



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales  
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas  
Producción y Salud Animal

**EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS EQUINOS  
UTILIZANDO SUERO DE YEGUA EN DOS ETAPAS DEL ESTRO, Y UNIONES  
HETERÓLOGAS CON ESPERMATOZOIDES EQUINOS TRATADOS CON  
HEPARINA Y PROCAÍNA**

TESIS QUE PRESENTA:

MVZ. Blanca Alicia Chávez Garibay

Para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biológicas

Comité tutorial:

Director de tesis:

Doctor en Ciencias Biomédicas Marco Cajero Juárez

Coo-asesor:

Doctor en Ciencias Agropecuarias Daniel Val Arreola

Doctor en Ciencias Agropecuarias Guillermo Salas Razo

Doctor en Ciencias Biotecnológicas Juan José Valdez Alarcón

Doctor en Microbiología Microbiana Aureliano Juárez Caratachea

Morelia, Mich., Diciembre de 2013.

## INDICE.

CAPITULO I . . . . .	1
1 RESUMEN GENERAL . . . . .	1
1.1 ABSTRACT . . . . .	2
2 INTRODUCCIÓN GENERAL . . . . .	3
2.1 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LOS EQUINOS . . . . .	3
2.1.1 CICLO ESTRAL . . . . .	4
2.1.2 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS . . . . .	5
2.1.3 MADURACIÓN DEL OVOCITO . . . . .	6
2.1.4 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES . . . . .	7
2.1.4.1 METABOLISMO DE LOS ESPERMATOZOIDES . . . . .	9
2.1.4.2 BASES FISIOLÓGICAS DE LA CAPACITACIÓN Y DE LA REACCIÓN ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE . . . . .	9
2.1.4.3 CAPACITACIÓN . . . . .	10
2.1.4.4 HIPERACTIVACIÓN . . . . .	10
2.1.4.5 REACCIÓN ACROSÓMICA . . . . .	11
2.1.5 COLECCIÓN DE OVOCITOS EQUINOS . . . . .	12
2.1.5.1 MADURACIÓN DE OVOCITOS IN VITRO . . . . .	13
2.1.5.2 MADURACIÓN NUCLEAR . . . . .	14
2.1.6 CAPACITACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES <i>IN VITRO</i> . . . . .	15
2.1.6.1 TINCIÓN CON CLORTETRACICLINA . . . . .	16
2.1.6.2 EFECTO DE LOS DILUYENTES EN EL SEMEN EQUINO . . . . .	17
2.1.6.3 EFECTO DE LA PROCAÍNA EN LA FOSFORILACIÓN DE LA TIROSINA Y LA EXOCITOSIS ACROSOMAL . . . . .	18
2.1.7 UNIONES HETERÓLOGAS . . . . .	18
2.1.7.1 FECUNDACIÓN Y ZONA PELÚCIDA . . . . .	18
2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA . . . . .	22
2.3 PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS . . . . .	22
2.4 OBJETIVOS . . . . .	22
3 METODOLOGÍA . . . . .	23

4	RESULTADOS .....	25
4.1	RESULTADOS ETAPA I .....	25
	MANIPULACIÓN Y MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS EQUINOS COMPARANDO DOS MEDIOS E INFLUENCIA ESTACIONAL SOBRE LA MADURACIÓN .....	25
4.2	RESULTADOS ETAPA II .....	35
	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HEPARINA Y LA PROCAÍNA EN LOS ESPERMATOZOIDES USANDO PRUEBAS HETERÓLOGAS .....	35
5	DISCUSIÓN GENERAL .....	44
6	CONCLUSIONES GENERALES .....	45
7	LITERATURA CITADA GENERAL .....	46
	IMAGENES .....	58
8	ANEXOS. ....	59

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores; Dr Marco Cajero Juárez, Dr. Daniel Val Arreola, Dr. Guillermo Salas Razo, Dr. Juan José Valdez Alarcón, por haber aceptado y apoyado este proyecto.

Al Dr. Jesús Conejo Nava muchas gracias por su colaboración y su ayuda.

Al Dr. Aureliano Juárez Caratachea por haber aceptado formar parte de mi grupo de asesores, y por haberme apoyado de manera incondicional durante todo el proceso.

Agradezco al Dr Rogelio Garcidueñas por su amistad y por la ayuda incondicional que recibí.

A mi esposo Alejandro Merlos Padilla y a mis hijos Alex, Leonardo y Ulises, que siempre me apoyan, creen en mí y me animan a seguir adelante, los quiero mucho.

Y para quienes me enseñaron con ejemplo los principios y valores que rigen mi vida, mis papás Ana y Raúl.

A todos muchas gracias.

## CAPITULO I.

### 1 RESUMEN GENERAL

El objetivo del presente estudio fue evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos equinos, utilizando suero de yegua en estro (EMS) y en ovulación (OMS) obtenido a las 36 h posteriores a la aparición de los primeros signos del celo. Los ovocitos fueron recuperados de yeguas sacrificadas durante la temporada reproductiva (primavera-verano) y la temporada no reproductiva, se manipularon con suero salino tamponado en fosfatos (PBS) o TCM 199 (Tissue culture medium) con 20% de suero de yegua en estro (EMS), en dos grupos. La maduración de los ovocitos utilizando 10% de EMS en el primer tratamiento, y 10% de EMS más 5% de suero de yegua en ovulación (OMS) en el segundo tratamiento, no presentaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ), a pesar que se obtuvieron mayor número de maduraciones con este último. Durante la etapa reproductiva el porcentaje de maduración obtenido fue 18% más alto que en la etapa no reproductiva. Por otra parte, se realizaron pruebas heterólogas, con ovocitos de cerda y espermatozoides equinos congelados y descongelados, utilizando 2 tratamientos, heparina y procaína además de un grupo control, con la ayuda de un microscopio se determinó por medio de conteo, el número de espermatozoides que se adhirieron a la zona pelúcida de los ovocitos. Los espermatozoides equinos tratados con procaína muestran hiperactividad, un promedio 250 espermatozoides presentaron unión primaria y secundaria en la ZP porcina, después de una hora de incubación, los espermatozoides tratados con heparina muestran movimiento normal, un promedio de 135 espermatozoides, lograron adherirse a la zona pelúcida de los ovocitos de cerda. Aproximadamente el 70 % de los espermatozoides que no recibieron tratamiento murieron.

**Palabras clave:** Maduración *in vitro* (MIV), suero de yegua en estro (EMS), hiperactivación.

## 1.1 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* maturation of equine oocytes using estrous mare serum (EMS) and ovulation (OMS) obtained at 36 h after the onset of the first signs of estrus. The oocytes were recovered from slaughtered mares during the breeding season (spring-summer) and non-breeding season, were handled with phosphate- buffered saline (PBS) or TCM 199 (Tissue culture medium) with 20 % horse serum in estrus (EMS), into two groups. The oocyte maturation using 10 % of EMS in the first treatment, and 10 % of EMS plus 5% horse serum in ovulation (OMS) in the second treatment, no significant statistical differences were found ( $P < 0.05$ ), although more maturations were obtained with this last one. During the reproductive stage of maturation the percentage obtained was 18 % higher than in non-reproductive stage. Moreover, heterologous tests were performed with sow oocyte and frozen and thawed equine sperm using two treatments, heparin and procaine and a control group, with the aid of a microscope was determined (by counting) the number of sperm who adhered to the oocyte's zona pellucida. The equine sperm treated with procaine show hyperactivity, an average of 250 sperms showed primary and secondary binding in the porcine ZP, after one hour of incubation, heparin-treated sperm show normal movement, an average of 135 sperm were able to attach to the zona pellucida of pig oocytes. Approximately 70% of sperm that were not treated died.

**Key Words:** *in vitro* maturation, estrous mare serum (EMS), hyperactivity.

## **2 INTRODUCCIÓN GENERAL**

La fertilización *in vitro* (FIV) convencional ha tenido muy poco éxito en equinos. A pesar de que los avances en la última década han sido grandes, aún no se han logrado estandarizar los métodos de maduración *in vitro* tanto de los ovocitos como de los espermatozoides.

En la mayoría de los estudios de maduración *in vitro* (MIV) en ovocitos de caballos se ha optimizado el uso de TCM 199 como medio de cultivo con la adición de suero, líquido folicular o de hormonas LH, FSH y estradiol 17 $\beta$ . (Willis *et al.*, 1991; Dell'Aquila *et al.*, 1997; Hinrichs y Schmidt, 2000; Galli *et al.*, 2002; Lagutina *et al.*, 2005) y variando los tiempos de cultivo. Sin embargo los niveles de LH y FSH no han podido ser optimizados.

Se afirma que comúnmente los ovocitos de yegua tienen una baja tasa de maduración *in vitro*, sin embargo, la habilidad meiótica de los ovocitos equinos, depende de muchos factores técnicos y foliculares (Hinrichs, 2010b). Un hallazgo sorprendente en relación con la maduración de ovocitos equinos fue que los ovocitos que tienen cúmulos expandido (óvulos Ex), tuvieron una mayor tasa de maduración que ovocitos con cúmulos compactos (ovocitos Cp) en el momento de la recuperación (Hinrichs, 1998).

La eficiente capacitación *in vitro* de espermatozoides equinos no se ha logrado todavía, es probable que las bajas tasas de penetración observadas, se hayan derivado de la incapacidad de capacitar y/o hiperactivar adecuadamente los espermatozoides equinos en el laboratorio.

Los avances en FIV convencional en equinos se han visto obstaculizados, en parte, por la poca disponibilidad de material biológico, lo que dificulta realizar experimentos a gran escala. Aún se siguen realizando estudios para mejorar las técnicas de manipulación, y se ensayan medios de maduración de los ovocitos equinos. Por otro lado se siguen realizando innumerables estudios para mejorar las condiciones de maduración (capacitación) en el espermatozoide y de esta manera, aumentar los porcentajes en la FIV (Mc Partlin, 2009).

### **2.1 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LOS EQUINOS**

En los caballos la etapa reproductiva empieza con la pubertad, en la hembra se inicia entre los 15 y 18 meses de edad, durante la primavera-verano del segundo año de vida y en los machos entre los 14 - 18 meses. El ciclo estral depende del fotoperiodo (las yeguas son poliéstricas estacionales), raza, temperatura ambiental, estado de nutrición y peso corporal.

El ciclo estral dura 21 días y la hembra permanece en celo por un lapso de 5 a 7 días. La ovulación se produce 24 a 48 h antes de finalizado el celo. La probabilidad de preñez aumenta cuando las yeguas han sido cubiertas antes o en el momento de la ovulación. Esto le da al espermatozoide la oportunidad de estar listo en la zona reproductiva femenina antes de la ovulación; esto significa que la yegua es típicamente receptiva al garañón (Slusher, 2004).

Durante el período de anestro, la mayoría de las yeguas no muestran receptividad sexual y no desarrollan folículos que ovulen. Aunque también hay un porcentaje pequeño de yeguas que no expresan un modelo de comportamiento estacional y quedan fisiológicamente receptivas a los garañones a lo largo del año (Slusher, 2004).

La situación cambia dramáticamente durante la primavera y el verano. Mientras que las horas luz del día aumentan, las secreciones hormonales ováricas también aumentan y la yegua comienza a experimentar una serie de ciclos estrales (Jones, 2004). La gestación dura entre 335 y 350 días (Hafez, 2002).

El proceso de la fertilización ocurre en el oviducto, es muy complejo e implica la interacción entre un gameto femenino y un masculino para formar un cigoto diploide, que con el tiempo, puede desarrollarse en un nuevo individuo. El término "fertilización *in vitro*" (FIV) se refiere a la fertilización del ovocito fuera del cuerpo de la yegua (Roldán, 1996).

### **2.1.1 CICLO ESTRAL**

El ciclo ovárico comprende las siguientes etapas: maduración folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo, seguido de su desarrollo y degeneración, con la posterior maduración de un nuevo folículo, que trae como consecuencia la iniciación de un nuevo ciclo ovárico. Este ciclo es un complejo sistema de retroalimentación en el que intervienen las hormonas sexuales estrógeno y progesterona, las gonadotropinas hipofisiarias LH, FSH y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRh) del hipotálamo (Gigli, 2006).

Durante el invierno, período de inactividad ovárica, los ovarios son duros al tacto y se les denomina ovarios en anestro. En el período primavera-verano, el ovario es de textura blanda al tacto y aumenta su tamaño y se llama a este período estro o ciclo estral. El ciclo estral se divide a su vez en dos etapas con un total de 21 días: 6 días de celo y 15 días de diestro, manteniendo esta regularidad hasta mayo. El ciclo estral en los mamíferos es

regulado por interacciones complejas entre el hipotálamo, la hipófisis, las gónadas y el endometrio (Souza, 2007; Magee *et al.*, 2009; King *et al.*, 2010).

A diferencia de otros animales domésticos, la especie equina posee una fase folicular altamente variable e inconsistente, presentándose la ovulación más próxima al final del estro que al inicio, dificultando así la predicción exacta del momento de la misma (Iroig, 2004), así como el control y la manipulación del ciclo estral (Cuervo-Arango y Newcombe, 2008).

En la yegua, la LH se secreta en pulsos a partir del día 16 del ciclo hasta el día 3 del ciclo siguiente. Los niveles de LH descienden gradualmente sobre los días 4 a 6 para estar en su nivel más bajo entre el día 6 a 7, a la mitad del ciclo, para aumentar nuevamente el día 17 a 18. Se cree que el estradiol es un factor clave en la generación del pico de LH en yeguas, al incrementar la síntesis de LH e inducir la formación de receptores de GnRH en la hipófisis y aumentar la secreción de GnRH. El estradiol presenta un incremento pronunciado 48 horas antes del pico de LH, poco antes de la ovulación (Ginther, 2002).

### **2.1.2 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS**

Los ovocitos son células altamente especializadas, las únicas dependientes de la introducción de ADN externo, proveniente del espermatozoide para poder llevar a cabo las siguientes fases de desarrollo embrionario en condiciones *in vivo* (García, 2008).

Estructuralmente el ovocito maduro está rodeado de una membrana llamada oolema o zona pelúcida (Figura 1). Esta membrana contiene el citoplasma del ovocito u ooplasma, donde se encuentran los organelos citoplasmáticos y el núcleo. Rodeando al conjunto ovocito-oolema está la llamada zona pelúcida, que es de naturaleza glicoproteica, su grosor disminuye tras de la fecundación. Entre el oolema y la zona pelúcida está el espacio perivitelino, en el que se encuentra el primer corpúsculo polar.

La presencia de un corpúsculo polar (CP) indica que la maduración nuclear ha finalizado. Se cree que hace falta un breve intervalo de tiempo tras la extrusión del primer CP, para que el citoplasma madure completamente. Un ovocito puede ser meióticamente maduro pero no haber alcanzado la madurez citoplasmática, lo que puede llevar a fallos o defectos en la fecundación (Veeck, 1988).

Los ovocitos recuperados tras la punción folicular están rodeados de células de la granulosa que forman el *cumulus ooforus*. Estas células son imprescindibles para la continuación de la meiosis. La capa mas interna constituye la corona radiata. Tradicionalmente, la valoración de la maduración del ovocito se ha basado en el grado de expansión del cúmulo y la corona que lo rodea:

- Metafase I: células del cúmulo menos expandidas.
- Metafase II: células del cúmulo expandidas.
- Profase I: células del cúmulo compactadas (Veeck, 1988).

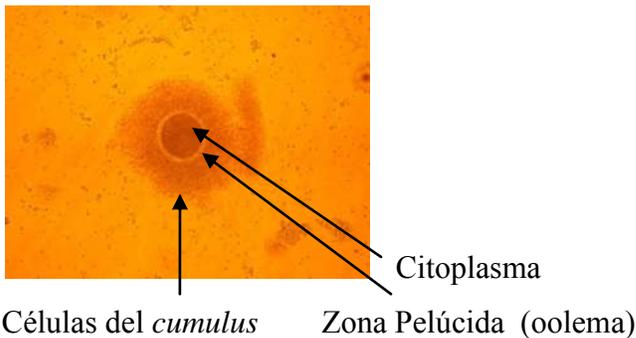


Figura 1. Características morfológicas del ovocito  
(Foto tomada en el CMEB de la UMSNH).

### 2.1.3 MADURACIÓN DEL OVOCITO

La fisiología del desarrollo folicular y la ovulación en la yegua muestran algunas diferencias interesantes con respecto a otras especies domésticas. La estimulación hormonal exacta que induce la ovulación en la yegua es desconocida. A diferencia de las hembras de la mayoría de otras especies, la yegua no experimenta un pico de la hormona luteinizante (LH), sino que sus niveles aumentan de forma gradual durante el estro hasta alcanzar su punto máximo 24 a 36 horas posteriores a la ovulación (Ginther, 2000).

La maduración del ovocito, dividida en maduración nuclear y citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Grøndahl, 2008).

La maduración nuclear comienza tras la reanudación de la meiosis. El paso de vesícula germinal (VG) a metafase II (MII) conlleva:

- 1) la disolución de la membrana nuclear conocida como “rotura de la vesícula germinal”,
- 2) la formación del huso meiótico y
- 3) la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando entonces el estadio de metafase I; para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la extrusión del primer corpúsculo polar (CP) y al paso del ovocito al estadio de MII, que es cuando se considera que la maduración nuclear finaliza. Este evento dura unas 36-40 horas después del pico de LH (Hunter, 1988), tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis.

La maduración citoplasmática, en cambio, es un término más amplio que abarca una serie de acontecimientos no directamente relacionados con la progresión de la meiosis pero que preparan al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario posteriores (Abeydeera, 2002). En el citoplasma del ovocito se produce una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales. Tras la rotura de la VG, las mitocondrias migran para situarse en una posición perinuclear durante la maduración (Cran, 1985; Thibault *et al.*, 1987), siendo este movimiento mitocondrial necesario para la progresión de la maduración.

Los gránulos corticales son un tipo especial de lisosomas primarios, formados a partir del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico, compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Los gránulos corticales migran hacia la periferia del ovocito, aumentan de número al final del periodo de maduración y se sitúan debajo de la membrana plasmática formando una monocapa (Cran y Cheng, 1986); circunstancia que será fundamental para el bloqueo de la poliespermia.

#### **2.1.4 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES**

El espermatozoide es una célula altamente especializada que se origina en los túbulos seminíferos de los testículos, mediante un proceso denominado espermatogénesis. Estos túbulos seminíferos se encuentran tapizados por un gran número de células epiteliales germinales llamadas espermatogonias, que son células diploides que proliferan continuamente para mantener su número. Un porcentaje de estas células sufrirá una serie de modificaciones hasta transformarse en los gametos masculinos. Sin embargo, estas

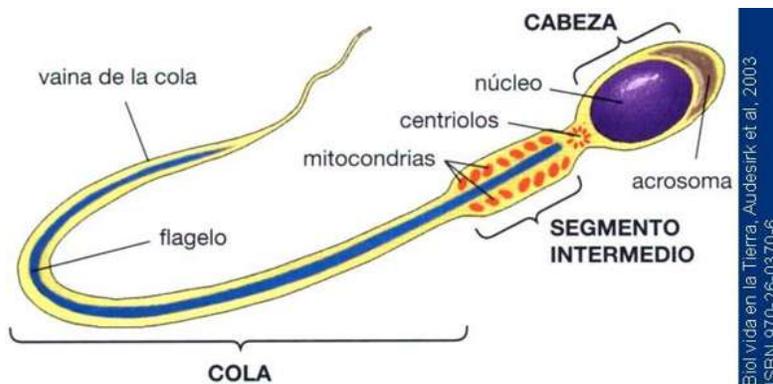
células haploides ya diferenciadas carecen de capacidad fecundante y poseen escasa motilidad. Se precisa, por tanto, de una última fase de maduración durante su tránsito por el epidídimo, para desarrollar dichas características (Amann, 2008).

La célula espermática se divide en: cabeza, cuello, segmento intermedio y cola (Figura 2).

En la cabeza está localizado el núcleo, compuesto de cromatina altamente condensada, que contiene el material genético. Los dos tercios anteriores de la cabeza están cubiertos por el acrosoma, que posee las porciones apical, principal y ecuatorial (Arenas, 2010).

El acrosoma contiene glicopéptidos y enzimas hidrolíticas como hialuronidasa, proacrosina/acrosina y lipasas que son liberadas en el momento de la reacción acrosómica.

El cuello conecta a la pieza intermedia con la cabeza. En el centro de la pieza intermedia está localizado el axonema, rico en ATPasa, que transforma la energía química en acción mecánica. Circundando longitudinalmente al axonema, están las fibras densas, que dan estabilidad a la estructura. Envolviendo las fibras densas, se disponen las mitocondrias en forma helicoidal. Son responsables de la alta producción de ATP. Finalmente, la cola está compuesta con una pieza principal y otra terminal (Amann y Graham, 1993; Morel, 1999).



Biología en la Tierra, Audresirk et al., 2003  
ISBN 970-26-0370-6

**Figura 2. Estructuras que componen el espermatozoide de mamífero (Audresirk *et al*, 2003).**

La membrana plasmática está formada por una doble capa de lípidos, una interfase de fosfolípidos y agua, y un glicocáliz. Los principales lípidos encontrados en la membrana son fosfolípidos y colesterol. La proporción de ambos determina la fluidez de la membrana. Cuanto mayor es la cantidad de fosfolípidos, más fluida es la membrana. El 50% del peso de la membrana está compuesto de otras proteínas con función estructural o de ligación

para otras proteínas. Las proteínas estructurales pueden actuar como canales o poros para permitir el pasaje de pequeñas moléculas (Arenas, 2010).

#### **2.1.4.1 METABOLISMO DE LOS ESPERMATOZOIDES**

La principal fuente de energía disponible para los espermatozoides eyaculados son los carbohidratos de sustrato extracelular, los espermatozoides equinos metabolizan rápidamente los monosacáridos como la glucosa, pero tienen una capacidad muy limitada para utilizar otros azúcares o carbohidratos más complejos, la glucosa se liga a proteínas de transporte para atravesar la membrana plasmática (Morel, 1999). La necesidad energética es suprimida en 90% por los sustratos exógenos y el restante 10% por fuentes intracelulares como los fosfolípidos. No hay almacenamiento de glucosa en las células espermáticas (Mann, 1964).

Los espermatozoides equinos dependen principalmente del metabolismo aeróbico para la producción de ATP. Ese metabolismo produce cantidades significativas de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias, que tiene un efecto adverso sobre las membranas por causar la peroxidación de los lípidos comprometiendo la integridad estructural, la motilidad y la viabilidad espermática (Álvarez y Storey, 1984). Después de consumido el oxígeno difundido en el plasma seminal, los espermatozoides dependen del metabolismo anaeróbico, que tiene como producto final el ácido láctico. Un aumento en la concentración de ácido láctico en el medio extracelular conduce a una disminución del pH, la cual a su vez conduce a una reducción del metabolismo con menor producción de ATP y consecuente disminución de la motilidad (Mann, 1964).

#### **2.1.4.2 BASES FISIOLÓGICAS DE LA CAPACITACIÓN Y DE LA REACCIÓN ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE**

La capacitación es un proceso del espermatozoide que comprende una serie de cambios previos a la fecundación, se desarrolla en el aparato reproductor femenino en vertebrados de fecundación interna, y requiere de la comunicación entre el espermatozoide y los ambientes que recorre en su tránsito hacia el sitio de fertilización. Cuando se une al ovocito, se induce otro proceso denominado reacción acrosomal (exocitosis), así como la

hiperactivación, que es un movimiento especial del flagelo, el cual facilita su desplazamiento, la penetración de las cubiertas del ovocito y finalmente la unión con este. Ambos procesos pueden también ser inducidos *in vitro* (Arenas, 2010).

#### **2.1.4.3 CAPACITACIÓN**

Durante su capacitación el espermatozoide sufre una serie de cambios morfológicos y funcionales hasta llegar a adquirir habilidad para fecundar el ovocito (De Lamirande, 1997; Aitken, 1997). Estos cambios ocurren, durante el tránsito del espermatozoide por el aparato reproductor de la hembra. Entre ellos, tiene lugar la pérdida de proteínas que envuelven el espermatozoide y que proviene del plasma seminal. Además, se produce un cambio en la distribución de los lípidos de las membranas, necesario para el reconocimiento y fusión con el ovocito. El colesterol de la membrana del espermatozoide limita su permeabilidad iónica, aportando una mayor rigidez y estabilizándola (Suzuki, 1988).

Se ha demostrado que la albúmina y lipoproteínas de alta densidad presentes en medios de cultivo o en el tracto reproductivo de la hembra, extraen el colesterol de la membrana del espermatozoide. A medida que van ocurriendo estos cambios a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide, se favorece una mayor fluidez de la membrana espermática la cual se acompaña de un cambio en el patrón de movimiento del espermatozoide que se conoce con el nombre de hiperactivación espermática (Töpfer-Petersen, 2008).

#### **2.1.4.4 HIPERACTIVACIÓN**

Son los cambios en la movilidad espermática, caracterizado en:

- a) aumento en el movimiento y flexión del flagelo.
- b) gran amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y
- c) trayectoria curva y tortuosa.

Genera la fuerza requerida para la penetración de la capa de células de la granulosa y la inserción inicial del espermatozoide con el ovocito (Tulsiani, 2006). Para inducirla se requiere  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, elevación intracelular de AMPc y disminución del pH intracelular. La hiperactivación del flagelo se debe al  $\text{Ca}^{++}$  que se une a proteínas fijadoras

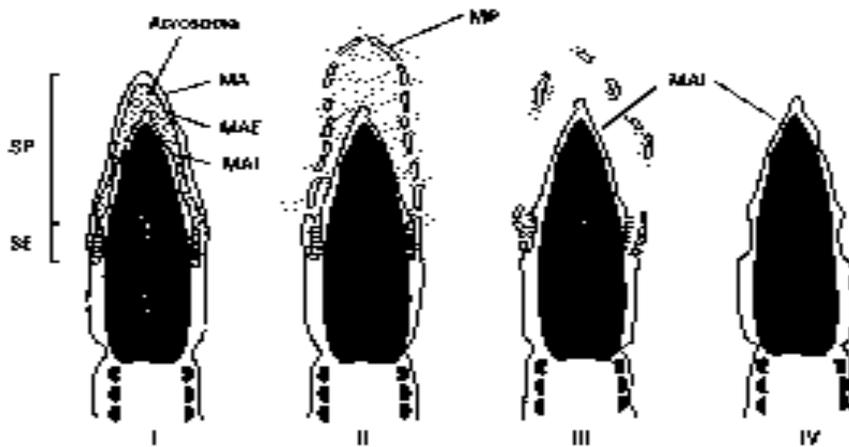
en el brazo externo de la dineina (en la parte interna del flagelo) induciendo el movimiento asimétrico (Inaba, 2003).

#### **2.1.4.5 REACCIÓN ACROSÓMICA**

En respuesta a un agonista o agonistas asociados al ovocito, el espermatozoide experimenta un proceso de exocitosis (reacción acrosómica) que ocasiona la liberación de enzimas contenidas en el acrosoma, un único gránulo secretor que se encuentra por encima del núcleo. La exocitosis del acrosoma es un proceso crucial ya que es esencial para que el espermatozoide pueda penetrar las cubiertas del ovocito y sea capaz de fusionarse con la membrana plasmática, involucra una serie de eventos moleculares que culmina con la fusión de la membrana externa del acrosoma y la membrana plasmática que se encuentra por encima de ésta, lo cual da lugar a la formación de poros que permiten la liberación de las enzimas contenidas en el gránulo acrosómico (Fig. 3) (Bedford, 1974). Estas enzimas degradan la zona pelúcida (ZP) del ovocito para permitir la fusión del ADN del espermatozoide con el gameto femenino (Knobi, 2006).

Esta reacción sólo se produce tras la capacitación espermática. La ZP del ovocito está constituida por 3 tipos de glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3). Estas tres familias de proteínas representan el 95 % de la masa total de la ZP. Desde un punto de vista estructural cada familia posee el mismo esqueleto polipeptídico y las diferencias radican en el patrón de glicosilación (secuencias de azúcares). La ZP3 es la que desencadena la reacción acrosómica en el espermatozoide (Bleil, 1980). Se produce además un aumento de pH y la activación de una serie de receptores.

Durante la reacción acrosómica se produce una fusión de la membrana plasmática y la acrosomal externa en varias regiones del acrosoma. La fusión de las membranas provoca la formación de vesículas y la liberación progresiva del contenido acrosomal. La reacción es lenta y está regulada por cambios en la membrana y elementos del citoesqueleto. La liberación de las enzimas hidrolíticas junto con la hiperactivación espermática hacen posible que el espermatozoide penetre el ovocito y lo fecunde (Bou-Haila, 2009).



**Figura 3. Cambios que se producen durante la exocitosis del acrosoma** (MP, membrana plasmática, Ac, acrosoma; MAE, membrana acrosómica externa; MAI, membrana acrosómica interna; N, núcleo; SE, segmento ecuatorial) (Roldán, 1996).

### 2.1.5 COLECCIÓN DE OVOCITOS EQUINOS

Debido a la estrecha unión de los ovocitos a la pared del folículo (Hawley, 1995), otra característica del ovario equino es el menor número de folículos visibles en comparación con otras especies. El promedio de folículos visibles en los equinos es de 6 por ovario (Hinrichs y DiGiorgio, 1991; Hinrichs *et al.*, 1993, Galli *et al.*, 2007), en comparación con 12.4 en vacas (Seneda, 2001). Por lo que el porcentaje de recuperación de ovocitos por aspiración de folículos resulta baja (Dell'Aquila, 2001).

Los ovocitos pueden ser recuperados de forma efectiva abriendo los folículos con una hoja de bisturí y el raspado de la capa de células de la granulosa del folículo utilizando una cucharilla de hueso (Hinrichs, 1991). El ovocito se observa en las células recuperadas utilizando un microscopio. No obstante la efectividad de este método, es un trabajo laborioso que requiere tiempo y resulta inconveniente cuando el número de ovarios es grande y el personal mínimo. La aspiración puede ser preferible, aunque la tasa de recuperación puede ser sólo la mitad de la obtenida a través de raspado (Alm, 1997; Dell'Aquila, 2001).

Si se recogen por raspado del folículo, los ovocitos pueden ser clasificados por su morfología como cúmulos compactos (Cp) o expandidos (Ex). Curiosamente, en equinos, los ovocitos Cp que provienen de folículos viables, son en gran medida de folículos

jóvenes y los ovocitos no son competentes para madurar *in vitro*. Por el contrario, los ovocitos (Ex) se originan en folículos atrésicos, pero tienen una alta capacidad meiótica (Hinrichs, 1997).

Usando estos métodos para la clasificación, del raspado de folículos de tejido del ovario de yeguas de matadero, el 60% de los ovocitos que se obtienen son Ex, el 30% Cp y el 10% son ovocitos degenerados. Las tasas de maduración *in vitro* (MIV), tal como se define en la tinción de ovocitos después la maduración o por extrusión del primer cuerpo polar, son aproximadamente el 65% de los ovocitos Ex y el 20% de ovocitos Cp (Alm, 1996; Hinrichs, 1997; Choi, 2004; Hinrichs, 2005).

Cuando la recuperación y el cultivo de los ovocitos equinos se realiza inmediatamente después del sacrificio, se obtiene un mayor porcentaje de maduración que el que se obtiene a partir de ovocitos de ovarios que han sido almacenados; esto está relacionado con daños a la cromatina en los ovocitos de Cp durante el almacenamiento. La duración óptima de maduración varía según la morfología del cúmulo y el tiempo de recuperación del ovario, pero no hay ninguna diferencia en capacidad de desarrollo entre los oocitos Ex y Cp (Hinrichs, 2010b).

#### **2.1.5.1 MADURACIÓN DE OVOCITOS *IN VITRO***

La primera maduración *in vitro* de ovocitos de yegua fue reportado por Fulka y Okolski (1981); estos autores utilizaron TCM 199 para la MIV y encontraron que los ovocitos equinos con *cumulus* compacto necesitaban un tiempo de más de 24 h y menor de 40 h para la maduración nuclear, alcanzando el 68% de maduración en metafase II.

Desjardins (1985) utilizó Krebs Ringer, una solución de bicarbonato, en el cultivo de ovocitos equinos *in vitro* e informó que el tiempo aproximado necesario para la maduración nuclear fue de 24 horas. Zhang *et al.* (1989) observaron que 30 horas era suficiente para la maduración *in vitro* de los ovocitos equinos que tienen *cumulus* sin expandir y 24 h para aquellos ovocitos con *cumulus* expandido.

Alm y Torner (1994) reportaron 73% de maduración de los ovocitos de 30 h después de cultivo en TCM 199 complementado con suero equino con más células de la granulosa.

Hormonas como la folículo-estimulante (FSH), luteinizante (LH) y la prolactina se han utilizado para madurar ovocitos equinos *in vitro* (Zhang, 1989). Estos mismos autores,

señalan que no había diferencia en la maduración nuclear de los ovocitos cultivados con un 20% de suero de yegua en estro solo, o el 10% suero fetal bovino con gonadotropinas (2.5 µg/ml FSH, 2.5 µg/ml LH, y 0.02 µg/ml de prolactina), pero las proporciones de ovocitos con *cumulus* completamente expandidos se incrementaron cuando se utilizaron gonadotropinas y suero fetal bovino en el medio de cultivo.

Willis *et al.* (1991) obtuvieron un promedio alto de ovocitos que formaron un cuerpo polar (67%) después de 32 h de cultivo en TCM 199 suplementado con suero colectado en el primer día del estro. Shabpareh, (1993) obtuvo 86% de ovocitos maduros al cultivarlos durante 30 h, en TCM 199 con 10% de EMS en asociación con FSH y estradiol. Se afirma que comúnmente los ovocitos de yegua tienen una baja tasa de MIV, sin embargo, la habilidad meiótica de los ovocitos equinos depende de muchos factores técnicos y biológicos (Hinrichs, 2010b).

Un hallazgo sorprendente en relación con la maduración temprana de ovocitos equinos fue que los que tienen cúmulos expandidos (óvulos Ex), al tiempo de recuperación de los folículos tuvieron una mayor tasa de maduración que los ovocitos con cúmulos compactos (ovocitos Cp), en el momento de la recuperación (Hinrichs, 1998).

El progreso en estas áreas fue inicialmente bajo, debido a que no se han estandarizado los métodos de fertilización *in vitro* en los equinos. Por lo tanto, no hay un método de fertilización disponible para probar el método de desarrollo, capacidad de los ovocitos en diferentes métodos de maduración y ninguna de ovocitos fecundados con el cual poner a prueba los procedimientos para el cultivo de embriones *in vitro*.

El desarrollo de métodos eficaces y repetibles para la fertilización y producción de embriones con principios de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) sentó las bases para la investigación en la producción de blastocisto *in vitro* en equinos (Hinrichs, 2010a).

#### **2.1.5.2 MADURACIÓN NUCLEAR**

Como se señaló anteriormente, los ovocitos Ex tienen una tasa significativamente mayor de maduración en la metafase II (MII) que los ovocitos Cp. De los ovocitos recuperados de los ovarios extirpados, el período de tiempo que pasa el óvulo dentro del ovario antes de que se recupere, afecta a la duración del cultivo necesario para la maduración nuclear y la

maduración citoplasmática o posibilidades de desarrollo. Los ovocitos recogidos del ovario inmediatamente después del sacrificio requieren mayor tiempo de cultivo, y tienen menor posibilidad de desarrollo, que los ovocitos recuperados de 5 a 9 h después del sacrificio. El tiempo requerido para una maduración óptima ha sido de entre 24 y 30 h de ovocitos Ex y entre 30 y 36 h de ovocitos Cp. Una vez madurado, no se ha encontrado diferencia en la capacidad de desarrollo de blastocisto entre ovocitos Cp y Ex (Hinrichs, 2005).

La evaluación de los ovocitos tras la MIV requiere eliminación de los cúmulos, lo que es más difícil en los equinos que en muchas otras especies. El proceso transzonal de los cúmulos equinos es extenso y el desnudando requiere pipeteo repetido con pipetas pequeñas y de menor diámetro. La hialuronidasa es útil para ovocitos maduros (Hinrichs, 1990).

Sin embargo, muchos aspectos de la maduración de ovocitos, fecundación y desarrollo embrionario difieren de las de otras especies. Cuando la recuperación y el cultivo de los ovocitos equinos se realiza inmediatamente después del sacrificio se obtiene un mayor porcentaje de maduración que el que se obtiene a partir de ovocitos de ovarios que han sido almacenados; esto está relacionado con daños a la cromatina en los ovocitos de Cp durante el almacenamiento. En contraste, el porcentaje de desarrollo de blastocisto *in vitro* es mayor en los ovocitos recuperados desde el ovario de manera tardía (Hinrichs, 2010a).

La duración óptima de maduración varía según la morfología del cúmulo y el tiempo de recuperación del ovario, pero no hay ninguna diferencia en capacidad de desarrollo entre los ovocitos Ex y Cp. La FIV se puede lograr utilizando inyección intracitoplasmática de espermatozoides: el cultivo de los ovocitos inyectados en un medio con glucosa alta puede producir más del 30% desarrollo del blastocisto (Hinrichs, 2010a).

#### **2.1.6 CAPACITACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS *IN VITRO***

La eficiente capacitación *in vitro* de espermatozoides equinos no se ha logrado todavía, como lo sugieren las bajas tasas de penetración de espermatozoides reportados en los estudios de FIV (McPartlin, 2009).

La tecnología de FIV en el equino se inició en 1989. Los primeros estudios utilizaron ovocitos madurados *in vivo* y semen tratado con ionóforo de calcio A23187 como sustancia capacitante, pero se reportó una baja tasa de fertilización (2 a 33%) (Alm, 2001; Hinrichs,

2002), y estos resultados fueron inconsistentes incluso entre los estudios realizados por los mismos laboratorios (Dell'Aquila, 1995). La fertilización también se ha logrado utilizando espermatozoides descongelados tratados con heparina (Dell'Aquila, 1995; Alm, 2001).

En 2008, McPartlin incubó los espermatozoides en medio Whitten modificado (MW) adicionado de 25 mM de NaHCO<sub>3</sub> y 7 mg/ml de BSA (medio de capacitación) por 4-6 h, y produjo altas tasas de fosforilación de proteína tirosina además de importantes porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal. Datos recientes indican que se pueden lograr buenas tasas de fertilización (60.7%) después del tratamiento de los espermatozoides con procaína para inducir hiperactivación (McPartlin, 2009), pero no se han demostrado avances en el desarrollo embrionario después de este tratamiento.

Es probable que las bajas tasas de penetración de los espermatozoides observadas en los estudios de fecundación *in vitro* se hayan derivado de la incapacidad de capacitar y/o hiperactivar adecuadamente los espermatozoides equinos en el laboratorio. Aunque la base molecular de la capacitación es aún poco conocida, la capacidad de los espermatozoides para fertilizar un ovocito se ha correlacionado con aumentos dependientes del tiempo en la fosforilación de la proteína tirosina y la adquisición de la capacidad de respuesta acrosomal en todas las especies estudiadas hasta ahora (McPartlin, 2009).

La FIV, es ampliamente utilizada con diferentes animales como vacas, cerdos y ovejas (Choi, 1993), sin embargo, en el caballo las tasas de éxito han sido limitadas (15 y 33%) (Fulka y Okolsky 1981; Blue, 1989), probablemente debido a la falta de una eficiente capacitación *in vitro* de los espermatozoides. Hasta el momento solo se ha reportado el nacimiento de 2 potrillos luego de la FIV convencional, y en ambos casos los ovocitos utilizados fueron madurados *in vivo* (Palmer, 1991).

#### **2.1.6.1 TINCIÓN CON CLORTETRACICLINA**

La capacitación es un fenómeno vital que un espermatozoide necesario para que pueda fertilizar un ovocito. Sin embargo, la falta de un método fiable y fácil para la evaluación de la capacitación espermática, ha dado lugar a una comprensión incompleta de este importante proceso. En la actualidad, el único ensayo generalmente aceptado de la capacitación es la tinción de clortetraciclina (CTC), se ha utilizado para evaluar el estado de capacitación de los espermatozoides (Varner, 1987; Saling, 1979) y actualmente es el

ensayo de elección, ya que distingue tres etapas diferentes de activación del espermatozoides; no capacitados, capacitados con acrosoma intacto, y capacitados con acrosoma reaccionado. Sin embargo, se desconoce como el CTC interactúa en la superficie de los espermatozoides en el nivel molecular y, por desgracia, la evaluación de la tinción de CTC se lleva a cabo en células fijas.

#### **2.1.6.2 EFECTO DE LOS DILUYENTES EN EL SEMEN EQUINO**

El primer trabajo sobre congelación de semen de burros fue realizado por Polge y Minotakis (1964), con un diluyente a base de yema de huevo y glicerol. Posteriormente, Krause y Grove (1967) evaluaron diluyentes a base de glucosa, lactosa y rafinosa con yema de huevo y glicerol en semen de burros y caballos, obteniendo motilidades de 50 a 70%, después del descongelamiento, con resultados de fertilidad muy variables.

Entre los diluyentes más empleados se encuentran la solución sacarosa al 11% (Piao *et al.*, 1988), solución glucosa EDTA (Klug, 1992), solución de lactato de ringer, solución de ringer lactato enriquecido con medio Kenney.

Pommer *et al.* (2002) encontraron que la incubación de espermatozoides en un medio con leche descremada adicionada con glucosa (SMG) presentaba una mayor proporción de reacciones del acrosoma, siendo también mayor la cantidad de calcio (Ca) intracelular presente en las células espermáticas en ese mismo medio. Se cree que la leche contiene factores que son capaces de aumentar el flujo de colesterol desde la membrana espermática (Bergeron y Manjunath, 2006).

La acción de las lipoproteínas de la yema de huevo en los diluyentes de otros crioprotectores, como por ejemplo, el dimetil sulfóxido y el glicerol, es la de reducir el número de poros en la membrana del espermatozoide y también las funciones ATP-dependientes, así mismo, la agregación proteica y formación de bloques lipídicos se verían reducidos. Aunque no se tiene bien determinado si la acción del glicerol tiene efectos externos o internos en la célula, hay evidencias de que la presencia de un aditivo crioprotector reduce la concentración de sales intracelulares a una temperatura dada, debido a que se incrementa la fracción no congelada en el exterior de la célula (Palacios, 1994).

A pesar de que los mecanismos de acción no se conocen con certeza, se considera que puede haber una interacción entre el glicerol-dilutor a base de leche y el aparato reproductivo de los equinos (Vidament *et al.*, 2008).

### **2.1.6.3 EFECTO DE LA PROCAÍNA EN LA FOSFORILACIÓN DE LA TIROSINA Y LA EXOCITOSIS ACROSOMAL**

La procaína es un anestésico local, pero está demostrado que induce la hiperactivación de los espermatozoides en algunas especies de mamíferos, posiblemente mediante un aumento en la permeabilidad del calcio por la membrana plasmática (Mujica, 1994). Las vías de señalización que inician y mantienen la motilidad y la hiperactivación no están bien definidos, pero se ha demostrado que el calcio, el bicarbonato y el AMPc son esenciales para este proceso (Suarez, 2003).

Los intentos para capacitar a los espermatozoides *in vitro* han tenido dificultades en el caballo, como se evidencia por los bajos niveles de fosforilación de la proteína tirosina (Ellington, 1993; Pommer, 2003) las bajas tasas de exocitosis acrosomal (Rathi, 2003; Christensen, 1996), y las bajas tasas de penetración de los espermatozoides al intentar la FIV (Alm, 2001; Hinrichs, 2002).

Se cree que la capacitación y la hiperactivación son procesos independientes. Aunque el mecanismo exacto por el cual la procaína induce hiperactivación no se conoce, se cree que estimula la afluencia de calcio mediante el aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática (Mujica, 1994).

### **2.1.7 UNIONES HETERÓLOGAS**

La comparación de las especies equina y porcina, podría ser una nueva estrategia para identificar los elementos clave en el mecanismo de fertilización, comprender las razones del fracaso de la FIV y mejorar las tasas de fecundación *in vitro* en ambas especies (Yanagimachi, 1994). En el cerdo, la fertilización *in vitro* (FIV) y las tasas son polispermia son altas, y los espermatozoides penetran fácilmente a través de la zona pelúcida (ZP). En cambio, las tasas de fecundación *in vitro* en los equinos son bajas, la polispermia es

escasa y la ZP presenta endurecimiento por la liberación precoz de los gránulos corticales (Dell'Aquila, 1998).

#### **2.1.7.1 FECUNDACIÓN Y ZONA PELÚCIDA**

La fecundación en mamíferos involucra una serie de eventos complejos. Una etapa clave en este proceso, es la unión del espermatozoide a la cubierta del ovocito (óvulo), estructura conocida como zona pelúcida (ZP) y que corresponde a una matriz extracelular, que se forma alrededor del ovocito de los mamíferos durante los estadios iniciales de la ovogénesis (folículo primario y secundario) (Dunbar, 1989).

La unión entre espermatozoides y ovocitos, en ensayos de uniones homólogas y heterólogas, involucra el reconocimiento entre los receptores del espermatozoide, en la superficie de la zona pelúcida (ZP), y las proteínas de unión correspondientes de la ZP en la célula espermática. La ZP, una matriz transparente extracelular que rodea al ovocito (Sinowatz *et al.*, 2001), desempeña importantes funciones en la interacción entre los gametos. Es de interés debido a su importancia biológica en los procesos de la foliculogénesis (Dunbar *et al.*, 1989), la fertilización (Dunbar, 1983; O'Rand *et al.*, 1986; Yanagimachi, 1988) y el desarrollo embrionario temprano (Modlinski, 1970). Las glicoproteínas de la ZP de varias especies de mamíferos, incluyendo ratones, cerdos, hámsters, conejos y seres humanos se han estudiado usando una variedad de métodos histológicos, inmunoquímica y electroforesis para demostrar que tienen antígenos determinantes que son compartidos, así como otros que son únicos para cada especie (Sacco *et al.*, 1981; Maresh y Dunbar, 1987; Timmons *et al.*, 1987).

Las características morfológicas de la ZP equina (EZP) han sido evaluadas con microscopio electrónico (Betteridge *et al.*, 1982) y se ha visto que cuando está madura tiene un espesor de 7 a 10  $\mu\text{m}$  (Vogelsang *et al.*, 1987), que es comparable con la ZP de cerdo o vaca, y la superficie morfológica que se visualizó demuestra patrones típicos a la otras ZP estudiadas hasta la fecha (Dunbar *et al.*, 1991).

Las proteínas de la ZP se han convertido en un asunto de interés creciente. Trabajos anteriores demostraron que la ZP porcina y EZP, cuentan con antígenos comunes (Skinner *et al.*, 1990; Paterson & Aitken, 1990). La escasez de información sobre la composición bioquímica de la EZP, es la respuesta probable a la dificultad encontrada al recuperar

ovocitos a partir de ovarios equinos, en cantidades suficientes como para llevar a cabo estudios bioquímicos o inmunológicos detallados. Se han desarrollado métodos para aislar EZP, y se han modificado los métodos de análisis existentes para estudiar sus glicoproteínas constituyentes (Nakano, 1989).

Se sabe que la EZP es menos selectiva que la ZP de los ovocitos porcinos, sin embargo, los espermatozoides equinos son menos competentes para someterse a reacción acrosomal (Skinner *et al.*, 1990).

En la especie porcina, los porcentajes de FIV son superiores al 80%, y los niveles de polispermia después de la fecundación *in vitro* suele superar el 50% (Abeydeera, 1997; Nagai, 2006). En la especie equina, las tasas de fertilización son inferiores a 60%, y la polispermia es escasa (Palmer, 1991; McPartlin, 2009). Esta diferencia en la eficacia de penetración *in vitro* a través de la ZP sugiere que los elementos que intervienen en la penetración de ZP difieren entre estas dos especies.

Se piensa que la FIV ha tenido poco éxito en el caballo, debido a las bajas tasas de penetración de los espermatozoides a través de la zona pelúcida (ZP). Se ha demostrado que la ZP de los ovocitos de rata y ratón se somete a un endurecimiento espontáneo de la ZP, definido como un incremento en la digestión de proteasas cuando son madurados *in vitro* en un medio libre de suero (De Felici, 1982; Zhang, 1991).

El endurecimiento de la ZP ocurre de manera natural después de la fertilización en los ovocitos, como consecuencia de la liberación de los gránulos corticales, constituyendo un bloqueo primario para la polispermia. Por otro lado, el endurecimiento espontáneo de la ZP ocurre *in vitro* probablemente seguido por una precoz exocitosis de los gránulos corticales impidiendo la penetración de los espermatozoides y la fertilización (Fuji, 1990; Zhang, 1991).

El fetuin es una glicoproteína presente en el suero fetal de ternera (FCS) y un inhibidor de la proteasa, se ha demostrado que durante la MIV de ovocitos de ratón inhibe el endurecimiento de la ZP, impidiendo la conversión proteolítica de ZP2 a ZP2f causante de la liberación precoz de los gránulos corticales y baja fertilización (Dellaquila, 1999).

El fenómeno de endurecimiento de la ZP se produce también en los ovocitos equinos madurados *in vitro*, está relacionada con la estación, la etapa del ciclo estral de la yegua donante y condiciones de cultivo. Los ovocitos recuperados de yeguas en diestro temprano

y cultivados en un medio libre de suero mostraron mayor resistencia de la ZP a la digestión con proteasa (Fusco, 1998). Además, los ovocitos cultivaron después de la eliminación de las células del cumulus mostraron un aumento en el endurecimiento de la ZP, mientras que la solubilidad ZP de ovocitos equinos madurados *in vitro* no se vio afectada por la duración del cultivo (Dell'Aquila, 1998), como en el ratón.

Las uniones de gametos heterólogas han sido observadas anteriormente empleando diferentes combinaciones de espermatozoides y ovocitos de mamíferos (Bedford, 1977; Glabe y Vacquier, 1977; Yoshimatsu, 1988; Liu, 1991; Cox, 1992; Lanzendorf, 1992; Oehinger, 1993). Las interacciones homólogas de espermatozoide y zona pelúcida parecen ser menos restrictivas empleando ovocitos madurados *in vitro* (Hartmann, 1983). En un trabajo de unión homóloga (Lynham y Harrison, 1999), fue estudiada la interacción espermatozoide-zona pelúcida empleando ovocitos inmaduros criopreservados libres de *cumulus*, obtenidos de numerosos ovarios de cerdas, con espermatozoides también criopreservados. La penetración de la zona no ocurrió al comienzo de la incubación, se incrementó gradualmente hasta las 3 h del inicio de este proceso, declinando posteriormente. La habilidad del sistema enzimático equino, frente a una unión heteróloga, parece más pronunciada que la porcina.

## **2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La fertilización *in vitro* en equinos reporta bajas tasas de éxito, debido principalmente a que las técnicas de maduración de los ovocitos *in vitro* no se han estandarizado y a una inadecuada capacitación e hiperactivación de los espermatozoides en los procesos *in vitro*.

## **2.3 HIPÓTESIS**

- La utilización de suero de yegua obtenido en dos etapas diferentes del estro, (12 y 36 h de presentarse los primeros signos), mejorarán las condiciones de la maduración *in vitro* de ovocitos y la hiperactivación de los espermatozoides con procaína aumentan la fertilización *in vitro*.

## **2.4 OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Mejorar las condiciones de maduración de los ovocitos equinos *in vitro* así como el proceso de hiperactivación de los espermatozoides.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar si la manipulación de ovocitos con PBS o TCM 199, suplementado con 20 % de suero de yegua en estro (EMS), afecta los porcentajes de maduración de los ovocitos equinos.
- Evaluar los porcentajes de maduración de los ovocitos equinos utilizando medio TCM 199 suplementado con hormonas y  $17\beta$  estradiol adicionado con 10 % de suero de yegua en estro (>12 h) y 5 % en ovulación (< 36 h) vs. 10 % de suero de yegua en estro (>12 h).
- Comparar la capacidad de unión de espermatozoides equinos tratados con heparina vs. procaína, en ovocitos de cerda.

### 3 METODOLOGÍA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, del Centro Multidisciplinario de Estudios de Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, que se ubican en el km 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro.

La recolección de ovocitos se realizó de ovarios de yeguas sacrificadas en el rastro del municipio de Zacapu, Mich. Se trasladaron en un termo, en suero salino tamponado en fosfatos (PBS: NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/l) con 0,1% (v/v) gentamicina y antimicótico; una vez en el laboratorio se enjuagaron con agua destilada. Los complejos *cumulus* ovocito (CCO) se recuperaron aspirando el contenido utilizando una jeringa estéril de 10 ml y aguja 18Gx1½ mm. Para aumentar la probabilidad de recuperación de ovocitos, se raspó la pared del folículo con el bisel de la aguja, el fluido se recuperó en un tubo cónico de 50 ml estéril o en una caja petri, dejando sedimentar por 15 minutos a 38°C.

La recuperación de los ovocitos se logró con la ayuda de un microscopio estereoscópico, utilizando una pipeta Pasteur de vidrio alargada por calor y conectada a una cánula de silicona (Tharasanit, 2006), se localizaron los ovocitos para su posterior selección.

Para lograr los objetivos, el trabajo se desarrolló en 2 etapas, los ovocitos recuperados se dividieron en dos grupos. Un grupo de ovocitos se manipuló con PBS y en el otro grupo se utilizó medio base TCM 199, suplementado con el 20 % de suero de yegua en estro (EMS); el paquete celular de cada grupo se lavó de 3 a 4 veces (PBS y TCM 199) respectivamente.

Para la maduración se colocaron en cajas de cultivo de 4 pozos, se utilizó medio de maduración (TCM 199 suplementado con hormonas, 17β estradiol), de esta manera se comparó si la manipulación influía en la maduración, este procedimiento se realizó durante la temporada reproductiva y temporada no reproductiva.

*Maduración de ovocitos.* En el experimento 1 el medio base utilizado fue: (TCM 199 con sales Earle's, con 4.43 mM Hepes y 33.9 mM bicarbonato de sodio y suplementado con 0.1 g/l L-glutamina, 2 mM piruvato de sodio, 2.92 mM hemilactato de calcio, y 50 mg/ml de gentamicina). Después de la preparación, el pH fue ajustado a 7.2, el medio fue filtrado con filtros de 0.22mm. Se suplementó con gonadotropinas (10 µg/ml de FSH ovina, 20 µg/ml de LH bovina, 1 µg/ml de 17β estradiol y 10% de EMS)

En el experimento 2, se utilizó medio base del experimento 1, agregando a la suplementación el 5% de suero de yegua en el primer día de la ovulación (OMS), obtenido a las 36 h posteriores a la presentación de signos de celo. El medio fue filtrado nuevamente y se preequilibró por 1 h en 5% de CO<sub>2</sub> en aire antes de comenzar a usarlo. En una caja de cultivo de 4 pozos, se colocaron los COCs con 400 µl de medio por pozo, se cubrieron con aceite mineral y se cultivaron por 36 h a 38 °C en 5% de CO<sub>2</sub> en el aire.

Después de la maduración, los COCs fueron parcialmente desnudados succionando suave y repetidamente con la punta de una pipeta Pasteur, en 0.5% hialuronidasa porcina diluida en TCM 199 con sales Hanks, 25 µg/ml de gentamicina, y 20% de suero fetal bovino (FBS) (Dell'Aquila, 1996; McPartlin, 2009).

La segunda parte consistió en comparar la capacidad de unión de los espermatozoides equinos tratados con heparina y procaína, utilizando un modelo heterólogo (ovocitos de cerda y espermatozoides equinos)

Una vez descongelados, los espermatozoides se colocaron en tubos de 15 ml, se lavaron 3 veces con PBS preequilibrado a 37°C por medio de centrifugación a 1000 rpm por 2.5 minutos, a la pastilla de espermatozoides se le agregaron 300µl de PBS y se resuspendieron, se colocaron en un tubo Eppendorf; se agregaron 5 µl de tinción Höchst; se cubrió el tubo con papel aluminio y se dejaron en incubación por 30 minutos, posteriormente se le agregaron 50µl de espermatozoides tratados con tinción Höchst (suspensión a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/ml) en las cajas que contenían los ovocitos de cerdo libres de células de la granulosa (20-30 por pozo). En uno de los tratamientos se agregaron 5 mM de procaína, al tratamiento 2 se agregaron 5 mM de heparina y un control, al que no se le agregó ninguna sustancia. Se colocaron en incubación por una hora con 5% de CO<sub>2</sub> en aire a 38.5°C.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS ETAPA I

#### MANIPULACIÓN Y MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS EQUINOS COMPARANDO DOS MEDIOS E INFLUENCIA ESTACIONAL SOBRE LA MADURACIÓN

##### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia del suero de yegua en estro (EMS) y en ovulación (OMS) obtenido a las 12 y 36 h posteriores a la aparición de los primeros signos del celo, en la maduración *in vitro* de los ovocitos equinos. Los ovocitos fueron recuperados de yeguas sacrificadas durante la temporada reproductiva (primavera-verano), y no reproductiva (otoño-invierno), se manipularon con suero salino tamponado en fosfatos (PBS) o TCM 199 (Tissue culture medium) con 20% de suero de yegua en estro (EMS), en dos grupos morfológicamente homogéneos, para su maduración. La maduración de los ovocitos se llevó a cabo utilizando 10% de EMS en el experimento 1, y 10% de EMS más 5% de suero de yegua en ovulación (OMS) en el experimento 2. Este último, presentó un número de maduraciones mayor, aunque las diferencias estadísticas no fueron significativas ( $P > 0.05$ ). En síntesis, durante la etapa reproductiva el porcentaje de maduración obtenido fue 18% más alto que en la etapa no reproductiva.

**Palabras clave:** ovocitos, suero de yegua en estro (EMS), temporada reproductiva.

##### ABSTRACT

**The objective of this study was to evaluate the efficiency of estrus mare serum (EMS) and ovulation (OMS) obtaining at 12 and 36 h after the onset of the first signs of estrus in in-vitro maturation of equine oocytes. The oocytes were recovered from slaughtered mares during the breeding season (spring-summer), and nonbreeding (autumn-winter), where processed with phosphate- buffered saline (PBS) or TCM 199 (Tissue culture medium) with 20% estrum mare serum (EMS) in two morphologically homogeneous groups, for their maturation. The maturation of the oocytes was carried out using 10% EMS in Experiment 1, and 10% of EMS plus 5% ovulation mare serum (OMS) in Experiment 2. This last one, showed a greater number of maturities,**

**although the statistical differences were not significant ( $P>0.05$ ). In summary, during the reproductive stage the maturation percentage obtained was 18 % higher than in non-reproductive stage.**

**Key words: oocytes, estrus mare serum (EMS), breeding season.**

## **Introducción**

Los estudios de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos equinos se han visto limitados por la dificultad para obtener material biológico en cantidad suficiente para la realización de experimentos a gran escala. Las condiciones para la maduración *in vivo* de los ovocitos de yegua difieren de la de otros mamíferos domésticos, debido principalmente a que la LH alcanza su pico aproximadamente 36 h posteriores al estro. El proceso de maduración *in vitro* en los equinos, aún no está claro. Fulka y Okolski (1981), fueron los primeros que describieron el proceso de maduración *in vitro*, reportando porcentajes de 12% de ovocitos en metafase II, después de 24 h de cultivo, y 68% a las 40 h. de cultivo utilizando TCM 199. Zhang *et al.* (1989) obtuvieron 40-68 % de ovocitos maduros a las 24 h y 67% a las 36 h. Shabpareh (1993) obtuvo 86% de maduración a las 30 h de cultivo utilizando TCM 199 con LH, FSH,  $17\beta$  estradiol y 10% de EMS. La mayoría de los estudios de MIV en ovocitos de caballos se ha optimizado el uso de TCM 199 como medio de cultivo con la adición de suero, líquido folicular o de hormonas (LH, FSH y estradiol  $17\beta$ ; Willis *et al.*, 1991; Dell'Aquila *et al.*, 1997; Hinrichs y Schmidt, 2000; Galli *et al.*, 2002; Lagutina *et al.*, 2005). Sin embargo, los niveles de LH y FSH no se han optimizado. Se han utilizado: hormona luteinizante de ovino (Dell'Aquila *et al.*, 1997), Bovina (Willis *et al.*, 1991; Shabpareh *et al.*, 1993; Squires *et al.*, 1996), de equino (Bezard *et al.*, 1997; Goudet *et al.*, 1997), y extracto de pituitaria equina (EPE) (Landim-Alvarenga y Choi, 1999), pero ninguno de ellos ha aumentado la eficacia de la FIV convencional. Por lo que la MIV y la fertilización *in vitro* (FIV) son técnicas que están lejos de ser utilizados de manera rutinaria como en otras especies, debido a que los porcentajes de éxito son muy bajos.

El objetivo de este trabajo fue comparar la suplementación del medio de cultivo TCM 199 con 10% ESM y el mismo medio con 10% EMS y 5% de suero de yegua en ovulación (OMS), así como la influencia de la estacionalidad en la maduración en los ovocitos *in vitro* (MIV).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, Centro Multidisciplinario de Estudios de Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, que se ubica en el km 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro.

### **Obtención de ovocitos**

La recolección de ovocitos se realizó de ovarios de yeguas sacrificadas en el rastro del municipio de Zacapu, Mich., éstos se trasladaron en suero salino tamponado en fosfatos (PBS: NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/l) con 0,1% (v/v) gentamicina y antimicótico en un termo, una vez en el laboratorio se enjuagaron nuevamente utilizando agua destilada. Los complejos *cumulus* ovocito (CCO) se recuperaron aspirando el contenido utilizando una jeringa estéril de 10 ml y aguja 18Gx1 ½ mm. Para aumentar la probabilidad de recuperación de ovocitos, se raspó la pared del folículo con el bisel de la aguja, el fluido se recuperó en un tubo cónico de 50 ml estéril dejando sedimentar por 15 minutos a 38°C. El paquete celular se lavó de 3 a 4 veces con medio de manipulación y se dejó sedimentar durante 10 minutos.

### **Manipulación de los ovocitos**

El paquete sedimentado se depositó en una caja de Petri, los ovocitos recuperados, se dividieron en 2 grupos, uno se manipuló con medio TCM 199 con sales de Earle, suplementado con 25 µg/ml de gentamicina y 20% de suero de yegua en estro, (Dell'Aquila, 1996) y el otro grupo se manipuló con PBS, ambos preequilibrados a 38 °C.

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se seleccionaron los complejos *cumulus*-ovocitos (CCOs) que presentaron 3, o más capas celulares y un citoplasma homogéneo (Figura 6), utilizando una pipeta Pasteur de vidrio alargada por calor y conectada a una cánula de silicona (Tharasanit, 2006).

### **Obtención de suero de yegua**

El suero se obtuvo de yeguas durante las primeras 12 horas de presentar los primeros signos de celo y del mismo animal 36 horas posteriores al inicio del celo (que es cuando la LH alcanza un pico máximo), con tubos vacutainer estéril con aditivo.

### **Medios de maduración**

En el experimento 1 el medio base utilizado fue: (TCM 199 con sales Earle's, con 4.43 mM Hepes y 33.9 mM bicarbonato de sodio y suplementado con 0.1 g/l L-glutamina, 2 mM piruvato de sodio, 2.92 mM hemilactato de calcio, y 50 mg/ml gentamicina). Después de la preparación, el pH fue ajustado a 7.2, el medio fue filtrado con filtros de 0.22 mm. Se suplementó con gonadotropinas (10 µg/ml de FSH ovina y 20 µg/ml de LH bovina, se agregó 1 µg/ml de 17β estradiol y 10% de EMS)

En el experimento 2, se utilizó medio base del experimento 1, agregando a la suplementación el 5% de suero de yegua en el primer día de la ovulación (OMS), obtenido a las 36 hrs. posteriores a la presentación de signos de celo. El medio fue filtrado nuevamente y se preequilibró por 1 h en 5% de CO<sub>2</sub> en aire antes de comenzar a usarlo. En una caja de cultivo de 4 pozos, se colocaron los COCs con 400 µl de medio por pozo, se cubrieron con aceite mineral y se cultivaron por 36 h a 38 °C en 5% de CO<sub>2</sub> en el aire. Después de la maduración, los COCs fueron parcialmente desnudados por pipeteo suave con la boca (Figura 5), en 0.5% hialuronidasa porcina diluida en TCM 199 con sales Hanks, 25 µg/ml de gentamicina, y 20% de suero fetal bovino (FBS) (Dell'Aquila, 1996; McPartlin, 2009). Se consideraron maduros los ovocitos que presentaron cuerpo polar visible (Figura 6). El análisis estadístico utilizando fue por medio de Chi cuadrada. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a P> 0.05.

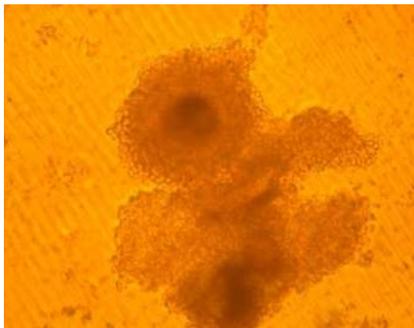


Figura 4. Ovocito con células de la granulosa intactas

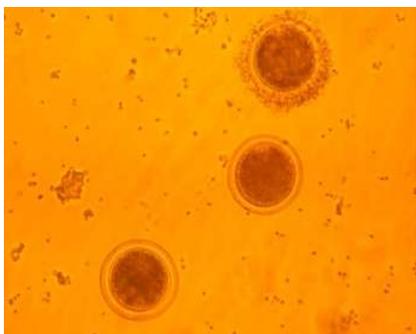


Figura 5. Ovocitos con las células de la granulosa parcialmente eliminadas, y sin células de la granulosa.

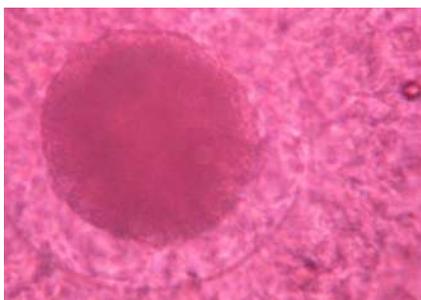


Figura 6. Ovocito maduro, se observa el cuerpo polar.

(Figuras 4, 5, 6, fotos tomadas en el laboratorio CMEB de la UMSNH)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la maduración de ovocitos equinos obtenidos utilizando dos tipos de manipulación, se presentan en la Tabla 1. Se utilizaron 128 ovocitos y fueron manipulados por aproximadamente 30 min.

Tabla 1. Manipulación de ovocitos tratados con PBS y TCM 199 +20% EMS

(PBS)	maduros	no maduros	TCM 199 +20% EMS	maduros	no maduros
5	4	1	5	4	1
6	5	1	6	5	1
7	6	1	7	7	0
8	4	4	8	4	4
13	8	5	13	10	3
11	7	4	11	8	3
5	3	2	5	3	2
9	7	2	9	8	1
<b>64</b>	<b>44</b>	<b>20</b>	<b>64</b>	<b>49</b>	<b>15</b>

El número de ovocitos maduros obtenidos utilizando TCM 199 +20% EMS como medio de manipulación fue mayor, aunque estadísticamente no significativo ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, a pesar de que la cantidad de ovocitos madurados son mayores, no se determinó si el uso de PBS o un medio de manipulación específico afectan al ovocito para su uso posterior en la MIV o en la FIV. El uso de EMS, tanto en medio de manipulación como en maduración ha reportado un porcentaje más alto de ovocitos madurados *in vitro* (Shabpareh, 1993; Dell'Aquila, 1996), sin embargo, no se ha determinado si produce en los ovocitos la liberación precoz de los gránulos corticales y por ende, el endurecimiento de la ZP. Choi (1993), concluye que los métodos de recuperación de los ovocitos no influyen en la maduración, aunque el uso de TCM 199 es más eficaz que el PBS y el Ham's F10 utilizado para la MIV en equinos.

**Gráfica 1.** Porcentaje de ovocitos maduros durante la estación reproductiva (primavera-verano) y la estación no reproductiva (otoño-invierno)



Las yeguas de las que se obtuvieron los ovarios provienen de diferentes regiones del estado, el estado nutricional y la edad son variables. El porcentaje de maduración de los ovocitos colectados durante la temporada reproductiva (primavera-verano) fue mayor que los que se colectaron durante la temporada no reproductiva (otoño-invierno).

Slusher, (2004) menciona que durante el periodo de anestro, la mayoría de las yeguas no muestran receptividad sexual y no desarrollan folículos que ovulen, aunque hay un porcentaje pequeño de yeguas que no expresan un modelo de comportamiento estacional y quedan fisiológicamente receptivas a los garañones a lo largo del año. La situación cambia dramáticamente durante la primavera y el verano. Mientras que las horas luz aumentan, las secreciones hormonales ováricas también aumentan. La capacidad de maduración de los ovocitos disminuye y los ovarios presentan una consistencia más dura y son más pequeños en la temporada no reproductiva.

Diversos estudios han utilizado hormonas de suero como apoyo en el proceso de maduración de los ovocitos equinos, debido a que la oleada de LH, es más gradual en la yegua al compararla con otras especies, y alcanza sus concentraciones periféricas máximas en uno a dos días después de que se presenta el celo, seguida de la ovulación, que se alcanza cuando los niveles de LH se incrementan (Ginther, 1992). Zhang (1989), informó que con el uso de EMS, se logra mayor número de ovocitos en Metafase II comparándolo con suero fetal de ternera (FCS). Willis (1991), obtuvo la tasa más alta de formación de cuerpo polar (80 %) después de 32 h de cultivo en TCM 199 suplementado con EMS y OMS, con resultados estadísticamente significativos ( $P < 0.001$ ) con 1027 ovocitos. Shabpareh (1993), obtuvo un porcentaje de maduración más alto (86%), utilizando medio TCM 199 con 20% de EMS para la manipulación y cultivándolos en TCM 199 suplementado con estradiol, FSH y 10 % de EMS por un periodo de 30 h. Del Aquila (1995) obtuvo una tasa de maduración alta utilizando EMS (82%) vs. suero de vaca en estro (ECS) (87%), aunque no hubo diferencia estadística., la tasa de fertilización que obtuvo del grupo con EMS fue de 32.6 % vs. 12.2% con ECS.

**Tabla 3.** Ovocitos maduros obtenidos adicionando al medio base suplementado, 10% de EMS y 10% de EMS y 5% OMS

Número de ovocitos tratados en el Grupo 1	Madurados con 10% EMS	Número de ovocitos tratados en el Grupo 2	Madurados con 10% EMS + 5% OMS
9	7	9	8
12	7	12	9
10	7	10	8
7	5	7	6
6	4	6	5
8	5	8	6
<b>52</b>	<b>35</b>	<b>52</b>	<b>42</b>

El análisis estadístico utilizando fue Chi cuadrada, los valores no son significativos ( $P > 0.05$ ), a pesar de que la cantidad de ovocitos madurados con 10% EMS + 5% OMS son mayores que los madurados con 10% EMS,

### CONCLUSIONES

Los resultados utilizando 10% EMS + 5% OMS no son estadísticamente significativos ( $P > 0.05$ ), sin embargo, el número de ovocitos madurados muestran tendencias a ser mayores que los ovocitos que se maduraron con EMS.

### LITERATURA CITADA

**Bezard J, Mekarska A, Goudet G, Duchamp G, Palmer E.** (1997) Meiotic stage of the preovulatory equine oocytes at collection and competence of immature oocytes for in vitro maturation: effect of interval from induction of ovulation to follicle puncture.

Theriogenology , 47:386.

**Choi Y H, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N.** (1993) In vitro maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. Theriogenology; 40: 959-966.

**Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F.** (1995) In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology*; 45:547–560.

**Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM and Maritato** (1996) *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season *Theriogenology* 45 547-560

**Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F.** (1997) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro* matured equine oocytes. *Theriogenology*, 47:1139-1156.

**Fulka J Jr, Okolski A.** (1981) Culture of horse oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil*; 61: 213-215.

**Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G, Duchamp G, Daels P, Lazzari G.** (2002) Frozen-thawed embryos produced by ovum pickup of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse, *Theriogenology*, 58:705-708.

**Ginther, OJ.** (1992) Reproductive biology of the mare. Characteristics of the ovulatory season. 2 ed. Madison, Wisconsin. p. 172-229

**Goudet G, Bezard J, Duchamp G, Gérard N, Palmer E.** (1997) Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicular size.

**Hinrichs K, Schmidt AL.** (2000). Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. *Biol Reprod*, 62:1402-1408.

**Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Colleoni S, Ponderato N, Turini P, Crotti G, Galli C.** (2005) Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocytes morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*, 130:559-567.

**Landim-Alvarenga FC, Choi YH.** (1999) *In vitro* maturation of equine oocytes without hormones. *Theriogenology*, 51:383. (abstract).

**McPartlin LA, Suarez SS, Czaya CA, Hinrichs K, and Bedford-Guaus SJ.** (2009) Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful *In Vitro* Fertilization of Equine Oocytes. *Biol. Reprod.* 81, 199–206

**Shabpareh V, Squires E L, Seidel E Jr, Jasko D J.**(1993) Methods for collecting and maturing and maturing equine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 40: 1161-1175.

- Slusher, SH.** (2004) Reproductive management of the mare. Disponible en: <http://www.mofoxtrot.com/mare-reproduction.htm> y también en: <http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3974web.pdf>
- Squires EL.** (1996) Maturation and fertilization of equine oocytes. *Veterinary clinics of North America: equine practice*; 12:31–45.
- Tharasanit, T.S Colleoni, G Lazzari, B Colenbrander, C Galli and T A E Stout.** (2006) Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Bologna, Italy
- Willis P, Candle AB, Fayrer-Ho&en RA.** (1991) Equine oocyte *in vitro* maturation: influence of maturation: influence of sera, time and hormones. *Mol Reprod Dev*; 30:360-368.
- Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR, Galli C.** (1989) Recent studies on *in vivo* fertilization of *in vitro* matured horse oocytes. *Equine Vet J (Suppl8)*:101-104.

## 4.2 RESULTADOS ETAPA II

### EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HEPARINA Y LA PROCAÍNA EN LOS ESPERMATOZOIDES USANDO PRUEBAS HETERÓLOGAS

#### RESUMEN

El mecanismo de la fertilización sigue siendo en gran medida enigmático en los mamíferos. La identificación de las divergencias entre las especies podría permitir resaltar los componentes clave en el mecanismo de la fecundación. El objetivo de este trabajo, fue utilizar dos modelos divergentes; ovocitos de cerda/espermatozoides equinos, tratados con heparina y procaína, con la finalidad de evaluar si la hiperactivación de los espermatozoides aumenta la capacidad de unión a la zona pelúcida (ZP). Los espermatozoides equinos se colocaron en tres grupos: el grupo 1 recibió un tratamiento con procaína, grupo 2 con heparina y un tercer grupo no recibió tratamiento (grupo control), para su posterior utilización en la FIV. Un promedio de 175 espermatozoides tratados con procaína lograron adherirse firmemente a la zona pelúcida de los ovocitos después de 1 h de incubación, 70 espermatozoides tratados con heparina, y 22 en el grupo control. En los espermatozoides tratados con procaína, se observa un movimiento más vigoroso, lo que permite que un mayor número de espermatozoides penetre la ZP del ovocito de cerda, y permanecer adheridos después de 3 lavados.

Palabras clave: Fertilización, hiperactivación, zona pelúcida.

#### ABSTRACT

**Fertilization mechanism remains largely enigmatic in mammals. Identifying the differences between species could allow highlight the key components in the mechanism of fertilization. The aim of this work was to use two diverse models; Oocytes sow / equine sperm, treated whit heparin and procaine, in order to assess if sperm hyperactivation increases the capacity of binding to the zona pellucida (ZP). The equine sperm were placed into three groups: group 1 was treated with procaine, group 2 with heparin and a third group received no treatment (control group), for later use in IVF. An average of 175 procaine treated spermatozoa were able to attach**

**firmly to the zona pellucida of oocytes after 1 h incubation, 70 sperm treated with heparin, and 22 in the control group. In sperm treated with procaine, there is a strong movement, which allows a greater number of sperm penetrate the bristle oocyte's ZP, and remain adhered after 3 washes.**

**Key words: Fertilization, hyperactivation, zona pellucida**

## **INTRODUCCIÓN**

El mecanismo de la fecundación sigue siendo en gran parte enigmática en mamíferos. La mayoría de los estudios que exploran los mecanismos moleculares fertilización subyacente se han limitado a una sola especie, generalmente el ratón (Clark, 2006; Dean, 2004), cerdo (Rath, 2006), caballo (Topfer-Petersen, 2005; Mugnier, 2008), bovino (Yonezawa, 2001; Molnarova, 2006) sin un enfoque comparativo. Sin embargo, la identificación de las divergencias entre las especies nos podría permitir destacar los componentes clave en el mecanismo de la fecundación (Goudet, 2009).

En relación con las interacciones espermatozoide-ovocito heterólogas (entre gametos de diferentes especies), hay publicados numerosos artículos que cuestionan los dogmas clásicos aceptados por la comunidad científica (Töpfer-Petersen y Cechova 1990; Töpfer-Petersen, 1995; Sinowatz, 1998), en relación a la estricta especificidad de especie de la unión entre espermatozoide y ovocito. Bedford, (1977) publicó que existía cierto grado de interacción entre especies heterólogas a nivel de la unión espermatozoide-ovocito.

En el cerdo, la fertilización *in vitro* (FIV) y los porcentajes de polispermia son altos, y los espermatozoides penetran fácilmente a través de la zona pelúcida (ZP). Por el contrario, las tasas de fecundación *in vitro* son bajas en el caballo, y la polispermia es escasa. Los estudios que comparan varias especies son escasos, sin embargo, hay diferencias, aunque pequeñas, potencialmente significativas en el mecanismo de fertilización entre diferentes especies.

Los estudios comparativos con diferentes especies podrían identificar, conservando la interacción molecular específica de la especie que, podríamos destacar los componentes clave involucrados en el mecanismo de fecundación (Larson, 1997; Hedrick, 2008).

La fertilización en mamíferos implica varios pasos; espermatozoides capacitados que se unen a la ZP, que induce la reacción de acrosoma, posteriormente, la célula espermática

reacciona penetrando y se fusiona con la zona pelúcida del ovocito. En el interior del citoplasma, el núcleo del espermatozoide se descondensa, y el núcleo del ovocito se activa para formar pronúcleos masculino y femenino (Yanagimachi, 1994). El objetivo de este trabajo, fue evaluar si el tratamiento con procaína y heparina influyen de manera favorable en el espermatozoide para su utilización posterior en la fertilización *in vitro* en pruebas homólogas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, Centro Multidisciplinario de Estudios de Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, que se ubica en el km 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro.

La recolección de ovocitos se realizó de ovarios de cerdas sacrificadas en el rastro de Morelia, Mich., se trasladaron en suero salino tamponado en fosfatos (PBS) con 0,1% (v/v) gentamicina y antimicótico en un termo, una vez en el laboratorio se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en PBS. Los complejos *cumulus* ovocito (CCO) se recuperaron aspirando el contenido con una jeringa estéril de 10 ml y aguja 20Gx1 ½ mm, el fluido se recuperó en un tubo cónico de 50 ml estéril dejando sedimentar por 15 minutos a 38°C. El paquete celular se lavó de 3 a 4 veces con PBS, se dejó sedimentar durante 10 minutos y se depositó en una caja de Petri con PBS.

Utilizando un microscopio estereoscópico se seleccionaron los complejos *cumulus* ovocitos (CCOs), considerando aquellos que presentaron 3 o más capas celulares y un citoplasma homogéneo, utilizando una pipeta Pasteur de vidrio alargada por calor y conectada a una cánula de silicona (Tharasanit, 2006).

Se utilizaron pajillas con semen congelado, se descongelaron a baño maría a 37°C y se realizaron pruebas de tinción Clorhidrato de Tetraciclina (CTC) (Figura 7), con ayuda de un microscopio electrónico se contaron los espermatozoides capacitados y no capacitados, observándose aproximadamente un 90% de los espermatozoides capacitados.



Figura 7. Espermatozoides teñidos con CTC.

(Foto obtenida en el laboratorio de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UMSNH).

### **Tinción de espermatozoides con Höchst y pruebas heterólogas**

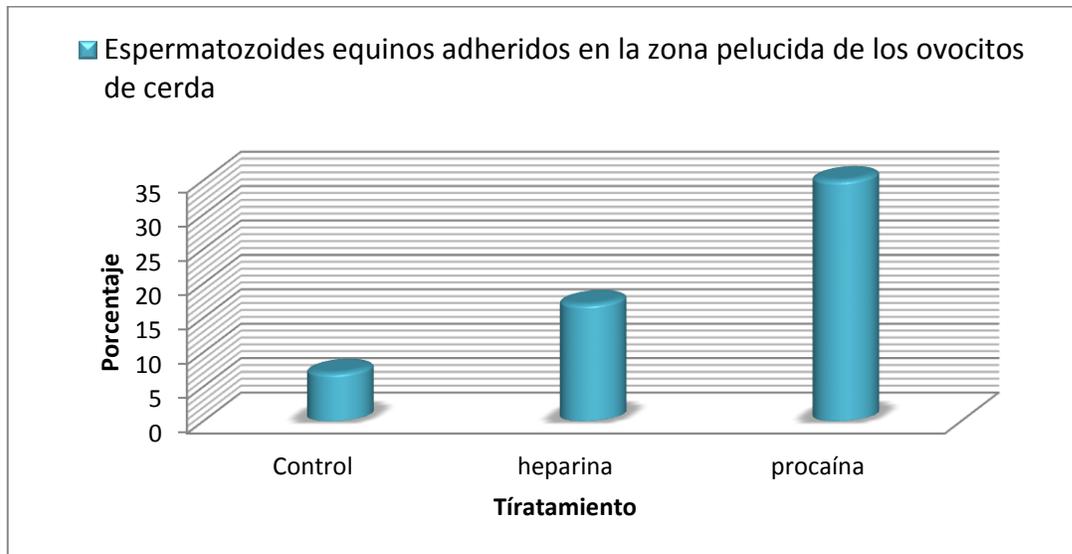
Un vez descongelados, los espermatozoides se colocaron en tubos de 15 ml, se lavaron 3 veces con PBS preequilibrado a 37°C por medio de centrifugación a 1000 rpm por 2.5 min, a la pastilla de espermatozoides se agregó 300µl de PBS y se resuspendieron, se colocaron en un tubo Eppendorf, se agregaron 5 µl de tinción Höchst, se cubrieron el tubo con papel aluminio dejándolos en incubación por 30 minutos, posteriormente, en una caja de cuatro pozos, con 20 a 30 ovocitos de cerda libres de células de la granulosa, se agregaron 50µl de espermatozoides tratados con tinción Höchst (suspensión a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/ml), se agregaron 5 mM de procaína en el pozo número 1, en el pozo número 2, se agregaron 5 mM de heparina y un control, al que no se le agregó ninguna sustancia. Se colocaron en incubación por una hora con 5% de CO<sup>2</sup> en aire a 38.5°C.

Los ovocitos se lavaron los 3 veces para contar la cantidad de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida de los ovocitos de cerdo, de manera aleatoria, se seleccionaron 3 ovocitos de cada grupo. Los ovocitos fueron contados en un plano focal utilizando 400 x aumento en un microscopio de fluorescencia y no fueron previamente madurados.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El número promedio de espermatozoides que se adhirieron firmemente a la ZP del ovocito se presenta en la Gráfica 1.

Gráfica 1. Porcentaje de espermatozoides que lograron adherirse firmemente a la zona pelúcida de los ovocitos de cerda con tratamiento de procaína, heparina y sin tratamiento.



En las pruebas realizadas con uniones heterólogas, los espermatozoides equinos tratados con procaína muestran hiperactividad, un promedio de 175 espermatozoides se adhirieron firmemente a la ZP porcina (Figura 8); muchos de ellos presentaron unión primaria y secundaria, después de una hora de incubación. En el pozo en que se colocaron los espermatozoides con heparina se observan con el movimiento normal, algunos se aglutinan en residuos de células de la granulosa y un promedio de 70 espermatozoides se adhieren a la zona pelúcida de los ovocitos de cerda.

Aproximadamente el 70 % de los espermatozoides que no recibieron tratamiento murieron, sólo lograron unirse un promedio de 22 espermatozoides (Figura 9). Aunque en las pruebas de tinción realizadas a los espermatozoides muestran un porcentaje alto de capacitación, la movilidad en el semen congelado disminuye notablemente. Actualmente los porcentajes de fertilización utilizando la heparina como agente capacitante han alcanzado un máximo de 33 %. En los espermatozoides tratados con procaína, se observa un movimiento más vigoroso, lo que permite que un mayor número de espermatozoides logre penetrar la ZP del ovocito de cerda, y permanecer adheridos después de 3 lavados.

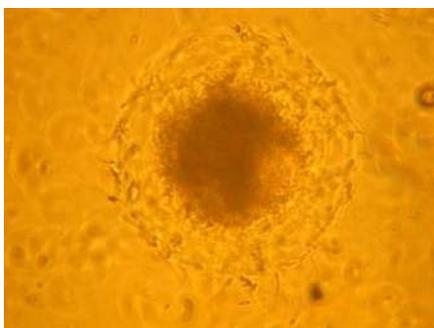


Figura 8



Figura 9

Figura 8. Ovocitos inmaduros de cerdo y espermatozoides equinos con procaína

Figura 9. Ovocitos inmaduros de cerdos y espermatozoides equinos control

(Fotos tomadas en el CMEB de la UMSNH)

McPartlin *et al.* (2009) utilizaron medio Whittens Modificado para capacitar los espermatozoides, y procaína para hiperactivarlos obteniendo un porcentaje de fertilización del 60.7%, en un experimento repetible, con este estudio comprueban que tanto la capacitación como la hiperactivación de los espermatozoides equinos, son necesarias para una exitosa FIV.

A pesar de que el tratamiento con procaína no se ha asociado con cambios en la fosforilación de la proteína tirosina o la inducción de exocitosis acrosomal, induce la hiperactivación de los espermatozoides equinos y facilita la fertilización.

Sinowatz *et al.* (2001) documentó que un promedio de 100 espermatozoides porcinos, y 150 a 200 equinos permanecieron fuertemente adheridos a la zona y no pudieron ser removidos con vigorosas agitaciones con una  $\mu$ -pipeta de 300 $\mu$ m de diámetro. A nivel ultraestructural, pudieron demostrar que la mayoría de los espermatozoides adheridos sufrieron reacción acrosómica. Bedford (1977), publicó que existía cierto grado de interacción entre especies heterólogas a nivel de la unión espermatozoide-ovocito. Posteriormente, se han descrito diferentes casos de interacción heteróloga entre espermatozoides porcinos y equinos con ZP bovina (Sinowatz, 2003). Uniones de gametos heterólogos han sido observadas anteriormente empleando diferentes combinaciones de espermatozoides y ovocitos de mamíferos (Bedford, 1977; Glabe y Vacquier, 1977; Yoshimatsu, 1988; Liu, 1991; Cox, 1992; Lanzendorf, 1992; Oehinger, 1993). Las interacciones especie-específicas de espermatozoide y zona parecen ser menos restrictivas empleando ovocitos madurados *in vitro* (Hartmann 1983).

## CONCLUSIONES

Las uniones heterólogas son una herramienta de gran utilidad en los experimentos equinos debido al poco material biológico del que se dispone. El tratamiento con procaína puede aumentar la tasa de fertilización por la hiperactivación que induce en los espermatozoides. La comparación de estos dos modelos divergentes podría ser una nueva estrategia para identificar los elementos clave en el mecanismo de la fertilización. Además, la comparación de las especies de equino y porcino presenta un nuevo enfoque para comprender las razones del fracaso de la FIV, y para mejorar las tasas de fertilización *in vitro*, en ambas especies.

## LITERATURA CITADA

- Bedford, JM** . (1977) Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa *Anat Rec* 188, 477–483.
- Clark, GF; Dell, A.** (2006) Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem* ; 281:13853–13856.
- Cox, JF.** (1992) Fecundación heteróloga usando gametos de animales domésticos *Arch Med Vet* 24, 125–131
- Dean, J.** (2004) Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays* ; 26:29–38.
- Glabe, CG; Vacquier, VD** (1977) Species specific agglutination of eggs by binding isolated from sea urchin sperm. *Nature* 267, 836–837
- Goudet G, Mugnier S, Dell'Aquila ME, Pelaez J, Douet C, Ambruosi B, De Santis T, Lacalandra GM, Lebos C, Sizaret PY, Delaleu B, Monget P, Mermillod P, Magistrini M, Meyers S, Goudet G.**(2009) New Insights into the Mechanisms of Fertilization: Comparison of the Fertilization Steps, Composition, and Structure of the Zona Pellucida Between Horses and Pigs. *Biology of reproduction* 81, 856–870
- Hartmann, JF** (1983) Mammalian fertilization: gamete surface interactions in vitro In: Hartmann, JF (ed.), *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Academic Press, New York, pp. 325–364

- Hedrick JL.** (2008) Anuran and pig egg zona pellucida glycoproteins in fertilization and early development. *Int J Dev Biol*; 52(5–6):683– 701.
- Lanzendorf, SF; Holmgren, WJ; Johnson, DE; Jeyendran, RS** (1992) Hemi zona assay for measuring zona binding in the lowland gorilla. *Mol Reprod Dev* 31, 264–267
- Larson JL, Miller DJ.** (1997) Sperm from a variety of mammalian species express beta 1,4-galactosyltransferase on their surface. *Biol Reprod*; 57:442– 453.
- Molnarova Z, Machatkova M, Machal L, Horakova J, Hanzalova K.** (2006) A potential relationship between the acrosome response characteristics of bovine spermatozoa and their *in vitro* fertilizing ability. *Zygote*; 14(1):63–69.
- Mugnier S, Boittin S, Douet C, Monget P, Magistrini M, Goudet G.** (2008) The involvement of beta-1,4-galactosyltransferase and N-acetylglucosamine residues in fertilization has been lost in the horse. *Reprod Biol Endocrinol* ; 6:e51.
- Oehninger S, MahonyMC, Swanson JF, Hodgen GD** (1993) The specificity of human spermatozoa/zona pellucida interaction under assay conditions *Mol Reprod Dev* 35, 57–61
- Rath D, Töpfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, von Witzendorff D, Ebeling S, Ekhlasi-Hundrieser M, Piehler E, Petrunkina A, Romar R.** (2006) Structural, biochemical and functional aspects of spermocyte interactions in pigs. *Soc Reprod Fertil Suppl*; 62:317–330.
- Sinowatz F, J Plendel, S Kölle** (1998) Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat* 161, 196-205.
- Sinowatz F, Topfer-Petersen E, Koller S, Palma G** (2001). Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histol Embryol* 5:257-263.
- Tharasanit, T.S Colleoni, G Lazzari, B Colenbrander, C Galli and T A E Stout.** (2006) Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Bologna, Italy
- Töpfer-Petersen E, D Cechova** (1990) Zona pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin *Int J Androl* 13, 190-196.
- Töpfer-Petersen E, JJ Calvete, L Sanz, F Sinowatz** (1995) Carbohydrate- and heparin-binding proteins in mammalian fertilization *Andrologia* 27, 3003-324
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H.** (2005) The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim Reprod Sci*; 89:159–170.

**Yanagimachi R.** (1994) Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994:189–317.

**Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, Nakano M.** (2001) Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem*; 268(12):3587–3594.

**Yoshimatsu N, Yanagimachi IZ, Lopata A** (1988) Zonae pellucidae of salt-stored hamster and human eggs: their penetrability by homologous and heterologous spermatozoa *Gamete Res* 21, 115–126

## 5 DISCUSIÓN GENERAL

La utilización de diversos sueros (EMS, OMS, FCS, etc.) han sido el tema de investigación de diversos autores (Zhang, 1989; Willis, 1991; Shabpareh, 1993; Dell'Aquila, 1996), El uso de EMS, tanto en medio de manipulación como en maduración ha reportado un porcentaje más alto de ovocitos madurados *in vitro*, sin embargo, no se ha determinado si produce en los ovocitos la liberación precoz de los gránulos corticales y por ende, el endurecimiento de la ZP. Del Aquila (1995), obtiene una tasa de maduración alta utilizando EMS (82%) vs. suero de vaca en estro (ECS) (87%), aunque no hubo diferencia estadística., la tasa de fertilización que obtuvo del grupo con EMS fue de 32.6 % vs. 12.2% con ECS.

McPartlin *et al.* (2009) utilizaron medio Whittens Modificado para capacitar los espermatozoides, y procaína para hiperactivarlos obteniendo un porcentaje de fertilización del 60.7%, en un experimento repetible, con este estudio comprueban que tanto la capacitación como la hiperactivación de los espermatozoides equinos, son necesarias para una exitosa FIV. A pesar de que el tratamiento con procaína no se ha asociado con cambios en la fosforilación de la proteína tirosina o la inducción de exocitosis acrosomal, induce la hiperactivación de los espermatozoides equinos y facilita la fertilización.

Sinowatz (2001), documentó que un promedio de 100 espermatozoides porcinos y 150 a 200 equinos permanecieron fuertemente adheridos a la zona y no pudieron ser removidos con vigorosas agitaciones con una  $\mu$ -pipeta de 300 $\mu$ m de diámetro. A nivel ultraestructural pudieron demostrar que la mayoría de los espermatozoides adheridos sufrieron reacción acrosómica. Bedford (1977), publicó que existía cierto grado de interacción entre especies heterólogas a nivel de la unión espermatozoide-ovocito. Posteriormente, se han descrito diferentes casos de interacción heteróloga entre espermatozoides porcinos y equinos con ZP bovina (Sinowatz, 2003).

## 6 CONCLUSIONES GENERALES

Las tasas de MIV de los ovocitos equinos son menores a las obtenidas en otras especies, debido principalmente a los factores relacionados con las condiciones de cultivo *in vitro*, que afectan la maduración, la composición de los medios para la MIV de ovocitos equinos es en la actualidad uno de los aspectos más relevantes a analizar, además de que no todos los ovocitos obtenidos, independientemente de la técnica utilizada (colección de ovocitos de ovarios de yeguas sacrificadas, etc), son capaces de madurar. La utilización de EMS y OMS puede ser una buena alternativa para futuros estudios de la maduración de los ovocitos *in vitro*.

La comparación de estos dos modelos divergentes podría ser una nueva estrategia para identificar los elementos clave en el mecanismo de la fertilización. Además, la comparación de las especies de equino y porcino presenta un nuevo enfoque para comprender las razones del fracaso de la FIV, y para mejorar las tasas de fertilización *in vitro*, en ambas especies.

No existe actualmente mucho interés en técnicas de reproducción asistida en equinos, muchos aspectos de la maduración de ovocitos, fecundación y desarrollo embrionario difieren de otras especies como: la unión estrecha del ovocito equino a la pared del folículo, son difíciles de manejar reproductivamente por ser poliéstrico estacional, no existe un método seguro de superovulación, esto implica que la cantidad de embriones que se pueden obtener por yegua, son limitados, los costos son elevados y no se aplica de manera rutinaria en el campo. Esto es lamentable, ya que el caballo es una de las pocas especies domésticas que es a menudo lo suficientemente valioso como para justificar el uso comercial de estas técnicas. Debido a estas dificultades para alcanzar tasas de fecundación eficientes mediante fertilización *in vitro* (FIV) convencional, se ha recurrido a la utilización de métodos alternativos para mejorar los índices en la producción de embriones, como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), y la transferencia embrionaria

## 7 LITERATURA CITADA GENERAL

**Abeydeera LR, Day BN.** (1997) Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod*; 57:729–734.

**Abeydeera, LR.** (2002) *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology*; 57: 257-273

**Alm H, Torner H.** (1994) *In vitro* maturation of horse oocytes. *Theriogenology*; 42, 345-349.

**Alm H, Hinrichs K.** (1996) Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. *J Reprod Fertil*, 107:215-202.

**Alm H, Torner H, Becker F, Kanitz W, Hinrichs K.** (1997) Comparison of different methods for recovery of horse oocytes. *Equine Vet J Suppl* 25, 47–50.

**Alm H, Torner H, Blottner S, Nurnberg G, Kanitz W.** (2001) Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*; 56:817–829.

**Alvarez J.G; Storey B.T.** (1984) Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Bio Rep* 30: 323-331.

**Aitken R.J. et al.** (1997) Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavonoid protein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev.* 47:468-82.

**Amann R.P.** (2008) The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl.* 29; 469-87.

**Amann R.P; Graham J.K.** (1993) Spermatozoa function In: *Equine Reproduction* AO McKinnon and JL Voss (eds), Lea & Febiger, Philadelphia, pp 715-745.

**Arenas, R. E; Cambrón R, A; Ambríz G, Zúñiga R, PJ; Rofríguez T, A; Rosado G, A.** (2010) Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide.

**Bedford, J.M.** (1974). En: *Physiology and Genetics of Reproduction* (EM Coutinho, F Fuchs, ed) Plenum Press, New York, pp 55-68.

**Bedford, J.M.** (1977) Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa *Anat Rec* 188, 477–483

- Bergeron, A., Manjunath, P.** (2006) New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev.* 73:1338-1344.
- Betteridge, K.J., Eaglesome, M.D., Mitchell, I. Flood, P.F. & Bériault, R.** (1982) Development of horse embryos up to 22 days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of Anatomy* 135, 191-209.
- Bezard J, Mekarska A, Goudet G, Duchamp G, Palmer E.** (1997) Meiotic stage of the preovulatory equine oocytes at collection and competence of immature oocytes for in vitro maturation: effect of interval from induction of ovulation to follicle puncture. *Theriogenology*, 47:386.
- Bleil, J.D. and Wassarman, P.M.** (1980) Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.*, 76, 185–203
- Blue BJ, McKinnon AO, Squires EL, Seidel GE Jr, Muscari KT** (1989) Capacitation of stallion spermatozoa and fertilization of equine oocytes *in vitro*. *Equine Vet J ; (Suppl 8):* 11 1-116.
- Bou-Haila, A.T., D.R.** (2009) Signal traduction pathway that regulate sperm capitation and the acrosoma reaction. *Arch Biochem Byophys.* 485: 72-81
- Choi Y H, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N.** (1993) *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. *Theriogenology* 40: 959- 966.
- Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K,** (2004) Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction* 127, 187–194.
- Christensen P, Whitfield CH, Parkinson TJ.** (1996) In vitro induction of acrosoma reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. *Theriogenology*; 45:1201–1210.
- Clark GF, Dell A.** (2006) Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem ;* 281:13853–13856.
- Cox JF** (1992) Fecundación heteróloga usando gametos de animales domésticos *Arch Med Vet* 24, 125–131
- Cran, DG.** (1985) Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J Reprod Fertil*; 74: 237-245

- Cran, DG. y Cheng, WTK.** (1986) The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gamete Res*; 13: 241-251
- Cuervo-Arango, J. y Newcombe, J. R.** (2008). Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology*, 69, 681-687.
- Dean J.** (2004) Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays*; 26:29–38.
- De Felici M, Siracusa G.** (1982) Spontaneous hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. *Gamete Res*; 6:107–113
- De Lamirande, Leclerc EP and Gagnon C.** (1997) Capacitacion as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction an fertilization. *Mol Hum Reprod.* 3:175-94.
- Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F.** (1995) *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology*; 45:547–560.
- Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM and Maritato** (1996) *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season *Theriogenology* 45 547-560
- Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F.** (1997). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro* matured equine oocytes. *Theriogenology*, 47:1139-1156.
- Dell'Aquila ME, De Felici M, Maritato F, Lacalandra GM, Minoia P.** (1998) Effects of culture conditions on zona pellucida hardening of *in vitro* matured equine oocytes. In: *Proceedings of the 14th Scientific Meeting of the European Society of Embryo Transfer*; Venice, Italy. Abstract 140.
- Dell'Aquila ME, De Felici M, Massari S, Maritato F, Minoia P.** (1999) Effects of Fetuin on Zona Pellucida Hardening and Fertilizability of Equine Oocytes Matured *In Vitro*. *Biology of Reproduction* 61, 533–540
- Dell'Aquila ME, Masterson M, Maritato F, Hinrichs K.** (2001) Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male

pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of equine oocytes. *Mol Reprod Dev* 60, 79–88.

**Desjardins M, King WA, Bousquet D.** (1985) *In vitro* maturation of horse oocytes. *Theriogenology* 23:187 (abst)

**Dunbar, B.S.** (1983) Antibodies to zona pellucida antigens and their role in fertility. In *International Congress on Reproductive Immunology*, pp. 505-534. Eds T. Wegmann & T. Gills. Oxford University Press, London.

**Dunbar, B.S., Maresh, G.A. & Washenik, K.** (1989) Ovarian development and the formation of the mammalian zona pellucida. In *The Mammalian Egg Coat: Structure and Function*, pp. 38-48. Ed. J. Dietl. Springer-Verlag, Berlin & New York.

**Dunbar, B.S., Prasad, S.V. & Timmons, T.M.** (1991) Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae. In *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*, pp. 97-114. Eds B. S.Dunbar & M. G. O'Rand. Plenum Press, New York.

**Ellington JE, Ball BA, Blue BJ, Wilker CE.** (1993) Capacitation-like membrane changes and prolonged viability *in vitro* of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *Am J Vet Res*; 54:1505–1510.

**Fujii Y, Yoshioka T, Sasaki J.** (1990) Fetal calf serum increased the zona pellucida penetrability of rat oocytes matured *in vitro*. *Acta Med Okayama*; 44:203–208.

**Fulka J Jr, Okolski A.** (1981) Culture of horse oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil*; 61: 213-215.

**Fusco S, Dell'Aquila ME, De Felici M, Lacalandra GM, Minoia P.**(1998) Zona pellucida hardening of *in vitro* matured equine oocytes as influenced by season and stage of estrous cycle. In: *Proceedings of the 14th Scientific Meeting of the European Society of Embryo Transfer*; Venice, Italy. Abstract 158.

**Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G, Duchamp G, Daels P, Lazzari G.** (2002) Frozen-thawed embryos produced by ovum pickup of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse, *Theriogenology*, 58:705-708.

**Galli C, Olleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G.**(2007). Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranking from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*, 98:39-55

- García Roselló, E.** (2008). Revisión bibliográfica.  
digitum.um.es/jspui/bitstream/10201/182/3/egr03de10.pdf
- Gastal, E. L.** (1999). Selection of the dominant follicle in mares: role of follicle-diameter differences, gonadotropins, and estradiol. Tesis (Ph.D), University of Wisconsin, Madison, WI, USA.
- Gigli, I; Russo, A.; Agüero, A.** (2006) Consideraciones sobre la dinámica ovárica en Equino, bovino y camélidos sudamericanos. Área de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.
- Ginther, O.J.** (1992) Reproductive biology of the mare. Characteristics of the ovulatory season. 2 ed. Madison, Wisconsin. p. 172-229
- Ginther, O. J.** (2000) Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reprod Sci*, 60-61, 61-79.
- Ginther O.J. Gastal E.L, Rodriguez B.L, Gastal M., Beeg M.A.G** (2002) Follicle diameters and hormone concentrations in the development of single versus double ovulations in mares. *Theriogenology*, 69, 583-590.
- Glabe CG, Vacquier VD.** (1977) Species specific agglutination of eggs by binding isolated from sea urchin sperm. *Nature* 267, 836–837
- Grøndahl, C.** (2008) Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of in vitro maturation (IVM) *Danish Medical Bulletin* No. 1 Vol. 55; 1-6.
- Goudet G, Bezárd J, Duchamp G, Gérard N, Palmer E.** (1997) Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicular size.
- Goudet G, Mugnier S, Dell'Aquila ME, Pelaez J, Douet C, Ambruosi B, De Santis T, Lacalandra GM, Lebos C, Sizaret PY, Delaleu B, Monget P, Mermillod P, Magistrini M, Meyers S, Goudet G.**(2009) New Insights into the Mechanisms of Fertilization: Comparison of the Fertilization Steps, Composition, and Structure of the Zona Pellucida Between Horses and Pigs. *Biology of reproduction* 81, 856–870
- Hafez, ES; Hafez, B; Féher de la Torre, Guillermina Trad.; Olvera Martínez, E. Trad.** (2002) Reproducción e inseminación artificial en animales. Cap. 4 Ciclos Reproductivos. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. MX

- Hartmann JF** (1983) Mammalian fertilization: gamete surface interactions *in vitro* In: Hartmann, JF (ed.), Mechanism and Control of Animal Fertilization. Academic Press, New York, pp. 325–364
- Hawley LR, Enders AC, Hinrichs K.** (1995) Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biol Reprod, Monograph 1*, 243–252.
- Hedrick JL.** (2008) Anuran and pig egg zona pellucida glycoproteins in fertilization and early development. *Int J Dev Biol*; 52(5–6):683– 701.
- Hinnchs K, Kenney DF, Kenney RM.** (1990) Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology 34*: 107- 112
- Hinrichs K.** (1991) The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare *Theriogenology 36* 157-168
- Hinrichs K, DiGiorgio LM.** (1991) Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes. *J Reprod Fertil Suppl*, 44:369-374.
- Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgrath JP, Martin MG.** (1993) *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Reprod*, 48:363-370.
- Hinrichs K, Williams KA.** (1997) Relationships among oocyte cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod 57*, 377–384
- Hinrichs K, Matthews GL, Freeman DA, Torello EM.** (1998) Oocyte transfer in mares. *J Am Vet Med Assoc 212*, 982– 986.
- Hinrichs K, Schmidt AL.** (2000) Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. *Biol Reprod*, 62:1402-1408.
- Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD.** (2002) *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. *Biol Reprod*; 67:256–262.
- Hinrichs K, Choi YH, Love LB, Varner DD, Love CC, Walckenaer BE.** (2005) Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post

mortem and relationship to meiotic and developmental competence. Biol Reprod; 72:1142–1150.

**Hinrichs K, Choi YH, Norris JD, Love LB, Bedford-Guaus SJ, Hartman DL, Velez IC.** (2010 a) Use of intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* culture to the blastocyst stage for clinical production of foals post mortem (abstract). Anim Reprod Sci Supp, in press.

**Hinrichs K.** (2010 b) The Equine Oocyte: Factors Affecting Meiotic and Developmental Competence. Molecular Reproduction & Development 77:651–661

**Hunter RHF.** (1988) The fallopian tubes. Their role in fertility and infertility. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

**Iroig JM; Muñoz F; Piedrahíta J; Quintero-Moreno A.** (2004). Prediction of the day of ovulation in mares through physiological parameters measured during estrous. Revista Científica (en línea), 14, 1-8. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/959/95911219008.pdf>.

**Jones SM; Troxel TR.** (2004). UACES: Publications: Understanding reproductive Physiology and (en línea). Disponible en: [http://www.uaex.edu/Other\\_Areas/publications/HTML/FSA-3039.asp](http://www.uaex.edu/Other_Areas/publications/HTML/FSA-3039.asp)

**King SS; Douglas BL; Roser JF; Silva KL; Jones KL.** (2010). Differential luteolytic function between the physiological breeding season, autumn transition and persistent winter cyclicity in the mare. Animal Reproduction Science, 117, 232-240.

**Klug E.** (1992) Routine AI application in Hannoverian Sport Horse Breeding Association. Anim Reprod Sci 28: 39-44.

**Knobil E. a J, DN.** (2006) Physiology of Reproduction.

**Krause D; Grove D.** (1967) Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. J Reprod Fert 14: 139-141.

**Lagutina I; Lazzari G; Duchi R; Colleoni S; Ponderato N; Turini P; Crotti G; Galli C.** (2005) Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocytes morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. Reproduction, 130:559-567.

**Landim-Alvarenga FC; Choi YH.** (1999) In vitro maturation of equine oocytes without hormones. Theriogenology, 51:383. (abstract).

- Lanzendorf SF; Holmgren WJ; Johnson DE; Jeyendran RS** (1992) Hemizona assay for measuring zona binding in the lowland gorilla. *Mol Reprod Dev* 31, 264–267.
- Larson JL; Miller DJ.** (1997) Sperm from a variety of mammalian species express beta 1,4-galactosyltransferase on their surface. *Biol Reprod*; 57:442– 453.
- Hedrick JL.** (2008) Anuran and pig egg zona pellucida glycoproteins in fertilization and early development. *Int J Dev Biol*; 52(5–6):683– 701.
- Lynham JA; Harrison RA** (1999) Use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions in vitro *Biol Reprod* 58, 539–550
- Liu, DY; Lopata, A; Pautke, P; Gordon Baker, HW** (1991) Horse and marmoset monkey sperm bind to the zona pellucida of salt-stored oocytes. *Fertil Steril* 56, 764–767.
- Magee C.** (2009) Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horses mares. *Endocrinology*, 150, 2813-2821
- Mann T.** (1964) Metabolism of semen: fructolysis, respiration and sperm energetics  
In: *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.* T Mann (ed),  
Barnes & Noble, NY, pp 265-307.
- Maresh G.A. & Dunbar B.S.** (1987) Antigenic comparison of five species of mammalian zonae pellucidae. *Journal of Experimental Zoology* 244, 299-307.
- McPartlin LA, Littell J, Mark E, Nelson JL, Travis AJ, Bedford-Guaus SJ.** (2008) A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. *Theriogenology*; 69:639–650.
- McPartlin LA, Suarez SS, Czaya CA, Hinrichs K, and Bedford-Guaus SJ.** (2009) Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful *In Vitro* Fertilization of Equine Oocytes. *Biol. Reprod.* 81, 199–206
- Modlinski J.A.** (1970) The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 23, 539-547.
- Molnarova Z, Machatkova M, Machal L, Horakova J, Hanzalova K.** (2006) A potential relationship between the acrosome response characteristics of bovine spermatozoa and their in vitro fertilizing ability. *Zygote*; 14(1):63–69.

- Morel M.** (1999). Semen Evaluation. En: Morel M. Equine artificial insemination. CABI Publishing, New York, Pp. 190-233.
- Mugnier S, Boittin S, Douet C, Monget P, Magistrini M, Goudet G.** (2008) The involvement of beta-1,4-galactosyltransferase and N-acetylglucosamine residues in fertilization has been lost in the horse. *Reprod Biol Endocrinol*; 6:e51.
- Mujica A, Neri-Bazan L, Tash JS, Uribe S.** (1994) Mechanism for procaine mediated hyperactivated motility in guinea pig spermatozoa. *Mol Reprod Dev*; 38:285–292.
- Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K.** (2006) Update of *in vitro* production of porcine embryos. *Front Biosci*; 11:2565–2573.
- Nakano M.** (1989) Fractionation and characterization of the glycoproteins of zona pellucida. In *The Mammalian Egg Coat: Structure and Function*, pp. 76-98. Ed. J. Dietl. Springer-Verlag, Berlin & New York.
- O'Rand M.G., Welch J.E. & Fisher S.J.** (1986) Sperm membranes and zona pellucida interactions during fertilization. In *Molecular and Cellular Aspects of Reproduction*, Vol. 205, pp. 131-144, Eds D. S. Dhindsa & O. P. Bahl. Plenum Press, New York.
- Palacios A.** (1994) Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Revista Veterinaria, México*, 25 (3): 207-210.
- Palmer E, Bezard J, Magistrini M, Duchamp G.** (1991) *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil (Supplement 44)*: 375-384.
- Paterson M. & Aitken, R.J.** (1990) Development of vaccines targeting the zona pellucida. *Current Opinion in Immunology* 2, 743-747.
- Piao S, Wang Y, Cheng Y.** (1988) A study of the technique of freezing concentrated semen of horses (donkeys) and the aspect of insemination. In: XII CAR Meeting. Dublin: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.
- Polge C, Minotakis C.** (1964) Deep freezing of jackass and stallion semen. In: V ICAR Meeting. Trento: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. p 545-552
- Pommer, A C. Rutllant, J. Meyers, S A.** (2002) The role of osmotic resistance on equine spermatozoa function. *Theriogenology* 58: 1373-1384.

- Pommer AC, Rutlant J, Meyers SA.** (2003) Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod*; 68:1208–1214.
- Rath D, Toöpfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, von Witzendorff D, Ebeling S, Ekhlesi-Hundrieser M, Piehler E, Petrunkina A, Romar R.** (2006) Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs. *Soc Reprod Fertil Suppl*; 62:317–330.
- Rathi R, Colenbrander B, Stout TA, Bevers MM, Gadella BM.** (2003) Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Mol Reprod Dev*; 64:120–128.
- Roldan ERS** (1996) Nuevas técnicas de reproducción asistida. Cap. 1. Preparación de los espermatozoides para la fecundación en mamíferos. Departamento de Reproducción Animal, Centro de Investigación y Tecnología, INIA, Ctra. de La Coruña Km 5,9, 28040-Madrid.
- Sacco AG, Yurewicz EC., Subramanian MG. & DeMayo FJ.** (1981) Zona pellucida composition: species cross reactivity and contraceptive potential of antiserum to a purified pig zona antigen (PPZA). *Biol of Reprod*; 25, 997-1008.
- Saling PM, Storey BT.** (1979) Mouse gamete interactions during fertilization *in vitro*: chlortetracycline as fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol*; 83:544–555.
- Sánchez RA.** (2010) Inmuno anticoncepción: un nuevo concepto en el control de la fertilidad en mamíferos. **TecnoVet**, Norteamérica, 830 09. <http://www.revistas.uchile.cl/index.php/RT/article/viewArticle/10507/10561>
- Seneda MM.** (2001). Aspectos Técnicos e Biológicos da Obtenção *in vivo* de Oócitos Bovinos. Jaboticabal, SP: University of São Paulo State (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 76 pp. Dissertation.
- Shabpareh V, Squires E L, Seidel E Jr, Jasko D J.**(1993) Methods for collecting and maturing and maturing equine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 40: 1161- 1175.
- Sinowatz F, J Plendel, S Kölle** (1998) Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat* 161, 196-205

- Sinowatz F, Topfer-Petersen E, Koller S, Palma G** (2001) Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histol Embryol* 5:257-263.
- Skinner S.M., Timmons T.M., Schwoebel E. & Dunbar B.S.** (1990) The role of zona pellucida antigens in fertility and infertility. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 10, 185-197.
- Slusher SH.** (2004) Reproductive management of the mare. (en línea). Disponible en: <http://www.mofox trot.com/mare-reproduction.htm> y también en: <http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3974web.pdf>
- Souza F. A.** (2007). Taxa de concepção de éguas cobertas 12 ou 24 horas após a ovulação. Dissertação de Mestrado, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.
- Squires EL.** (1996) Maturation and fertilization of equine oocytes. *Veterinary clinics of North America: equine practice.*; 12:31–45.
- Suarez SS, Ho HC.** (2003) Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim*; 38:119–124.
- Suzuki M and T. Wakabayashi.** (1988) Packaging of DNA in cricket sperm. A compass mode of DNA packaging. *J Mol Biol*, 1988. 204:653-61
- Tharasanit T.S Colleoni, G Lazzari, B Colenbrander, C Galli and TAE Stout.** (2006) Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Bologna, Italy
- Thibault C, Szollosi D y Gerard M.** (1987) Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev*; 27: 856-896.
- Timmons T.M., Maresh G.A., Bundman D.S. & Dunbar B.S.** (1987) Use of specific monoclonal and polyclonal antibodies to define distinct antigens of the porcine zonae pellucidae. *Biology of Reproduction* 36, 1275-1287.
- Topfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H.** (2005) The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim Reprod Sci*; 89:159–170.
- Topfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsolova M.** (2008) Glycobiology of fertilization in pig. *Dev Biol*. 2:717.
- Varner DD, Ward CR, Storey BT, Kenney RM.** (1987) Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am J Vet Res*; 48:1383–1389

- Veeck LL.** (1988) Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci*;541:259-74.
- Vidament M, Vicent P, Martin FX, Magistrini M, Blebois E.** (2008) Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim Reprod Sci* (in Press).
- Visconti PE, Tinohomer HG, Moore GD, Bailey J L, Ning X, Fornes M, And Kopf GS.** (1998) The Molecular Basis of Sperm Capacitation. *Journal of Andrology*. Vol. 19, No. 2.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB.** (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol*; 53:133–150.
- Vogelsang M.M; Kraemer D.C; Potter G.D. & Stoot G.G.** (1987) Fine structure of the follicular oocyte of the horse. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl*, 157-167.
- Willis P, Candle AB, Fayrer-Ho&en RA.** (1991) Equine oocyte *in vitro* maturation: influence of maturation: influence of sera, time and hormones. *Mol Reprod Dev*; 30:360-368.
- Yanagimachi R.** (1988) Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, Vol. 1, pp. 154-162. Eds E. Knobil & J. Neill. Raven Press, New York.
- Yanagimachi R.** (1994) Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994:189–317.
- Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, Nakano M.** (2001) Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem*; 268(12):3587–3594.
- Yoshimatsu N, Yanagimachi IZ, Lopata A** (1988) Zonae pellucidae of salt-stored hamster and human eggs: their penetrability by homologous and heterologous spermatozoa *Gamete Res* 21, 115–126.
- Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR, Galli C.** (1989) Recent studies on *in vivo* fertilization of *in vitro* matured horse oocytes. *Equine Vet J (Suppl8)*:101-104.
- Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT.** (1991) Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. *Mol Reprod Dev*; 28:292–296.

## **IMAGENES**

Figura 1. Características morfológicas del ovocito

(Foto tomada en el CMEB de la UMSNH).

Figura 2. Morfología del espermatozoide. Audresrk et al, 2003

Figura 3. Cambios que se producen durante la exocitosis del acrosoma (Roldán, 1996).

Figura 4. Ovocito con células de la granulosa intactas.

Figura 5. Ovocitos con las células de la granulosa parcialmente eliminadas y sin células de la granulosa.

Figura 6. Ovocito maduro, se observa el cuerpo polar.

(Figuras 4, 5, 6, fotos tomadas en el laboratorio CMEB de la UMSNH)

Figura 7. Espermatozoides teñidos con CTC.

(Foto obtenida en el laboratorio de reproducción de la UMSNH)

Figura 8. Ovocitos inmaduros de cerdo y espermatozoides equinos con procaína

Figura 9. Ovocitos inmaduros de cerdos y espermatozoides equinos control

(Fotos tomadas en el CMEB de la UMSNH)

## 8 ANEXOS

### PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS) PH 7.4

	Fórmula	Cantidad por Lt
Cloruro de Sodio	NaCl	8 gr
Cloruro de Potasio	KCl	0.2 gr
Fosfato disódico anhidro	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 gr
:Fosfato de Potasio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 gr

### MEDIO DE MANIPULACIÓN PH 7.4

	Cantidad	25 ml	10 ml
TCM 199		0.2375 gr	0.095 gr
<b>SUPLEMENTADO CON:</b>			
Gentamicina	25µgr	7.8 µl	3.9 µl
Suero de yegua en estro	20 %	5 ml	2.5 ml

### MEDIO DE MADURACIÓN PH 7.2

	Cantidad	50 ml	10 ml
TCM 199		0.475 gr	0.095 gr
Hepes	4.43 mM	0.0518 gr	0.0103 gr
Bicarbonato de Sodio	33.9 mM	0.1423 gr	0.0284 gr
<b>SUPLEMENTADO CON:</b>			
L-Glutamina	0.1 gr/l	0.005 gr	0.001 gr
Piruvato de Sodio	2 mM	0.011 gr	0.0022 gr
Lactato de calcio	2.92 mM	0.0318 gr	0.0063 gr
Gentamicina	50 µ gr/ml	0.0025 gr *31.12 µl	6.224 µl
<b>GONADOTROPINAS</b>			
FSH ovino	10 µ gr/ml	50 µ gr	10 µ gr
LH bovino	20 µ gr/ml	100 µ gr	20 µ gr
17β estradiol	1 µ gr/ml	5 µ gr	1 µ gr

\*la gentamicina está en concentración 80 µgr/µl (80 mg/ml)

FSH 0.01 U/µl

LH 10 U/ml

FSH y LH = 0.75 UI/ml

### **TINCIÓN CON CLORHIDRATO DE TETRACICLINA (CTC)**

	Fórmula química	Cantidad.	50 ml
Tris		20 mM	0.121 gr
Cloruro de Sodio	NaCL	130 mM	0.379 gr
L. Cisteina		5 mM	0.0303 gr

PBS = Phosphate Buffer Saline. Es suero salino tamponado en fosfatos, para reproducir lo mejor posible las condiciones fisiológicas de la sangre y que esta no se degrade tan rápido.

## **TRATAMIENTO Y MANIPULACION DE OVOCITOS Y ESPERMATOZOIDES PARA LA PRODUCCIÓN Y DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES EQUINOS**

Blanca Alicia Chávez Garibay<sup>1</sup>, Daniel Val Arreola<sup>1</sup>, Jesús Conejo Nava<sup>2</sup>, Juan José Valdez Alarcón<sup>3</sup>,  
Guillermo Salas Razo, Marcos Cajero Juárez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, <sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, <sup>3</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FIVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.  
blancaalvarez@iifvoo.com.mx

**Resumen.** La fertilización *in vitro* (FIV) en equinos debido entre otras cosas al endurecimiento de zona pelúcida (ZP) durante la maduración *in vitro* y también una inadecuada capacitación e hiperactivación de los espermatozoides en los procesos *in vitro*, reporta bajas tasas de éxito. En este estudio, como fase de estandarización de tratamientos y manipulación de ovocitos se recuperaron ovarios de yeguas sacrificadas. Para el cultivo y maduración celular se utilizó medio TCM-199 con sales Earle's suplementado por 24 h. se desarrollarán técnicas de FIV en los ovocitos de equino, con intención de valorar cual de ellas nos ofrece mejores resultados. En la primera, se maduraran los ovocitos con células de la granulosa y zona pelúcida intacta. En la segunda, se eliminarán las células de la granulosa con la utilización de hialuronidasa, y se removerá la ZP con una solución ácida de Tyrodes, para finalmente realizar la FIV. En este caso se utilizará semen congelado de caballo para la FIV, adicionando 5 mM de procaína en el medio, con la finalidad de incrementar los porcentajes de hiperactivación de los espermatozoides y aumentar los porcentajes de fertilización. Hasta el momento, el porcentaje de maduración obtenido es del 75%.

