y modificado de Revenig, L., et al., 2014 [17].		
Órgano	% del eyaculado	Composición
Conducto deferente	5-10	Espermatozoides
Vesícula seminal	65-75	Líquido alcalino, fructuosa, citrato y prostaglandinas
Próstata	25-30	Fosfatasa acida, ácido cítrico, proteasas serina, zinc y otros electrolitos
Glándulas de Cowper	1-2	Líquido preeyaculatorio

#### 1.4 Capacitación espermática

Los espermatozoides una vez eyaculados y depositados en el tracto reproductor de la hembra, para poder fertilizar al ovocito, deben completar el proceso conocido como capacitación espermática (CE), el cual se puede definir como los cambios fisiológicos y bioquímicos que se producen en el espermatozoide durante su tránsito por el tracto reproductor femenino, para adquirir la capacidad fertilizante. Este proceso fue descrito por primera vez por Chang y Austin en los años 50's, quienes observaron que los espermatozoides recién eyaculados no tenían capacidad de fertilizar y requerían de

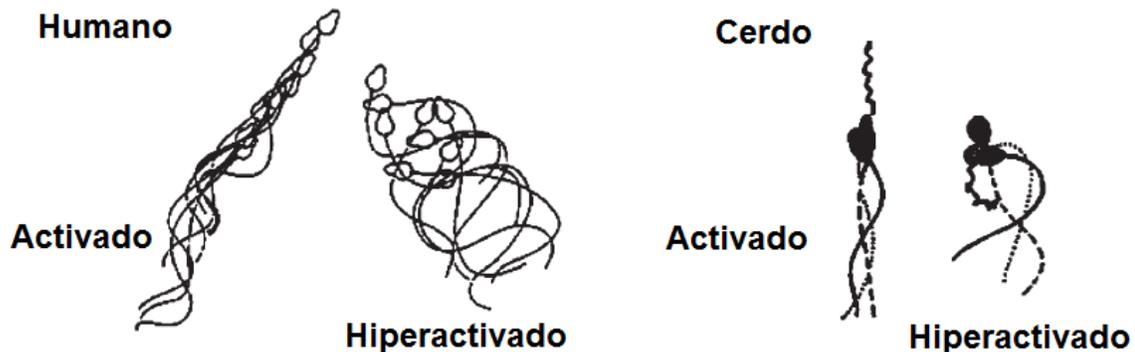
cierto tiempo en el tracto reproductor femenino para poder hacerlo [20, 21]. Durante la capacitación es removido el plasma seminal, el cual, está compuesto por aminoácidos, proteínas, enzimas, antioxidantes y moléculas que aportan energía conocidos como FD, estas moléculas ayudan a protegen al espermatozoide de una prematura CE y RA [22, 23].

La CE involucra una serie de modificaciones como: cambios en las propiedades de la membrana, cambios en la concentración intracelular de iones, actividad enzimática, modificaciones de proteínas que permiten activar diversas vías de señalización que ocurren *in vivo*, en el tracto reproductivo femenino o *in vitro*, en protocolos de laboratorio. Estos cambios no se limitan a una parte del espermatozoide sino que, ocurren tanto en la cabeza para llevar a cabo RA como en el flagelo para generar hiperactivación; Visconti en 2009 [24] los clasifica como procesos lentos y rápidos respectivamente, e independiente de la velocidad del proceso (lento/rápido), la CE *per se*, involucra una serie de procesos que aún no son totalmente comprendidos, a pesar de tener más de 60 años de ser definida, pero ya se tiene conocimiento de algunas moléculas que participan [25].

La CE inicia con la salida de colesterol de la membrana, mediada principalmente por la albúmina y lipoproteínas de alta densidad (HDL), presentes en el tracto reproductor femenino (*in vivo*) o utilizado en el laboratorio (*in vitro*), en este último caso, también se ha utilizado metil- $\beta$ -ciclodextrina (M- $\beta$ -CD) como otro de los aceptores de colesterol [26]. La mayor parte del colesterol forma microdominios conocidos como balsas lipídicas las cuales son centros de organización de proteínas, que a partir de la activación de receptores, permite la activación de vías de señalización que conducen a la CE y que, por consiguiente, al eliminar parte del colesterol, se produce un aumento en la fluidez membranal, generando un reordenamiento estructural de estos microdominios [26]. Durante este reordenamiento, se produce la activación de algunos transportadores, como el co-transportador de  $\text{Na}^+$  /  $\text{HCO}_3^-$  (NBC), canales iónicos como: el canal catiónico de espermatozoides (CatSper) para la entrada de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), el canal de protones 1 (Hv1) para la salida de  $\text{H}^+$ , el canal Slo3 para la entrada de  $\text{K}^+$  y el canal sNHE para la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$  por mencionar algunos. Este

intercambio iónico, sobre todo la entrada de bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ), se asocia con el aumento de pH intracelular ( $\text{pHi}$ ), además de participar en la apertura de canales que facilitan el transporte de otros iones [22]. Como consecuencia, se activa la enzima adenilato ciclasa soluble (ACs), que hidroliza al trifosfato de adenosina (ATP) para formar e incrementar las concentraciones de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), tal aumento de AMPC facilita la fosforilación de la proteína cinasa A (PKA), que posteriormente fosforilarán proteínas involucradas en la CE, como es el caso de la proteína cinasa C (PKC), e inhibiendo proteínas fosfatasas [27, 28] .

Una característica de la CE es el cambio del movimiento flagelar, pasando de uno simétrico a uno asimétrico dándole la fuerza motriz necesaria para liberarse de las criptas oviductales del istmo, atravesar las células del cúmulo y adherirse a la Zona Pelúcida (ZP) para experimentar RA (figura 3) [29, 30].



**Figura 3.** La CE y el cambio en el movimiento flagelar. El cambio en el patrón de movilidad es un estado representativo de un espermatozoide capacitado, pasando de un movimiento simétrico a uno asimétrico. Tomado y modificado de Harvey y Florman, 2015 [31].

### 1.5 Reacción acrosomal

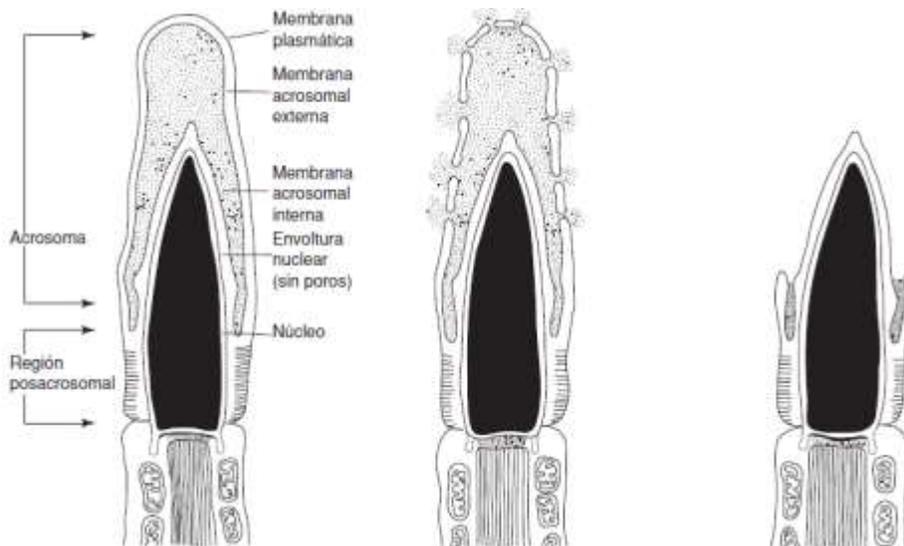
Los espermatozoides capacitados salen del istmo y viajan a la región ampular para encontrarse con el ovocito, realizando un primer contacto con las células del cúmulo

las cuales, tienen como función promover el crecimiento y el desarrollo del ovocito, además de ayudar como soporte estructural y síntesis de hormonas [32].

Cuando el espermatozoide logra atravesar las células del cúmulo, estas células hacen contacto con la ZP, comenzando el proceso de RA, el cual, se puede definir como la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa, para la liberación de enzimas acrosomales que le permitirán la entrada al ovocito [33], cabe mencionar que, estudios recientes han mostrado que la RA ocurre antes del contacto con la ZP producido talvez por progesterona, algún otro agonista o ácido hialurónico, este último producido por las células del cúmulo durante la maduración del ovocito (figura 4) [34, 35].

La composición del contenido acrosomal está dada por múltiples enzimas, las más estudiadas y mejor caracterizadas son: la hialuronidasa y la acrosina, la primera se encarga de abrir paso a los espermatozoides, degradando el ácido hialurónico que forma parte de la matriz que rodea al ovocito; la segunda, permite degradar la ZP y atravesarla. La RA es un proceso rápido que puede durar desde segundos hasta algunos minutos, por ejemplo en humano, su comienzo dura 10 segundos y es completada a los 3 min, en cerdo su comienzo entre 30 y 60 segundos y es completada a los 5 min [33].

Una vez que el espermatozoide ha logrado completar los distintos procesos ya descritos para adquirir capacidad fertilizante, es necesario que el ovocito también experimente distintos procesos para adquirir la capacidad de ser fertilizado.



**Figura 4.** Reacción acrosomal. La fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa del espermatozoide permite la liberación de enzimas hidrolíticas, dando paso a la fusión de las membranas de los dos gametos. Tomado y modificado de Jiménez y Merchant, 2003 [35].

## 1.6 El ovocito y la ovogénesis

La formación de células sexuales femeninas llamadas ovocitos ocurre a través de un proceso nombrado ovogénesis, formándose a partir de una serie de divisiones mitóticas y meióticas; los ovocitos son producidos al igual que los espermatozoides, a partir de células germinales primordiales (CGP), proceso que inicia durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, comenzando con la diferenciación en ovogonias, las cuales, a través de una serie de divisiones mitóticas, mantendrán una carga genética diploide produciendo ovocitos primarios, estos ovocitos iniciarán la primera división meiótica, sin embargo, sufrirán un primer arresto deteniéndose en la fase de diploteno de la profase I durante unos meses (cerdo) [36] a algunos años (humano) [37], hasta que la hembra llegue a la pubertad; en el caso de la cerda, se estima que la pubertad se alcanza entre el quinto y el séptimo mes de nacida [38].

Una vez que la cerda alcanza la pubertad, continúa la meiosis I por acción de la FSH y LH, y poco antes de la ovulación, finaliza la meiosis I, expulsando ovocitos secundarios haploides y la extrusión del primer cuerpo polar [39]. Este ovocito sufrirá de un segundo arresto meiótico, deteniéndose en la metafase II, y permanecerá en esta fase hasta ser fertilizado, en ese momento podrá concluir la meiosis II, resultando en un ovocito haploide y la extrusión del segundo cuerpo polar [40].

### 1.7 Foliculogénesis

La foliculogénesis es un proceso que se desarrolla a la par con la ovogénesis en el ovario y se puede definir como: la salida de la reserva folicular para el crecimiento y proliferación celular, dando origen a la formación del antro para la liberación del ovocito o la atresia folicular [41]. Durante la foliculogénesis se presentan una serie de cambios morfofisiológicos que permiten el desarrollo folicular, dando origen a las diferentes etapas del folículo como a continuación se describen: folículo primordial, este tipo de folículo es la reserva ovárica, los ovocitos se encuentran detenidos en el diploteno de la profase de la meiosis I, el ovocito es ovoide con citoplasma homogéneo, núcleo en posición central, cromatina no condensada, y se encuentra rodeado de una capa aplanada de células de la granulosa; folículo primario, el núcleo presenta gran cantidad de lípidos, las proteínas de la ZP comienzan a secretarse, hay aparición de uniones comunicantes y proliferación de las células de la granulosa adquiriendo forma cúbica; folículo secundario (preantrales) hay formación y reacomodo de organelos del ovocito, hay un aumento en las capas de células de la granulosa (2 a 4 capas); folículos terciarios, tienen de 4 a 6 capas de células de la granulosa; y, finalmente, folículos preovulatorios (antrales), estructura completa y funcional, el ovocito pasa a metafase II (madurado) y pausado nuevamente hasta su encuentro con el espermatozoide para fertilizarlo, lo cual permitirá reanudar y terminar la meiosis II [42-44].

### 1.8 Fertilización

Una vez formados y madurados los gametos masculino y femenino, su objetivo es la fertilización, de no ser así, ambas células morirán. La fertilización dará origen a una nueva célula diploide, capaz de desarrollar un individuo con características genotípicas y fenotípicas únicas, resultado de la recombinación de sus progenitores, permitiendo la perpetuación de la especie [45].

A pesar de que la reproducción sexual lleva descrita más de cien años, aún hay muchos procesos por comprender, ya que durante la unión de los gametos ocurren diferentes eventos para la formación de un cigoto, un embrión, y finalmente un nuevo organismo [46].

#### 1.8.1 Primer contacto: Interacción del espermatozoide con las células del cúmulo

Cuando el espermatozoide es capacitado en el tracto reproductor femenino y adquiere hiperactividad en la región del istmo, pasará hacia la región ampular donde se encontrará con el ovocito. Sin embargo, antes de poder hacer contacto con la ZP, se encontrará con células del cúmulo, que se encuentran expandidas debido a la secreción de ácido hialurónico, lo que se conoce como Matriz del *Cumulus Oophorus*, *in vitro*, tal expansión de las células del cúmulo es un indicador de la maduración del ovocito [35]. Esta barrera permite seleccionar a los espermatozoides con CE y sin RA prematura y los que no cumplan con estas condiciones no podrán atravesar la matriz celular, ya que es necesario un mecanismo mecánico (bateo flagelar) obtenido durante la CE y un mecanismo químico (liberación de enzimas) obtenido durante la RA para poder llegar a la ZP [33].

#### 1.8.2 Reconocimiento del espermatozoide con la zona pelúcida

La ZP es una capa translúcida que rodea al ovocito cuya función principal es: proteger contra daños físicos, reconocimiento especie-específico, generar RA, evitar la entrada de más de un espermatozoide, contener a los blastómeros de una posible disociación y finalmente, permitir la implantación en el útero [33]. La ZP tiene un grosor aproximado

de 1 a 2  $\mu\text{m}$  en diferentes especies de mamíferos pero se ha encontrado un grosor aproximado hasta de 16  $\mu\text{m}$  en cerdo [33], además, está formada de glicoproteínas, con una composición de proteínas del 71%, de carbohidratos del 19% y el porcentaje restante de otras moléculas como ácido siálico y sulfatos [35]. En humano se han identificado familias de glicoproteínas con diferentes pesos moleculares que han sido clasificadas en 4, nombradas como: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 mientras que en ratón se han identificado las 3 primeras y en cerdo se han identificado 2 en condiciones reducidas y 4 en condiciones reductoras [47]. El espermatozoide una vez en la ZP, después de haber completado la CE y tener capacidad de generar RA, se unirá a un receptor inicial, ZP3, que tiene dos funciones principales: 1) Unir al ovocito y el espermatozoide a través de un enlace O-glicosídico mediado por la enzima galactosil-transferasa y 2) disparar la RA producida por la porción peptídica de la ZP3. El disparo de la RA produce la exocitosis del contenido acrosomal de enzimas hidrolíticas como: hialuronidasa, acrosina y otras enzimas, además, también se liberan otras proteínas de unión a ZP2 y permiten una mayor adherencia en la ZP. Una vez unidos, el espermatozoide atravesará la ZP gracias a una acción mecánica (bateo flagelar) y a una acción enzimática (liberación de enzimas) [30].

### 1.8.3 Fusión de gametos

Una vez que el espermatozoide logra atravesar la ZP, pasará por el espacio perivitelino y se unirá a la membrana plasmática del ovocito a nivel de la zona ecuatorial, donde, con ayuda de microvellosidades del ovocito, el espermatozoide se adherirá con firmeza para iniciar su fusión. Tal proceso, permite no solo la incorporación de la cabeza del espermatozoide sino también del flagelo, lo que provocará un cese de movilidad, esta incorporación es dada por integrinas ( $\alpha 6$  y  $\beta 1$ ) que se encuentran en las microvellosidades del ovocitos y otras proteínas miembros de la familia ADAMS como la fertilina  $\alpha$  y  $\beta$  y ciritestina, además se han identificado otras proteínas que también participan en la fusión como: IZUMO y CD9 [48], esta última presente en el ovocito permitirá activar diferentes moléculas en el espermatozoide, una de ellas es el factor

espermático u oscilina, la cual, participa en la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  través de pulsos, este aumento en la concentración del  $\text{Ca}^{+2}$  dentro del ovocito provoca la activación de éste, generando la reanudación de la meiosis, la formación del pronúcleo del ovocito y la descondensación del ADN del gameto masculino para la formación del pronúcleo masculino, además de la extrusión del segundo cuerpo polar [49, 50].

Este mecanismo ocurre entre el ovocito y el espermatozoide en porción 1:1 ya que un número mayor de espermatozoides dentro del ovocito no es benéfico y conduce a degeneración de éste, para ello el ovocito cuenta con un mecanismo para evitar que más de un espermatozoide fertilice, conocido como bloqueo de la polispermia [50].

#### 1.8.4 Bloqueo de la polispermia

Para garantizar la correcta fertilización, el ovocito cuenta con un mecanismo doble para evitar la polispermia (entrada de más de un espermatozoide) ya que al tener más de dos juegos cromosómicos (poliploidía) podría ser fatal para el embrión provocando degeneración; particularmente el cerdo tiene la característica de ser una especie con un alto índice de polispermia *in vitro*, sin embargo, estudios de fertilización en cerdo han demostrado que el ovocito es capaz de eliminar espermatozoides adicionales, logrando el desarrollo de un embrión, siempre y cuando, los espermatozoides adicionales, no interfieran con el genoma del embrión [51].

El ovocito cuenta con un doble mecanismo para prevenir la polispermia que, dependiendo la especie de mamífero, uno puede ser más esencial que el otro, o pueden trabajar en conjunto para impedir el paso de más de un espermatozoide. El primer mecanismo, consiste en producir un cambio en el potencial de la membrana plasmática, ya que la entrada del primer espermatozoide genera una despolarización de membrana; mientras que el segundo mecanismo, consiste en la remodelación estructural de la ZP, esto es generado por la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  durante la activación del ovocito, provocando la liberación de gránulos corticales (pequeños organelos derivados del aparato de Golgi y que su tamaño varía entre  $0.2 \mu\text{m}$  a  $0.6 \mu\text{m}$  de diámetro dependiendo la especie) hacia el espacio perivitelino que a su vez liberan

enzimas que modifican la composición de proteínas de la ZP, lo que propicia la inactivación de receptores y endurecimiento de la ZP [51-53]. La comprensión del mecanismo de acción de los gránulos corticales podría ayudar a resolver el problema del alto porcentaje de polispermia en el cerdo [51].

.

#### 1.8.5 Singamia

El proceso de transición entre la fertilización y el desarrollo embrionario se le denomina singamia y se puede definir como la migración de los pronúcleos en el centro del ovocito fusionando sus membranas nucleares [33]. Sin embargo, para que tal evento suceda, el espermatozoide tiene que ser capacitado y además del evento descrito con anterioridad, se han relacionado otras moléculas que ayudan al espermatozoide a hacerlo, como las especies reactivas de oxígeno (ERO) [54].

#### 1.9 Radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas que poseen un electrón desapareado en su último orbital, cada electrón tiene giros opuestos con determinada carga y al no ser neutralizado provoca inestabilidad de la molécula; tal inestabilidad del RL provoca la búsqueda inmediata de otros átomos o moléculas para “robar” el o los electrones faltantes, y así anular su inestabilidad, esta característica los hace muy reactivos a diversos elementos celulares como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, modificando su estructura y función [55]. La reacción producida y tiempo de vida suelen ser muy rápidas, de milisegundos (1ms) a nanosegundos (1ns), además las reacciones son muy variables pues los RL pueden reaccionar entre ellos mismos, anulando su reactividad e inclusive con el oxígeno ( $O_2$ ), una molécula de suma importancia para la sobrevivencia de los seres vivos, ya que, al ser un biradical (molécula que tiene dos electrones con spin paralelo) ambos electrones pueden ser donados produciendo formas activas de metabolitos de  $O_2$  mejor conocidas como ERO incluyen: anión

superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y al radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}^-$ ), cuya formación dependerá del número de electrones transferidos (tabla 2) [54, 56, 57].

**Tabla 2.** Especies Reactivas de Oxígeno

Tiempo de vida de las Especies Reactivas de Oxígeno. Tomado y modificado de Arenas-Ríos, E., et al., 2014 [54].				
Molécula	Símbolo	Tiempo de vida en segundos a 37°C	Potencial de reducción estándar	(-oxidante)
Oxígeno	$\text{O}_2$	$>10^2$	-0.46	
Peróxido de Hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$	.....	0.32	
Anión Superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	$1 \times 10^{-6}$	0.94	
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}^-$	$1 \times 10^{-9}$	2.31	

### 1.10 Sistema antioxidante enzimático y no enzimático

Para contrarrestar el efecto de las ERO, la célula cuenta con un sistema que permite mantener un determinado equilibrio para la homeostasis de óxido-reducción de la célula, a tal mecanismo se le conoce como sistema antioxidante no enzimático (exógeno) y enzimático (endógeno). El primer sistema, es obtenido a partir de la dieta por el consumo de frutas, verduras, cereales integrales, legumbres y ácidos grasos como el omega-3, de los cuales se obtienen moléculas como vitaminas (C y E principalmente), carotenoides y polifenoles que permiten contrarrestar los efectos de las ERO. EL sistema antioxidante enzimático está integrado principalmente por las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); esta última participa tomando como sustrato al glutatión reducido (GSH), reduciendo al ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el cual es una de las ERO con mayor importancia en la célula, ya que es precursor del  $\cdot\text{OH}^-$  uno de los RL más dañinos para el espermatozoide [54, 58].

### 1.11 Estrés oxidante

El término estrés oxidante fue definido por primera vez por Sies en 1997 [59] como: “una alteración en el equilibrio pro-oxidante / antioxidante a favor de la primera, lo que conduce a un daño potencial” [60]. En efecto, diferentes estudios han concluido que el estrés oxidante, es una de las principales causas de daño celular, ya que provoca daño en el ADN, oxidación de proteínas, lipoperoxidación de la membrana plasmática así como interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial [57, 61-63], y particularmente la membrana del espermatozoide, al poseer una gran cantidad de ácidos grasos, es muy susceptible al daño por ERO, limitando la permeabilidad de la membrana y generando una disfuncionalidad del espermatozoide [54].

### 1.12 La participación de las ERO y su relación en la CE.

Si bien se ha considerado que las ERO pudieran ocasionar un daño celular, al estar relacionadas con diferentes enfermedades y envejecimiento, también es claro que juegan un papel fisiológico importante en el espermatozoide durante la CE [64], esto fue determinado por Claude Gagnon, uno de los pioneros en los años 90's [65]. Los espermatozoides producen ERO, por ello es importante entender su dualidad en diferentes procesos [66]. Se ha determinado que la CE es considerada, en parte, un proceso de óxido-reducción [67]. Koppers en 2008 determinó que las principales fuentes de ERO en el espermatozoide son: la membrana plasmática, por la acción de la NADPH oxidasa, y en la mitocondria por la oxidorreductasa (diaforasa) dependiente de NADH, sin embargo, este último tiene una menor producción de ERO [68]. A pesar de la gran controversia que existe sobre si las ERO participan en la CE, hay suficiente evidencia de la participación de ERO como:  $H_2O_2$  y  $\cdot O_2^-$ , óxido nítrico (NO). La producción de ERO durante la CE implica la activación de diferentes blancos en la membrana plasmática como canales iónicos, además de la activación directa de la enzima Adenilato Ciclasa soluble (ACs) por  $H_2O_2$  y  $\cdot O_2^-$ , lo cual genera un aumento en

los niveles de AMPc intracelular activando la PKA, esencial en la fosforilación de tirosina, además de la inhibición de fosfatasas (TF), que conducen a la CE del espermatozoide [69].

Otro blanco clave de las ERO es la TF, estas enzimas tienen un residuo de cisteína en su sitio activo, que al estar reducido, la TF expresa actividad, por lo que, al oxidarse en presencia de las ERO ( $H_2O_2$ ) inhiben su función, que como ya se mencionó, es un evento importante en la CE [70].

Estudios han demostrado que, al disminuir las ERO por la adición de enzimas antioxidantes se produce una disminución de la fosforilación de tirosinas por lo que el proceso de CE se ve afectado [71]. Por el contrario, al añadir ERO como  $H_2O_2$  en espermatozoides de mamíferos hay un aumento en la fosforilación de tirosinas lo que favorece la CE, lo que podría parecer contradictorio al efecto que las ERO y los antioxidantes tienen en diferentes funciones fisiológicas en el organismo [72].

Se han descrito otras vías que tienen importante participación en la CE, tal es el caso de la vía AMPc activadora de enzimas, esto implica la activación de PKA y la fosforilación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MEK) [63], sin embargo en la activación de MEK se ha visto involucrado el  $H_2O_2$ , por activación de la cinasa PKC, la fosforilación de Raf y posteriormente activando a MEK, además se ha identificado como un transductor de señales clave en la fosforilación de tirosinas que desencadena la CE y la RA [63].

Como ya se mencionó, las ERO tienen un papel fundamental en la CE, sin embargo un excedente de éstas, podría causar estrés oxidante, para ello se requiere del sistema antioxidante que permita mantener un equilibrio redox, uno de estos antioxidantes es el GSH [54].

### 1.13 Síntesis del GSH y su papel en la capacitación espermática.

El GSH es una molécula de bajo peso molecular que se sintetiza en el citoplasma de la célula por acción de dos enzimas, la glutamato cisteína ligasa (GCL), que como su

nombre lo indica, se encarga de ligar el glutamato y a la cisteína formando  $\gamma$ -glutamilcisteína, posteriormente, la glutatión sintetasa (GS) cataliza la reacción para unir a la glicina y así formar el GSH, dicha síntesis es regulada por la GCL [73]. A niveles basales el GSH se encuentra en las células de mamífero en una concentración de 1 a 11 mM, mientras que en espermatozoides de cerdo la concentración de GSH oscila entre  $3.84 \pm 0.21 \text{ nM}/10^8$  [73].

El GSH, es un tripéptido constituido por los aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico [74], tiene un papel fundamental como regulador de ERO, ya que participa como agente reductor del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), la GPX toma como sustrato al GSH, dando como resultado la oxidación del glutatión (GSSG), este será reducido por la glutatión reductasa GR utilizando como cofactor el NADPH para generar de nuevo GSH y  $\text{H}_2\text{O}$  [75-77].

El mecanismo de acción del GSH radica en el grupo sulfhidrilo de la cisteína, participando en reacciones de reducción y conjugación, eliminando compuestos como peróxidos y actuando como un sistema de defensa contra el estrés oxidante [78].

Se ha demostrado su participación cuando está presente en el espacio extracelular, en la protección de la membrana plasmática por su capacidad para reaccionar con aldehídos citotóxicos que se producen durante la peroxidación de lípidos [79].

Por tal motivo, se propone al GSH como un importante regulador de la CE, donde una adecuada concentración pueda aumentar los porcentajes de CE y posteriormente los porcentajes de FIV en el modelo porcino.

#### 1.14 Fertilización *in vitro* y el modelo porcino

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad se encuentra dentro de las 5 discapacidades que más afectan al ser humano a nivel mundial, ya que una de cada seis parejas, tiene problemas al concebir un nuevo ser [80]. Desafortunadamente, este problema podría ser contradictorio, debido al hecho de que el mundo se encuentra sobrepoblado, sin embargo, es necesario implementar técnicas

de concepción para parejas que deciden, por diversas razones, planificar su embarazo. Para ello, diversos investigadores han ampliado el estudio de técnicas que solucionen problemas de infertilidad; tal es el caso de la fertilización *in vitro* (FIV), la cual, es una técnica de reproducción asistida (TRA) que permite aumentar la tasa de éxito reproductivo [81].

En los últimos años, la FIV ha tenido gran auge en especies de gran valor económico, cultural, social y médico, tal es el caso del cerdo, en donde la TRA permite producir cerdos de valor en la ganadería como verracos, además de recuperar otras variedades que se encuentran en peligro de extinción y son endémicas de nuestro país, como el cerdo pelón mexicano, ya que se han creado cerdos genéticamente modificados para ser donantes de tejidos y órganos [82]. En esta última metodología, es en donde los investigadores han apuntado para que el cerdo sea un buen modelo para tratar diferentes patologías como problemas reproductivos debido a su fisiología similar con el humano [83].

## 2. Antecedentes

En las TRA que buscan conservar la calidad espermática se ha utilizado el GSH como antioxidante, intentando alargar la vida útil del gameto masculino [84]. Estudios han demostrado el papel del GSH como regulador de ERO y que su efectividad depende de la concentración en el medio capacitante, particularmente, en espermatozoides de cerdo, se ha observado que, cuando se utiliza una concentración de 5 mM disminuye no solo la capacitación sino, además, la viabilidad en comparación con una concentración de 1 mM donde aumenta la CE [85], esto demuestra la dualidad que existe de las ERO, ya que es necesario de una concentración adecuada regulada por el GSH para favorecer la CE [85-87].

Estudios recientes han demostrado que, en espermatozoides congelados de toro y de cerdo, se produce un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes debido a daños en la membrana, disminuyendo la viabilidad del espermatozoide, por lo que se considera

de suma importancia la presencia de un sistema que equilibre el estrés oxidante al que está expuesto el espermatozoide [84, 88] durante su capacitación y aumente la fertilización [89].

Estrada y colaboradores (2014) reportaron que la adición de 2 mM de GSH en medios de congelación en espermatozoides crioconservados de cerdo, incrementa la tasa de partos y número de lechones vivos por camada [90], estos resultados fueron similares a los reportados por Lucio y colaboradores (2016), donde determinaron que en un extensor para la crioconservación de espermatozoide de perro con una concentración de 10 mM de GSH, y utilizados para inseminación aumentó la tasa de fertilidad en perras a diferencia de una concentración de 20 mM [91]. De ahí la importancia de conocer la concentración adecuada de GSH que permita incrementar la fertilidad [91].

Nuestro grupo de trabajo demostró que el GSH a una concentración 1 mM favoreció la CE de semen fresco en cerdo, esto se asocia a un aumento en la fosforilación de tirosinas y disminución en la oxidación de grupos sulfhidrilos procesos importantes en la CE, mientras que, la concentración de GSH 5 mM la CE disminuyó; por lo que el GSH podría estar participando como un importante regulador de la CE [92]. Sin embargo, ahora es importante conocer si estas modificaciones en el proceso de CE repercuten en la fertilización.

### 3. Justificación

El papel de los antioxidantes es contrarrestar el efecto nocivo de las ERO, evitando el estrés oxidante. Sin embargo, los antioxidantes se han usado indiscriminadamente para la conservación de espermatozoides, sin tomar en cuenta que la oxidación tiene un papel importante en el proceso de capacitación.

En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado el papel relevante del GSH, reportando que a concentraciones de 1 mM se obtiene un porcentaje adecuado de espermatozoides capacitados, mientras que, a otras concentraciones, el proceso de capacitación se ve afectado; esto nos permite suponer que el GSH es un importante

regulador de la CE. Por lo que es importante analizar, si la concentración de GSH administrada durante la capacitación, puede modificar los porcentajes FIV.

#### 4. Pregunta de investigación

¿Cómo afectará la concentración de GSH durante la capacitación espermática la fertilización *in vitro* de ovocitos porcinos?

#### 5. Hipótesis

Las concentraciones de GSH que favorecen la capacitación espermática, incrementarán la fertilización *in vitro* en ovocitos porcinos.

#### 6. Objetivos

##### 6.1 General

Determinar si al adicionar diferentes concentraciones de GSH durante la capacitación espermática se modifica la fertilización *in vitro* de ovocitos porcinos.

##### 6.2 Específicos

1. Evaluar mediante un análisis seminal, la calidad del semen.
2. Evaluar después de cuantos días de almacenamiento de los espermatozoides con medio Duragen, se puede determinar la CE de forma confiable.
3. Evaluar la capacitación de espermatozoides de cerdo a diferentes concentraciones de GSH: 0 mM (control), 0.5 mM, 1 mM y 5 mM.
4. Determinar el tiempo de CE y coincubación para la fertilización *in vitro*.

5. Determinar el medio CE (TALP-HEPES vs TBMm) más adecuado para la posterior fertilización *in vitro*.
6. Evaluar si la centrifugación de los espermatozoides afecta la fertilización *in vitro*.
7. Evaluar la fertilización *in vitro* de ovocitos porcinos usando espermatozoides capacitados con las concentraciones de GSH: 0 mM (control), 0.5 mM, 1 mM y 5 mM.
8. Evaluar la fertilización *in vitro* de ovocitos porcinos en coincubación con espermatozoides a concentraciones de GSH: 0 mM (control), 0.5 mM, 1 mM y 5 mM.

## 7. Materiales y métodos

Para realizar el trabajo se tomaron en cuenta parámetros de inclusión como: el análisis de la calidad espermática, CE, MIV y finalmente la FIV; obteniendo los siguientes resultados.

### 7.1 Material biológico

Se utilizó semen fresco de verracos de aproximadamente 2 años con fertilidad comprobada proveniente de una granja porcina comercial. La muestra se obtuvo por técnica de mano enguantada y fue transportada a 16 °C en diluyente Duragen de alta duración para su mantenimiento, sin exposición a luz y en menos de 1 hora fue llevada al laboratorio para su procesamiento. Previo a utilizar la muestra se verificó que presentara un mínimo de 80% de movilidad para poder ser consideradas para FIV, esto se pudo realizar con ayuda de un microscopio invertido a 250X (Olympus M021, Olympus Optical, Japón).

## 7.2 Análisis seminal

Una vez en el laboratorio, el semen fue almacenado en una cava a 16°C hasta su uso. Para evaluar la viabilidad de la muestra se realizó una tinción con Eosina-Nigrosina. En un portaobjetos se realizó un frotis colocando 5µL de semen y 5µL de Eosina-Nigrosina, secando en una parrilla a 38°C por 30 segundos, se determinó la viabilidad espermática haciendo un conteo de 200 espermatozoides, considerando los siguientes criterios: aquellos espermatozoides que permanecen sin teñir se consideraron vivos y los que estén teñidos se consideraron muertos. Las muestras fueron observadas con ayuda de un microscopio óptico a 400X.

Para evaluar la morfología se utilizaron las mismas laminillas de Eosina-Nigrosina. Se realizó un conteo de 200 espermatozoides y se evaluó considerando los criterios descritos por el manual para la examinación y el procesamiento de la OMS 2010 [93]. Las muestras fueron observadas con ayuda de un microscopio óptico a 400X.

Para evaluar la concentración espermática se colocaron en un portaobjetos 10 µL de muestra y con el objetivo de 100X se hizo un conteo un campo y de acuerdo con el número de espermatozoides se realizó la dilución correspondiente al de la OMS 2010 [93] (Tabla 3).

**Tabla 3.** Dilución espermática.

La concentración de espermatozoides se obtiene a partir de la dilución obtenida del conteo de espermatozoides visualizados en un campo del microscopio óptico a 100X. Tomado y modificado de OMS, 2010 [93].			
Número de espermatozoides	Dilución	Semen (µL)	Fijador (µL H <sub>2</sub> O)
> 101	1:20	50	950
16 – 100	1:5	50	200
2 – 15	1:2	50	50
< 2	1:2	50	50

De la dilución, fueron colocados a cada lado de una cámara de Neubauer 10  $\mu\text{L}$  de dilución realizando el conteo en 5 cuadrículas diferentes de cada lado y cuyo resultado se expresó en millones  $1 \times 10^6$  de espermatozoides por mL. El conteo fue hecho con un microscopio óptico a 400x.

### 7.3 Obtención de ovocitos y maduración *in vitro* (MIV)

Los ovarios fueron colectados de cerdas prepúberes recién sacrificadas en el rastro, siendo transportados al laboratorio en cloruro de sodio (NaCl) 0.9% a 25°C en menos de 2 horas.

Una vez en el laboratorio, los folículos ováricos de 3-6 mm de diámetro, se puncionaron con una jeringa estéril con capacidad de 10 mL, sustituyendo la aguja por una de calibre 18 para obtener fluido folicular sin dañar a los ovocitos; la muestra se dejó sedimentar por 20 min, al paquete celular obtenido se agregaron 25 mL de medio modificado de lavado Tyrode suplementado con lactato de sodio 10 mM, HEPES 10 mM y PVA 1mg/mL (TL-HEPES-PVA) con un pH de 7.3 a 7.4 y se dejó sedimentar por 15 min, por dos ocasiones para su lavado. Posteriormente, fueron colocados en la base y en la tapa de una caja de Petri estéril de 90 mm de diámetro para comenzar con la colecta de ovocitos.

La selección de ovocitos se realizó con una manguera de látex de aproximadamente 60 cm de longitud con un diámetro de 5 mm, la cual, en un extremo estaba conectada a una pipeta Pasteur estéril; antes de utilizar la pipeta Pasteur, se sometió a calor y por estiramiento manual, se redujo su diámetro para dejar pasar los ovocitos lo más limpios posible, pero sin dañarlos, tal selección se llevó a cabo bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZ60, Olympus Optical, Japón). Se realizó la colecta de ovocitos que presentaron citoplasma uniforme y granular además de encontrarse rodeados de 2 a 3 capas de células del cúmulo. Los ovocitos seleccionados fueron

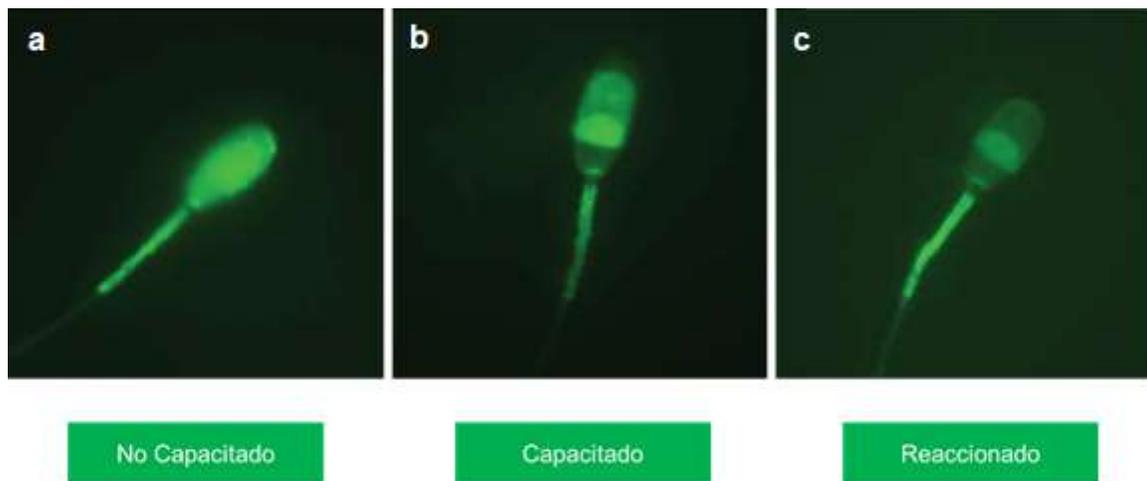
lavados por tres ocasiones en cajas Petri estériles de 35 mm de diámetro, con gotas de 500  $\mu$ L de medio de maduración TCM-199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio 26.2 mM libre de proteínas, suplementado con D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, PVA 0.1 %, cisteína 0.57 mM, EGF 10ng/mL. Finalmente, entre 35 a 40 ovocitos fueron transferidos a una gota de 500  $\mu$ L en una placa de 4 pozos estéril, agregando LH (0.5  $\mu$ g/mL) y FSH (0.5  $\mu$ g/mL). Las cajas se incubaron a 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad por 44 h [94].

#### 7.4 Capacitación espermática con TALP-HEPES

Se realizó tomando 1 mL de semen, que fue lavado en un tubo Eppendorf de 1.5 mL centrifugando a 600 g durante 10 min, el sobrenadante fue eliminado y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de PBS y se centrifugó a 600 g por 10 min, esta acción se repitió una vez más. El sobrenadante fue eliminado y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de Tyrode con Albumina Lactato Piruvato (TALP-HEPES) e inmediatamente se tomaron 50  $\mu$ L de la dilución y se fijaron con 50  $\mu$ L de Paraformaldehido (PAF) en un tubo Eppendorf de 1.5 nuevo, almacenando a 4°C para evaluar el tiempo cero. Posteriormente con ayuda de la cámara de Neubauer se realizó un conteo para tomar de la dilución  $8 \times 10^6$  espermatozoides / mL y llevar a 1 mL con medio TALP-HEPES que contiene: NaCl 116.0 mM, KCl 3.1m M, Lactato sódico 21.7 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 0.3 mM, Glucosa 5.0 mM, NaHCO<sub>3</sub>, Piruvato Sódico 1.0 mM, HEPES s/sodio 20 mM, Rojo Fenol 334.38 mM, suplementado con 3 mg/mL de BSA y ajustado a pH 7, en placas de 4 pozos previamente incubadas con las diferentes concentraciones de GSH.

Para el preparado de cajas con GSH, se elaboró una solución Stock de 10 mL con una concentración de 50 mM de GSH. Para la concentración control se colocaron 1000  $\mu$ L de TALP-HEPES, para la concentración de 0.5 mM se tomaron 100  $\mu$ L de solución Stock más 900  $\mu$ L de TALP-HEPES, para la concentración de 1 mM se tomaron 200  $\mu$ L de solución Stock más 800  $\mu$ L de TALP-HEPES y para la concentración de 5 mM se tomaron 1000  $\mu$ L de la solución Stock.

Las muestras fueron incubadas a 39 °C con 5% de CO<sub>2</sub> a saturación de humedad por 4 horas. La CE se evaluó por la técnica de clortetraciclina (CTC 750mM en NaCl 130mM, cisteína 5mM y 20mM Tris-HCl ajustando a pH 7.8), y montados con solución Dabco (glicerol-PBS, a una proporción 9:1) observando a 510nm con ayuda de un microscopio de epifluorescencia a 400X logrando observar los siguientes patrones: espermatozoides no capacitados con fluorescencia generalizada, capacitados con fluorescencia en acrosoma y pieza media y reaccionados con baja fluorescencia en acrosoma [95].



**Figura 5.** Parámetros evaluados durante la CE por tinción de CTC. a) Espermatozoide no capacitado, b) capacitado y c) reaccionado. Tomado y modificado por Ded, L., et al. (2010) [92].

### 7.5 Capacitación espermática para comparar TALP-HEPES y TBMm para FIV

Con ayuda de una micropipeta (100-1000  $\mu$ L) se tomaron 5 mL de muestra de semen y se diluyeron en 5mL de solución salina de fosfatos (PBS-Dulbecco. Gibco), suplementada con BSA fracción V al 0.1%, 75  $\mu$ g/mL de penicilina potásica G y 50  $\mu$ g/mL de sulfato de estreptomina a un pH de 7.2, en un tubo falcón de 15 mL. La dilución obtenida se centrifugó a 61 g en una centrífuga clínica (Jouan, Francia)

atemperada a 35°C durante 5 min, se recuperaron 5 mL del sobrenadante y se resuspendió 1:1 con DPBS, se centrifugó a 1900 g por 5 min. El sobrenadante fue desechado y se recuperó el paquete celular, éste se resuspendió nuevamente en 10mL de DPBS, centrifugando a 1900 g por 5 min, el sobrenadante fue desechado y se recuperó el paquete celular.

El lavado de espermatozoides se realizó por duplicado, un paquete celular fue resuspendido en 100 µL de medio TALP-HEPES y otro paquete celular fue resuspendido en 100 µL de medio amortiguado con Tris modificado (TBMm, por sus siglas en inglés), compuesto de NaCl 113.1 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O 7.5 mM, Tris 20 mM, glucosa 11 mM, piruvato de sodio 5 mM. Dicho medio fue previamente suplementado con cafeína 2.5 mM (0.0098g de cafeína anhidra o 0.019g de benzoato de cafeína) (Sigma 4144) y Albumina Sérica Bovina (BSA) al 0.4% (Sigma 7888), 48 horas antes de la CE y se preincubó de acuerdo con las especificaciones descritas. Del concentrado de espermatozoides (100 µL de TALP-HEPES y TBMm en cada tubo), se realizó el conteo de espermatozoides con ayuda de la cámara de Neubauer para tomar de la dilución de 8 x 10<sup>6</sup> espermatozoides y colocarlos en una placa de 4 pozos con 1 h previa de incubación con lo correspondiente en µL de medio TALP-HEPES y TBMm para capacitar en un volumen total de 1 mL de medio capacitante.

Unas muestras de espermatozoides fueron incubadas a 39 °C con 5% CO<sub>2</sub> a saturación de humedad por 4h y otras por 2h para ser co-incubadas para la FIV por 2 y 4h, respectivamente.

## 7.6 Denudación de ovocitos

Durante el tiempo de la CE *in vitro* y una vez transcurridas las 44 h de la MIV, con ayuda de una micropipeta (10-100 µL), bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZ60, Olympus Optical, Japón) y con pipeteos suaves en repetidas ocasiones se denudaron los ovocitos, posteriormente se utilizó la misma manguera y pipeta Pasteur para transferir los ovocitos a 2 cajas Petri de 35 mm de diámetro estériles, con gotas con 500

$\mu\text{L}$  de TCM-199, y después a 3 cajas con las mismas características pero con TBMm, la transferencia entre el total de las cajas (5) fue de manera sucesiva. Finalmente, los ovocitos fueron transferidos a una caja de 4 pozos con 50  $\mu\text{L}$  de TBMm suplementado, colocando de 30 a 35 ovocitos e incubándolos a 38.5 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> hasta su inseminación [96].

Para la evaluación del GSH en co-incubación, los ovocitos no fueron transferidos a la caja de 4 pozos, estos fueron mantenidos en la quinta caja de TBMm.

### 7.7 Fertilización *in vitro* (FIV) de acuerdo con el protocolo de laboratorio de Biología celular

De acuerdo con el protocolo de FIV del laboratorio [96] los espermatozoides son lavados en medio DPBS como se describe en el apartado 7.5; Se realizó el cálculo necesario para tomar 50  $\mu\text{L}$  con una concentración de  $5 \times 10^5$  espermatozoides/mL y colocarlos junto con los ovocitos en gotas de 50  $\mu\text{L}$  de TBMm en una placa de 4 pozos para tener un volumen total de 100  $\mu\text{L}$  de medio fertilizante.

Las muestras fueron co-incubadas a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad por 6h [97].

### 7.8 Fertilización *in vitro* (FIV) para comparar medios: TALP-HEPES y TBMm; y tiempo de co-incubación: 4 h + 2 h vs 2 h + 4 h

En la FIV para comparar diferentes medios capacitantes y diferentes tiempos de co-incubación se realizó el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior (7.7). Se tomaron  $5 \times 10^5$  espermatozoides/mL para colocarlos junto con los ovocitos en gotas de 50  $\mu\text{L}$  de TBMm en una placa de 4 pozos, las gotas se llevaron a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de TBMm de acuerdo con lo sugerido en el protocolo de fertilización.

Las muestras fueron co-incubadas a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad por 4 y 2 h dependiendo el tiempo previo de CE y así completar las horas de fertilización (6 h) [97]. De esta manera se logró evaluar los medios capacitantes y el tiempo de CE y co-incubación necesario para la FIV.

### 7.9 Fertilización *in vitro* (FIV) en espermatozoides con y sin centrifugados

En la FIV para espermatozoides centrifugados se realizó el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior (7.8), con la diferencia en que los espermatozoides fueron capacitados solo en TBMm y fueron centrifugados a 1900 g por 5 min. Posteriormente, el sobrenadante fue desechado, se recuperó el paquete celular y se diluyó en 100µL de TBMm. Finalmente se realizó el cálculo necesario para tomar  $5 \times 10^5$  espermatozoides/mL y colocarlos junto con los ovocitos en gotas de 100 µL de TBMm en una placa de 4 pozos por un tiempo total de 6 h.

### 7.10 Fertilización *in vitro* (FIV) para co-incubación

En la FIV para co-incubación se realizó el procedimiento descrito en el apartado anterior (7.7), pero se preparó la placa de 4 pozos con 50 µL de TBMm y las diferentes concentraciones de GSH (0. 0.5. 1 y 5 mM) a evaluar. Para el preparado de cajas, se elaboró una solución stock de 1 mL con una concentración de 50 mM de GSH. Para la concentración control se colocaron 50 µL de TBMm, para la concentración de 0.5 mM se tomó 1 µL de solución Stock más 49 µL de TBMm para la concentración de 1 mM se tomó 2 µL de solución Stock más 48 µL de TBMm y para la concentración de 5 mM se tomó 10 µL de solución Stock y 40 µL de TBMm; con esto obtendríamos una concentración doble de las concentraciones de GSH a evaluar, de tal manera que al agregar los 50 µL de espermatozoides, la concentración de GSH sería la deseada.

Finalmente se realizó el cálculo necesario para tomar  $5 \times 10^5$  espermatozoides/mL y colocarlos junto con los ovocitos en la placa de 4 pozos por un tiempo total de 6 h.

#### 7.11 Lavado de ovocitos y transferencia al medio de desarrollo (NCSU-23)

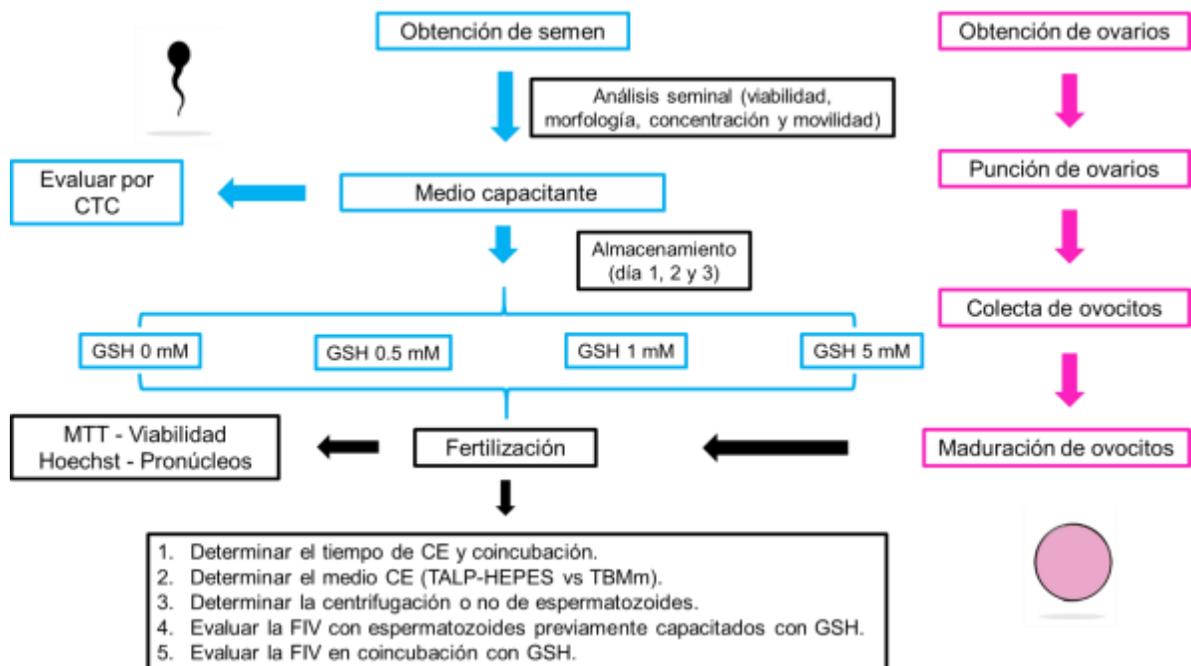
Una vez transcurridas las 6 h de inseminación, se realizó la eliminación de espermatozoides pasando los ovocitos por tres ocasiones consecutivas a cajas Petri de 35mm de diámetro con gotas de 50  $\mu$ L de NCSU-23 (North Carolina State University-23), suplementando con BSA libre de ácidos grasos al 0.4 %, las cuales fueron cubiertas con aceite mineral. Finalmente se transfirieron a una placa de cuatro pozos con gotas de 500  $\mu$ L del mismo medio cubiertas con aceite mineral. Las muestras fueron co-incubadas a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad por 12 a 14 h. [98]

#### 7.12 Tinción, fijado y montaje

Después de las 12 a 14 horas de incubación se realizó una doble tinción. Se inició transfiriendo los ovocitos a una caja nueva con 500  $\mu$ L de PBS en cada pozo para su lavado. Para viabilidad se añadieron 250  $\mu$ L de MTT (bromuro de 3- 4,5-dimetiltiazol-2-il -2,5-difeniltetrazolio) por 20 min en incubación, se eliminó el exceso de MTT y nuevamente se lavó con PBS, se añadieron 500  $\mu$ L de glutaraldehído (fijador), se cubrió con papel aluminio e incubó a -4 °C por 20 min, se eliminó el exceso de glutaraldehído y nuevamente se lavó con PBS, se añadieron 250  $\mu$ L de Hoechst, se cubrió con papel aluminio y se incubó -4 °C por 45 min, se eliminó el exceso de Hoechst y nuevamente se lavó y mantuvo con PBS para su montaje. Una vez teñidos y fijados, se tomaron de 10 a 15 ovocitos y se colocaron en un portaobjetos agregando de 1 a 2 gotas de medio de montaje, se cubrió con un cubreobjetos y se selló con barniz para uñas, almacenando para su posterior evaluación.

### 7.13 Evaluación de la fertilización

La fertilización fue evaluada mediante la tinción Hoechst el cual es un colorante que emite fluorescencia azul cuando se une al ADN [99] observando con ayuda de un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axiostar plus),  $\lambda=460$  nm a 400X, considerando los siguientes criterios: ovocitos con un pronúcleo (PN), fueron considerados como activados; con dos PN, considerados como fertilizados monospermicos y; con tres o más PN, tomados como polispermicos. La viabilidad se determinó con MTT, el cual implica la conversión del MTT en formazan insoluble por acción de enzimas mitocondriales, con microscopio óptico a 400X se observó una coloración purpura para los ovocitos viables y sin coloración los no viables [100].



**Figura 6.** Métodos. La imagen muestra forma general el diseño experimental que fue empleado.

### 8. Análisis estadístico

Se realizó un mínimo de tres experimentos por análisis, evaluando de 25 a 30 ovocitos por tratamiento.

Para la FIV se realizó una prueba ANOVA seguida de Tukey para comparar el número de ovocitos fertilizados por tratamiento. Se consideró diferencia estadísticamente significativa a una  $p < 0.05$ .

Para determinar la CE se realizó la prueba T-student.

## 9. Resultados y discusión

El GSH se ha usado indiscriminadamente para la conservación de espermatozoides de diferentes especies debido al papel antioxidante que presenta [88, 89, 91, 101-103]. Sin embargo, no siempre se toma en cuenta que, la oxidación tiene un papel importante en procesos relacionados con la fisiología del espermatozoide, particularmente, en la CE [54, 63, 69, 75, 104]. Por tal motivo, en el presente trabajo se estudió la funcionalidad de los espermatozoides en la FIV sometidos previamente a tratamientos con diferentes concentraciones de GSH.

### 9.1 Análisis seminal

El análisis seminal se realizó a partir de la evaluación de diferentes parámetros como: viabilidad, morfología, concentración y movilidad (tabla 4). Para ello, se evaluaron un total de 4 muestras obteniendo como resultado lo siguiente: en la viabilidad se obtuvo un  $93.5 \pm 1.7\%$  (media  $\pm$  DE) de células vivas, por encima de lo recomendado por Gadea y colaboradores en 2004 y por Bucci y colaboradores en 2012, quienes obtienen un porcentaje de  $84.8 \pm 0.7\%$  y  $91.3 \pm 2\%$  (media  $\pm$  DE) respectivamente [105, 106]; para morfología, el resultado obtenido fue del  $97.7 \pm 0.9\%$  (media  $\pm$  DE) de células normales, de lo cual, González y Ramírez en 2014 encontraron un total de  $68.8 \pm 16.1\%$  (media  $\pm$  DE), sin embargo, Sutkeviciene y colaboradores en 2009 encontraron un  $84.8 \pm 10.3$  a un  $55.0\%$  (media  $\pm$  DE), como mínimo, de

espermatozoides normales para poder lograr la fertilización [107, 108]; finalmente la concentración espermática fue de:  $365.0 \times 10^6 \pm 37.0 \times 10^6$  espermatozoides/mL, para lo cual Tsakmakidis y colaboradores en 2010 señalan que, el rango de una adecuada concentración de muestra de semen porcino debe de ser superior a  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL [109] finalmente, la movilidad se determinó de manera subjetiva verificando que las muestras presentaran como mínimo, un aproximado de 80% de movilidad [110].

**Tabla 4.** Parámetros evaluados en el análisis seminal.

Parámetros evaluados, resultados obtenidos, así como, las referencias que sustentan que las muestras cumplen los parámetros de inclusión n=4.		
Análisis seminal	Parámetros obtenidos	Parámetros recomendados
Viabilidad (V)	$93.5 \pm 1.7$ vivos	>84.8 (Gadea et al, 2004 y Bucci et al, 2012).
Morfología	$97.7 \pm 0.9$ normales	>55 (González y Ramírez, 2014 y Sutkeviciene 2009).
Concentración	$365.0 \times 10^6 \pm 37.0 \times 10^6$ espermatozoides/mL	> $100.0 \times 10^6$ (Tsakmakidis y colaboradores, 2010)
Movilidad	80% movilidad	>80% (Ducolomb, 2004).

Los resultados obtenidos de los parámetros espermáticos indican que, las muestras utilizadas en el presente trabajo cumplen con las recomendaciones para ser consideradas en el presente estudio.

## 9.2 Capacitación espermática

De acuerdo con las especificaciones del vendedor de la muestra de semen, las muestras utilizadas las entregaban diluidas 1:10 en un extensor comercial (Duragen) de “alta duración”, que permitía usar las muestras aun después de 5 días de

almacenamiento, sin embargo, con la finalidad de validar lo anterior, a partir de 3 muestras de semen por día, se determinó la CE por un total de 3 días consecutivos. El día de llegada de la muestra al laboratorio (día 1) se realizó la capacitación espermática, evaluando a tiempo 0 (T0) y después de 4 h de incubación (tiempo final=TF) en medio capacitante, obteniendo los siguientes resultados:  $11.3 \pm 7.7\%$  (media  $\pm$  DE) de espermatozoides capacitados a tiempo cero y un  $54.8 \pm 3.8\%$  (media  $\pm$  DE) de espermatozoides capacitados después de 4 h en medio capacitante; al siguiente día (día 2) se realizó la determinación de la capacitación de la muestra, obteniendo un porcentaje mayor de espermatozoides capacitados a tiempo 0 con un  $45 \pm 27.6\%$  (media  $\pm$  DE) y  $72.3 \pm 19.8\%$  (media  $\pm$  DE) a TF, y finalmente al tercer día (Día 3), el porcentaje de espermatozoides capacitados fue de  $86 \pm 8\%$  (media  $\pm$  DE) a T0, similar a TF, con un porcentaje del  $87.5 \pm 8.4\%$  (media  $\pm$  DE) (tabla 4; gráfica 1). Este análisis logró ser evaluado a partir de la tinción con CTC, el cual permite observar espermatozoides no capacitados con fluorescencia generalizada, capacitados con fluorescencia en acrosoma y pieza media y reaccionados con baja fluorescencia en acrosoma.

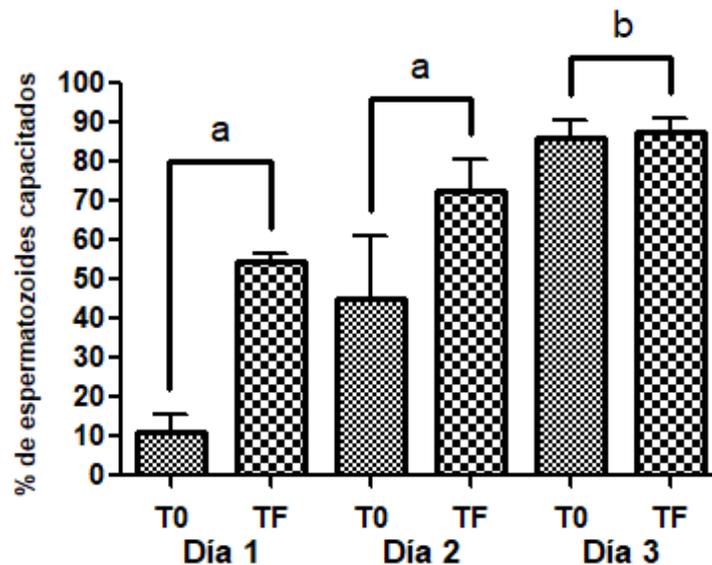


**Figura 7.** Evaluación de la CE por tinción de CTC. Parámetros observados durante la CE: a) Espermatozoide no capacitado, b) capacitado y c) reaccionado. Análisis por CTC a 400X.

El aumento en la CE a tiempo 0 podría deberse a problemas en la manipulación de la muestra, desde la recolección hasta el almacenamiento ya que se sabe que diversos factores influyen en su mantenimiento, como la temperatura, tipo de almacén, así como, el tipo de diluyente [111], Schulze y colaboradores (2015) menciona que el problema más crítico para el procesamiento de semen fresco es la contaminación bacteriana [112], esto provoca un daño en la membrana plasmática y del acrosoma después de 3 días de almacenamiento, Waterhouse y colaboradores (2006) indican que la membrana plasmática del espermatozoide es muy sensible a los cambios de temperatura, no solo durante la congelación, sino también en la conservación, debido a la composición de la membrana [113], como por ejemplo, la cantidad de colesterol comparada con otras especies [114], generando pérdida en la permeabilidad de la membrana, lo que ocasiona un deterioro en la función de proteínas de membrana, esto desregula la entrada y salida de diversas moléculas importantes para el mantenimiento adecuado del espermatozoide en su conservación [114-116]. Green y Whtason reportan que, no solo hay un aumento de fluidez de membrana, sino también, coinciden con lo reportado por Bravo y colaboradores en 2005, quienes mencionan que, además hay variaciones en la fosforilación de tirosinas entre espermatozoides crio-conservados a 5 °C y semen fresco [117, 118] De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que, las muestras de semen solo podían ser utilizadas el día 1, es decir, el día de llegada al laboratorio, ya que, debido a su conservación y manipulación, a partir del día 2, los espermatozoides comienzan a tener CE y RA espontánea, lo que podría interferir con la fertilización del ovocito.

**Tabla 5.** Capacitación espermática en diferentes días.

Evaluación de CE a tiempo cero y a tiempo final de muestras de 1 a 3 días de obtención. n=9.		
Capacitación espermática	Tiempo cero	Tiempo final
Día 1	11.3 ± 7.7 <sup>a</sup>	54.8 ± 3.8 <sup>a</sup>
Día 2	45 ± 27.6 <sup>a</sup>	72.3 ± 19.8 <sup>a</sup>
Día 3	86 ± 8 <sup>b</sup>	87.5 ± 8.4 <sup>b</sup>



**Gráfica 1.** Evaluación de la CE en diferentes días. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE de CE a tiempo 0 (cuadros pequeños) y después de 4 horas (cuadros grandes) en condiciones capacitantes, en muestras con 1 a 3 días de haber sido obtenidas. Las letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas entre tiempo de capacitación y días de almacenamiento  $p < 0.05$ . T-student.

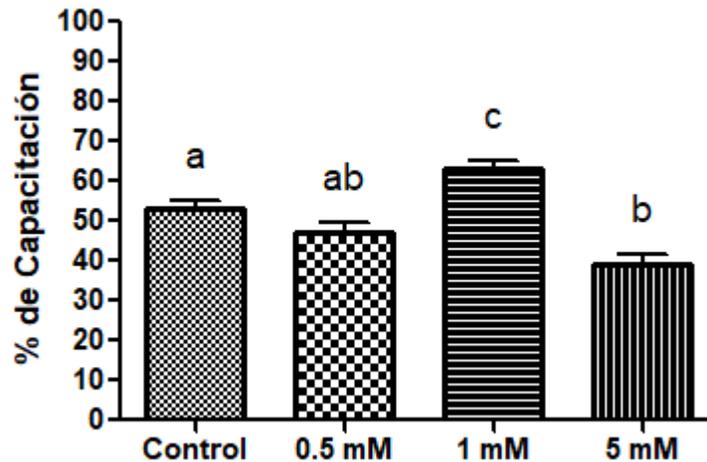
### 9.3 Capacitación espermática con GSH

Para evaluar la FIV con espermatozoides capacitados a diferentes concentraciones de GSH fue necesario evaluar previamente la CE con las concentraciones de GSH a evaluar, para determinar si los porcentajes obtenidos durante la CE tendrían una relación con la FIV de acuerdo con nuestra hipótesis planteada.

A partir de la evaluación de 200 espermatozoides por tratamiento, se obtuvieron los siguientes resultados: para el grupo control, la proporción de espermatozoides capacitados fue del 53%; grupo con una concentración de GSH de 0.5 mM, la proporción de espermatozoides capacitados fue del 47%; grupo con una concentración

de GSH de 1 mM, la proporción de espermatozoides capacitados fue del 63% y finalmente en el grupo con una concentración de GSH de 5 mM, la proporción de espermatozoides capacitados fue del 39%; el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre el grupo control y la concentración de 1 mM y tampoco muestra diferencias entre concentración de 1 mM y 5 mM, sin embargo, a una concentración de 1 mM existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de 1 mM con el grupo control y las otras concentraciones (gráfica 2), estos resultados son similares a lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo [66], mostrando que hay un aumento de CE a una concentración de 1 mM comparado con las demás concentraciones. Lo que resulta muy importante, y confirma la “dualidad” que tiene el GSH, a una concentración de 0.5 mM y 5 mM, en donde se obtiene un menor porcentaje de CE [66]. Un balance generado por una concentración adecuada de GSH (1 mM), propicia un aumento en la fosforilación de tirosinas y una disminución en los grupos sulfhidrilos que, de acuerdo con varios autores, son procesos importantes para que la CE se lleve a cabo [61, 87, 89, 90].

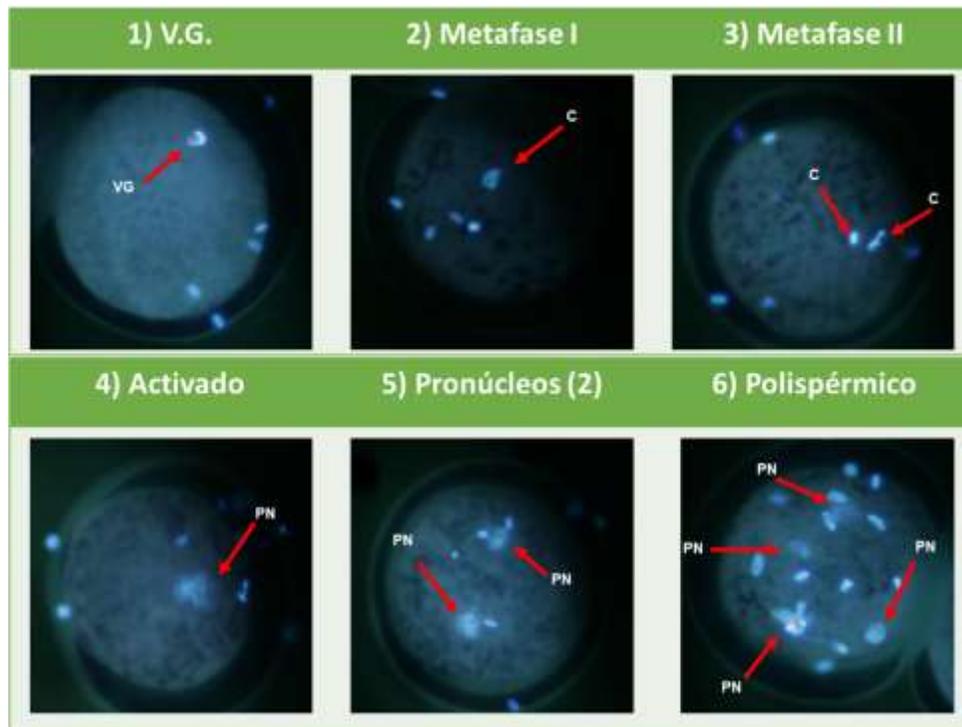
Como ya se mencionó, la CE es un proceso donde las ERO tienen una importante participación, y que al verse disminuidas por consecuencia de una alta concentración de GSH (5 mM), la oxidación disminuye, lo que podría estar afectando el proceso de CE; mientras que a concentración de 1 mM, se mantiene el estado redox en equilibrio permitiendo que la CE se lleve a cabo de forma correcta [66, 85].



**Gráfica 2.** Espermatozoides capacitados con diferentes concentraciones de GSH (0, 0.5, 1 y 5 mM). La barra con cuadros pequeños muestra al grupo control, la barra con cuadros grandes la concentración de 0.5 mM, la barra con líneas horizontales la concentración de 1 mM y la barra con líneas verticales la concentración de 5 mM. El análisis de ANOVA seguido de Tukey muestra diferencias significativas de la concentración de 1 mM entre el control y las demás concentraciones (0.5 y 5 mM) a una  $p < 0.05$ .  $n=3$ .

#### 9.4 Maduración de ovocitos y Fertilización *in vitro*.

Los porcentajes de maduración y fertilización de ovocitos se obtuvieron a partir de la evaluación de un total de 627 ovocitos realizados en 7 ensayos. Del total de ovocitos, al 16% (100 ovocitos), se les catalogó como inmaduros, considerando la presencia de vesícula germinal o de cromosomas en la primera metafase; el 84% (527 ovocitos) fueron considerados como madurados, presentando cromosomas en la segunda metafase y la presencia del primer cuerpo polar, a esta categoría también se le sumaron los ovocitos fertilizados, ya que, un requisito previo a la fertilización es la maduración de los ovocitos (tabla 6). Esta evaluación se realizó a partir de la tinción de Hoechst (figura 7).



**Figura 8.** Evaluación de la etapa del ovocito en la FIV. Estadios del ovocito durante la FIV: 1) VG 2) Metafase I; Madurado: 3) Metafase II, 4) Activado; Fertilizado: 5) Fertilizado y 6) Polispérmico. VG = Vesícula Germinal. PN = Pronúcleo, C = Cromosoma. Evaluación por tinción de Hoechst en microscopio de epifluorescencia a 400X. n=627 ovocitos.

Finalmente, de los 527 ovocitos maduros, el 47% (248 ovocitos) tuvieron la presencia de dos PN, o en el caso de los polispérmicos, más de dos, resultado similar a lo reportado por Ducolomb y colaboradores en 2013, quienes reportan una FIV del 47% [119]. Es importante mencionar que, Kwak y colaboradores en 2012 obtuvieron un mínimo de 32% de FIV en cerdo [120], y otros autores lograron un máximo de 60% de FIV en cerdo (tabla 5) [119, 121]. De acuerdo a los resultados obtenidos y a lo reportado en la literatura, se decidió continuar con la evaluación del GSH sobre la CE en la FIV.

Para la evaluación de viabilidad de los ovocitos se realizó la tinción con MTT, la cual, permite distinguir ovocitos vivos con coloración púrpura y ovocitos muertos sin ser teñidos (figura 8).

**Tabla 6.** Porcentajes de MIV y FIV.

Estandarización de la MIV y FIV obtenida en el laboratorio, comparado con lo reportado en la literatura. n=7		
MIV y FIV	Porcentaje obtenido	Porcentaje reportado
Maduración	84 ± 10.31	76% [122] 84% [120] 77% [119]
Fertilización	47 ± 16.79	32% [120] 60% [121] 44% [119]



**Figura 9.** Evaluación de la viabilidad de los ovocitos por tinción de MTT. Los ovocitos vivos se tiñen de purpura y los muertos no son teñidos. Se evaluaron 627 ovocitos observados a 400X.

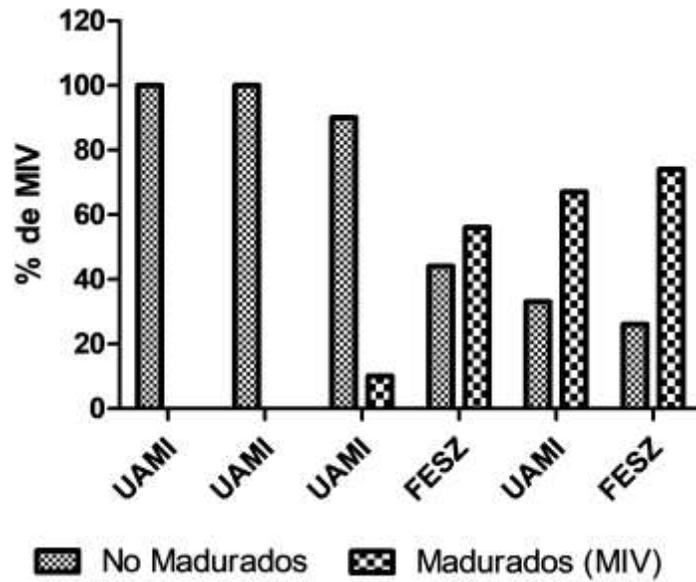
### 9.5 MIV y FIV en otros laboratorios (UAM-I/FESZ)

A consecuencia del terremoto del 19 de septiembre del 2017, el laboratorio y equipo sufrieron daños, sin embargo, se nos prestó un espacio en el edificio R de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), y otro, en la Facultad

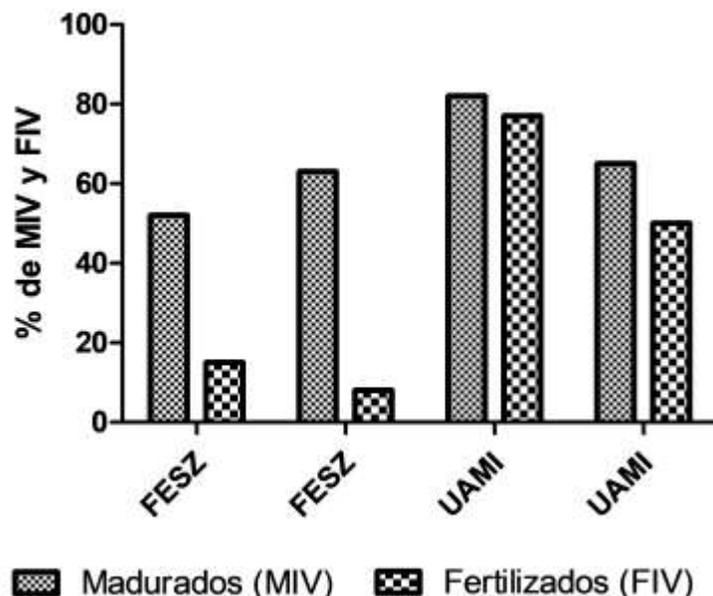
de Estudios Superiores Zaragoza (FESZ) comenzando nuevamente con la estandarización de las técnicas. Primero se realizó la MIV en UAM-I donde en los dos primeros experimentos, se obtuvo un 0% MIV, en el tercero solo se logró un 10%.

Por lo anteriormente expuesto, se decidió trabajar simultáneamente en FESZ obteniendo una MIV del 55 al 75% y posteriormente también en UAM-I se logró obtener una maduración del 67% que, de acuerdo con la literatura citada con anterioridad para MIV, los resultados se consideraron pertinentes para continuar con la FIV (gráfica 3).

Los resultados para la FIV en ambos laboratorios fueron los siguientes: en FESZ los porcentajes obtenidos estuvieron entre el 8 y el 15%, son bajos si los comparamos con la literatura anteriormente citada (44 y el 60% de FIV) [119, 121], mientras que en UAM-I se obtuvieron porcentajes entre el 50% y el 77% similar a lo reportado en la literatura [119, 121]. De acuerdo con los resultados obtenidos en los laboratorios (UAM-I/FESZ), se determinó que, en FESZ el equipo necesario para el manejo y la preparación del semen era inadecuado para tener un buen porcentaje de FIV, ya que es necesario cuidar diversos factores para conservar que el semen fuera eficiente para la FIV, ya que, variaciones en la temperatura, retrasos en el tiempo en el protocolo de la FIV (aunque se trate de tan solo segundos), serían suficientes para disminuir la fertilización [123, 124]. Por ello, se consideró pertinente trabajar en UAM-I, ya que los resultados de MIV y FIV (del 65 al 82% y del 50 al 77% respectivamente) fueron los más adecuados para continuar con los experimentos de acuerdo con la literatura citada con anterioridad (gráfica 4) [119-122].



**Gráfica 3.** MIV en UAM-I y FESZ. La gráfica muestra los porcentajes de MIV en dos diferentes laboratorios donde los porcentajes son adecuados para continuar con la FIV; las barras con cuadros pequeños representan ovocitos inmaduros y las barras con cuadros grandes representan la MIV n=6.



**Gráfica 4.** MIV y FIV en UAMI-I y FESZ. La gráfica muestra los porcentajes de MIV y FIV en dos diferentes laboratorios sin embrago, a pesar de obtener una adecuada maduración, solo en UAMI se logró obtener un porcentaje adecuado de FIV; las barras con cuadros pequeños representan la MIV y las barras con cuadros grandes representan la FIV n=4.

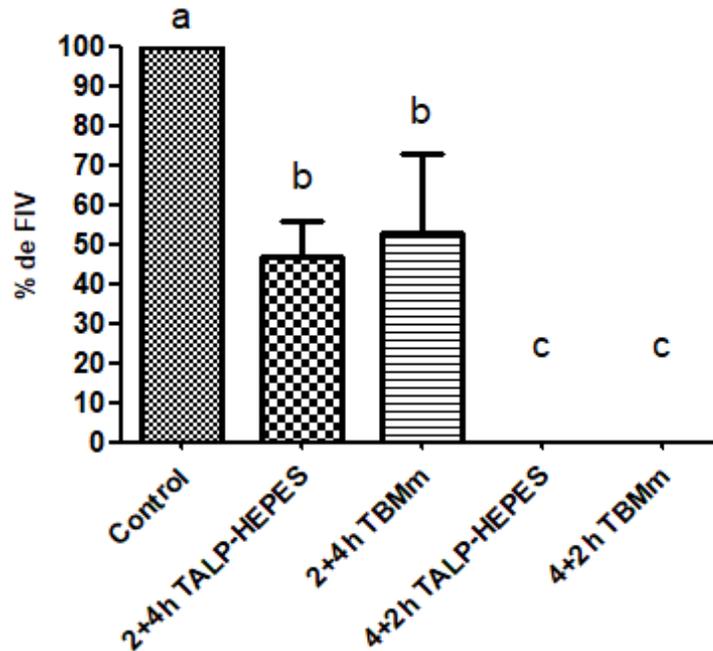
#### 9.6 Comparación de la FIV con espermatozoides capacitados a diferentes tiempos de CE y co-incubación (4 h + 2 h vs 2 h + 4 h)

Para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de GSH durante la CE, evaluada antes de la FIV, fue necesario hacer un ajuste en el tiempo de incubación de CE (solo espermatozoides) para conocer el tiempo mínimo necesario para que el GSH tuviera efecto, por consiguiente, también fue necesario conocer el tiempo de co-incubación (espermatozoide en contacto con ovocito), ya que en el protocolo de laboratorio la CE y la co-incubación es de 6 h continuas.

La CE de cerdo tiene una duración aproximada de 4 h, por lo tanto, se capacitó *in vitro* en medio TALP-HEPES y TBMm por un período de 4 h, posteriormente se co-incubó por 2 h en TBMm para completar el tiempo de FIV (6 h), sin embargo, los porcentajes

de FIV obtenidos fueron de 0% tanto en TALP-HEPES como en TBMm. Por estas razones se decidió hacer la evaluación de la FIV a 2 h de CE más 4 h de co-incubación en TBMm, obteniendo un porcentaje de FIV del 47% y 53% en TALP-HEPES y en TBMm respectivamente de medio capacitante (gráfica 5). Según Rodríguez en 2014, en una evaluación de CE en espermatozoides de cerdo con las mismas concentraciones de GSH indica que no hay diferencias significativas a 1, 2 y 3 h de CE, sin embargo, a las 4 h hay diferencias significativas con un incremento en la CE, es por ello que se decidió capacitar por 2 h y co-incubar 4h.

La participación del GSH es la base de este proyecto, por lo que era necesario determinar si las 2 h de CE serían suficientes para que el GSH tuviera efecto. De acuerdo con lo reportado por Lamirande y colaboradores en 1998, indican que la participación de las ERO durante la CE oscilan entre los 15 y 25 min y estos descienden después de 1 a 2 h, por otro lado mencionan que la adición de moléculas antioxidantes después de 1 h no modifica los porcentajes de CE, por ello, se piensa que el fenómeno de oxido-reducción ocurre al comienzo de la capacitación y no participa en estados posteriores [125, 126].



**Gráfica 5.** FIV a diferentes tiempos de CE y coincubación. El tiempo 4 h de CE en medio TALP-HEPES y en medio TBMm es representada en la trama de cuadros grandes y líneas horizontales respectivamente, más 2 h de coincubación en TBMm. El tiempo 2 h de CE en medio TALP-HEPES y en medio TBMm es representada en la trama de líneas verticales y líneas diagonales respectivamente, más 4 h de coincubación en TBMm. ANOVA seguido de Tukey. Letras indican diferencias significativas entre tiempos a una  $p < 0.05$ . No se muestran diferencias significativas entre medios capacitantes,  $n=3$ .

De acuerdo con estos resultados se continuó con la evaluación de la FIV en un tiempo de 2 h de CE y 4 h de coincubación.

### 9.7 Comparación de la FIV con espermatozoides capacitados con dos diferentes medios capacitantes (TALP-HEPES vs TBMm).

De acuerdo con el protocolo del laboratorio, se utilizó el medio TBMm para capacitar espermatozoides y medio de fertilización, sin embargo, en el laboratorio asociado, el

medio TALP-HEPES es utilizado únicamente para capacitar espermatozoides, por esta razón se realizaron pruebas para determinar si el TBMm podría sustituir al medio TALP-HEPES para la CE, y así evitar utilizar un medio adicional, modificando el protocolo de la FIV del laboratorio, que pudiera modificar la variabilidad en los resultados de la fertilización.

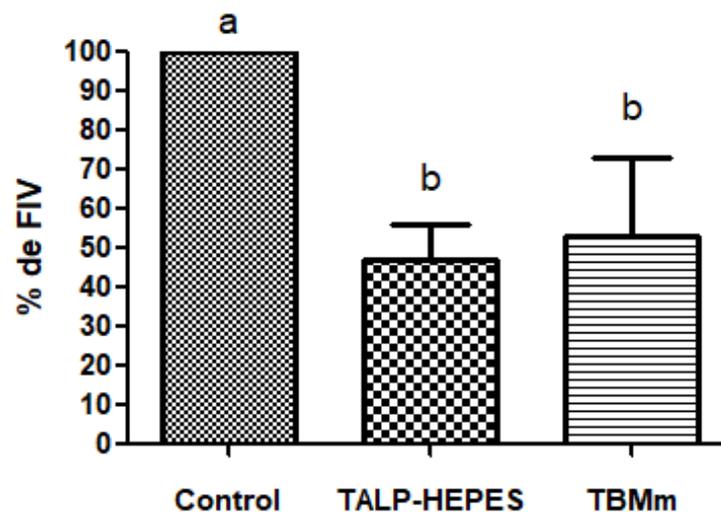
Durante la FIV es necesario utilizar diferentes medios de cultivo para lograr el éxito de la fertilización: medio para lavado de ovocitos (HEPES), medio de MIV (TCM-199), medio de CE (TBMm), medio de FIV (TBMm), así como, medio de desarrollo (NCSU-23); todo ello se trabaja en conjunto para obtener ovocitos fertilizados, sin embargo, dependiendo del laboratorio, estos protocolos van cambiando tanto del tipo de medio como en la cantidad de cada reactivo, que lo conforman [127]. De manera particular, los medios de capacitación suelen ser medios amortiguadores, es decir, que mantienen una determinada osmolaridad (280-300 mOsm/kg) y pH (7.2-7.4), esto es obtenido a partir de la adición de HEPES, fosfato o bicarbonato, además de diversos reactivos que van determinando el medio necesario para la CE, y esto varía entre protocolos ya que este medio al añadir otros reactivos también podría ser útil para FIV [128].

En el caso de la maduración de ovocitos, diferentes casas comerciales pueden proveer de diversos medios de maduración, entre los más comunes se encuentran: NCSU23 (North Carolina State University-23), NCSU37 (North Carolina State University-37) y TCM199 (Medio de cultivo de tejidos-199) que además pueden ser suplementados por otros compuestos como cisteína y factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés, EGF) para aumentar el porcentaje de MIV. Para la FIV, los medios que son mayormente utilizados son: TBMm (Medio amortiguado con Tris modificado), TCM-199, medio de Tiroide modificado (TALPm) y el medio de Whitten modificado (WMm) [83].

Para determinar el grado de CE por ambos medios (TALP-HEPES y TBMm) se continuó con la evaluación de FIV con espermatozoides previamente capacitados por un período de 2 h de CE y 4 h de coincubación en TBMm para determinar cuál era el que ayudaba al espermatozoide a tener una mejor capacidad fertilizante, encontrando

que el TBMm tuvo un mayor porcentaje de FIV (53%) en comparación con el medio TALP-HEPES (47%) sin encontrar diferencias (gráfica 6).

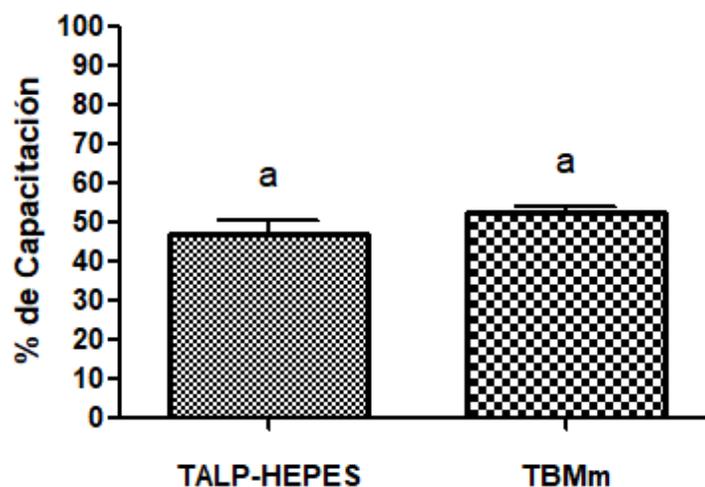
La composición de los medios TBMm y TALP-HEPES observan diferencias en su composición, suplementación y tiempo de preparación para adaptarlos y poder utilizarlos en la CE (en el caso del TBMm y TALPHEPES) y posterior FIV (solo en el caso del TBMm) sin embargo, diversos estudios [46, 83, 129, 130] consideran al TBMm como un medio donde los espermatozoides logran alcanzar una adecuada capacitación para después fertilizar al ovocito, este medio ha sido estandarizado y usado en diferentes laboratorios que comprueban su eficacia, ya que al considerarse un medio definido se puede conocer, el reactivo y la cantidad que conforma al medio a diferencia de los medios no definidos, por ello se consideró pertinente sustituir al medio TALP-HEPES por medio TBMm para la CE y posterior FIV sin que el protocolo de laboratorio se viera modificado [46, 119].



**Gráfica 6.** FIV con TALP-HEPES y TBMm. La gráfica muestra los resultados obtenidos de la FIV con espermatozoides previamente capacitados con los diferentes medios a evaluar (TALP-HEPES vs TBMm). La trama con cuadros grandes muestra la evaluación del medio TALP-HEPES, la trama de líneas horizontales muestra la evaluación del medio TBMm. ANOVA seguido de Tukey. No se muestran diferencias significativas entre tiempos  $p < 0.05$ ,  $n=3$ .

## 9.8 Capacitación espermática con TALP-HEPES y TBMm

Para sustentar los resultados, se realizó la capacitación espermática con los dos medios, encontrando que hay un mayor porcentaje de capacitación en TBMm, sin embargo, el análisis estadístico (t-Student) indicó que no hay diferencias entre ambos medios (gráfica 7). Con este resultado se sugiere utilizar el mismo medio de fertilización (TBMm) para capacitar con las diferentes concentraciones de GSH a evaluar.



**Gráfica 7.** Evaluación de la CE en TALP-HEPES y TBMm. Para sustentar los resultados de la FIV, se evaluó la CE con ambos medios. Con cuadros pequeños muestra la CE en TALP-HEPES y la barra con trama con cuadros pequeños muestra la CE en TBMm. Las barras indican promedio  $\pm$  DE de los medios de CE. No hay diferencias significativas.  $n=3$ .

Estos resultados permitieron continuar con la FIV capacitando a los espermatozoides por 2 h en medio de TBMm y 4 h de coincubación en medio TBMm.

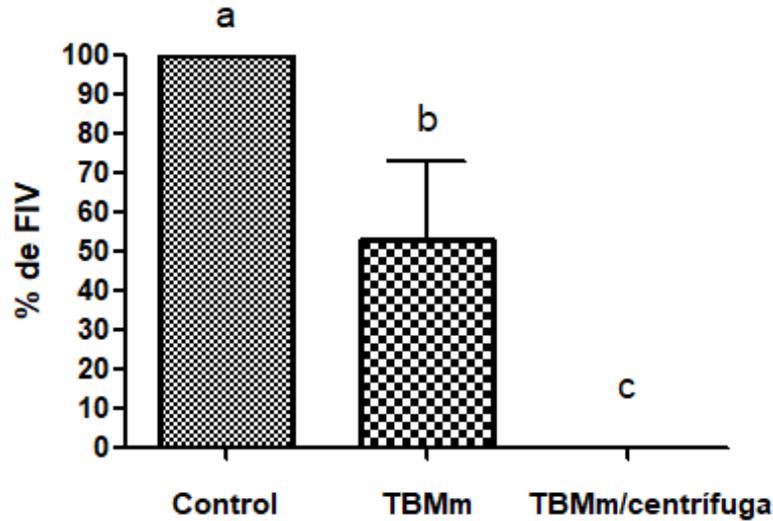
## 9.9 FIV con espermatozoides capacitados y lavados para FIV

Los espermatozoides que serían capacitados con las diferentes concentraciones de GSH (0, 0.5, 1 y 5 mM) debían ser lavados previamente a la FIV, para no añadir medio capacitante, con GSH al medio de FIV (TBMm) con los ovocitos y que ello no pudiera interferir en nuestros datos. El resultado obtenido en la FIV con espermatozoides previamente lavados fue de 0% en comparación con el grupo control 100% y con espermatozoides sin lavar con 58% (gráfica 8). Es bien sabido que, durante la FIV, es necesario eliminar el plasma seminal de los espermatozoides ya que contiene componentes de recubrimiento que se adhieren firmemente a la superficie del espermatozoide inhibiendo su capacidad de fertilización [131]. Sin embargo, en un estudio sobre los diferentes factores de estrés físico en el espermatozoide indican que, la centrifugación a 200 g no afecta la movilidad espermática, ni la integridad de la membrana plasmática, sin embargo, a una fuerza de centrifugación mayor de 600 g la viabilidad espermática disminuye, e inclusive un pipeteo excesivo es considerado como un factor que disminuye la calidad espermática, tales manipulaciones mecánicas sobre el espermatozoide, generan un aumento de las condiciones basales de ERO [132]

El aumento de ERO genera daño en los espermatozoides producido por un estrés oxidante que genera desequilibrio de antioxidantes y oxidantes, donde estos últimos son favorecidos [133]. Tal desequilibrio provoca entre otras cosas, daño al ADN, proteínas y peroxidación de moléculas lipídicas [133] también se asocia a una interrupción en el acoplamiento en la fuga de electrones con la fosforilación oxidativa, esto disminuye el potencial de membrana mitocondrial necesario para la producción de ATP, la baja de ATP produce una disminución de energía necesaria para la movilidad del espermatozoide [134].

Estos resultados de una nula FIV pueden ser atribuidos a que los espermatozoides son centrifugados y resuspendidos, una vez más, a lo establecido en el protocolo del laboratorio (lavado con DPBS) a 1900 g. Estos lavados (centrifugaciones) son un preparativo que, a través de un gradiente de densidad permiten eliminar parcialmente

plasma seminal que recubre a los espermatozoides, el cual contiene componentes que estabilizan la membrana del espermatozoide conocidos como FD, por lo que, probablemente, una centrifugación más podría eliminar totalmente los FD, esto, podría desestabilizar la membrana espermática, generando cambios de superficie como modificación o liberación de moléculas que promueven una CE prematura [135], se coincide con lo reportado por [136] donde mencionan que una centrifugación adicional puede aumentar la concentración de ERO siendo perjudicial para el espermatozoide. Fischer y colaboradores en 2007 indican que, durante la centrifugación hay un aumento en la temperatura lo que puede alterar la calidad de los espermatozoides sugiriendo disminuir la velocidad y el tiempo de centrifugado [137]. Además, en algunas especies se han identificado diferentes moléculas en el plasma seminal que participan en la estabilización del acrosoma, lo cual ayuda a la protección del espermatozoide para evitar una RA prematura, generando una inhibición en la unión con el ovocito [138]. Mahfouz y colaboradores en 2010 indican que la disminución en la calidad espermática se debe a un aumento en la actividad de la SOD que se encarga de convertir el  $\cdot O_2^-$  en  $H_2O_2$ , el cual es uno de los ERO más dañinos para el espermatozoide [133]. Por lo que es importante considerar a la manipulación física como una variable que puede afectar la medición de parámetros en los espermatozoides e indica, la importancia de ser cuidadosos en los protocolos para manejo de espermatozoides y de FIV.



**Gráfica 8.** Evaluación del lavado de espermatozoides después de la CE para FIV. Los espermatozoides sin centrifugar son presentados en la barra de cuadros grandes y los espermatozoides centrifugados son presentados en la barra con líneas horizontales. ANOVA seguido de Tukey. Se muestran diferencias significativas entre espermatozoides centrifugados y no centrifugados  $p < 0.05$ .  $n = 3$

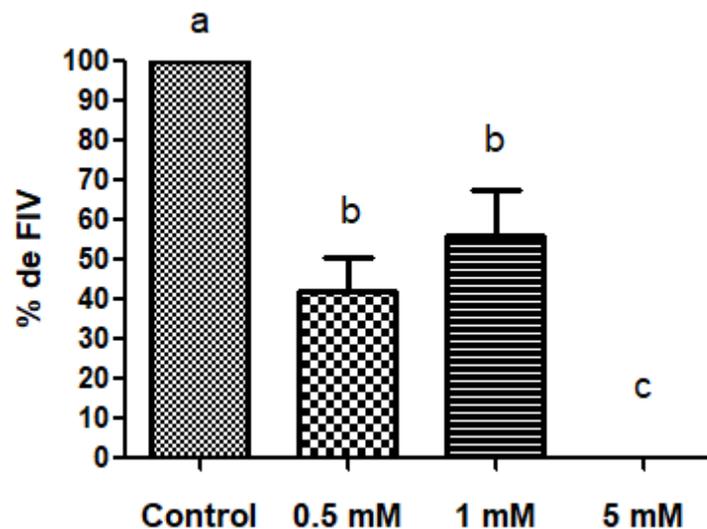
Conforme a los resultados obtenidos, fue necesario analizar los diferentes obstáculos que se presentaron en el proyecto y, finalmente proponer un protocolo de CE y FIV que cumpliera con nuestras necesidades para cumplir con nuestro segundo objetivo: “Evaluar la fertilización in vitro de ovocitos porcinos usando espermatozoides capacitados con las concentraciones de GSH: 0 mM (control), 0.5 mM, 1 mM y 5 mM”.

#### 9.10 FIV con espermatozoides capacitados con diferentes concentraciones de GSH

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que, para satisfacer los objetivos del proyecto era necesario hacer una CE de 2 h en TBMm con las diferentes concentraciones de GSH y tomar una concentración de  $5 \times 10^5$  espermatozoides por mL para la coincubación en TBMm con ovocitos.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: para la concentración de 0.5 mM de GSH se obtuvo un porcentaje de FIV del 37%; para la concentración de 1 mM de GSH se obtuvo un porcentaje de FIV del 47% y para la concentración de 5 mM se obtuvo un porcentaje de FIV del 0% (Gráfica 9). El análisis estadístico indica que, no hubo diferencia significativa entre la concentración de 0.5 mM y 1 mM, pero sí hubo diferencias de ambos con el control, mientras que, en la concentración de 5 mM al no presentar porcentaje alguno de FIV fue diferente tanto al control como a las demás concentraciones.

De acuerdo con los resultados obtenidos de CE con las diferentes concentraciones de GSH, se puede mencionar que los resultados mostrados en la gráfica 9, se observa una tendencia similar a los porcentajes mostrados en la gráfica 3 (Capacitación espermática con diferentes concentraciones de GSH), a pesar de que la gráfica fue normalizada, ya que hay un mayor porcentaje de FIV en la concentración de 1 mM, la FIV disminuye en la concentración de 0.5 mM y la FIV está ausente en la concentración de 5 mM.



**Gráfica 9.** FIV con espermatozoides capacitados con GSH. La gráfica muestra la FIV con espermatozoides previamente capacitados con 0.5 mM de GSH (cuadros grandes), 1 mM (líneas horizontales) y 5 mM (líneas verticales). El análisis de ANOVA seguido de Tukey muestra diferencias estadísticamente significativas con letras diferentes a una  $P < 0.05$ .  $n=4$

A pesar de no tener un porcentaje mayor al grupo control, se puede afirmar que, aunque no existan diferencias significativas con la concentración de 0.5 mM de GSH, la concentración de 1 mM, tiene un mayor porcentaje de FIV, confirmando nuestra hipótesis, ya que se observa una tendencia similar a los resultados obtenidos en las concentraciones de GSH evaluadas en la CE.

Tobón en 2014 [66], determinó que a una concentración de 1 mM de GSH se obtenía un mayor porcentaje de espermatozoides a diferencia de otras concentraciones (0, 0.5 y 5 mM de GSH) indicando que a una concentración baja (0.5 mM) de GSH provoca un desequilibrio que produce daño celular e influye de manera negativa en la calidad espermática, mientras que a concentraciones altas (5 mM), la cantidad de ERO disminuye, por consiguiente, también disminuirá la cantidad de oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas afectando el proceso de CE [139] demostrando que, a pesar de que los antioxidantes son benéficos para la célula, también es necesario de las ERO para mantener un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes para que el espermatozoide lleve a cabo la CE de forma correcta, dado que es importante la disminución en la oxidación de grupos sulfhidrilos y un aumento en la fosforilación de tirosinas que, de acuerdo con la literatura, son procesos determinantes para la CE [140, 141].

Como ya se mencionó, durante la CE la fosforilación de tirosinas aumenta y esto es de suma importancia ya que estas proteínas en la membrana plasmática del espermatozoide, permiten iniciar la RA y la unión a la ZP para iniciar la fertilización [142] aunque no es del todo claro tal mecanismo. Asquith y colaboradores en 2004 identificaron sobre la membrana plasmática de la superficie de la cabeza del espermatozoide a dos proteínas que se encontraban fosforiladas en residuos de tirosina y que participaban en la unión a la ZP, por lo tanto sugirieron que la activación de tales proteínas durante la CE desencadena cambios conformacionales que permiten crear un complejo de unión espermatozoide-ovocito durante la fertilización [143].

Mediante estudios *in vitro* se determinó que hay una supresión en la fosforilación de tirosinas por células oviductales, retrasando la CE, esto le permite modular al oviducto la CE para sincronizar la ovulación y permitir la fertilización [144].

Una vez que el espermatozoide se somete de manera adecuada a aquellos cambios bioquímicos y fisiológicos que le permiten capacitarse, podrá interactuar de forma específica con el ovocito, fertilizando y activando una cadena de eventos que conducen a la formación del cigoto, feto y, finalmente, un nuevo individuo [145, 146]. Toasti y colaboradores en 2016, mencionan que la capacitación es un proceso de múltiples pasos, que implica cambios en la forma y función del espermatozoide que, además, permite interactuar con el ovocito para ser atraído hacia él (quimiotaxis), unirse al ovocito, generar RA y producir la activación del ovocito, dando como resultado una fertilización exitosa que no ocurriría si la CE no se llevara a cabo [147]. Se puede mencionar que un aumento en la CE producido por una concentración de 1 mM permite aumentar la FIV en ovocitos porcinos.

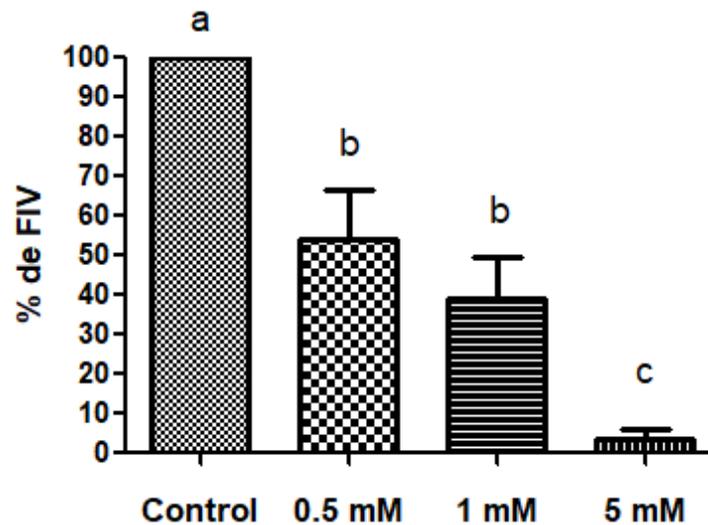
#### 9.11 FIV en coincubación de espermatozoides y ovocitos con diferentes concentraciones de GSH

Como complemento de esta investigación se decidió hacer la FIV en coincubación, es decir, se agregó el GSH en el TBMm interactuando tanto con el espermatozoide como el ovocito, esto se realizó debido a que se obtuvo un bajo porcentaje en la FIV con espermatozoides capacitados previamente. Como ya se discutió en el apartado anterior, esta exposición y manipulación previa de los espermatozoides podría estar disminuyendo los porcentajes de FIV en las concentraciones de GSH evaluadas.

Los resultados de la coincubación obtenidos fueron los siguientes: el porcentaje de FIV usando una concentración de 0.5 mM de GSH fue de 65%, mientras que el porcentaje de FIV usando una concentración de 1 mM de GSH fue de 48% y finalmente el porcentaje de FIV en la concentración de 5 mM de GSH obtuvo solo el 6% (gráfica 10). El análisis estadístico indica que, no hubo diferencias significativas entre la

concentración de 0.5 mM y 1 mM, pero sí hubo diferencias de ambos respecto al control, mientras que en la concentración de 5 mM presenta diferencias significativas con el control y con ambas concentraciones.

A diferencia de la gráfica 9, la gráfica de coincubación muestra una tendencia dosis dependiente, ya que conforme va aumentando la concentración de GSH la FIV disminuye, esta puede deberse a que el GSH interactúa con ambos gametos; diferentes estudios han reportado lo que el GSH produce en el espermatozoide a diferentes concentraciones y en diferentes especies [87, 88, 90, 148], sin embargo, es importante analizar lo que el GSH produce en el ovocito y si el GSH interviene en los porcentajes de FIV.



**Gráfica 10.** FIV en coincubación con GSH. La gráfica muestra la FIV en coincubación con 0.5 mM de GSH (cuadros grandes), 1 mM (líneas horizontales) y 5 mM (líneas verticales). El análisis de ANOVA seguido de Tukey muestra diferencias estadísticamente significativas con letras con diferentes a una  $P < 0.05$ .  $n=4$ .

Yoshida y colaboradores en 1993 determinaron que la concentración de GSH es crucial para la maduración y posterior formación del pronúcleo masculino en cerdos, indicando que, la adición de una concentración de 0.57 mM de GSH es la óptima para que tales procesos ocurran, explican que durante la espermatogénesis y la maduración epididimaria hay un proceso de alta compactación de ADN por enlaces disulfuro de las

protaminas y que una vez que el espermatozoide fertiliza al ovocito, estos enlaces deben de reducirse para la descondensación del ADN, determinando que a tal concentración (0.57 mM de GSH) hay un mayor poder reductor promoviendo la formación del pronúcleo masculino [149].

Sin embargo, Bleil y Wassarman determinaron que a concentraciones altas de GSH disminuye la FIV en ratón debido a modificaciones estructurales en el espacio perivitelino y en la ZP por un aumento en la oxidación de grupos disulfuro [150], Takeo y colaboradores en 2011 explican que las glicoproteínas que conforman a la ZP (ZP1, ZP2, y ZP3) contienen residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro dándole a la ZP mayor estabilidad estructural, por lo que un cambio conformacional en la ZP altera la interacción de proteínas de membrana del ovocito limitando su unión con el espermatozoide para su fertilización [151]. Por el contrario, una concentración baja de GSH provoca un aumento en la rigidez de la ZP, esto es producido por una alta cantidad de grupos disulfuro, que no son reducidos a grupos sulfhidrilos por el GSH, lo que genera un endurecimiento de la ZP inhibiendo la penetración de espermatozoides [152].

Takeo y colaboradores en 2011 determinaron en estudios con ratones, que a una concentración de 1 mM de GSH en medio de fertilización, se obtiene un mayor porcentaje de FIV comparado con otras concentraciones, esto lo asocian como ya se mencionó, a que el GSH reduce enlaces disulfuro aumentando la concentración de grupos sulfhidrilos disminuyendo el endurecimiento de la ZP sin afectar el cambio estructural de proteínas en la ZP necesario para la FIV [153].

Ishizuka y colaboradores en 2013 determinaron la influencia del GSH en medio de fertilización en ratones, mostrando que con la concentración de 1 mM se obtienen mayores porcentajes en comparación con el grupo control (0 mM) y a una concentración de 2 mM, aunque en esta última no se observaron diferencias significativas, señalan que hay una disminución en la tasa de blastocisto, concluyendo que una alta concentración de GSH no solo disminuye los porcentajes de FIV, sino además, afecta el desarrollo embrionario [154]. Estos datos fueron similares a lo reportado por Luvoni y colaboradores en 1996 en bovinos, mostraron que al adicionar

1 mM en un medio definido el porcentaje de blastocistos aumenta [155]. Sin embargo, estudios en gatos, la concentración de 1 mM no causó efectos positivos durante la FIV [156] por lo que la concentración de GSH para aumentar la FIV varía entre diferentes especies de mamíferos.

En el presente estudio, se demostró que una concentración de 0.5 mM y 1 mM hay un aumento en los porcentajes de FIV en comparación que a una concentración de 5 mM de GSH en la cual, se obtiene el porcentaje más bajo de FIV, similar a lo reportado por Jeong y colaboradores en 2001 donde determinaron en cerdos que durante la MIV y FIV las concentraciones de GSH varían y que una alta concentración de GSH no solo afecta la fertilización sino además influye de manera negativa en el desarrollo del cigoto [157]. Esto indica que, las ERO pueden afectar la CE, MIV, FIV y el desarrollo embrionario, sin embargo, pueden ser necesarias a una concentración adecuada, ya que, el sistema antioxidante podría mantener un equilibrio, y favorecer que, los procesos ocurran de forma adecuada. Sin embargo, el papel del GSH para mejorar la FIV en coincubación aún no es entendido por completo.

## 10. Conclusiones

- El GSH a una concentración de 1 mM incrementa la CE y a concentración de 5mM la disminuye.
- El GSH a una concentración de 0.5 mM y 1 mM con una duración de 2 h de incubación para la CE y 4 h de incubación para la FIV, favorece la eficiencia de la FIV y a concentración de 5mM la disminuye.
- El GSH a una concentración de 0.5 a 1 mM con una duración de 6 h de coincubación de espermatozoides con los ovocitos, favorece la eficiencia de la FIV y a concentración de 5mM la disminuye.

## 11. Bibliografía

1. Kiyotaka Toshimori, E.E., *The Spermatozoon*. Knobil and Neill's physiology of reproduction, 2015. **1**(Gulf Professional Publishing.): p. 50.
2. Griswold, M.D., *Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis*. *Physiol Rev*, 2016. **96**(1): p. 1-17.
3. Eddy, E. and D. O'Brien, *The spermatozoon*. Knobil and Neill's physiology of reproduction, 2006. **1**: p. 3-54.
4. Marina, S., *Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas*. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 2003. **20**(4): p. 213-225.
5. del Pilar Ruiz, M., *Regulación hormonal de los procesos reproductivos*. Manual de bases biológicas del comportamiento humano.
6. Griswold, M.D., *Spermatogenesis: the commitment to meiosis*. *Physiological reviews*, 2015. **96**(1): p. 1-17.
7. Rodríguez-Tobón, A., *Análisis macro y micro estructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus**. 2011, in *Universidad Autónoma Metropolitana México*.
8. González, M.B.R.E.B. and E.C.H.Y.D. Ramírez, *Maduración de gametos y fertilización en mamíferos*. *Biología celular y molecular*, 2003: p. 912.
9. Hinton, B.T., et al., *How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum?* *Journal of andrology*, 2011. **32**(6): p. 558-564.
10. Guo, W., et al., *Identification and characterization of ERp29 in rat spermatozoa during epididymal transit*. *Reproduction*, 2007. **133**(3): p. 575-584.
11. Joseph, A., B.D. Shur, and R.A. Hess, *Estrogen, efferent ductules, and the epididymis*. *Biology of reproduction*, 2011. **84**(2): p. 207-217.
12. Shum, W.W., et al., *Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk*. *Journal of Experimental Biology*, 2009. **212**(11): p. 1753-1761.

13. Gervasi, M.G. and P.E. Visconti, *Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation*. *Andrology*, 2017. **5**(2): p. 204-218.
14. Tobón, A.R., E. Arena-Ríos, and M.A. León-Galván, *El almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo, adaptación que permite sincronizar el periodo de apareamientos en murciélagos*. *ContactoS*, 2010. **78**: p. 58-64.
15. Lodish, H., *Biología celular y molecular*. 2005: Ed. Médica Panamericana.
16. Navarro, N.C. and A.S.J. Salas, *Anatomía y fisiología de la eyaculación. Clasificación de los trastornos de la eyaculación*.
17. Revenig, L., A. Leung, and W. Hsiao, *Ejaculatory physiology and pathophysiology: assessment and treatment in male infertility*. *Translational andrology and urology*, 2014. **3**(1): p. 41.
18. de Lamirande, E. and C. Gagnon, *Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003. **35**(10): p. 1271-1285.
19. Mas, M., *Actualización de la fisiología de la eyaculación. Definición, prevalencia y etiología de la eyaculación precoz*. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 2014. **40**: p. 3-10.
20. Austin, C., *Observations on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1951. **4**(4): p. 581-596.
21. Chang, M.C., *Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes*. *Nature*, 1951. **168**: p. 697.
22. Jin, S.-K. and W.-X. Yang, *Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?* *Oncotarget*, 2017. **8**(2): p. 3600.
23. De Jonge, C., *Biological basis for human capacitation*. *Hum Reprod Update*, 2005. **11**(3): p. 205-14.
24. Visconti, P.E., *Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(3): p. 667-668.

25. De Jonge, C., *Biological basis for human capacitation*. Human Reproduction Update, 2005. **11**(3): p. 205-214.
26. Leahy, T. and B.M. Gadella, *New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane*. Asian journal of andrology, 2015. **17**(4): p. 561-567.
27. Salicioni, A.M., et al., *Signalling pathways involved in sperm capacitation*. Society of Reproduction and Fertility supplement, 2007. **65**: p. 245.
28. LEFIÈVRE, L., et al., *Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction*. Journal of andrology, 2002. **23**(5): p. 709-716.
29. López-González, I., et al., *Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation*. Molecular human reproduction, 2014. **20**(7): p. 619-629.
30. Olivera, M., et al., *El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 2006. **19**(4): p. 426-436.
31. Harvey M. Florman, R.A.F., *Fertilization in Mammals*. Knobil and Neill's physiology of reproduction, 2015. **1**: p. 2684.
32. Young, J. and A.S. McNeilly, *Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle*. Reproduction, 2010. **140**(4): p. 489-504.
33. Yanagimachi, R., *Mammalian fertilization*. In 'The physiology of reproduction'.(Eds E. Knobil and JD Neill.) pp. 189–317. 1994, Raven Press: New York.
34. Simons, J. and L. Fauci, *A model for the acrosome reaction in mammalian sperm*. Bulletin of mathematical biology, 2018. **80**(9): p. 2481-2501.
35. Felipe, J.C. and M. Horacio, *Biología celular y molecular*. F. Jimrnez, & H. Merchant, Biología Celular y Molecular, 2003.
36. Gonzalez-Añover, P., et al., *Advanced onset of puberty in gilts of thrifty genotype (Iberian pig)*. Reproduction in domestic animals, 2010. **45**(6): p. 1003-1007.
37. Liu, Y., et al., *Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary*. Developmental biology, 2007. **306**(1): p. 112-120.
38. Porrás-Gómez, T.J. and N. Moreno-Mendoza, *Neo-oogenesis in mammals*. Zygote, 2017. **25**(4): p. 404-422.

39. Howles, C.M., *Role of LH and FSH in ovarian function*. Molecular and cellular endocrinology, 2000. **161**(1-2): p. 25-30.
40. Virant-Klun, I., *Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings*. Stem cells and cloning: advances and applications, 2015. **8**: p. 49.
41. Baerwald, A.R., G.P. Adams, and R.A. Pierson, *Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review*. Human Reproduction Update, 2012. **18**(1): p. 73-91.
42. Tajima, K., et al., *Role of granulosa and theca cell interactions in ovarian follicular maturation*. Microscopy research and technique, 2006. **69**(6): p. 450-458.
43. Paulini, F., et al., *Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals*. Journal of ovarian research, 2014. **7**(1): p. 102.
44. Young, J.M. and A.S. McNeilly, *Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle*. 2010. **140**(4): p. 489.
45. Georgadaki, K., et al., *The molecular basis of fertilization (Review)*. Int J Mol Med, 2016. **38**(4): p. 979-86.
46. Betancourt, M., R. Fierro, and D. Ambriz, *In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro*. Theriogenology, 1993. **40**(6): p. 1155-1160.
47. Gupta, S.K., et al., *Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization*. Cell Tissue Res, 2012. **349**(3): p. 665-78.
48. Stein, K.K., P. Primakoff, and D. Myles, *Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane*. Journal of cell science, 2004. **117**(26): p. 6269-6274.
49. Trejo Albarrán, R.B.R., C.H. Miguel, and M.M. Eduardo, *Los gametos: células reproductoras de los mamíferos*. 2005.
50. Florman, H.M. and T. Ducibella, *Fertilization in mammals*. Knobil and Neill's physiology of reproduction, 2006. **1**: p. 149-96.
51. Liu, M., *The biology and dynamics of mammalian cortical granules*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 149.
52. Florman, H.M. and T. Ducibella, *Fertilization in mammals*. Knobil and Neill's physiology of reproduction, 2006. **3**: p. 55-112.

53. Anifandis, G., et al., *Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions opinions relative to in vitro fertilization (IVF)*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(7): p. 12972-12997.
54. Arenas-Ríos, E., et al., *Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática*. Revista Iberoamericana deficiencias, 2014. **1**: p. 73.
55. de Lamirande, E., et al., *Reactive oxygen species and sperm physiology*. Reviews of reproduction, 1997. **2**(1): p. 48-54.
56. Halliwell, B., *Free radicals and antioxidants – quo vadis?* Trends in Pharmacological Sciences, 2011. **32**(3): p. 125-130.
57. Poljsak, B., D. Šuput, and I. Milisav, *Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 956792.
58. Poljsak, B., D. Šuput, and I. Milisav, *Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2013. **2013**.
59. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Experimental Physiology, 1997. **82**(2): p. 291-295.
60. Poljsak, B. and I. Milisav, *The neglected significance of “antioxidative stress”*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2012. **2012**.
61. Homa, S.T., et al., *Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2015. **32**(5): p. 757-764.
62. Aitken, R.J., et al., *Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa*. Biology of reproduction, 1998. **59**(5): p. 1037-1046.
63. Aitken, R.J., et al., *Oxidative stress and male reproductive health*. Asian journal of andrology, 2014. **16**(1): p. 31.
64. O’Flaherty, C., *Redox regulation of mammalian sperm capacitation*. Asian journal of andrology, 2015. **17**(4): p. 583.

65. de Lamirande, E. and C. Cagnon, *Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process*. Free Radical Biology and Medicine, 1993. **14**(2): p. 157-166.
66. Tobón, E.R., *El papel del glutatión reducido (GSH) en el proceso de capacitación en el espermatozoide de cerdo sus scrofa domesticus*. 2014, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa: CDMX.
67. Arenas-Ríos, E., *Enzimas anti-especies reactivas de oxígeno, como reguladores en los procesos de espermatogénesis maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago Corynorhinus mexicanus..* 2009. Universidad Autónoma Metropolitana México.
68. Koppers, A.J., et al., *Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(8): p. 3199-207.
69. Agarwal, A., et al., *Effect of oxidative stress on male reproduction*. The world journal of men's health, 2014. **32**(1): p. 1-17.
70. Hecht, D. and Y. Zick, *Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate in vitro*. Biochemical and biophysical research communications, 1992. **188**(2): p. 773-779.
71. Leclerc, P., E. De Lamirande, and C. Gagnon, *Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives*. Free Radical Biology and Medicine, 1997. **22**(4): p. 643-656.
72. Rivlin, J., et al., *Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction*. Biology of reproduction, 2004. **70**(2): p. 518-522.
73. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis*. Molecular aspects of medicine, 2009. **30**(1-2): p. 42-59.
74. Luberda, Z., *The role of glutathione in mammalian gametes*. Reprod Biol, 2005. **5**(1): p. 5-17.
75. Cárdenas-Rodríguez, N., O. Medina-Campos, and J. Pedraza-Chaverrí, *Glutati6n peroxidasas: una familia de enzimas*. Radicales libres y estr6s oxidativo. Aplicaciones m6dicas. Ed. Konigsberg M. M6xico: El Manual Moderno, 2008: p. 201-217.

76. Gadea, J., et al., *Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa*. International journal of andrology, 2008. **31**(1): p. 40-49.
77. Chatterjee, S., E. de Lamirande, and C. Gagnon, *Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione*. Molecular reproduction and development, 2001. **60**(4): p. 498-506.
78. Martínez Sarrasague, M., et al., *Conceptos actuales del metabolismo del glutati3n Utilizaci3n de los is3topos estables para la evaluaci3n de su homeostasis*. Acta bioqu3mica cl3nica latinoamericana, 2006. **40**(1): p. 45-54.
79. Atig, F., et al., *Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men*. BMC urology, 2012. **12**(1): p. 1.
80. (OMS), O.M.d.I.S. *Prevalencia de discapacidad moderada y severa (en millones), por condici3n de salud l3der asociada con discapacidad, y por edad y estado de ingresos de los pa3ses 2018* [cited 2018 23 de noviembre de 2018]; Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>.
81. Abbara, A., S.A. Clarke, and W.S. Dhillon, *Novel Concepts for Inducing Final Oocyte Maturation in In Vitro Fertilization Treatment*. Endocr Rev, 2018. **39**(5): p. 593-628.
82. Delgado, J.V., et al., *El cerdo Pel3n Mexicano, una raza en peligro*. Archivos de zootecnia, 2005. **54**(206): p. 165-170.
83. Gil, M., et al., *Advances in swine in vitro embryo production technologies*. Reproduction in domestic animals, 2010. **45**: p. 40-48.
84. Gadea, J., et al., *Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders*. Theriogenology, 2004. **62**(3): p. 690-701.
85. Gadea, J., et al., *Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation*. Journal of Andrology, 2005. **26**(6): p. 749-756.

86. Anel-López, L., et al., *Reduced glutathione addition improves both the kinematics and physiological quality of post-thawed red deer sperm*. *Animal reproduction science*, 2015. **162**: p. 73-79.
87. Gadea, J., et al., *Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa*. *Reproductive biology*, 2013. **13**(1): p. 24-33.
88. Perumal, P., et al., *Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred Jersey bulls on sperm parameters and conception rates*. *Reproduction in Domestic Animals*, 2011. **46**(4): p. 636-641.
89. Meseguer, M., et al., *The human sperm glutathione system: a key role in male fertility and successful cryopreservation*. *Drug metabolism letters*, 2007. **1**(2): p. 121-126.
90. Estrada, E., et al., *Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen*. *Andrology*, 2014. **2**(1): p. 88-99.
91. Lucio, C., et al., *Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation*. *Cryobiology*, 2016. **72**(2): p. 135-140.
92. Ded, L., et al., *Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2010. **8**(1): p. 87.
93. Organization, W.H., *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2010.
94. Ducolomb, Y., et al., *In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine*. *Cell biology and toxicology*, 2009. **25**(6): p. 623.
95. Harrison, R., P. Ashworth, and N. Miller, *Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes*. *Molecular reproduction and development*, 1996. **45**(3): p. 378-391.

96. Ramírez, Y.C.D., et al., *Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos in vitro*. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 2005. **43**(3): p. 425-432.
97. Abeydeera, L.R., et al., *Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro*. Biology of reproduction, 1998. **58**(5): p. 1316-1320.
98. Balcázar Sánchez, J.A., et al., *Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos in vitro*. Técnica Pecuaria en México, 2005.
99. Conover, J.C. and R.B. Gwatkin, *Pre-loading of mouse oocytes with DNA-specific fluorochrome (Hoechst 33342) permits rapid detection of sperm-oocyte fusion*. J Reprod Fertil, 1988. **82**(2): p. 681-90.
100. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of immunological methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
101. Gadea, J., et al., *Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders*. Cryobiology, 2011. **62**(1): p. 40-46.
102. Chatterjee, S., E. de Lamirande, and C. Gagnon, *Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione*. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 2001. **60**(4): p. 498-506.
103. Anel-López, L., et al., *Reduced glutathione addition improves both the kinematics and physiological quality of post-thawed red deer sperm*. Animal reproduction science, 2015. **162**: p. 73-79.
104. Du Plessis, S.S., et al., *Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2015. **32**(4): p. 509-520.
105. Gadea, J., E. Sellés, and M. Marco, *The Predictive Value of Porcine Seminal Parameters on Fertility Outcome under Commercial Conditions*. Reproduction in Domestic Animals, 2004. **39**(5): p. 303-308.

106. Bucci, D., et al., *Effect of sex sorting on CTC staining, actin cytoskeleton and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa*. *Theriogenology*, 2012. **77**(6): p. 1206-1216.
107. Sutkeviciene, N., et al., *Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2009. **51**(1): p. 53.
108. González-Cadavid, V., et al., *Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters*. *Theriogenology*, 2014. **82**(5): p. 697-707.
109. Tsakmakidis, I.A., A.G. Lymberopoulos, and T.A. Khalifa, *Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen*. *J Vet Sci*, 2010. **11**(2): p. 151-4.
110. Ramírez, Y.C.D., *Estudio de las fracciones proteínicas del fluido folicular porcino en la maduración, fertilización in vitro y polispermia de ovocitos de cerdo*, in *División de ciencias biológicas y de la salud doctorado en ciencias biológicas*. 2004, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa México. p. 123.
111. López Rodríguez, A., et al., *Effect of Dilution Temperature on Boar Semen Quality*. *Reproduction in Domestic Animals*, 2012. **47**(5): p. e63-e66.
112. Schulze, M., et al., *Analysis of hygienic critical control points in boar semen production*. *Theriogenology*, 2015. **83**(3): p. 430-7.
113. Waterhouse, K., et al., *Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm*. *Reproduction*, 2006. **131**(5): p. 887-894.
114. De Leeuw, F.E., et al., *Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes*. *Cryobiology*, 1990. **27**(2): p. 171-183.
115. Schulze, M., et al., *Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions*. *Theriogenology*, 2013. **80**(9): p. 990-998.
116. Schmid, S., et al., *The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermally stored boar spermatozoa*. *Andrology*, 2013. **1**(3): p. 376-386.

117. Green, C. and P. Watson, *Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation*. *Reproduction*, 2001. **122**(6): p. 889-898.
118. Bravo, M., et al., *Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa*. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 2005. **71**(1): p. 88-96.
119. Ducolomb, Y., et al., *Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization*. *Theriogenology*, 2013. **79**(6): p. 896-904.
120. Kwak, S.-S., et al., *The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization*. *Theriogenology*, 2012. **78**(1): p. 86-101.
121. Romar, R., H. Funahashi, and P. Coy, *In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years*. *Theriogenology*, 2016. **85**(1): p. 125-134.
122. Park, H.J., et al., *Melatonin improves the meiotic maturation of porcine oocytes by reducing endoplasmic reticulum stress during in vitro maturation*. *Journal of pineal research*, 2018. **64**(2): p. e12458.
123. O'Hara, L., et al., *Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm*. *Theriogenology*, 2010. **73**(4): p. 541-549.
124. Diskin, M., *Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle*. *animal*, 2018: p. 1-10.
125. de Lamirande, E., A. Harakat, and C. Gagnon, *Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion*. *J Androl*, 1998. **19**(2): p. 215-25.
126. O'Flaherty, C., *Redox regulation of mammalian sperm capacitation*. *Asian J Androl*, 2015. **17**(4): p. 583-90.

127. Coy, P., et al., *Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems*. Theriogenology, 1999. **51**(4): p. 799-812.
128. Parrish, J.J., *Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin*. Theriogenology, 2014. **81**(1): p. 67-73.
129. Romar, R., H. Funahashi, and P. Coy, *In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years*. Theriogenology, 2016. **85**(1): p. 125-34.
130. Grupen, C.G., *The evolution of porcine embryo in vitro production*. Theriogenology, 2014. **81**(1): p. 24-37.
131. Suzuki, K., et al., *Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan*. Int J Androl, 2002. **25**(2): p. 84-93.
132. Kim, S., C. Agca, and Y. Agca, *Effects of various physical stress factors on mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa*. Reprod Fertil Dev, 2013. **25**(7): p. 1051-64.
133. Mahfouz, R.Z., et al., *Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress*. Fertility and sterility, 2010. **93**(3): p. 814-821.
134. Guthrie, H.D. and G.R. Welch, *Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry*. J Anim Sci, 2006. **84**(8): p. 2089-100.
135. Caballero, I., et al., *PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa*. Int J Androl, 2009. **32**(5): p. 505-13.
136. Aitken, R.J. and J.S. Clarkson, *Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques*. J Androl, 1988. **9**(6): p. 367-76.
137. Fischer, C., et al., *A thermodynamic study on bovine spermatozoa by microcalorimetry after Percoll density-gradient centrifugation-experimental probe of its utility in andrology*. Aktuelle Urologie, 2007. **38**(3): p. 237-242.

138. Martins, S.G., P.V. Miranda, and A. Brandelli, *Acrosome reaction inhibitor released during in vitro sperm capacitation*. Int J Androl, 2003. **26**(5): p. 296-304.
139. de Lamirande, E. and C. O'Flaherty, *Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2008. **1784**(1): p. 106-115.
140. Aitken, R.J. and B. Nixon, *Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored*. Molecular human reproduction, 2013. **19**(12): p. 785-793.
141. Harayama, H., et al., *Relationship between cyclic AMP-dependent protein tyrosine phosphorylation and extracellular calcium during hyperactivation of boar spermatozoa*. Molecular reproduction and development, 2012. **79**(10): p. 727-739.
142. Flesch, F., et al., *Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida*. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 2001. **60**(1): p. 107-115.
143. Asquith, K.L., et al., *Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition*. Journal of cell science, 2004. **117**(16): p. 3645-3657.
144. Petrunkina, A., et al., *Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro*. Reproduction, 2001. **121**(6): p. 889-896.
145. Eddy, E., *The spermatozoon*. The physiology of reproduction, 1994.
146. de Lamirande, E., P. Leclerc, and C. Gagnon, *Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization*. MHR: Basic science of reproductive medicine, 1997. **3**(3): p. 175-194.
147. Tosti, E. and Y. Ménézo, *Gamete activation: basic knowledge and clinical applications*. Human Reproduction Update, 2016. **22**(4): p. 420-439.
148. Lucio, C.d.F., et al., *Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation*. Cryobiology, 2016. **72**(2): p. 135-140.

149. Yoshida, M., et al., *Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus*. *Biology of Reproduction*, 1993. **49**(1): p. 89-94.
150. Bleil, J.D. and P.M. Wassarman, *Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida*. *Developmental biology*, 1980. **76**(1): p. 185-202.
151. Takeo, T. and N. Nakagata, *Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin*. *Biology of reproduction*, 2011. **85**(5): p. 1066-1072.
152. Kwamoto, K., et al., *Disulfide formation in bovine zona pellucida glycoproteins during fertilization: evidence for the involvement of cystine cross-linkages in hardening of the zona pellucida*. *Reproduction*, 1999. **117**(2): p. 395-402.
153. Takeo, T. and N. Nakagata, *Reduced Glutathione Enhances Fertility of Frozen/Thawed C57BL/6 Mouse Sperm after Exposure to Methyl-Beta-Cyclodextrin1*. *Biology of Reproduction*, 2011. **85**(5): p. 1066-1072.
154. Ishizuka, Y., et al., *The influence of reduced glutathione in fertilization medium on the fertility of in vitro-matured C57BL/6 mouse oocytes*. *Theriogenology*, 2013. **80**(5): p. 421-426.
155. Luvoni, G.C., L. Keskinetepe, and B.G. Brackett, *Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media*. *Molecular Reproduction and Development*, 1996. **43**(4): p. 437-443.
156. Boquest, A.C., et al., *Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro*. *Theriogenology*, 1999. **51**(7): p. 1311-1319.
157. Jeong, B.S. and X. Yang, *Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization in vitro*. *Molecular reproduction and development*, 2001. **59**(3): p. 330-335.



El papel del glutatión reducido (GSR) en la capacitación espermática y su relación con la fertilización in vitro en espermatozoides de cerdo Sus scrofa domésticus

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 13 del mes de mayo del año 2019 en la Unidad Itzapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
- DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN
- DR. ABIEZER RODRIGUEZ TOBON
- DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RUIZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL  
DE: VICTOR MANUEL MONTECINOS FUENTES

y de acuerdo con el artículo 7º fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

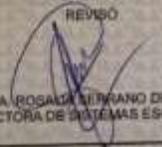
APROBAR

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



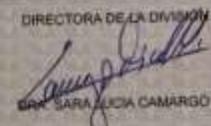
VICTOR MANUEL MONTECINOS FUENTES  
ALUMNO

REVISÓ



MTRA. ROSALVA NAVARRO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA



DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL



DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN

VOCAL



DR. ABIEZER RODRIGUEZ TOBON

SECRETARIO



DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RUIZ