



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE
ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA

***“ PARTICIPACIÓN DE COMPUESTOS TIOL EN EL MEDIO
DE MADURACIÓN DE OVOCITOS DE CABRA Y SU
EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES
IN VITRO ”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M.C. ALEJANDRA SOBERANO MARTÍNEZ

DIRECTOR:

DR. MARCO CAJERO JUÁREZ

ASESORES:

**DR. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO
DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO
DRA. MARÍA DEL C. NAVARRO MALDONADO
DR. JOSÉ C. SEGURA CORREA**

MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO DE 2011.



*El que más sabe, sabe que es
menos lo que sabe que lo que no
sabe y así como su inteligencia
se lo da a conocer, su sinceridad
se lo hace confesar.*

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL DR. MARCO CAJERO JUÁREZ

PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA-UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO Y LANDSTEINER SCIENTIFIC, S.A.

Agradecimientos:

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por acogerme para lograr esta meta.

Al Dr. Marco Cajero Juárez., Dra. María del C. Navarro Maldonado, Dr. José Herrera Camacho, Dr. José C. Segura Correa y Dr. Alejandro Bravo Patiño. Por compartir sus conocimientos.

Al Dr. Demetrio Ambríz García y al Dr. Antonio Campos Mendoza. Por su participación y ayuda incondicional.

Al Dr. Joel E. Meza. Excelente trabajo como coordinador del doctorado.

Liliana Cerritos. Gracias por todo tu apoyo.

Dedicatoria:

Muchas noches mientras estudiaba busca y leía artículo tras artículo pensaba en esta parte que en lo particular es la más difícil, pensaba que iba a escribir cuando llegara este momento, que iba a decir para no herir susceptibilidades. Por lo que idealice tantos pensamientos con el efecto de acaparar a todos aquellos que participaron directa e indirectamente en este trabajo. Sin embargo, cometí el error de no plasmarlo en papel y ahora sé que la mente no es la mejor consejera a lo largo del tiempo.

Por lo que dedico este trabajo principalmente a siete personas:

Padre. Ere mi ejemplo, espero algún día ser como tú. Tener ese amor incondicional y entrega total por tú profesión.

Madre. Eres la fuerza y el equilibrio que se necesita en los momentos de flaqueza, desesperación y gozo. Gracias por no dejarme desfallecer.

Lupita (+) Mariana y Mónica. Somos una sola.

José Ahkín y Verónica. Gracias hijos por emprender y vivir conmigo este largo camino lleno de emociones y algunas veces de sin sabores. Sé que he tomado mucho del tiempo que ustedes merecen y necesitan, pero espero algún día logren entender que lo que hago es por el bien de nuestra familia; que cuando logren alcanzar su vida profesional disfruten y amén lo que hacen, como ahora lo vive su madre.

José. Que puedo decirte que no sepas, entre nosotros las palabras sobran porque son los hechos que hablan por sí mismos.

La abundancia de palabras y la ignorancia predominan en la mayor parte de los hombres; si quieres sobresalir de la mayoría inútil, cultiva tu conocimiento y envuélvelo en nubes de silencio.

*El que más sabe, sabe que es
menos lo que sabe que lo que no
sabe y así como su inteligencia
se lo da a conocer, su sinceridad
se lo hace confesar.*

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL DR. MARCO CAJERO JUÁREZ

PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA-UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO Y LANDSTEINER SCIENTIFIC, S.A.

Agradecimientos:

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por acogerme para lograr esta meta.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada. Número de expediente 43120/43120

Al Dr. Marco Cajero Juárez., Dra. María del C. Navarro Maldonado, Dr. José Herrera Camacho, Dr. José C. Segura Correa y Dr. Alejandro Bravo Patiño. Por compartir sus conocimientos.

Al Dr. Demetrio Ambríz García y al Dr. Antonio Campos Mendoza. Por su participación y ayuda incondicional.

Al Dr. Joel E. Meza. Excelente trabajo como coordinador del doctorado.

Liliana Cerritos. Gracias por todo tu apoyo.

Dedicatoria:

Muchas noches mientras estudiaba buscaba y leía artículo tras artículo pensaba en esta parte que en lo particular es la más difícil, pensaba que iba a escribir cuando llegara este momento, que iba a decir para no herir susceptibilidades. Por lo que idealice tantos pensamientos con el efecto de acaparar a todos aquellos que participaron directa e indirectamente en este trabajo. Sin embargo, cometí el error de no plasmarlo en papel y ahora sé que la mente no es la mejor consejera a lo largo del tiempo.

Por lo que dedico este trabajo principalmente a siete personas:

Padre. Ere mi ejemplo, espero algún día ser como tú. Tener ese amor incondicional y entrega total por tú profesión.

Madre. Eres la fuerza y el equilibrio que se necesita en los momentos de flaqueza, desesperación y gozo. Gracias por no dejarme desfallecer.

Lupita (+) Mariana y Mónica. Somos una sola.

José Ahkín y Verónica. Gracias hijos por emprender y vivir conmigo este largo camino lleno de emociones y algunas veces de sin sabores. Sé que he tomado mucho del tiempo que ustedes merecen y necesitan, pero espero algún día logren entender que lo que hago es por el bien de nuestra familia; que cuando logren alcanzar su vida profesional disfruten y amén lo que hacen, como ahora lo vive su madre.

José. Que puedo decirte que no sepas, entre nosotros las palabras sobran porque son los hechos que hablan por sí mismos.

ÍNDICE	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	7
3.1.1 Radicales Libres.....	7
3.1.2 Tipos de Radicales Libres.....	9
3.2 ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS CÉLULAS	10
3.3 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	12
3.4 GLUTATIÓN...	13
3.5 COMPUESTOS TIOLES EN LA MADURACIÓN DE OVOCITOS	15
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	21
7. METODOLOGÍA GENERAL...	22

8. RESULTADOS.....	23
CAPÍTULO I. ARTÍCULO 1. Motility and functional state of the membrane of caprine capacitated spermatozoa under different chemical agents	24
CAPÍTULO II. NOTA CORTA. Fertilización de ovocitos caprinos madurados en dos medios de cultivo.....	40
CAPÍTULO III. ARTÍCULO 2. Efecto de compuestos tiol sobre la maduración in vitro y el contenido intracelular de GSH en ovocitos de cabra... ..	48
9. RESUMEN GENERAL DE RESULTADOS... ..	65
10. CONCLUSIÓN.....	66
11. BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL	67
ANEXO 1. REVISIÓN. BIOQUÍMICA DE LOS GAMENTOS REPRODUCTIVOS....	75

1. RESUMEN

La producción de embriones *in vitro* (PIV) de mamífero mediante la fertilización *in vitro* (FIV), permite la posibilidad de obtener un número elevado de embriones para ser utilizados a nivel científico y comercial. Cada uno de los pasos que conforman este proceso, condiciona *per se* el éxito o el fracaso del siguiente.

Para incrementar la eficiencia de la PIV de embriones de mamífero, es importante actuar desde las primeras etapas de la técnica, como es la maduración *in vitro* (MIV) del gameto femenino (ovocito), de tal manera que en los cultivos se pueda semejar tempranamente, al microambiente oviductal y uterino que ocurre en condiciones *in vivo*.

Al respecto se ha reportado que bajo condiciones artificiales el ovocito sufre cambios en su maduración bioquímica que compromete la FIV (Mucci *et al.*, 2006). Rodríguez *et al.* (2003), indican que las especies reactivas de oxígeno (ROS) alteran el desarrollo normal del ovocito durante la MIV, por lo que sugieren que la utilización de compuestos tioles aumenta las concentraciones de glutatión (GSH) y por lo tanto reduce el efecto negativo de los ROS.

El presente estudio planteó la hipótesis de que un medio definido simple como es el HECM-9, al ser combinado con compuestos tioles, mejora la tasa de MIV en los ovocitos de cabra doméstica y por ende, la tasa de fertilización.

Al igual que con los ovocitos, es necesario asegurar capacidad fértil de los gametos masculinos (espermatozoides), por ello, en este trabajo se evaluaron algunos parámetros de los espermatozoides caprino, como fueron: el porcentaje de movilidad progresiva (MP) y el estado funcional de su membrana plasmática (porcentaje de espermatozoides no capacitados NCAP, capacitados CAP y reaccionados REA) en presencia de un extensor comercial base tris, líquido oviductal sintético y dos agentes capacitantes: cafeína y heparina.

En un primer estudio, el semen fue colectado por vagina artificial, diluido en un extensor comercial y almacenado a 15°C durante tres días consecutivos. Los espermatozoides fueron lavados en medio mDM e incubados en Líquido Oviductal Sintético (SOF), Tryladil (TRY), mDM con Heparina y Cafeína, durante 60, 120, 180 y 240 min. Los parámetros fueron evaluados en tres días diferentes (24, 48 y 72 h). La MP superior en el TRY (69.5%), mientras que el porcentaje de CAP fue mayor en heparina (63.2%). El extensor TRY mantuvo una movilidad progresiva durante mayor tiempo (69.5%) comparado con el uso de agentes capacitantes diluidos en medio mDM (Heparina 34.8% y Cafeína 29.2%).

En un segundo estudio se evaluó el efecto del HECM-9 como medio de maduración de ovocitos, sobre la tasa de MIV y FIV en cabras. Los complejos cumulus ovocito (CCO's) fueron obtenidos de ovarios de cabras post-mortem. Se usó TCM-199 como control, suplementado con 275µg/ml de piruvato de sodio, 146µg/ml de L-glutamina, 10% (v/v) suero fetal bovino (Gibco) y 1µg/ml de 17 β-estradiol. El HECM-9 fue elaborado con base en lo señalado por McKiernan y Bavister (2000). El medio base (10 ml de BM-3) se suplementó con 100µL de un stock de 11 aminoácidos no esenciales (ácido glutámico 0.01mM, asparagina 0.01mM, cisteína 0.01mM, glicina 0.01mM, histidina 0.01mM, lisina 0.01mM, prolina 0.01mM, serina 0.01mM, ácido aspártico 0.01mM, glutamina 0.20mM y taurina 0.50mM), y 10µl de un stock 3.02mM de pantotenato de sodio. Adicionalmente ambos medios se suplementaron con 10µg/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF), 10µg/ml de Hormona Luteinizante (LH), Hormona Folículo Estimulante (FSH) y con antibiótico (50µg/ml de gentamicina). Grupos de 10-25 CCO's fueron transferidos a 450µL del medio respectivo bajo aceite mineral preincubado por 24h a 37.5 °C, 5% CO₂. El pH fue ajustado a 7.4 y los CCO's fueron cultivados a 37.5 °C, 5% CO₂ por 27h. La tasa de MIV fue superior (p<0.05) en el HECM-9 (60.5%) con respecto al TCM-199 (38.6%). Asimismo, la tasa de FIV fue superior (p<0.05) en el HECM-9 (19.18%,) que en TCM-199 (9.59%,). De acuerdo a los resultados, el HECM-9 puede ser utilizado en los procesos de MIV y FIV de ovocitos en la especie caprina.

Un tercer estudio investigó el efecto de la adición de compuestos tioles en el medio de maduración definido HECM-9, valorando la concentración del glutatión reducido (GSH) y la tasa de MIV en ovocitos de cabras. La metodología de MIV fue la ya descrita en el estudio 2. Se analizó el contenido de GSH intracelular de ovocitos inmaduros y tras 27h de maduración, mediante el ensayo cíclico de la enzima 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) glutatión reductasa (DTNB-GSSG). Aún y cuando los resultados no fueron los esperados con respecto a la suplementación de los compuestos tioles al HECM-9, es posible asumir que el medio HECM-9 *per se* contiene los elementos necesarios para la síntesis de novo de GSH. Por lo tanto, es necesario realizar estudios que determinen la disponibilidad de cisteína, fuente de energía y la enzima γ-glutamyl transpeptidasa requeridos en el ciclo del γ-glutamyl.

2. ABSTRACT

The *in vitro* production (IVP) of mammalian embryos by *in vitro* fertilization (IVF), allows a large number of embryos to be used in scientific and commercial issues. Each of the steps that make this process determines the success or failure of the next.

To increase the efficiency of IVP of mammalian embryos, it is important to take actions from the earliest stages of the technology, such as the *in vitro* maturation (IVM) of the female gamete (oocyte), so that cultura media can mimic early oviductal and uterine microenvironment that occurs *in vivo*.

The present study hypothesized that a simple defined media such as HECM-9, when combined with thiol compounds, improves the rate of IVM oocytes in domestic goat and hence, fertilization.

In this regard has been reported that under artificial conditions the oocyte undergoes changes in biochemical maturation which commits the IVF (Mucci et al., 2006). Rodriguez *et al.* (2003), indicate that the reactive species oxygen (ROS) alter the normal development of the oocyte during the MIV, by which suggest that the use of composite thiols increases the concentration of glutathione (GSH) and therefore reduces the negative effect of ROS.

As with oocytes, it is necessary to ensure the viability of male gametes (spermatozoa), so, in this work were carried out two studies.

In a first study, the semen was collected by artificial vagina, diluted in a commercial and stored extensor at 15 °C for three consecutive days. Sperm were washed in mDM medium and incubated in synthetic Oviductal fluid (SOF), Tryladil (TRY), mDM with heparin and caffeine, 60, 120, 180 and 240 min. The parameters were evaluated on three different days (24, 48 and 72 h). The MP was higher in the TRY (69.5%), while the percentage of CAP was higher in heparin (63.2%). TRY extender remained a progressive motility for more time (69.5%) compared with the use of capacitating agents diluted in medium mDM (heparin 34.8% and caffeine 29.2%).

The second study evaluated the effect of HECM-9 as oocyte maturation media, on the rate of IVM and IVF in goat. Cumulus oocyte complexes (COC's) were obtained from ovaries of goat post-mortem. TCM-199 was used as control media supplemented with 275µg/ml sodium pyruvate, 146µg/ml L-glutamine 10% (v / v) fetal calf serum (Gibco), 1µg/ml of 17 β-estradiol. The HECM-9 was developed as reported by McKiernan and Bavister (2000). The

basal media (10 ml of BM-3) was supplemented with 100 μ l of a stock of 11 non-essential amino acids (glutamic acid 0.01mm, 0.01mm asparagine, cysteine, 0.01mm, 0.01mm glycine, histidine, 0.01mm, 0.01mm lysine, proline 0.01mm, serine 0.01mm, 0.01mm aspartic acid, glutamine and taurine 0.20mm 0.50mm), and 10 μ l of 3.02mM stock sodium pantothenate. Additionally, both media were supplemented with 10 μ g/ml of epidermal growth factor EGF, and 10 μ g/ml of Hormone Luteinizing (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) and antibiotics (50 μ g/ml gentamicin). Groups of 10 to 25 CCO's were transferred to 450 μ l of the respective medium under mineral oil, pre-incubated for 24h at 37.5°C, 5% CO₂. The pH was adjusted to 7.4 and CCO's were cultured at 37.5°C, 5% CO₂ for 27h. The IVM rate was higher (p <0.05) in the HECM-9 (60.5%) compared to TCM-199 (38.6%). Also, the rate of IVF was higher (p <0.05) in the HECM-9 (19.18%) that it TCM-199 (9.59%). Accordingly to the results, the HECM-9 can be used in IVM of oocytes in goat, however, additional studies are needed to intensify the findings.

A third study investigated the effect of the addition of thiol compounds in the maturation médium, on the concentration of reduced glutation (GSH) and the rate of IVM in oocytes from adult goats. *In vitro maturation* method was the same used in Study 2. We analyzed the intracellular GSH content of immature oocytes after 27h of maturation, by testing the enzyme cyclic 5.5 '-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) glutathione reductase (DTNB-GSSG). Even if the results were not as expected, with respect to supplementation of thiol compounds to HECM-9, it is possible to assume that the media itself contains the necessary elements for the *de novo synthesis* of GSH. Studies are needed to determine the availability of cysteine, a source of energy and γ -glutamyl transpeptidase enzyme required in the γ -glutamyl cycle.

3. INTRODUCCIÓN

Las grandes expectativas esperadas en los programas de mejoramiento productivo animal por los procedimientos de producción de embriones *in vivo*, se han visto insatisfechas con el tiempo. Ello es consecuencia de que su rendimiento no es tan elevado como se suponía en un principio, debido al bajo número de embriones transferibles; a la existencia de hembras que no responden a los tratamientos para inducir una ovulación múltiple; a la necesidad de respetar periodos de descanso entre dos colectas consecutivas y a la obligatoriedad de que las donantes estén en perfectas condiciones ginecológicas.

Estas circunstancias poco satisfactorias han creado la necesidad de desarrollar un procedimiento alternativo para la producción de embriones. Este procedimiento se basa en la utilización de ovocitos inmaduros, colectados directamente del ovario con independencia de la edad y de la situación fisiológica de la hembra. Esta técnica ofrece la posibilidad de convertir a la hembra en productora de gametos, equiparándola a los machos productores de semen para la inseminación artificial, lo que supondría numerosas ventajas en los programas de selección.

La técnica de producción de embriones *in vitro* (PEIV) es una herramienta que contribuye a acelerar la valoración del proceso reproductivo en los mamíferos con objeto de facilitar la producción de un elevado número de embriones en el mismo estadio de desarrollo, permite el incremento de la diseminación del material genético y la obtención de una mayor descendencia de hembras seleccionadas (Baldassarre, 2003).

Sin embargo, a pesar de existir una serie de eventos que pueden influir en la PEIV, el principal factor limitante parece ser la maduración *in vitro* del ovocito debido a que los componentes que conforman el medio de maduración son limitados si se comparan con los del fluido uterino o bien a la falta de sustratos adecuados para la síntesis de nuevos compuestos (Cognié *et al.*, 2003; Korhonen *et al.*, 2005). Al respecto Krisher *et al.* (2007), indican que la colección de ovocitos inmaduros seguidos por la maduración *in vitro* altera la fisiología del ovocito por lo que se obtiene un ovocito con una reducida capacidad de desarrollo comparado con los que maduran en condiciones *in vivo*. Aún y cuando la meiosis, o la maduración nuclear llegaran a finalizar *in vitro*, se desconoce si la variedad de procesos que ocurren *in vivo* en el citoplasma son llevados a cabo en su totalidad de forma artificial, de manera que los porcentajes de la fertilización son consecuencia de estos procesos. (Mucci *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, el medio de cultivo de tejidos-199 (TCM-199) ha sido el medio de maduración indefinido (MIV) más usado en las investigaciones de PEIV; sin embargo, se ha demostrado que contiene algunos componentes como la hipoxantina (Bavister *et al.*, 1992), la glucosa y fosfatos (Piniommmunyntr y Bavister, 1991) que han sido asociados con el bloqueo o inhibición del desarrollo embrionario temprano en bovinos y hámsteres, respectivamente.

Alternativamente, se han desarrollado otros medios como el fluido oviductal sintético (SOF) y el medio de cultivo para embriones de hámsteres-6 y 9 (HECM-6 y HECM-9, respectivamente). Ambos han sido utilizados para la MIV de ovocitos en bovinos (Ali y Sirard, 2002; Oyamada y Fukui, 2004) y en ovinos (Walker *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 2006; Robledo *et al.*, 2009), obteniendo igual o mejor tasa de desarrollo embrionario comparado con el medio de maduración TCM-199.

Adicionalmente, a los efectos del medio de maduración sobre la disminución en la PEIV, factores externos como el envejecimiento celular, exposición a tóxicos y las condiciones ambientales adversas de incubación, provocan que los ovocitos y embriones en etapa de pre-implantación incrementen la producción de especies reactivas de oxígeno (Takahashi *et al.*, 2002; Guérin *et al.*, 2001) comparados con aquellos que maduran y son fecundados *in vivo*; disminuyendo por ende el potencial de maduración y desarrollo de ovocitos y embriones.

3.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

3.1.1. Radicales Libres

Un radical libre es una molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad. Poseen una estructura birradicálica, tienen una vida media extraordinariamente pequeña del orden de nanosegundos a milisegundos debido a su gran reactividad, aunque puede variar según el tipo de radical libre. Esta inestabilidad les confiere una avidez física por la captura de un electrón de cualquier otra molécula de su entorno, ocasionando que la estructura afectada quede inestable. De esta forma pueden establecer reacciones en cadena por medio de varios transportadores que se oxidan y se reducen secuencialmente, cuando un radical inicial modifica una biomolécula después de transferir o capturar un electrón. El daño es transmitido por medio de los transportadores que incluso pueden ser moléculas circulantes (Venereo, 2002; Tortolero *et al.*, 2005).

Estas moléculas o átomos tremendamente reactivos se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de numerosas enfermedades incluyendo aquellas que pueden comprometer la reproducción y la fertilidad (Goud *et al.*, 2008). Tras la evidencia del papel patológico de estos compuestos, se han abierto numerosas vías de investigación con el fin de modular sus efectos deletéreos. En el medio biológico, los radicales libres más frecuentes son compuestos oxigenados y se les llaman especies reactivas de oxígeno (ROS).

La acción de los ROS en las células es compleja y depende de diferentes factores como su concentración, el tipo celular y su estado metabólico, o una combinación de los factores anteriores (Tortolero *et al.*, 2005). En un estudio reciente se observó cómo células sometidas a un estímulo oxidativo eran capaces de activar señales específicas, para morir o tolerar la agresión, dentro de la primera hora tras el estímulo (Nair *et al.*, 2004). Algunos estudios proponen que la concentración de ROS en el fluido folicular puede representar un rango natural de pro-oxidantes que podrían ser necesarios para el desarrollo normal del ovocito. Un promedio fisiológico de ROS puede ser indicativo de un desarrollo de ovocito saludable, mientras que una excesiva concentración denota un estado de estrés oxidativo que compromete la FIV (Attaran *et al.*, 2000; Agarwal *et al.*, 2003; Pasqualotto *et al.*, 2004).

Medir las concentraciones de ROS es un proceso extremadamente difícil, debido al corto período de tiempo que permanecen estas moléculas como tales. Para la cuantificación de los niveles de ROS en células se han utilizado diferentes métodos como resonancia magnética de electrones (O_2^- y OH^\cdot), técnicas de quimioluminiscencia (mide en general los ROS, no es específica) y de citometría de flujo (H_2O_2) (Halliwell y Whiteman, 2004).

Un estudio realizado a través de la técnica de quimioluminiscencia en humanos sugiere que niveles de ROS en líquido folicular por encima de 100 fotones por segundo (cps), tiende a inhibir la formación del embrión o la fertilización (Das *et al.*, 2006).

Las estructuras subcelulares de generación de ROS incluyen principalmente a las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, la citoplasmática y la del retículo endoplásmico (Curtin *et al.*, 2002).

Además de las especies reactivas de oxígeno, existen también radicales libres nitrogenados o especies reactivas de nitrógeno (RNS) cuya importancia aunque en principio menor que la de las especies reactivas de oxígeno, ha crecido considerablemente en la actualidad (Moran *et al.*, 2001).

Los ROS pueden tener tanto un origen endógeno como exógeno. Las fuentes exógenas de ROS dependen de:

- a) La concentración ambiental de O_2 . Cuanta más alta sea, mayor es la actividad enzimática de las oxidasas y, por tanto, mayor es la concentración intracelular del anión superóxido (O_2^-).
- b) La presencia de cationes metálicos.
- c) La luz visible.
- d) La actividad amino oxidasa, presente en medios de cultivo tras ser liberada por los espermatozoides muertos (Rausell y Tarín, 2005).

Endógenamente, los ROS pueden proceder de:

- a) La fosforilación oxidativa.
- b) La actividad de la NADPH oxidasa.
- c) Actividad de la xantina oxidasa (Rausell y Tarín, 2005).

3.1.2. Tipos de Radicales Libres

Los tres principales tipos de ROS (figura 1) son: a) anión superóxido (O_2^-), se forma a partir de la captación de un electrón por una molécula de oxígeno en muchas reacciones de autoxidación catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc; e hidroxilasas o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial. Es poco reactivo pero potencialmente tóxico por los intermediarios que puede producir (Behard *et al.*, 1979; Korycka-Dahi y Richardson; 1981; Kowaltowski *et al.*, 2009); b) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se forma cuando el radical superóxido capta dos protones. No es un radical libre, pero puede atravesar las membranas causando daño oxidativo lejano. Muchas enzimas producen peróxido de hidrógeno a partir de oxígeno: superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, la D-aminoácido oxidasa, uricasa (Romero y Cadena, 1987) y también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre (Korycka-Dahi y Richardson, 1981). Se convierte en agua por acción de la catalasa, un proceso que determina su vida media. (Kowaltowski *et al.*, 2009) y c) el radical hidroxilo (OH^\cdot), este radical aparece cuando el peróxido de hidrógeno se une al superóxido. Es muy reactivo y con una vida media extremadamente corta. Se forma esencialmente a partir de O_2^- y H_2O_2 , a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (Martínez-Sánchez, 2005).

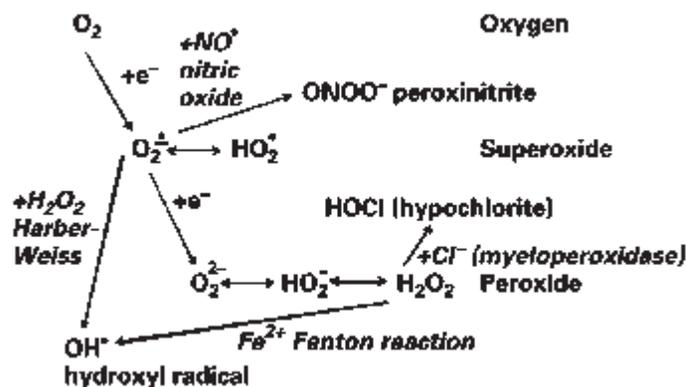


Figura 1. Formación de las especies reactivas de oxígeno (Tomado de Ford, 2004).

3.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS CÉLULAS

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de ROS. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Dröge, 2002; Venereo, 2002).

El daño oxidativo es generado debido a que los radicales libres solo llegan a ser estables adquiriendo electrones de ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y carbohidratos (Agarwal *et al.*, 2005). Los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres. Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son: el radical hidroxilo (OH \cdot), el peróxido (ROO \cdot), el alcóxido (RO \cdot) y el alquílico (R \cdot). El proceso de ataque oxidativo a los lípidos, denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende de un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico. Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O $_2$ \cdot^- y forma un radical peróxido, R-COO \cdot . Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, para formar un radical alquílico (R'-CH \cdot) y un peróxido lipídico (R-COOH), con lo que se propaga la reacción en la cadena radical. De esta manera, un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano. Estas reacciones alteran las propiedades de las membranas de tal modo que cambian su fluidez, aumentan la permeabilidad de la

membrana, disminuyen el potencial de membrana, hacen perder las funciones secretoras e inhiben los procesos metabólicos celulares (Halliwell, 1994).

El radical hidroxilo es muy reactivo con las proteínas y puede causar modificaciones en casi todos los residuos de aminoácidos. Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren, forman entrecruzamientos de tipo covalente e inducen a la fragmentación de la cadena polipeptídica, lo que se traduce en una pérdida de la función, o en mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas. Las proteínas oxidadas son fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas debido a la formación de grupos carbonilo, a la creación de nuevos grupos N-terminales, o a cambios conformacionales de la molécula (Prinsze *et al.*, 1990; Villar-Rojas *et al.*, 1996).

Uno de los componentes de la molécula de ADN que es susceptible a ser dañado por radicales libres es la desoxirribosa, la que al oxidarse puede inducir el rompimiento del enlace entre este azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo mediante el cual se forman rompimientos de la cadena sencilla, los que son reparados por medio de las enzimas correspondientes. Cuando gran cantidad de radicales hidroxilo atacan una parte restringida de la molécula de ADN, se forman numerosos rompimientos de cadena sencilla, que por su cercanía podrían conducir a la formación de rompimientos de cadena doble, los que provocan daño permanente al material genético. La reactividad del radical hidroxilo hacia los diferentes átomos de hidrógeno de la desoxirribosa varía considerablemente, siendo los carbonos 4 y 5 los sitios primarios de ataque, ya que en la molécula de ADN son los que quedan más expuestos. Los radicales hidroxilos tienen la capacidad de reaccionar también con las bases nitrogenadas del ADN. El tipo predominante de alteración que puede observarse a este nivel son las sustituciones, aunque también es frecuente observar deleciones y con menor frecuencia inserciones (Ward, 1985; Breen y Murphy, 1995; Balasubramanian, 1998).

Los efectos de los radicales libres sobre los carbohidratos, son poco conocidos, pero se ha establecido que los glucosaminoglicanos, son susceptibles a su degradación (Moseley *et al.*, 1997).

3.3. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se puede considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar interactúan más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción de los antioxidantes es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN, etc.) funcionalmente vitales más importantes. Actúan como eliminadoras, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante (Redox Homeostasis) a favor de estos últimos. (Dröge, 2002). Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen (Venereo, 2002).

Se conocen tres grupos de antioxidantes:

a) Antioxidantes primarios: previenen la formación de nuevos radicales libres, transformándolos en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas.

Entre estos antioxidantes tenemos a la enzima superóxido dismutasa (SOD), que convierte al O_2^- en peróxido de hidrógeno.



La enzima glutatión peroxidasa (GPX) convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. Existen dos tipos de glutatión peroxidasa, una selenio dependiente (Se-GPx), y otra que no contiene selenio (GPx).





La enzima catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno.



b) Antioxidantes secundarios: los cuales capturan los radicales libres, evitando reacciones en cadena. Entre estos se reportan el glutatión, la vitamina E (alpha-tocoferol), vitamina C (ascorbato), betacaroteno, ácido urico, bilirrubina y albúmina;

c) Antioxidantes terciarios: reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se indican las enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxidoreductasa (Tortolero *et al.*, 2005).

3.4 GLUTATIÓN

Diversos estudios reportan la existencia de un conjunto de medidas protectoras frente al estrés oxidativo que disminuyen el efecto negativo de los ROS, dentro de las cuales el glutatión reducido (GSH), es el principal agente antioxidante no enzimático presente en el ovocito y en el embrión en la etapa de pre-implantación (Rausell y Tarín, 2005).

El GSH es el más abundante tripéptido tiol no proteico (figura 2) presente en las células de mamíferos, se encuentra en concentraciones intracelulares en alrededor de 5 μmol por gramo de tejido.

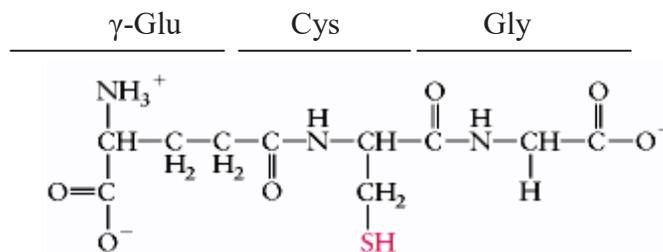


Figura 2. Estructura química del glutatión.

Su grupo sulfhidril (SH) le confiere una acción protectora contra el daño oxidativo. Es un tripéptido (GSH, L- γ -glutamil-cisteinglicina), derivado de la glicina, el glutamato y la cisteína que se sintetiza mediante el ciclo γ -glutamil, y su síntesis es dependiente de la disponibilidad en el medio de cisteína (Sastre *et al.*, 2005). Su síntesis se realiza en dos pasos (figura 3), catalizados por reacciones ATP-dependientes. El primer paso consiste en una condensación del grupo γ -carboxilo del glutamato con el grupo α -amina de la cisteína. El grupo carboxilo es activado en un principio por el ATP para dar lugar a un intermedio del tipo fosfato de acilo, que a continuación es atacado por el grupo amino de la cisteína, este paso es catalizado por la γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) y es paso limitante para la su síntesis. El segundo paso es parecido, siendo activado por el grupo α -carboxilo de la cisteína a una forma fosfato de acilo que le permite la condensación con la glicina, éste es catalizado por la glutatión sintetasa. (Sastre *et al.*, 2005).

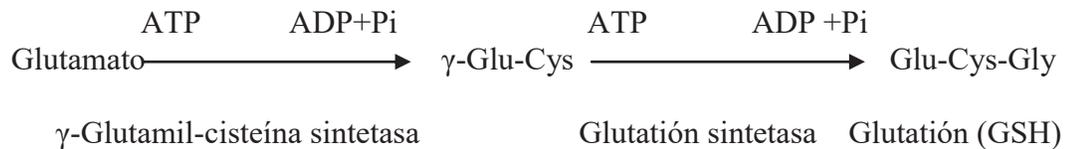
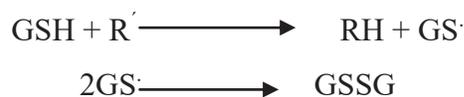


Figura 3. Biosíntesis del glutatión (GSH).

El glutatión, gracias a su grupo tiol, puede intervenir en reacciones de tipo redox, intercambiando electrones a través del azufre de la cisteína que contiene en su estructura. Así puede actuar de las siguientes formas:

1.- Reacción directa con un radical libre.

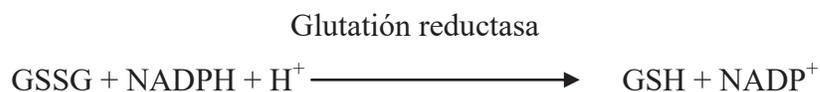
El GSH (forma reducida) reacciona con un radical libre formándose el radical GS \cdot , este radical es estable y persiste hasta encontrar otro radical y formar una molécula de GSSG (forma oxidada).



2.-Intercambio tiol-disulfuro



El GSSG es reducido de nuevo a GSH por una glutatión reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH como donador de electrones (Moran *et al.*, 2001).



La concentración de la forma oxidada GSSG, es significativamente más baja. El porcentaje es GSH 10/GSSG 100; esto significa que hay cerca de 100 veces más GSH que GSSG en la célula viva. Su acción protectora contra los ROS es facilitada por la interacción con las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Luberda, 2005, Sastre *et al.*, 2005).

En el ovocito *in vivo*, el GSH es sintetizado durante la primera meiosis (ruptura de vesícula germinal) en el estadio de maduración en las células del cúmulo (COCs), por lo que se hipotetiza que el GSH se transfiere directamente desde las células del cúmulo al ovocito mediante la unión cúmulo-ovocito y cesa una vez que el ovocito es arrestado en la metafase II (Zuelke *et al.*, 2003). Por lo tanto, si se bloquea la síntesis de GSH durante su desarrollo, se disminuye el potencial de fecundación en el ovocito (Sutovsky y Schatten, 1997). Así mismo, la maduración del citoplasma del ovocito incluye procesos como la síntesis de compuestos bioquímicos, fosforilación de proteínas o la activación de rutas metabólicas. La síntesis de GSH forma parte de esta maduración, y por lo tanto, es requerida para la fecundación y desarrollo embrionario normal (Zuelke *et al.*, 2003; Luberda, 2005). Brad *et al.* (2003), demostraron que la concentración intracelular del GSH al final de la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos es mucho menor que la de ovocitos madurados *in vivo*.

El GSH ejerce múltiples acciones en el gameto femenino contra el estrés oxidativo, actúa sobre el transporte de amino ácidos, DNA, síntesis de proteínas, los microtúbulos y su polimerización, formación del huso acromático y reducción de disulfidos (Furnus *et al.*, 2008).

3.5 COMPUESTOS TIOLES EN LA MADURACIÓN DE OVOCITOS

Los grupos tioles son aquellos que contienen un grupo funcional CH₂-SH en el cual conservan sus residuos de cistina.

Los tioles contienen proteínas que son reconocidos como factores clave en las reacciones redox (Moran *et al.*, 2001).

La cisteamina (figura 4) es una molécula con estructura sencilla derivada del aminotol (mercaptamina) que actúa sobre el metabolismo de la cistina.

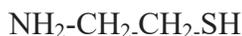


Figura 4. Estructura de la cisteamina.

Efectos de una determinada cantidad suplementada de cisteamina no solo dependen de la especie, sino también del medio de maduración. Estas diferencias entre el medio pueden ser explicadas por la presencia y cantidad de diferentes factores que puedan ayudar a proteger las células del daño oxidativo tal como el citrato y piruvato. También es probable se adquieran por el consumo de disulfidos mixtos cisteína-cisteamina mediante el sistema L (Deleuze y Goudet, 2010).

El β -mercaptoetanol (BME) es un compuesto tiol de bajo peso molecular (figura5).



Figura 5. Estructura de β -mercaptoetanol (BME).

Se ha demostrado que reduce cistina y cisteína. Asimismo, se ha sugerido que dicho tiol promueve la captación de cisteína y cistina dentro de las células y el aumento de la síntesis de GSH. Se ha mencionado la formación de disulfidos mixtos cistina-BME, hallando que éste tiene el mismo efecto que la cistina más BME. Se ha propuesto que el sistema de transporte usado para captar el disulfido mixto es diferente del sistema empleado para transportar cistina o cisteína y, por tanto, que el disulfido se reduce a cisteína y BME dentro de la célula. El BME puede escapar de la célula, volver al medio de cultivo y reaccionar después con la cistina (Ohmori y Yamamoto, 1983).

La disponibilidad de GSH depende de la cisteína (figura 6) en el medio.

Fuera de la célula, la cisteína es inestable y en consecuencia, no hay cisteína libre en el medio debido a la autooxidación a cistina. Es posible que esta cistina se convierta a cisteína por las células del cúmulo y se incorpore a la síntesis de GSH durante la MIV.

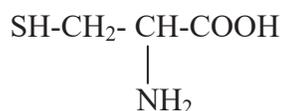


Figura 6. Estructura de la cisteína.

En condiciones fisiológicas, solamente un 10-20% de la cistina libre total está presente en forma reducida. Bajo condiciones en las que el suministro de cisteína celular es insuficiente, se supone que la promoción de la captación de cisteína por otros compuestos químicos incrementaría los niveles de GSH. La cistina y la cisteína se captan por diferentes sistemas de transporte, sin que se hayan demostrado interacciones entre los sistemas. La cisteína se transporta al interior de las células por el sistema ASC (alanina, serina, cisteína), transporta aminoácidos neutros y es Na^+ dependiente. La cisteína extracelular puede reaccionar espontáneamente con otros compuestos tioles para formar disulfidos mixtos bajo ciertas condiciones. Los disulfidos pueden captarse por el sistema de transporte L, que se ha demostrado que es Na^+ independiente para el disulfido de cisteamina y cisteína (Rodríguez *et al.*, 2003).

Tras la captación de cistina (figura 7) al interior de las células esta se reduce rápidamente a cisteína, aunque probablemente no directamente mediante NADH o NADPH.

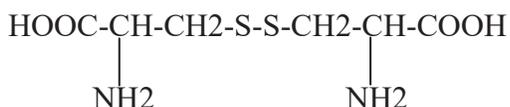


Figura 7. Estructura de la cistina.

En su lugar, la reacción parece proceder de un intercambio sulfhidril-disulfido con el GSH para formar el disulfido mixto CySSG, seguido por la regeneración del GSH por la NADPH-glutatión disulfido (GSSG) reductasa (Rodríguez *et al.*, 2003).

4. JUSTIFICACIÓN

La maduración *in vitro* constituye una etapa decisiva en el rendimiento del proceso de producción de embriones *in vitro*. Sin embargo, se le ha prestado una escasa atención, ya que si revisamos la literatura existente podemos comprobar que en muchos laboratorios se continúa empleando el procedimiento descrito por Fukui y Ono (1989), consistente en incubar durante 24 horas los ovocitos inmaduros de bovinos (Curnow et al., 2008), caprinos (Rodríguez et al., 2003) en TCM-199, suplementado con 10% de suero fetal, gonadotropinas (FSH y LH), y 17 β -estradiol, a una temperatura de 38.5° C en una atmósfera con 5% de CO₂. No obstante, existen claras evidencias de que los ovocitos madurados *in vivo* tienen una competencia para el desarrollo notablemente superior a los madurados *in vitro* (Dieleman et al., 2002). Cuando las condiciones en las que se produce la maduración son muy desfavorables, se observa el bloqueo de la meiosis y de la fecundación. Sin embargo, cuando el sistema empleado tiene pequeñas imperfecciones, sus efectos no se manifiestan hasta la segmentación o la formación de blastocistos y en muchos casos no se observan hasta después de la implantación. Se ha comprobado recientemente que el cultivo de los ovocitos y de embriones en condiciones inapropiadas induce cambios epigenéticos en el genoma embrionario (Niemann y Wrenzycki, 2000) y paralelamente en la expresión génica (Rinaudo y Schultz, 2004).

Alternativamente, se han desarrollado otros medios como el fluido oviductal sintético (SOF) y el medio de cultivo para embriones de hámsteres-6 y 9 (HECM-6 y HECM-9), respectivamente. Ambos han sido utilizados para la MIV de ovocitos en bovinos (Ali y Sirard, 2002; Oyamada y Fukui, 2004), en ovinos (Walker et al., 1996; Navarro et al., 2006; Robledo et al., 2009) y en caprinos (Soberano et al., 2011), obteniendo igual o mejor la tasa de desarrollo embrionario comparado con el medio de maduración TCM-199.

Hay que considerar que el entorno intra-folicular diverge considerablemente de las condiciones para la MIV. Es necesario tomar en cuenta las actividades metabólicas y la actividad de las células de la granulosa en el folículo, así como el microambiente que rodea directamente la dinámica del folículo (riego sanguíneo, por ejemplo). En sistemas *in vivo*, la gran cantidad de radicales libres generados durante el metabolismo celular es probable que en gran medida esté a cargo de las defensas antioxidantes del folículo (Combelle et al., 2009), mientras que en sistemas *in vitro*, es necesario generar estos compuestos antioxidantes para

que actúen en contra de los radicales libres. Se han examinado los efectos potenciales de los componentes tiol en la maduración del ovocito. Un medio que contiene compuestos tiol puede proteger a los ovocitos en desarrollo contra el daño oxidativo. Tal efecto protector se ha demostrado en los ovocitos de mamíferos, y parece estar relacionado con la generación de GSH, que a su vez posee propiedades de captación de radicales libres mejorando la maduración citoplasmática y nuclear (de Matos y Furnos, 2000; Luberda, 2005; Hossein *et al.*, 2007).

Por otro lado, Curnow *et al.*, (2008), demostraron que la adición de fuentes de proteína al TCM-199, como albumina sérica bovina (0.4% de BSA) o suero fetal de ternero (2 y 10% de SFB) afecta los niveles de GSH en el ovocito (SFB 2% y 10%, 5.26 y 5.39 pmol GSH por ovocito, respectivamente, mientras que BSA obtuvo una concentración de 8.70 pmol GSH por ovocito)

No existe evidencia en la bibliografía acerca del uso de compuestos tiol en un medio de maduración definido en la especie caprina, por lo que el estudio del medio HECM-9 *per se* y suplementado con compuestos tioles podría aportar conocimientos del efecto que estos compuestos ejercen sobre la maduración nuclear, el contenido intracelular de GSH y la FIV de ovocitos de cabra.

5. HIPÓTESIS

La adición de compuestos tioles en el medio de maduración (HECM-9) mejorará las tasas de maduración y fertilización *in vitro* en ovocitos de caprino.

6. OBJETIVOS

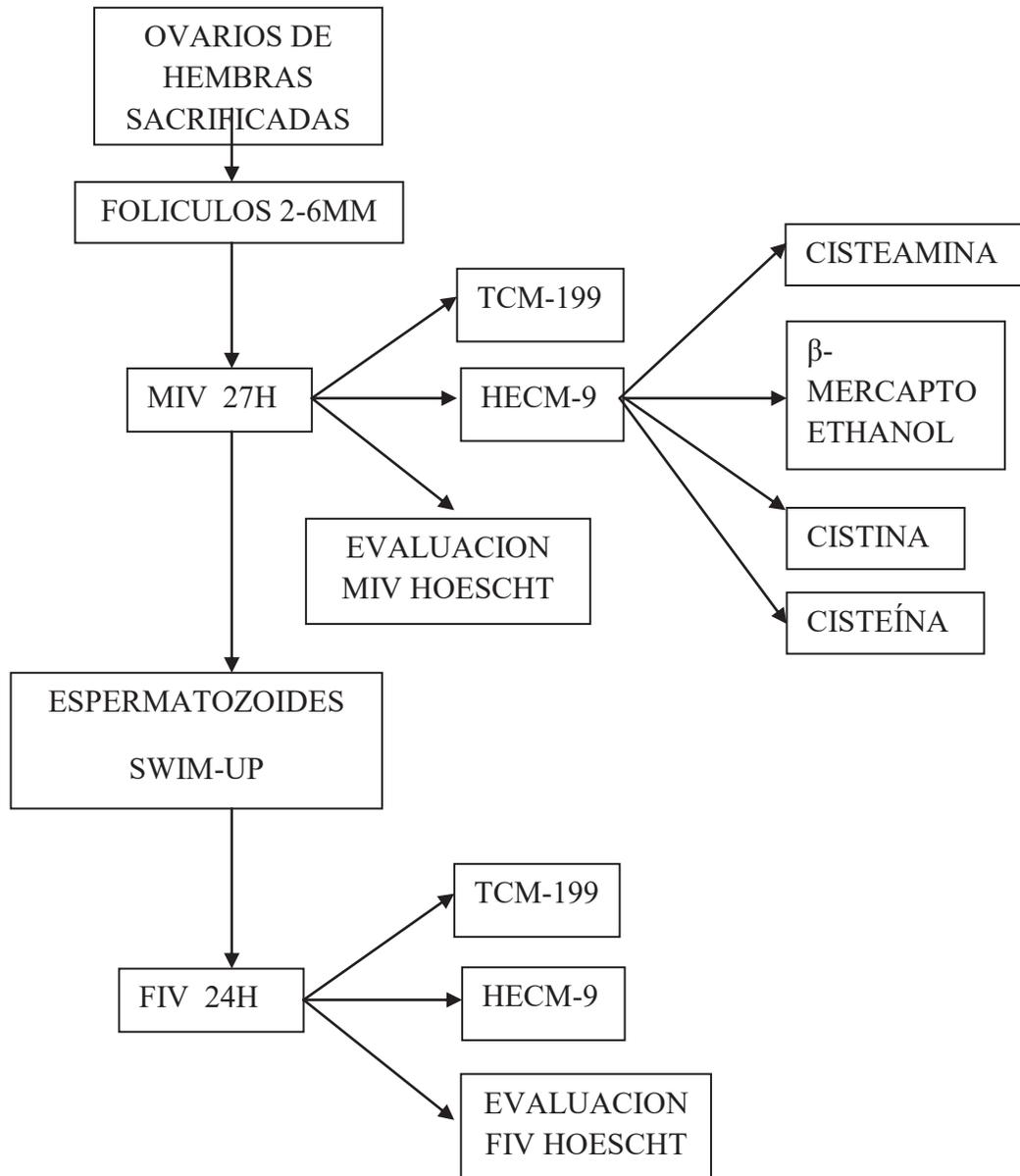
OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los compuestos tioles en un medio de cultivo definido sobre la maduración y fertilización *in vitro* en ovocitos de caprino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estimar el porcentaje de movilidad progresiva (MP) y el estado funcional de la membrana plasmática (espermatozoides no capacitados %NCAP; capacitados %CAP y reaccionados %REA de espermatozoides caprinos en dos agentes capacitantes (cafeína y heparina).
- 2) Evaluar el efecto del TCM-199 y HECM-9 sobre la maduración nuclear y la fertilización *in vitro* de ovocitos de cabra.
- 3) Evaluar el efecto de la adición de compuestos tioles (cisteamina, cisteína, cístina y β -mercaptoetanol) en HECM-9 sobre la maduración nuclear y fertilización *in vitro* de ovocitos de cabra.
- 4) Analizar el contenido intracelular de GSH de los ovocitos de cabra maduros e inmaduros en medio HECM-9 suplementado con Cisteamina y β -mercaptoetanol.

7. METODOLOGÍA GENERAL



8. RESULTADOS

Los lineamientos para la redacción de la tesis de grado señalan que el artículo publicado exigido para la titulación se incluya en el Capítulo I, sin embargo en este caso se decidió ubicarlo en el Capítulo II de acuerdo al planteamiento de los objetivos.

Capítulo I

1. Motilidad y estado funcional de la membrana de espermatozoides caprinos capacitados en diferentes agentes químicos.

Capítulo II

2. Fertilización de ovocitos caprinos madurados en dos medios de cultivo.

Capítulo III

3. Efecto de compuestos tiol sobre la maduración *in vitro* y el contenido intracelular de GSH en ovocitos de cabra.

CAPÍTULO I. ARTÍCULO 1

La inseminación artificial es una tecnología reproductiva comúnmente utilizada en todo el mundo, debido a la relación costo beneficio, cuando se emplean machos caprinos probados (Baldasare y Karatzas, 2004). Para la inseminación artificial el semen de un macho mejorado puede ser utilizado de forma fresca, refrigerado o congelado. Sin embargo, el semen en forma fresca debe ser empleado inmediatamente después de su colección, ya que la movilidad y viabilidad de los espermatozoides bajo esas condiciones se reduce drásticamente en poco tiempo. Mientras que el semen conservado en refrigeración puede mantenerse por más de 48h (Evans y Maxwell, 1990). Lo anterior es debido a que la tasa metabólica tiende a ser proporcional a la temperatura, acumulándose con mayor rapidez los productos tóxicos. Por lo que la disminución de la temperatura ha sido el medio principal para reducir las reacciones químicas y prolongar la vida de las células espermáticas brindando mayor flexibilidad de su uso en programas de IA, por la posibilidad de trasladar el semen desde centros de mejoramiento genético o desde las explotaciones hacia rebaños criollo locales (Martínez *et al.*, 2006).

Por lo general el semen ha sido diluido en extensores formulados con Tris, usando como agente crioprotector no penetrante a las lipoproteínas de la yema de huevo y, a las proteínas de la leche descremada de origen bovino, debido a que se conoce que ambas actúan contra los efectos osmóticos durante el proceso de congelación, promoviendo que un medio hipertónico induzca la salida de agua de las células elevando la deshidratación y, reduciendo la posibilidad de la formación de cristales de hielo intracelular (Amman y Pickett, 1987). Aún y cuando se ha demostrado que este diluyente permite aumentar la vida útil del espermatozoide, además de permitir la capacitación espermática en varias especies (Paulenz *et al.*, 2002, Vishwanath *et al.*, 2000), no es suficiente para criopreservar espermatozoides caprinos, debido a que la yema de huevo (Aboagla *et al.*, 2004) y la leche descremada (Purdy, 2006), al interactuar con la enzima coaguladora de la yema de huevo (EYCE), la enzima glicoproteín lipasa (BUSgp60) y la fracción glicoproteíca (SBU111), presentes en el plasma seminal generan una serie de reacciones nocivas (hidrólisis de lecitina y triglicéridos) para el espermatozoide (Pellicer *et al.*: 1998; Palomino *et al.*, 2001; Sias *et al.*, 2005; Purdy 2006; Vera, 2006), además de los daños irreversibles producidos en la ultraestructura y

funcionalidad de las membranas (hidrólisis de triglicéridos de las membranas y ruptura del acrosoma) durante el proceso de congelación y descongelación (Dorado, 2003), lo que conlleva a que la IA sea limitada en esta especie (Batista *et al.*, 2006).

El objetivo de este estudio fue probar el uso de un extensor comercial (Tryladil) como diluyente en semen de macho cabrío refrigerado a 15°C, usando cafeína (CF), heparina (HP), líquido oviductal sintético (SOF) y tryladil (TRY) como agentes químicos capacitantes en diferentes tiempos.

El semen caprino fue colectado por vagina artificial de un macho adulto. El eyaculado fue diluido en un extensor comercial y almacenado a 15°C durante tres días consecutivos. El objetivo fue evaluar el porcentaje de movilidad progresiva (MP) y estado funcional de la membrana plasmática (porcentaje de espermatozoides no capacitados %NCAP, capacitados, %CAP, y reaccionados, %REA) de espermatozoides caprinos en dos agentes capacitantes: cafeína (CAF) y Heparina (HEP); un medio de cultivo: Líquido oviductal sintético (SOF) y un extensor comercial: Tryladil (TRY) a 60, 120, 180 y 240 min de incubación, por 24, 48 y 72 h. La MP fue superior en el TRY, mientras que el %CAP fue mayor en HEP. El extensor TRY puede ser una alternativa para realizar la capacitación de espermatozoides caprinos, manteniendo una movilidad progresiva por mayor tiempo que los agentes capacitantes HEP o CAF.

Motility and functional state to membrane of caprine capacitated spermatozoa under different chemical agents

¹A. Soberano Martínez,²M. Cajero Juárez,²J. Herrera Camacho,³M.C. Navarro Maldonado,⁴J.C. Segura Correa,¹A. Bravo Patiño

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo *morula_2@hotmail.com

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Posta Zootecnia. Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapecuaro. Col. El Trébol. Tarímbaro, Michoacán, México CP 58880.

³Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Av San Rafael Atlixco No.186, Col.Vicentina C.P.09340 Del. Iztapalapa México D.F.

⁴Campus Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 Carr. Mérida-X'matkuil. CP 97100, Mérida, Yucatán.

Abstract: Caprine semen was collected from an adult male using an artificial vagina. The ejaculates were diluted in commercial extender and kept at 15°C during three days. The objective of this study was to evaluate the progressive motility (PM) and the functional state of the plasmatic membrane (non-capacitated spermatozoa NCS; capacitated CS, and reacting spermatozoa REA) of caprine spermatozoa in two capacitating agents: caffeine (CAF) and heparin (HEP); one culture medium: Synthetic oviductal fluid (SOF) and a commercial extender: Triladyl (TRY) at 60, 120, 180 and 240 min of incubation, during 24, 48 and 72 h. PM was high under TRY, and CS was high under the HEP treatment. TRY could be an alternative to capacitate caprine spermatozoa, keeping PM for a longer time than HEP or CAF.

Key words: spermatozoa, capacitation, caprine, chemical agents

INTRODUCTION

Artificial insemination (AI) is probably the reproductive technology most widely used, because it is simple and provide the highest benefit: cost ratio when tested bucks are used for reproduction

(Baldasarreand Karatzas, 2004). Semen from tested bucks could be used fresh, freeze or frozen. However, fresh semen must be used immediately after its collection, because motility and viability of the spermatozoa is reduced in a short time. However, freezed semen could be

maintained longer than 48 h (Evans and Maxwell, 1990), providing a greater flexibility of their use in AI programs. Frozen semen could be carried from the animal breeding center or a given ranch to the desired one (Martínez *et al.*, 2006). Preservation of ovine semen kept at 15°C (Yániz *et al.*, 2005), caprine semen at 5° - 21°C (Salvador *et al.*, 2006) and canine semen (Baquero *et al.*, 2004) have been notified. However, it has been found that the production of reactive oxygen species (ROS) occurs mainly during the cooling period at 5°C, (Santiani, 2003).

In this context, semen has been diluted in Tris base extenders using as cryoprotector agent non-penetrant lipoproteins of yolk egg and milk proteins because both act against the osmotic effects of the cooling process, causing the exit of water of the cells by the hypertonic medium, increasing deshydration and reducing the possibility of intracellular crystal ice formation. However, even though this diluent lengthens the lifetime of the spermatozoa and allows the sperm capacitation (Vishwanath *et al.*, 2000), this does not happen during the cryopreservation process of the caprine spermatozoa, because the interaction of the egg yolk (Aboagla *et al.*, 2004) and descreamed

milk (Purdy, 2006) with the seminal plasma produce a set of nocive reactions in the spermatozoa (Vera, 2006). It also causes, irreversible damages in the structure and function of the membranes during the freeze and defreeze processes (Dorado, 2003), which limits the use of AI in caprines.

The *in vivo* sperm capacitation occurs during migration in the reproductive tract of the female, whereas *in vitro* capacitation requires the exposition of fresh or freeze semen to specific capacitating agents (Salgado *et al.*, 2005). The beginning of this process implies the removal of cholesterol and probably other sterols from the plasmatic membrane of the spermatozoa, changes in the membrane, flux and redistribution of the proteins modulation in the intracellular ion concentration (Ca^{+2} , HCO_3 , K^+ and Na^+), hyperpolarization of the plasmatic membrane associated with K^+ flux, pH increase and an increase of phosphorylation of the protein tyrosine (García *et al.*, 2005).

Many methods have been applied to measure the changes that occur in the membrane, during the *in vitro* capacitation process. The most common method used is chlortetracycline tinction (CTC) (Fraser *et al.*, 1995). This fluorescent antibiotic binds

to the membrane linking cations, specially Ca^{2+} and then shows an increase of fluorescence on the segments of the membrane where these cations accumulate. CTC tinction has demonstrated to interact with spermatozoa of different species of mammals, that present different fluorescent patterns on the spermatozoa head, which are though to express different stages of the capacitation process (Bergqvist *et al.*, 2006).

In vivo the fluid of the reproductive tract of the female is used as a cholesterol-acceptor because is reach in albumins and high density lipoproteins (HDL), capable of withdrawing cholesterol from the membrane of the spermatozoa (Companyó *et al.*, 2007). Similarly, the pass through the reproductive tract cause that the spermatozoa get rid of the seminal plasma keeping only those proteins or descapitating factors (mucopolysaccharides and proteins) that cover the spermatic surface (Caballero, 2007), which are removed in the oviductal crypts (Olivera *et al.*, 2006) and by progesterone receptors that initiated the capacitation process (Lösel *et al.*, 2004). In *in vitro* studies, glycosaminoglycans (GAGs) have been identified as efficient inductors of the spermatozoa capacitation. This group of

carbohydrates (polysaccharides) formed by repetitive units of disaccharides include the heparin, heparin sulphate, chondroitin sulphate, keratan sulphate and hyaluronic acid. GAGs promote the capacitation binding and removing the proteins of the seminal plasma fixed by adsorption to the plasmatic membrane of the spermatozoa and inhibin the capacitation (Therrien *et al.*, 1995). Heparin have been the most potent inductor of capacitation, because it attacheds to the spermatozoa through union proteins situated in the cell membrane, driving to the affluence of Ca^{+} , which increase the synthesis of AMPc and consequently produce the protein phophorylation (Chamberland *et al.*, 2001). Caffeine is an alcaloid compose of the metilxantin group used *in vitro* as capacitating agent because it inhibit the phosphodisterasa nucleotide which is responsible of the degradation of AMPc; inducing an increase in its concentration (Pereira *et al.*, 2000). This has conducted to find new ways to improve the spermatozoa capacitation results. Bergqvist *et al.* (2006) have point out the use of oviductal fluid collected *in vivo*, as spermatozoa capacitation medium for bovines. The use of this medium based on synthetic oviductal fluid (SOF) of ovine has not been

used in caprines. The use of only the extender triladyl on caprine frozen semen and spermatozoa capacitation with caffeine, heparin, SOF and extender triladyl have also not been evaluated.

The objective of this study was to test the use of a commercial extender (Triladyl) as a diluent in caprine semen refrigerated at 15°C, using caffeine (CF), heparin (HP), synthetic oviductal fluid (SOF) and triladyl (TRY) as capacitating chemical agents at different times.

MATERIALS AND METHODS

Twenty ejaculates from a buck (Saanen) were collected using an artificial vagina. Semen was evaluated in terms of its micro- and macroscopic characteristics and thereafter diluted 9:1 in a commercial base TRIS (Triladyl; Minitüb, Tiefenbach, Germany) extender and refrigerated at 15°C. In order to evaluate the spermatozoa capacitation of the cool semen under different conditions, the experimental protocol was carried out during three consecutive days.

Semen samples (3 ml) diluted in TRIS were divided in four aliquots, which were incubated at 37 °C by 15 min. Samples were swim-up three times

consecutively. Semen was centrifuged at 750 rpm during 5 min at environmental temperature. The semen fluid was decanted and reposed twice with equal volume of mDM medium and homogenized gently. In the third wash the pill was incubated with mDM for 45 min to allow to up and to select the spermatozoa with greater movility (Avila *et al.*, 1993).

The supernatant was separated and placed in independent vials to get the different treatments of the study: *Treat 1) upper fraction + mDM (Vol/vol) + Caffeine (concentration 5mM; CA); Treat 2) upper fraction + mDM (Vol/Vol) + Heparin (50µg/ml; HE); Treat 3) upper fraction + synthetic oviductal fluid (SOF; Vol-Vol; and Treat 4) upper fraction + Triladyl (TR; Vol:Vol).*

Evaluation of the functional state of the spermatic membrane: It was done through fluorescent CTC tinction, counting 200 spermatic cells. The evaluation of the functional state of the membrane and PM of the spermatozoa was carried out in 150µl of each treatment sample at 60, 120 180 and 240 min. At all times the treatments stayed in incubation at 37° C. The protocol was repeated 24 h (day 2) and

48 h (day 3) with diluted semen and refrigerated in Triladyl.

The functional state of the membrane was classified according to tinction portion in the following categories: a) Non-capacitated spermatozoa, with uniform fluorescence in the head and intact acrosome; b) Capacitated spermatozoa, with fluorescence concentrated in the acrosomal region, a band without fluorescence in the postacrosomal region and the presence of intact acrosomes; c) Spermatozoa with acrosomal reaction, without fluorescence in the head, except by a thin band in the equatorial region (Guerín *et al.*, 1999).

Statistical analysis. The effect of chemical agent (caffeine (CF), heparin (HP), synthetic oviductal fluid (SOF) and triladyl (TRY) extender), culture time (60, 120, 180 and 240 min), day of evaluation (1, 2 and 3) and simple interactions on

progressive motility (PM), non-capacitated spermatozoa (NCS), capacitated spermatozoa capacitated (CS) and reacting spermatozoa (REA) was tested.

Data were analyzed using the general linear model procedure of SAS (SAS, 1998).

RESULTS

The statistical analysis showed effects of treatment ($P>0.0001$), day ($P>0.0001$) and culture time ($P>0.0001$). However, there was no effect of the treatment*day ($P>0.476$) and treatment*time interaction ($P>0.995$).

Treatment effect. PM, CS, NCS and REA were affected by treatment. A greater PM and NCS spermatozoa was observed for TRY and SOF treatments ($P<0.01$), respectively (Table 1). CS was better for HEP and CAF; whereas better REA was found for CAF.

1

Table 1. Effect of treatment on progressive motility and functional state of the plasmatic membrane of caprine spermatozoa.

Variable (%)	Caffeine	Heparin	SOF	Triladyl	SE	P value
PM	29.2 ^a	34.8 ^a	59.9 ^b	65.9 ^b	1.67	0.0001
CS	59.5 ^{ab}	63.2 ^a	55.7 ^{bc}	54.2 ^c	0.95	0.0011
NCS	31.2 ^a	29.2 ^a	37.1 ^b	37.8 ^b	1.09	0.0002
REA	9.3 ^a	7.7 ^{ab}	7.2 ^{ab}	7.8 ^b	0.32	0.04

abc Different literals in the same row mean statistical significant effect

PM= progressive motility; CS= capacitated spermatozoa; NCS= non-capacitated spermatozoa; REA= reacting spermatozoa.

Time effect. PM was greatest at 120 min and CS at 240 min as compared with other culture times (Table 2). No significant difference was found with respect to REA.

Table 2. Effect of incubation time with different chemical agents on progressive motility and functional state of the caprine spermatozoa membrane.

Variable (%)	Incubation time (min)				SE	P value
	60	120	180	240		
PM	57.4 ^a	49.6 ^b	42.7 ^c	40.1 ^c	1.73	0.0001
CS	52.9 ^a	56.3 ^{ab}	60.1 ^{bc}	63.3 ^c	1.71	0.002
NCS	40.1 ^a	35.9 ^{a^b}	31.4 ^{bc}	27.9 ^c	1.65	0.0001
REA	6.9 ^a	7.8 ^a	8.4 ^a	8.7 ^a	0.53	0.08

abc Different literals in the same row mean statistical significant effect

PM= progressive motility; CS= capacitated spermatozoa; NCS= non-capacitated spermatozoa; REA= reacting spermatozoa.

Effect of day (Storage time): Evaluation as day of evaluation increased PM day had a significant effect on PM and CS; decreased but CS increased.

Table 3. Effect of incubation day with different chemical agents on progressive motility and functional state of the caprine spermatozoa membrane.

Variable (%)	Evaluation day			SE	P value
	1 (0h)	2 (24 h)	3 (48h)		
PM	55.6 ^a	49.2 ^b	37.7 ^c	1.45	0.0001
CS	56.1 ^a	55.3 ^a	62.3 ^b	0.82	0.002
NCS	37.2 ^a	35.8 ^a	28.4 ^b	0.95	0.0001
REA	5.8 ^a	8.1 ^b	9.3 ^b	0.28	0.0001

abc Different literals in the same row mean statistical significant effect.

PM= progressive motility; CS= capacitated spermatozoa; NCS= non-capacitated spermatozoa; REA= reacting spermatozoa.

DISCUSION

The spermatozoa capacitation process makes possible the union of the cell to the zona pellucida, it experiment acrosomic reaction in response to natural agonistics and express hypermotility, a special movement that allow spermatozoa to move in the viscose fluid of the oviduct and get into the zona pellucida (Yanagimachi, 1988).

The results of this study indicate that caprine semen diluted in a tris base extender (Triladyl) could be preserve at 15°C until 48 h maintaining an aceptable motility ($P > 0.0001$). Probably the presence of lipoproteins of egg yolk and milk may not be required because the extender *per se*, compose of TRIS, sugar, glycerol and citric acid, is capable of providing the nutrients that the spermatozoa need for its metabolism. It also gives protection against pH variation (Guérin *et al.*, 1999), an adequate osmotic pressure for the spermatozoa, and avoids dehydration damage through the stabilization of the lipid bilayer. Because sugars (sucrose, raffinose, trehalose and lactose) are non-penetrant cryoprotectors of high molecular weight they are useful when applied at high cooling speeds, because the cryoprotector

action is associated with its dehydrate activity and its specific interaction with the phopholipid membrane (Aisen *et al.*, 2000). In this context, the type and sugar concentration used can modify not only the sperm motility but also the viability and acrosomal integrity (Rigau *et al.*, 2002). In general the monosaccharides in addition to act as cryoprotectors play other functions. They provide a source of energy for the spermatic cell and maintain the osmotic pressure (Yildis *et al.*, 2000).

The glycerol has been used as a penetrant cryoprotector agent since its discovery by Polge *et al.* (1949). It has been show that its presence in the extenders reduce damage in the spermatozoa, because it avoids the build of intracellular crystal ice, as well as the excessive dehydration cause by the slow cooling (Medeiros *et al.*, 2002), and improve fertility (Vishwanath *et al.*, 2000). The discrepancies between studies respect to the use of glycerol, is due to alterations in the organization and viscosity of the cytoplasm of the spermatozoa, to the permeability and stability of the membrane, and toalteration of the protein and phospholipid organization. However, the previous could be due to many factors such as glycerol concentration, the use of different diluents,

different cryopreservation protocols, and the use of other cryoprotectors; as well as the different criteria and methods used to evaluate sperm quality.

Sugar and glycerol act in a way that their hydrogens bind to the polar group of the head of the membrane lipids, which have the ability to replace the water molecules normally found in the polar groups, which help to stabilize the membrane during the temperature transition (Vishwanath *et al.*, 2000).

On the other hand, the results of CS (54.2%) and PM (65.9%) here obtained suggest that the results obtained in the percentage of capacity permatzoa and movility of this study suggests that time may be stored (CA 54.2% and 5.9% movility) allowing training as reported by Toscano (2005) in sheep sperm.

This is due to that citric acid and sugar compounds provide a source of energy enough for the sperm metabolism and to increase motility (Donnelly *et al.*, 1998). Previous studies indicate that the use of triladyl can provide sustrates such as citric acid, which through a serie of chemical reactions favor sperm motility due to an increase of ATP production (Alberti, 2004). Spermatozoa require a permanent produccion of ATPs in order to

maintain the cell structure, the composition of intracellular ions and motility. It has been hypothesized that composition of ions participate in the capacitation process (Arvelo, 2005).

The decreasing effect of HEP on PM and the increasing effecct of CAF on CS agree with the results of Zhou *et al.* (2004), who evaluating the effect of heparin in fresh semen during caprine spermatic capacitation by 120 min observed a significant reduction of motility and membrane integrity. El Gaafary *et al.* (1990) using CAF obtained acceptable results of sperm motility of fresh bovine semen during 1 h; however, motility decreased as incubation time increased (up to 6 h). To the authors knowdlege there are no reports of this chemical agents in refrigerated caprine semen.

Previous research suggest that the reduction of the motility of *in vitro* capacitated spermatozoa treated with heparin or caffeine may be due to reduction of the glycosilable substrates like glucose and/or fructose, and also to a reduction in the availability of piruvate and lactate, sustrates that during the cell metabolism are primordial to produce ATPs (Fernández *et al.*, 2003); which make difficult its conservation and use for longer times.

With respect to the medium known as synthetic oviduct fluid (SOF) which composition is based in the biochemical analysis of ovine oviduct fluid plus HEPES and polyvinyl alcohol (PVA). The incubation results with the SOF medium showed a greater PM than for CAF and HEP but the capacitation percentages was similar. It has not been established the mechanism by which the motility changes. However, it is known that motility is particularly dependent on the mitochondrial function (Kao *et al.*, 1998). Mitochondria are strategically distributed around the midpiece of the spermatozoa to provide energy to dineina that propel the microtubules. The mitochondria provides the main source of oxidative energy throughout the production of ATPs via the electrons transport chain. On the other hand, the response to the capacitation could be due to the fact that the medium is a source of intracellular ions (NaCl^{+2} , KCl, KH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , $\text{CaCl}_2\text{-}2\text{H}_2\text{O}$) piruvate and lactate, that cause changes in the properties of the plasmatic membrane, particularly of the ionic conductance which have been shown to be powerful regulator of the metabolism and consequently of capacitation and sperm motility (Gatti *et al.*, 1993). Also, it is

known that bicarbonate plays an important rol in the capacitation and fertilization processes both *in vivo* and *in vitro*, because it increases the distabilization of the lipid membrane (Gadella and Harrison 2000), and regulates and stimulates the adenylyl cyclase activity (ACs). The ACs increases the concentration of AMPc and speed up the A1 cynase protein (PKA1), which phosphorylate some proteins (Vadnais *et al.*, 2007). On the other hand, Huo *et al.* (2002) made reference to the fact that the elimination of the seminal plasma by centrifugation and sperm dilution could cause distabilization of the spermatic membrane. Therefore the hydrophobic anadjustment among membranes of the proteins and the “lipid rafts” cause small changes in the membrane tickness (Antoinette, 1998) and protein interactions resident in the rafts. This may allow the exteriorization of receptors of the ion channels that participate in the activation of the mechanims of calcium transduction flux, AMPc synthesis, and protein phosphorylation- dipphosphorylation (Sleight *et al.*, 2005).

CONCLUSIONS

In summary TRY could be an option for refrigerating caprine sperm. The use of SOF medium and TRY extender maintained an acceptable motility and sperm capacitation for longer time compared with HEP or CAF.

Refrigerated semen diluted in triladyl without egg yolk and milk could be a viable and flexible option to use in caprine AI programs. However, further FIV test are required to determine the fecundant capacity of the spermatozoa.

REFERENCES

1. Aboagla, M. and T. Terada, 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62: 1160-1172.
2. Aisen, E. V. Medina and A. Venturino, 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57: 1801-1808
3. Alberti, K., 2004. Congelacao de semen bovino: Novos enfoques em meios diluentes. Monografía apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu. BOTUCATU – SP. 30pp
4. Antoinette, K. J., 1998. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys. Acta*, 1376: 401-415.
5. Arvelo, M.D.A., 2005. Estudio del metabolismo energético de los espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para la conservación de semen refrigerado. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
6. Baldassarre, H. and C.N. Karatzas, 2004. Advanced assisted reproduction technologies ART in goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 82/83: 255-266.
7. Baquero, P.J.S., R.E.A. Pardo and C.P.E. Cruz, 2004. Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: Efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución

- y de la concentración de fructuosa. Orinoquia. 8:26-33.
8. Bergqvist, A.S., J. Ballester, A. Johannisson, M. Hernandez, N. Lundeheim, and H. Rodríguez-Martínez, 2006. *In vitro* capacitation of bull spermatozoa by oviductal fluid and its components. *Zygote*, 14:259-273.
 9. Caballero, P.I., 2007. Tesis doctoral. Estudio del plasma seminal y la espermadhesina PSP-I/PSP-II sobre la funcionalidad de los espermatozoides de verraco. Facultad de Veterinaria. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad de Murcia. p 215.
 10. Chamberland, A., V. Fournier, S. Tardif, Ma. Sirard, R. Sullivan and J.L. Bailey, 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*, 55:823-835.
 11. Companyó, M., A. Iborra, J. Villaverde, P. Martínez and A. Morros, 2007. Membrane fluidity changes in goat sperm induced by cholesterol depletion using beta-cyclodextrin. *Bioch. Biophys. Acta*, 1768: 2246-2255.
 12. Donnelly, E.T., S.E. Lewis, J.A. McNally and W. Thompson, 1998. *In vitro* fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil. Steril*, 70: 305-314.
 13. Dorado, J., I. Rodríguez, M. Hidalgo and C.C. Pérez, 2003. Aportaciones a la crioconservación de esperma de macho cabrío en nitrógeno líquido. <http://www.uco.es/dptos/medicina-cirurgia/reproduccion/documentos/abst14.pdf>
 14. El-Gaafary, M.N., A.H. Daader and A. Ziedan, 1990. Effects of caffeine on bull semen quality and sperm penetration into cervical mucus. *Anim. Reprod. Sci.*, 23:13-19.
 15. Evans, G. and W.M. Maxwell, 1990. *Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras*. Josefina Illadera del Portal (trad). Acribia. Zaragoza, España. 204 p.
 16. Fernández, R.F., G.Y. Gutiérrez, N.N.E. Gómez and P.J.E. Hernández, 2003. Motilidad y sobrevivencia espermática *in vitro* con la utilización de pirofosfato de

- tiamina en semen caprino. *Rev. Salud Animal*, 25:34-38.
17. Fraser, L.R., L.R. Abeydeera and K. Niwa, 1995. Ca^{2+} - regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.*, 40: 233-241.
 18. Gadella, B.M. and R. A. P. Harrison, 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, 127: 2407-2420.
 19. García, R.E., 2005. Análisis de diferentes factores que afectan al rendimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España.
 20. Gatti, J.L., C. Chevrier, M. Paquignon and J.L. Dacheux, 1993. External ionic conditions internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertility*, 98: 439-449.
 21. Guérin, P., M. Ferrer, A. Fontbonne, L. Bénigni, M. Jacquet and Y. Ménézo, 1999. *In vitro* capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 52: 617-628.
 22. Huo, L.J., X.H. Ma and Z.M. Yang, 2002. Assessment of sperm viability mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, 58: 1349-1360.
 23. Kao, S., H. Chao and Y. Wein, 1998. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 4: 657-666
 24. Lösel, R., A. Dorn-Beineke, E. Falkenstein, M. Wehling and M. Feuring, 2004. Porcine spermatozoa contain more than one membrane progesterone receptor. *Int J Biochem Cell Biol.*, 36:1532-154
 25. Martínez Rojero Rubén Dario, Javier Hernández Ignacio, Humberto Hernández Hernández, Alejandro C. Michel Aceves y Javier Valencia Méndez, 2006.

- Inseminación artificial intrauterina en cabras criollas con semen refrigerado. *Agrociencia*: 40: 71-76.
26. Medeiros, C, F. Forell, A. Oliveira and J. Rodríguez, 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57: 327-344.
 27. Olivera, M., T. Ruíz, A. Tarazona and C. Giraldo, 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19: 426-436.
 28. Pereira, R.J.T.A., R.K. Tuli, S. Wallenhorst and W. Holtz, 2000. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A 23187 on *in vitro* induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology*, 54:185-192.
 29. Polge, C., A.V. Smith, A.S. Parkes, 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666
 30. Purdy, P.H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res.*, 63:215-225.
 31. Rigau, T., M. Rivera and M.J. Paloma, 2002. Differential effect of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*, 123: 579-591.
 32. Salgado, R.D., C.C. Rugeles and J. Álvarez, 2005. Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos *in vitro*. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 18: 122-126.
 33. Salvador, I., J. Yaniz, M.P. Viudes de Castro, E.A. Gómez and M.A. Silvestre, 2006. Effect of solid stage on caprine semen conservation at 5° C. *Theriogenology*, 66:974- 981
 34. Santiani, A., 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis de Maestría en Ciencias. Temuco, Chile: Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. 95 p.
 35. Sleight, B.S., V.P. Miranda, N. Washington, N.W. Plaskett, B. Maier, J. Lysiak, H. Scrable, C.J. Herr and P.E. Visconti, 2005. Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: Evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol. Reprod.*, 73: 721-729.

36. Therien, I., G. Bleau and P. Manjunath, 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.*, 52: 1372-1379
37. Toscano, T.I.A., 2005. Efecto de la congelación-descongelación del semen ovino sobre el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide utilizando un diluyente para bovinos. Tesis Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 60p.
38. Vadnais, L.M., H. Galantino-Homer and C. Gary, 2007. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 53: 109-123.
39. Vera, T., 2006. Evaluación sobre la viabilidad y fertilidad de espermatozoides caprinos congelados con diluyente sin proteína animal y el agregado de plasma seminal pos descongelado. <http://www.inta.gov.ar/balcarce/ResumenesPG/PGPA2006/ResumenTOMASVERA.doc> -
40. Vishwanath, R. and P. Shannon, 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reprod. Sci.*, 62:23-53.
41. Yanagimachi, R., 1988. Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds. E. Knobil y J. Neil *et al.* Raven Press. Ltd. New York. pp: 135-185.
42. Yániz, J., J.L. Martí, M. A. Silvestre, J. Folch, P. Santolaria, J.L. Alabart and F. López-Gatius, 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on the survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, 64:1844-51
43. Yildis, C., A. Kaya, M. Aksoy and T. Tekeli, 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54:579-585.
44. Zhou, J.B., Y.G. Wu, L.Q. Liu, M.J. Luos, Z.L. Chang, X.W. Tan, N. Liu and J.H. Tan, 2004. Studies on *in vitro* capacitation of goat spermatozoa by heparin treatment.

CAPÍTULO II

NOTA CORTA



NOTA CORTA [SHORT NOTE]

FERTILIZACION DE OVOCITOS CAPRINOS MADURADOS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO

[FERTILIZATION OF GOAT OOCYTES MATURATED IN TWO CULTURE MEDIA]

A. Soberano-Martínez¹, A. Bravo-Patiño¹, I. Olivo-Zepeda¹, I. Toscano-Torres¹, M. Cajero-Juárez^{*2}, J. Herrera-Camacho², M. C. Navarro-Maldonado³, J. C. Segura-Correa⁴

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Posta Zootecnia. Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro. Col. El Trébol. Tarímbaro, Michoacán, México CP 58880. ³Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Av San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina C.P.09340 Del. Iztapalapa México D.F.

⁴Campus Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 Carr. Mérida-X'matkuil. CP 97100, Mérida, Yucatán.

Email: cajeromarco@hotmail.com

*Corresponding Author

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de dos medios de cultivo en la tasa de maduración y fertilización de ovocitos de cabra. Los complejos cumulus ovocito (CCO's) fueron obtenidos de ovarios de cabras post-mortem. En el experimento I (EXP I), 361 CCO's fueron divididos al azar para su maduración en TCM-199 (n=171) y HECM-9 (n=190). Ambos medios fueron suplementados con LH y FSH (10µg/ml) y 50µg/ml de gentamicina. Los CCO's fueron cultivados a 38.5 °C, 5% CO₂ y a las 27 h post-maduración, fueron lavados en PBS y teñidos con Hoescht 33342 para evaluar la tasa de maduración. En el experimento II (EXP II) 667 CCO's fueron distribuidos en TCM-199 (n=323) y HECM-9 (n=344), y 30 ovocitos de cada tratamiento fueron evaluados como en el EXP I, el resto fueron co-incubados con 2x10⁴ espermatozoides caprinos en medio TBM + 0.03% de BSA para evaluar la tasa de fertilización a las 36 h después. En el EXP I, la tasa de maduración nuclear fue superior (p<0.05) en HECM-9 (60.5%), respecto al TCM-199 (38.6%). En el EXP II, la tasa de maduración *in vitro* (MIV) y de fertilización *in vitro* (FIV) fue superior (p<0.05) en el medio HECM-9 (84.8% y 19.18%, respectivamente) que en TCM-199 (62.7% y 9.59%, respectivamente). El HECM-9 mejora la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cabra.

Palabras clave: cabras; HECM-9; maduración *in vitro*; producción *in vitro*.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the effect of two culture media on the *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) rates of goat oocytes. Cumulus oocyte complexes (COC's) were obtained from ovaries of postmortem goats. In experiment I (EXP I), 361 COC's were randomly distributed for maturation in TCM-199 (n=171) and HECM-9 (n=190) media. Both media were supplemented with LH and FSH (10µg/ml) and 50µg/ml gentamicin. COC's were cultivated at 38.5 °C, 5% CO₂. Twenty-seven hours post-maturation, the COC's were washed in PBS and stained with Hoescht 33342 to evaluate the nuclear maturation. In experiment II (EXP II) 667 COC's were distributed in TCM-199 (n=323) and HECM-9 (n=344), and 30 oocytes of each treatment were evaluated as in EXP I, the rest were co-incubated with 2x10⁴ buck spermatozoa in TBM medium + 0.03% BSA to evaluate the fertilization rate after 36 h. In EXP I, the nuclear maturation rate was higher (p<0.05) in HECM-9 (60.5%), respect to TCM-199 (38.6%). *In vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) rates in the EXP II were higher (p<0.05) in the HECM-9 (84.8% and 19.18%, respectively) than in TCM-199 media (62.7% and 9.59%, respectively). The HECM-9 is able to support the *in vitro* maturation and fertilization of goat oocytes.

Key words: goat; HECM-9; *in vitro* maturation; *in vitro* production.

INTRODUCCIÓN

En pequeños rumiantes, la producción de embriones *in vitro* muestra gran variabilidad debido a que los componentes de los medios utilizados son limitados si se comparan con los del fluido uterino o bien por la falta de sustratos adecuados para la síntesis de nuevos compuestos (Korhonen *et al.*, 2005; Kharche *et al.*, 2009).

Los protocolos estándar para la producción de embriones *in vitro* (PIV), precisan de la exposición de los ovocitos y embriones a tres diferentes medios durante cada una de las fases, que incluyen la maduración (MIV), fertilización (FIV) y desarrollo *in vitro* de los embriones (DIV) (Yoshioka *et al.*, 2008). Se desconoce el efecto de transferir el embrión en desarrollo a los diferentes medios; no obstante, es posible que el embrión realice cambios en su metabolismo para soportar cambios en la osmolaridad, pH y aprovechamiento eficiente de los sustratos necesarios para su desarrollo (Yoshioka *et al.*, 2008).

El medio TCM-199 (Tissue Culture Medium), originalmente diseñado para satisfacer necesidades de células somáticas en prolongados períodos de cultivo (Herradón *et al.*, 2007), se utiliza en forma frecuente, solo o suplementado con diferentes sustancias como suero fetal o albúmina sérica bovina (BSA) y algunas hormonas (Kharche *et al.*, 2009), en la producción de embriones *in vitro*; no obstante, se demostró que contiene algunos componentes que bloquean o inhiben el desarrollo embrionario temprano (Bavister *et al.*, 1992). Alternativamente, se desarrollaron medios libres de proteínas y químicamente definidos como el fluido oviductal sintético y el medio de cultivo para embriones de hámsteres -6 y 9 (HECM-6 y 9). El HECM, se diseñó para evaluar efectos de compuestos contenidos en el medio y evitar confusión con factores componentes del suero (Bavister, 1995). Los medios HECM-6 y 9 se utilizaron para el cultivo de embriones (85.2%) en bovinos (Krisher *et al.*, 1999) y maduración *in vitro* (65%) en ovinos (Navarro *et al.*, 2006), pero no existe información en la especie caprina; por lo tanto el objetivo del estudio fue evaluar el efecto del medio químicamente definido HECM-9 sobre la tasa de maduración y fertilización de ovocitos de cabra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ovocitos. Los ovocitos fueron obtenidos de ovarios de cabras sacrificadas en un rastro comercial y mantenidos en solución salina al 0.9% (38.5 °C) suplementada con gentamicina (50µg/ml) y se transportaron al laboratorio del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología Molecular (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en el Km. 9 de la

Carretera Morelia-Zinapécuaro, en el municipio de Tarímbaro, Michoacán en menos de 2 h post-sacrificio. Los folículos de 2-6 mm de diámetro fueron aspirados con una aguja hipodérmica calibre 18 y el líquido folicular fue depositado en un tubo cónico con medio TCM-199 suplementado con sales Earl's, 26.9mM NaHCO₃ (Gibco), suplementado con 25mM de Hepes, 0.001g/ml de polivinil alcohol (PVA) y 100UI/ml de heparina, se mantuvo en reposo por 15min, el precipitado se depositó en cajas de Petri estériles para realizar la clasificación de los complejos cumulus ovocitos (CCO's), de acuerdo con las características morfológicas del citoplasma y de las capas celulares del cúmulo descritas por Ward *et al.* (2000).

Experimento I

Maduración in vitro: Un total de 361 CCO's fueron lavados 3 a 4 veces en TCM-199, sin heparina, y fueron asignados de manera aleatoria a dos medios para su maduración: **TCM-199** (n=171 ovocitos suplementado con 275µg/ml de piruvato de sodio, 146µg/ml de L-glutamina 10% (v/v) suero fetal bovino (Gibco), 1µg/ml de 17 β-estradiol; **HECM-9** (n=190 ovocitos) elaborado con base en BM3 (McKiernan y Bavister, 2000), 100 µl de un stock de 11 aminoácidos no esenciales (ácido glutámico 0.01mM, asparagina 0.01mM, cisteína 0.01mM, glicina 0.01mM, histidina 0.01mM, lisina 0.01mM, prolina 0.01mM, serina 0.01mM, ácido aspártico 0.01mM; glutamina 0.20mM y taurina 0.50mM), y suplementado con 10µL 3.02mM de pantotenato en solución salina, 10µg/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF) y 0.1mg/ml de PVA. Ambos medios fueron suplementados con 10µg/ml de LH, FSH, y 50µg/ml de gentamicina.

Los CCO's fueron depositados en grupos de 10, en cajas estériles de maduración de cuatro pozos en un volumen de 500µl del medio TCM-199 o HECM-9 (pH 7.4), previamente equilibrado por 24 h a 38.5 °C, y se incubaron por 27 h, a 38.5 °C en una atmósfera de 5% CO₂. Posteriormente, fueron desnudados con hialuronidasa al 0.01%, lavados en PBS y teñidos con Hoescht 33342 (1% en PBS) para evaluar la tasa de maduración nuclear mediante la extrusión del primer cuerpo polar (metafase II), siguiendo el protocolo descrito por Velilla *et al.* (2002).

Experimento II

Maduración in vitro: 727 CCO's fueron distribuidos en los medios de maduración TCM-199 (n=323) y HECM-9 (n=344), como se describe en el EXP I, excepto que en el EXP II se realizó la desnudación y tinción con Hoescht 33342 en 30 ovocitos de cada tratamiento para evaluar la tasa de maduración, el resto de los CCO's continuaron en el proceso de FIV.

Fertilización in vitro. Después de la MIV, grupos de 10 CCO's de ambos medios fueron lavados, por separado, tres veces en medio TBM (medio amortiguador Tris) y transferidos a cajas estériles de cuatro pozos en gotas de 100µl de TBM suplementado con 0.3% de BSA, pre-equilibrado por 24 h a 38.5 °C. El semen fue obtenido de un macho cabrío mediante la técnica de vagina artificial. Una vez que el semen fue evaluado macro (color, olor y volumen) y microscópicamente (movilidad masal, movilidad progresiva, concentración, viabilidad y morfología espermática), se diluyó 1:3 v/v en medio mDM (Younis *et al.*, 1991), se centrifugó (2min a 100g) en dos ocasiones. Al final se repuso igual volumen de medio del sobrenadante retirado (swim-up); posteriormente se incubó, para su capacitación, en volumen 1:6 v/v durante 45 min a 37° C en una atmósfera del 5% de CO₂. Inmediatamente después, una muestra de 500µl del sobrenadante fue obtenida y diluida en 1.5ml de medio mDM suplementado con 100µg/ml de heparina durante 15 min. Aproximadamente 2x10⁴ espermatozoides fueron co-incubados con los CCO's en el medio TBM + 0.3% de BSA durante 24 h a 38.5°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y humedad saturada.

A las 24 h de iniciado el proceso de FIV, los CCO's de cada medio de maduración, fueron desnudados con hialuronidasa al 0.1%, lavados en el medio de TBM + 0.3% de BSA y colocados de manera independiente en 450µl del mismo medio. Los ovocitos fueron

observados y evaluados 12 h después y aquellos con dos o más blastómeros fueron considerados como fertilizados.

Análisis estadístico

Los datos de la tasa de maduración y fertilización fueron analizados mediante la prueba de chi-cuadrada, utilizando el procedimiento NPAR1WAY del programa estadístico SAS (2000).

RESULTADOS

Experimento I

La tasa de maduración nuclear (Figura 1), fue superior ($p < 0.05$) en los ovocitos mantenidos en HECM-9 (60.5%), respecto al TCM-199 (38.6%).

Experimento II

La tasa maduración nuclear (Figura 2) fue superior ($p < 0.05$) en el medio HECM-9 (84.8%) que en TCM-199 (62.7%), mientras que la tasa de fertilización *in vitro* en el medio TBM + 0.03% de BSA (Figura 2) de los ovocitos madurados HECM-9 fue superior ($p > 0.05$) que en el TCM-199 (19.18% vs 9.59%, respectivamente).

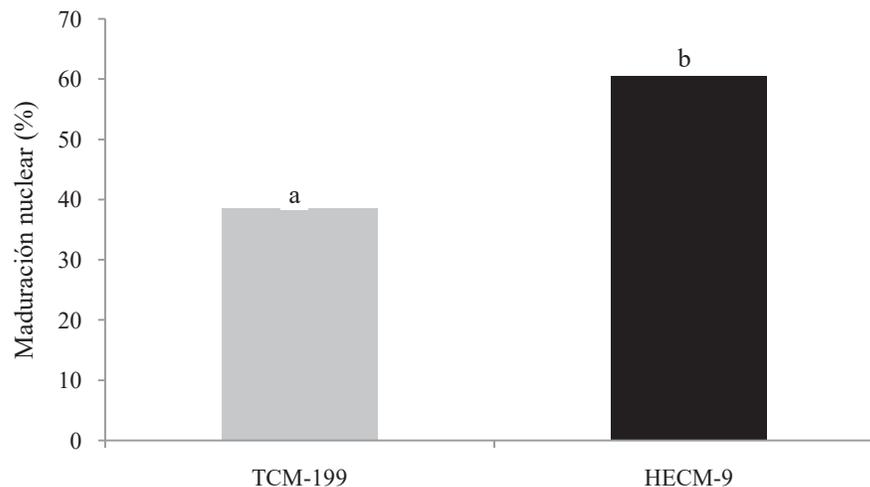


Figura 1. Tasa de maduración *in vitro* de ovocitos caprinos en medio TCM-199 y HECM-9. ^{ab} Indica diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

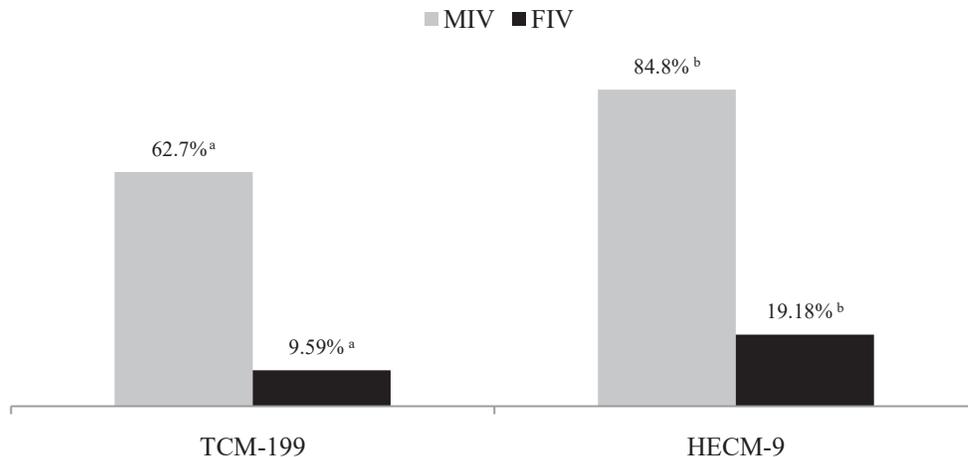


Figura 2. Tasa de maduración (MIV) y fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos de cabra en medio TCM-199 y HECM-9. ^{ab} Indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Los resultados de la maduración *in vitro* en medio HECM-9 o TCM-199 en el EXP I (60.5 vs 38.6%, respectivamente) y EXP II (84.8% vs 62.7%, respectivamente) del presente estudio, difieren con los reportados por Navarro *et al.* (2006) quienes, en ovinos, no encontraron diferencias en la tasa de maduración cuando los ovocitos fueron mantenidos en medio HECM-9 (65.0%) o TCM-199 (71.0%). En el mismo sentido, Robledo *et al.* (2009), no encontraron efectos en la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos cuando fueron mantenidos en el medio HECM-9 (73.3%) con respecto al TCM-199 (71.4%). Estos resultados sugieren que el medio HECM-9, puede aportar elementos necesarios para que el ovocito de cabra y de oveja, completen su maduración nuclear lo que pudiera favorecer la posterior tasa de fertilización.

Algunos estudios (Zheng *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2004) han dejado de manifiesto que la adición de compuestos específicos como los aminoácidos no esenciales, el factor de crecimiento epidérmico y el pantotenato, al HECM-9, desempeñan en conjunto un papel fundamental en el proceso de maduración y desarrollo embrionario, como ha sido demostrado previamente en otras especies (Devreker *et al.*, 2001; Jeong y Yang, 2001; Zheng *et al.*, 2002), no obstante que fue un medio diseñado para la maduración y desarrollo embrionario de hámster (Bavister, 1995).

In vivo, los aminoácidos no esenciales se encuentran presentes en altas concentraciones en fluidos del oviducto y algunos como glicina, alanina, taurina y cisteína se detectan en concentraciones variables en el tracto reproductivo de mamíferos (Miller y Schultz, 1987; Zheng *et al.*, 2002; Hong y Lee, 2007).

En estudios *in vitro*, se ha observado que la adición de aminoácidos no esenciales en el medio de maduración de porcinos (Hong *et al.*, 2004) y bovinos (Lim *et al.*, 1999; Naurollah y Chian, 2005), promueve la maduración citoplasmática del ovocito, favoreciendo la penetración del espermatozoide y el subsecuente desarrollo de los embriones hasta la etapa de blastocito.

Estudios en monos (Zheng *et al.*, 2002), demostraron que la adición de aminoácidos no esenciales en el medio básico modificado 5 (mBM5), estimularon un mayor ($p < 0.05$) potencial de maduración de los ovocitos ($66.0\% \pm 19.0\%$), en comparación con los tratamientos sin aminoácidos esenciales mBM5 (37.3%) y mBM5+Glutamina (48.3%) y los medios donde se incluyeron aminoácidos esenciales mBM5 + 11 AA (41%), mBM5 + EA (41%). El papel que desempeñan los aminoácidos no esenciales en la producción de embriones *in vitro*, no es del todo claro, pero es posible que favorezcan la síntesis de proteínas, participen en la regulación del pH intracelular y la osmoregulación, así como quelatores de metales pesados y señales celulares (Van Winkle, 2001; Hong y Lee, 2007). La acumulación de estos aminoácidos en el ovocito es usada en eventos meióticos, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y producción de energía; eventos esenciales en la maduración de los ovocitos, debido a que los mayores cambios que ocurren durante su maduración, están relacionados con la fosforilación de proteínas y con la activación del factor promotor de la maduración, la asimilación e incorporación de aminoácidos debe ocurrir antes de la etapa de mórula (Naurollah y Chian 2005; Rahman *et al.*, 2008).

Por otra parte, la inclusión del factor de crecimiento epidérmico (EGF; epidermal growth factor) en el medio de maduración HECM-9, podría influenciar la

tasa de maduración y el desarrollo embrionario, ya que se ha demostrado, que en ovocitos de cabra, la expresión de receptores de EGF desencadenan señales a través de las vía proteínas activadoras de las cinasas mitogénicas -MAPK (Gall *et al.*, 2005).

Estudios previos han demostrado que la adición de 20ng/ml de EGF en el medio de cultivo de ovocitos caprinos promovió una mayor expansión de las células del *cumulus oophurus* (52.25%) y alto porcentaje (64.51%) de maduración nuclear (Nagar y Purohit, 2005). Es posible que la adición del EGF en el medio de maduración modifique la síntesis de proteínas durante el proceso de maduración *in vitro* de los ovocitos, posiblemente por un incremento en la actividad de las histonas y en las proteínas cinasas mitógenas durante los estadios tempranos de la maduración *in vitro* (Purohit *et al.*, 2005).

La adición del ácido pantoténico en el medio de maduración HECM-9, puede favorecer la maduración citoplasmática de los ovocitos de cabra y el subsecuente desarrollo embrionario, como consecuencia de un incremento en la producción de ATP y de glutamato, precursor del glutatión, en el ciclo de Krebs (Bormann *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el incremento en la síntesis del glutatión durante la maduración de ovocitos de vacas (Luvoni *et al.*, 1996) y cerdos (Abeydeera *et al.*, 1998) incrementan el desarrollo y viabilidad de blastocitos, ya que ejerce un papel fundamental en la defensa de radicales libres de oxígeno que adelantan el proceso de apoptosis (McKiernan y Bavister, 2000).

En cuanto a la tasa de fertilización *in vitro*, se observó una mayor respuesta en los ovocitos madurados en HECM-9 (19.8%), respecto a los mantenidos en TCM-199 (9.59%). Es preciso señalar que el medio TBM (Tris Buffered Medium), utilizado en el presente estudio como un medio de fertilización, tradicionalmente se utiliza en la FIV de la especie porcina (Coy *et al.*, 2002); mientras que los medios TALP (Tyrode's Albumine Lactate Piruvate médium) o el SOF (Synthetic Oviductal Fluid), de uso en rumiantes y utilizados en este laboratorio, no mostraron resultados consistentes, por lo que se decidió utilizar el TBM para evaluar el efecto de la maduración en HECM-9 y del TCM-199 sobre la tasa de FIV.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, difieren de lo reportado por Jiménez *et al.* (2006), quienes observaron una tasa de fertilización de ovocitos de cabras prepúberes madurados en TCM-199 y fertilizados en medio SOF de 26.6%. Otros autores (Coy *et al.*, 2002), reportaron una tasa de FIV de ovocitos porcinos de 26.26% en medio TBM y madurados en medio NCSU-37 (North Caroline State University-37 medium), porcentaje superior al

observado en el presente trabajo tanto en el medio HECM-9 como TCM-199.

Por otra parte, Nagar y Purohit (2005), observaron una tasa de fertilización de ovocitos de cabra madurados y fertilizados en TCM-199 de 9.3%, lo que coincide con lo observado en el presente trabajo, encontrando además que la adición creciente de EGF incrementó significativamente la tasa de FIV. Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que el TCM-199, por sí solo no es adecuado para soportar el proceso de FIV y que requiere de sustancias adicionales como el EGF que faciliten el proceso de la fecundación.

Aunque el efecto del cambio de medios en las etapas de la producción de embriones *in vitro*, se desconoce, algunos autores (Krisher *et al.*, 2007; Yoshioka *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2010), señalaron que si bien el ovocito puede modificar su metabolismo para ajustar el pH, la osmolaridad del medio y aprovechamiento de sustratos, también es posible que se reduzca la capacidad de interacción con el espermatozoide, afectando la tasa de FIV y el desarrollo embrionario posterior (Yoshioka *et al.*, 2008). El cambio de medios entre una etapa y otra de la PIV, puede ejercer un efecto estresante sobre el ovocito, que puede desencadenar mecanismos de respuesta a corto plazo destinados a preservar la homeostasis, si esto no es posible, el embrión provoca cambios en la morfología y reducción en la proliferación celular, pudiendo llegar hasta la apoptosis; a mediano y largo plazo, el efecto del estrés embrionario puede provocar bajas tasas de preñez, un elevado riesgo de aborto, presencia de anomalías congénitas y muerte posnatal (Feugang *et al.*, 2009).

En conclusión, los resultados obtenidos del presente estudio demuestran que el HECM-9 puede ser utilizado en los procesos de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos en la especie caprina, no obstante, se precisan estudios adicionales que permitan reforzar los hallazgos encontrados en el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CIC-UMSNH, Landsteiner Scientific y CONACYT. Alejandra Soberano Martínez recibió una beca del CONACYT (43120/43120).

REFERENCIAS

- Abeydeera, L.R., Wang W.H., Cantley T.C., Rieke A., Day B.N. 1998. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biology of Reproduction*. 58: 213-218.

- Bavister, B., Rose-Hellekant, T.A., Pinyopummintr, T. 1992. Development of *in vitro* matured *in vitro* fertilized Bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*. 37: 127-146.
- Bavister, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update*. 1: 91-148.
- Bormann, L.C., Onger, ME, Krisher LR. 2003. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*. 59:1373-1380.
- Coy, P., Gadea, J., Romar, R., Matás, C., García, E. 2002. Effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and *in vitro* development in pigs. *Reproduction*. 124: 279-288.
- Devreker, F., Hardy, K., Van den Bergh, M., Vannin, A.S., Emiliani, S., Englert, Y. 2001. Amino acids promote human blastocyst development *in vitro*. *Human Reproduction*. 16: 749-756.
- Feugang, M.J., Camargo, R.O., Memili, E. 2009. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*. 121: 141-149.
- Gall, L., Boulesteix, C., Ruffini, S., Germain, G. 2005. EGF-induced EGF-receptor and MAP Kinase phosphorylation in goats cumulus cells during *in vitro* maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 71: 489-94.
- Herradón, P.G., Quintela, L.A., Becerra, J.J., Ruibal, S., Fernández, M. 2007. Fecundación *in vitro*: Alternativa para la mejora en bovinos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 15: 38-41 (Suppl. 1).
- Hong, J., Lee, E. 2007. Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. *Theriogenology*. 68: 728-735.
- Hong, J.Y., Yong, H.Y., Lee, B.C., Hwang, W.S., Lim, J.M., Lee, E.S. 2004. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Theriogenology*. 62: 1473-1482.
- Jeong, B.S., Yang, X. 2001 Cysteine, glutathione, and percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 59: 330-335.
- Jiménez, M.A.R., Anguita, B., Izquierdo, D., Mogas, T., Paramio, M.T. 2006. Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology*. 66: 1065-1072.
- Kharche, S.D., Goel, A.K., Jindal, S.K., Yadav, E.N., Yadav, P., Sinha, R., Sinha, N.K. 2009. Effect of serum albumin supplementation on *in vitro* capacitation and fertilization of caprine oocytes. *Small Ruminant Research*. 81: 85-89.
- Krisher, R.L., Brad, A.M., Herrick, J.R., Sparman, M.L., Swain, J.E. 2007. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. *Animal Reproduction Science*. 98:72-96.
- Korhonen, K., Matomäki, J., Ketoja, E., Kananen, K., Halmekytö, B., Rätty, M., Peippo, J. 2005. The effect of *in vitro* maturation medium on cryosurvival, cell numbers and apoptotic indexes of bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 17: 293 (Abstract 286).
- Krisher, R.L., Lane, M., Bavister, B.D. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*. 60: 1345-1352.
- Lim, J.M., Lee, B.C., Lee, E.S., Chung, H.M., Ko, J.J., Park, S.E., Cha, K.Y., Hwang, W.S. 1999. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. *Reproduction Fertility and Development*. 11: 127-132.
- Luvoni, G.C., Keskinetepe, L., Brackett, B.G. 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Molecular Reproduction and Development*. 43: 437-443.
- Magalhães, D.M., Fernandes, D.D., Mororó, M.B.S., Silva, C.M.G., Rodriguez, G.Q., Bruno, J.B., Matos, M.H.T., Campello, C.C., Figueiredo, J.R. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vivo* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. *Reproduction in Domestic*

- Animals. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01607.x
- McKiernan, S.H., Bavister, B.D., 2000. Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. *Human Reproduction*. 15: 157-164.
- Miller, J.G., Schultz, G.A. 1987. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biology of Reproduction*. 34: 125-129.
- Nagar, D., Purohit, N.G. 2005. Effect of epidermal growth factor on maturation and fertilization *in vitro* of goat follicular oocytes in a serum free or serum supplemented medium. *Veterinarski Arhiv*. 75: 459-467.
- Naurollah, R., Chian Ri-Cheng. 2005. Effects of amino acids on *in vitro* maturation, fertilization and development of immature bovine oocytes. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 3: 36-41.
- Navarro, M.C., Ducolomb, R.Y., Galindo, R.A., Rosado, G. 2006. Sheep oocytes matured in a simplex medium (HECM-1), an answer to *in vitro* fertilization. *Reproduction, Fertility and Development*. 18: 275-276.
- Purohit, G.N., Brady, M.S., Sharma, S.S. 2005. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 87: 229-239.
- Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B., Wan-Khadijah, W.E. 2008. *In vitro* maturation of oocytes special reference to goat: A Review. *Biotechnology*. 7: 599-611.
- Robledo, V.J.M., Herrera, C.J., Cajero, J.M., Navarro, M.M.C., García, V.A. 2009. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10: 95-99.
- SAS. 2000. Institute Inc. SAS/STAT User's Guide. Version 8. Cary, NC, SAS Institute Inc.
- Van Winkle, L.J. 2001. Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biology of Reproduction*. 64: 1-12.
- Velilla, E., López-Béjar, M., Rodríguez-González, E., Vidal, F., Paramio, M.T. 2002. Effect of Hoechst 33342 staining on developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 10: 201-208.
- Ward, F.A., Lonergan, P., Enright, B.P., Boland, M.P. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology*. 54: 433-446.
- Yoshioka, K., Suzuki, C., Onishi, A. 2008. Defined system for *in vitro* production of porcine embryos using single basic medium. *Journal of Reproduction and Development*. 54: 208-213.
- Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Oliveira, M.A.I., Brackett, B.G. 1991. *In vitro* fertilization of goats oocytes. *Biology of Reproduction*. 44: 1177-1182.
- Zheng, P., Bavister, B.D., Ji, W.J. 2002. Amino acid requirements for maturation of rhesus monkey (*Macacca mulatta*) oocytes in culture. *Reproduction*. 124: 515-522.

Submitted July 08, 2010 – Accepted September 24, 2010
Revised received September 28, 2010

CAPÍTULO III. ARTÍCULO 2

EFFECTO DE COMPUESTOS TIOL SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO* Y EL CONTENIDO INTRACELULAR DE GSH EN OVOCITOS DE CABRA

¹Soberano Martínez A, ²Cajero Juárez M, ²Herrera Camacho J, ³ Navarro Maldonado MC, ⁴Segura Correa JC, ¹Bravo Patiño A

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo *morula__2@hotmail.com

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Posta Zootecnia. Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapecuaro. Col. El Trébol. Tarímbaro, Michoacán, México CP 58880.

³Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Av San Rafael Atlixco No.186, Col.Vicentina C.P.09340 Del. Iztapalapa México D.F.

⁴Campus Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 Carr. Mérida-X'matkuil. CP 97100, Mérida, Yucatán.

INTRODUCCIÓN

Factores externos como el envejecimiento celular, exposición a tóxicos y las condiciones ambientales de cultivo adversas, provocan que los ovocitos y embriones en etapa de pre-implantación incrementen la producción de especies reactivas de oxígeno (Takahashi *et al.*, 2002; Guérin *et al.*, 2001) comparados con aquellos que maduran y son fecundados *in vivo*; disminuyendo por ende el potencial de maduración y desarrollo de ovocitos y embriones.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) presentan uno o más electrones desapareados (Jonson y Nasr-Esfahani, 1994), que pueden ejercer un potencial

oxidante importante sobre moléculas celulares. Pueden por lo tanto tener un origen exógeno como endógeno. Las fuentes exógenas de ROS dependen de la a) concentración ambiental de oxígeno, b) presencia de cationes metálicos, c) luz visible y d) actividad amino oxidasa liberada por espermatozoides muertos. Endógenamente, pueden proceder por a) fosforilación oxidativa, b) actividad de la NADPH oxidasa y c) actividad de la xantina oxidasa (Jonson y Nasr-Esfahani, 1994; Guérin *et al.*, 2001).

Ante tales circunstancias, diversos estudios reportan la existencia de un conjunto de medidas protectoras frente al estrés oxidativo que disminuyen el efecto

negativo de las ROS, dentro de las cuales el glutatión reducido (GSH) es el principal agente antioxidante no enzimático presente en el ovocito y en el embrión en la etapa de pre-implantación (Rauseell y Tarín, 2005).

El GSH es un tripéptido (GSH, L- γ -glutamyl-cisteinglicina), que se sintetiza mediante el ciclo γ -glutamyl. Es el mayor componente sulfhidrilo (-SH) no proteico presente en las células de mamíferos derivado de la glicina, el glutamato y la cisteína; este último posee el grupo -SH que le da a la molécula su capacidad donadora. Existe en dos formas: la forma antioxidante o glutatión reducido (GSH) y la forma oxidada, un compuesto unido por enlaces disulfuro, conocido como glutatión oxidado (GSSG). El GSH está presente dentro de las células, mayormente en forma reducida, encontrándose en concentraciones de 0.5-10 mmol/L (Meister, 1983).

El estado del GSH es homeostáticamente controlado, esto significa que continuamente está siendo auto-ajustado con respecto al balance entre la síntesis de GSH (GSH sintetasa), su reciclaje a partir de GSSG (GSH reductasa) y su utilización. La síntesis de GSH ocurre en el citoplasma. Primero, la cisteína y el glutamato son combinados por la enzima

gamma-glutamylcisteinil sintetasa, la disponibilidad de cisteína usualmente es factor limitante. La acumulación excesiva de GSH actúa inhibiendo esta enzima, y de esta manera se controla la síntesis de GSH. La segunda reacción para la síntesis de GSH combina a la gamma-glutamylcisteína con la glicina para generar GSH, esta reacción es catalizada por la GSH sintetasa.

El GSH es un cofactor esencial para las enzimas antioxidantes llamadas GSH peroxidasas, las cuales son utilizadas para detoxificar peróxidos, Una vez que el GSH ha sido oxidado a GSSG, el reciclaje de GSSG a GSH se lleva a cabo por la enzima glutatión reductasa. Esta enzima emplea como fuente de electrones la coenzima NADPH, la cual proviene principalmente de la ruta de las pentosas fosfato. El GSH también contribuye al reciclaje de otros antioxidantes que han sido oxidados como el α -tocoferol (vitamina E) y los carotenoides (Lozada y García, 2009).

En el ovocito, *in vivo*, el GSH es sintetizado durante la primera meiosis apareciendo como un regulador de la maduración citoplasmática y nuclear. El metabolismo del GSH en el folículo ovárico puede estar bajo regulación hormonal, permitiendo que las células del cúmulus puedan transferir GSH al ovocito

(Tarín *et al.*, 2005). Por lo tanto, si se bloquea la síntesis de GSH durante su desarrollo, se disminuye el potencial de fecundación en el ovocito (Sutovsky y Schatten, 1997). Así mismo la maduración del citoplasma del ovocito incluye procesos como la síntesis de compuestos bioquímicos, fosforilación de proteínas o la activación de rutas metabólicas. La síntesis de GSH forma parte de esta maduración, y por lo tanto, es requerida para la fecundación y desarrollo embrionario normal (Zuelke *et al.*, 2003; Luberda, 2005). Brad *et al.* (2003), demostraron que la concentración intracelular del GSH al final de la maduración *in vitro* de los ovocitos es mucho menor que la de ovocitos madurados *in vivo*.

En la producción *in vitro* el GSH cumple fundamentalmente tres funciones, a) participación en la descondensación de la cabeza del espermatozoide y en su posterior transformación a pronúcleo masculino, b) confiere protección del blastocisto frente a efectos oxidativos del peróxido de hidrógeno presente en el fluido del blastocele y c) participa en la detoxificación de sustancias tóxicas sintéticas que pueden estar presentes en el medio de cultivo (Rauseell y Tarín, 2005).

Existen estudios que muestran que el incremento en el contenido de GSH proporciona a los ovocitos madurados *in vitro* grandes cantidades de GSH adecuadas para la protección de los embriones hasta el estadio de blastocisto, mejorando la eficiencia en la producción *in vitro* de blastocistos a partir de ovocitos inmaduros (Telford, 1990; Gardiner y Reed, 1995; de Matos 1995; de Matos, 1996).

Diversos estudios han analizado la adición de GSH *per se* en el medio de maduración, capacitación espermática, fecundación y/o cultivo embrionario *in vitro*; sin embargo, la mayoría de las células somáticas de mamíferos y los ovocitos no pueden captar el GSH intacto, ya que no poseen un sistema de transporte para importar GSH directamente al interior de citoplasma (Meister, 1991) De igual manera se ha tratado de adicionar los tres aminoácidos que lo constituyen (glutamato, cisteína y glicina) sin tener éxito dado que la cisteína y la glutamina comparten el sistema de transporte alanina-serina-cisteína (ASC), actuando, esta última, competitivamente para limitar el flujo neto de cisteína o bien estimulando la pérdida de cisteína celular mediante este sistema de transporte (Christensen, 1990). Los componentes tioles, entre otras funciones

se consideran reservas naturales del poder reductor, los cuales pueden ser rápidamente utilizados por la células como defensa contra el estrés oxidativo (Del Corso *et al.*, 1994).

Estudios realizados en cerdos (Whitaker y Knight, 004), ovejas (de Matos, 2002), bovinos (de Matos *et al.*, 2000; Oyamada y Fukui, 2004), novillas (Mertens *et al.*, 2005), búfalo (Gasparrini *et al.*, 2003; Gasparrini *et al.*, 2006), cabras (Mayor *et al.*, 2001; Urdaneta *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2003) y perros (Kim *et al.*, 2004) han demostrado que la adición de cisteamina, cisteína, cistina, β -mercaptoetanol e intermediarios de ciclo γ -glutamil al medio de maduración *in vitro* incrementan los niveles de GSH ovocitario permitiendo a los embriones que todavía no habían podido sintetizar GSH de novo, seguir con su desarrollo una vez que las reservas de GSH procedentes del ovocito se han agotado (Gasparrini *et al.*, 2003).

El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de la adición de compuestos tioles en un medio de maduración definido sobre la concentración de GSH y la tasa de maduración en ovocitos de cabras adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ovocitos. Los ovocitos se obtuvieron a partir de ovarios de cabra colectados en rastro y para su transporte al laboratorio se mantuvieron en solución salina al 0.9% a 37 °C suplementada con 100 UI de estreptomicina/mL. El tiempo de transporte del rastro al laboratorio fue de 1 a 2 h. Los complejos cumulus-ovocito (CCO's) fueron aspirados de aquellos folículos de 2-8 mm de diámetro, utilizando jeringas de 10 mL con aguja hipodérmica calibre 18, y se colocaron en tubos conteniendo 10 mL de TCM-199 a base de sales Earl's, 26.9 mM de NaHCO₃ (Gibco), suplementado con 25 mM de Hepes, 0.001 g/mL de Polivinil Alcohol (PVA) y 100 UI/mL de heparina.

El sedimento de los tubos se depositó en cajas de Petri estériles. Los CCO's fueron seleccionados de acuerdo con la clasificación de calidad excelente (grado 1) y buena (grado 2), con base en las características morfológicas del citoplasma y de las capas celulares del cúmulo descritas por Ward *et al.* (2000).

Experimento I (EXPI).

Maduración in vitro (MIV) de los ovocitos.

Un total de 727 CCOs obtenidos fueron lavados 3 a 4 veces en TCM-199 sin

heparina, y fueron asignados al azar, tras la adición al medio de maduración (HECM-9) de β -Mercaptoetanol 100 μ M (n=95 calidad excelente y 57 calidad buena); Cistina 0.57mM (n=90 calidad excelente y 61 calidad buena); Cisteína 0.50mM (n=91 calidad excelente y 43 calidad buena), Cisteamina 100 μ M (n=59 calidad excelente y 41 calidad buena) El medio HECM-9 fue elaborado a base de BM3, suplementado con 100 μ L de un stock de 11 aminoácidos no esenciales (ácido glutámico 0.01mM, asparagina 0.01mM, cisteína 0.01mM, glicina 0.01mM, histidina 0.01mM, lisina 0.01mM, prolina 0.01mM, serina 0.01mM, ácido aspártico 0.01mM; glutamina 0.20mM y taurina 0.50mM), 10 μ l de un stock 3.02mM de pantotenato en solución salina, 10 μ g/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 10 μ g/mL de LH, 10 μ g/mL de FSH, y 50 μ g/mL Gentamicina (McKiernan y Bavister, 2000).

Grupos de 10 a 25 CCO's fueron transferidos a 450 μ L del medio respectivo bajo aceite mineral previamente incubado por 24h a 37.5 °C, 5% CO₂. El pH fue ajustado a 7.4 y los CCO's fueron cultivados a 37.5 °C, 5% CO₂ por 27h. Posteriormente fueron desnudados de las células del cúmulo con hialuronidasa al

0.01%, lavados en PBS y teñidos con Hoescht para evaluar la tasa de maduración mediante la presencia del primer cuerpo polar y cromosomas en Metafase II. Todos los reactivos fueron de Sigma Aldrich a menos que se indique lo contrario.

Experimento II (EXP2)

Maduración in vitro (MIV) de los ovocitos.

Un total de 295 CCO's obtenidos fueron lavados 3 a 4 veces en TCM-199 sin heparina, y fueron asignados al azar para su maduración al medio TCM-199 (n=103) suplementado con 275 μ g/mL de piruvato de sodio, 146 μ g/mL de L-glutamina 10% (v/v) de suero fetal bovino (Gibco), 1 μ g/mL de 17 β -estradiol, HECM-9 (n=66), HECM-9 + β M (n=63) y HECM-9 + Cisteamina (n=63). La elaboración del HECM-9 y las condiciones de maduración fueron iguales a las indicadas en el experimento 1.

Análisis del contenido de glutatión (GSH) intracelular.

Se analizó el contenido de GSH intracelular de ovocitos inmaduros y tras 27 h de MIV. Células del cumulus de los COCs fueron eliminadas con hialuronidasa al 0.01%. Los ovocitos se lavaron 3 veces con la solución tampón stock 200mM de tampón fosfato sódico, (preparada a partir de la mezcla de dos soluciones: solución A (V:V): Na₂HPO₄

(200mM) y EDTA (10mM) y Solución B (V:V): $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (200mM) y EDTA (10mM) ajustado a un pH de 7.2). Un total de 20 ovocitos por replica fueron transferidos en 5 μl de solución tampón stock a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se añadieron 5 μl de 1.25M de ácido fosfórico y se almacenaron a -80°C. Las muestras se descongelaron, se rompieron los ovocitos con un pipeta estrecha de vidrio de punta roma hasta el día del ensayo.

La concentración de GSH intracelular se determinó empleando el protocolo descrito por Funahashi *et al.* (1994). Este método está basado en el ensayo cíclico de la enzima 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoido) glutatión reductasa (DTNB-GSSG), descrito por primera vez por Owens y Belcher (1965), modificado posteriormente por Tietze (1969) y, finalmente, modificado por Anderson (1985).

Se añadieron 700 μl de 0.33 mg/mL de NADPH en solución tampón stock, 100 μl de 6mM 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) en solución tampón stock y 190 μl de agua. Se pipeteo el contenido de cada tubo dejándose reposar durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 10 μL de 250 UI/ml de glutatión reductasa para iniciar la

reacción. Se siguió la formación de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) cada 30 segundos durante 2 minutos con un espectrofotómetro. Para la curva de calibración se evaluaron los estándares (0.01mM, 0.02mM, 0.05mM, 0.1mM y 0.5mM) de GSH y una muestra blanco sin GSH (PBS). La lectura se realizó a una absorbancia de 412nm.

Análisis estadístico: Los datos de la tasa de maduración fueron analizados mediante la prueba de chi-cuadrada, utilizando el procedimiento NPAR1WAY del paquete estadístico SAS (2000). Se consideró diferencia estadística significativa si $P < 0.05$. La concentración intracelular de GSH se sometió a una transformación logarítmica.

RESULTADOS

EXP I: Con base a la tinción Hoescht no hubo diferencia estadística significativa en los ovocitos calidad excelente madurados con β -mercaptoetanol, cistina y cisteína. El porcentaje inferior de maduración de ovocitos calidad excelente fue para el tratamiento con cisteamina (74.58%). Resultados similares se reportan para los ovocitos de calidad buena.

Tabla1. Efecto de compuestos tioles en un medio definido sobre la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de cabra.

Calidad	Medio de Maduración	n	Madurados n(%)
Excelente	TCM-199	83	40(48.19)
	HECM-9	73	59(80.82)
	β -mercaptoetanol	95	84(88.42) ^a
	Cistina	90	74(82.22) ^a
	Cisteína	91	74(81.32) ^a
	Cisteamina	59	44(74.58) ^b
Bueno	TCM-199	88	26(29.55)
	HECM-9	117	56(47.86)
	β -mercaptoetanol	57	36(63.16) ^a
	Cistina	61	45(73.77) ^a
	Cisteína	43	30(69.77) ^a
	Cisteamina	41	35(85.37) ^b
Total	TCM-199	171	66(38.60)
	HECM-9	196	115(60.53)
	β -mercaptoetanol	152	120(78.95) ^a
	Cistina	151	119(78.81) ^a
	Cisteína	134	104(77.61) ^a
	Cisteamina	100	79(79.00) ^a

^{a,b} diferencia significativa entre tratamientos dentro de cada grupo de calidad morfológica.

Los ovocitos madurados en medio HECM-9 mejoraron significativamente la concentración de GSH con respecto a los madurados en TCM. Sin embargo, la adición de los compuestos tioles β -

mercaptoetanol y cisteamina a este medio no manifestó un efecto positivo sobre la concentración de GSH.

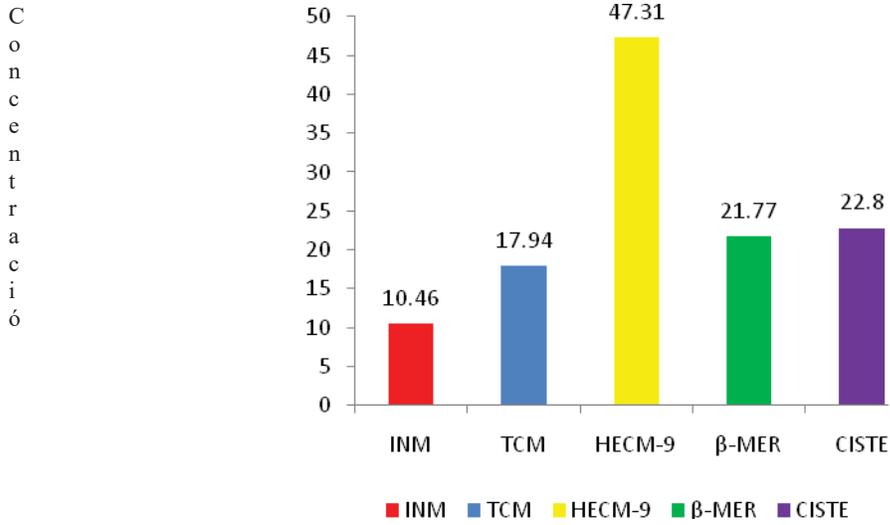


Figura 1. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración *in vitro* sobre el contenido de GSH intracelular (media \pm ee) post MIV de ovocitos de cabra (replica=2).

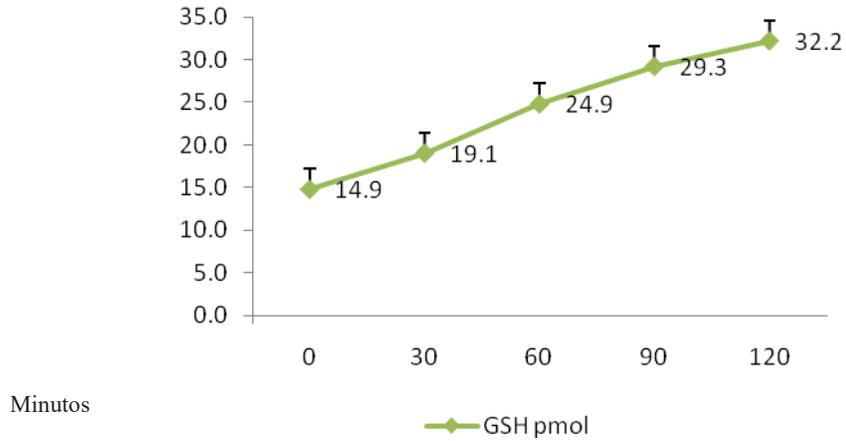


Figura 2. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración HECM-9 *in vitro* sobre el contenido intracelular de GSH (media \pm ee) a diferentes tiempos (replica=2).

DISCUSIÓN

El glutatión es una de las principales defensas no enzimáticas contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) en ovocitos de mamíferos y en embriones. Los ovocitos contienen altas concentraciones de GSH, el cual es sintetizado durante la primera meiosis (Meiosis I), esta concentración es crucial para la formación del huso acromático, del pronúcleo masculino y la preimplantación del embrión en desarrollo (Zuelke *et al.*, 2003), mejorando la eficiencia de la producción *in vitro* de blastocistos a partir de ovocitos inmaduros (de Matos, 1996). En condiciones *in vitro* el cultivo ejerce un estrés oxidativo, originando la formación de ROS y por ende la disminución intracelular del contenido de GSH en el ovocito (Cetica *et al.*, 2001). La disminución de GSH puede ser uno de los factores fundamentales que contribuyen a la maduración citoplasmática incompleta y la integridad estructural del ovocito (Brad *et al.*, 2003). En este estudio se observó que el contenido intracelular de GSH de los ovocitos de cabra madurados en el medio TCM-199 (17.94 pmol/ovocito) fue más alto con respecto a los ovocitos inmaduros (10.46 pmol/ovocito). Los resultados aquí obtenidos difieren con los reportados por

Rodríguez *et al.* (2003), quienes encontraron una concentración de GSH en ovocitos de cabra prepúberes madurados en medio TCM-199 de 10.57 pmol/ovocito, mientras que en ovocitos inmaduros la concentración fue inferior a la observada en este trabajo (4.15 pmol/ovocito). Mayor *et al.* (2001), observaron una concentración aún más baja de GSH en ovocitos maduros e inmaduros (1.53 y 1.21 pmol/ovocito, respectivamente). Dada la discrepancia en los resultados, diversos autores han dejado de manifiesto que muchos factores pueden afectar el desarrollo potencial del ovocito (Krisher *et al.*, 2007), incluyendo talla y salud del folículo (Vassena *et al.* 2003, Anguita *et al.* 2007), número de oleadas de la fase folicular (Machatkova *et al.* 2004), estimulación hormonal (Sirard *et al.* 2007), condición corporal del animal, manejo zootécnico, alimentación; así como las condiciones geográficas (Combelles, 2009).

Por otra parte, la concentración de GSH en ovocitos madurados en medio HECM-9 (43.31 pmol/ovocito) fue significativamente más alto con respecto al TCM-199. Curnow *et al.*, (2008), refiere que la adición de fuentes de proteínas al medio de maduración *in vitro* como la albumina sérica bovina (BSA) o suero fetal

de ternero (SFB) en TCM-199 afectan los niveles de GSH en el ovocito. Estudios previos mostraron un incremento en el contenido de GSH de ovocitos madurados *in vitro* cuando el SFB fue reemplazada por BSA (4.84 vs. 7.87 pmol/ovocito (Luciano *et al.*, 2006). No se tienen reportes que indiquen la concentración de GSH utilizando como medio de maduración HECM-9, sin embargo, nuestros resultados sugieren que el medio puede aportar los elementos necesarios para que el ovocito de cabra sintetice de novo GSH y por ende favorezca la maduración nuclear una vez que las reservas procedentes del ovocito se han agotado.

Estudios realizados en cerdos (Whitaker y Knight, 004), ovejas (de Matos, 2002), bovinos (de Matos *et al.*, 2000; Oyamada y Fukui, 2004), novillas (Mertens *et al.*, 2005), búfalo (Gasparrini *et al.*, 2003; Gasparrini *et al.*, 2006) cabras (Mayor *et al.*, 2001; Urdaneta *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2003) y perros (Kim *et al.*, 2004) han demostrado que la adición de cisteamina, cisteína, cistina, β -mercaptoetanol e intermediarios de ciclo γ -glutamil al medio de maduración *in vitro* incrementan los niveles de GSH ovocitario.

Tanto el β -mercaptoetanol como la cisteamina, son grupos tioles de bajo peso

molecular que estimulan la síntesis de GSH. Ambos favorecen la reducción de la cistina a cisteína en el medio de cultivo, por lo que esta queda a disposición del ovocito o del blastocisto para la síntesis del GSH en el ciclo α -glutamil (Takahashi *et al.*, 2002).

En el presente estudio la suplementación con cisteamina y β -mercaptoetanol al medio de maduración *in vitro* (HECM-9), mejoró la concentración de GSH en el ovocito (22.8 y 21.7 pmol/ovocito, respectivamente) con respecto al medio TCM-199, no siendo así para el medio definido. Sin embargo, aún y cuando no se tienen reportes específicos al medio, la concentración encontrada supera a la que se menciona en la literatura. Rodríguez *et al.* (2003), reportaron que en ovocitos de cabras prepúberes madurados en TCM-199 bajo la misma concentración de compuestos tioles, la cantidad de GSH fue de 11.87 pmol/ovocito para β -Mercaptoetanol y 10.16 pmol/ovocito para Cisteamina. Mientras que en bovinos se ha demostrado que la adición de β -mercaptoetanol (100 μ M) incrementa la concentración intracelular de GSH en ovocitos (9 pmol/ovocito) después de la maduración *in vitro* (de Matos y Furnus, 2000). En ovinos, de Matos *et al.* (2002)

mostraron que la cisteamina y β -mercaptoetanol (BME) incrementaron los niveles intracelulares de GSH en el ovocito, pero solo la cisteamina tuvo un efecto positivo en la tasa de desarrollo embrionario.

Se ha mencionado que el BME transporta cisteína a través de la formación de compuestos disulfidos mixtos cistina-BME, hallando que este disulfido mixto tiene el mismo efecto que la cistina más BME y sugerido que la acción ejercida por el BME está mediada por el disulfido mixto. Además se ha propuesto que el sistema de transporte usado para captar el disulfido mixto es diferente del sistema empleado para transportar cistina o cisteína y, por tanto, que el disulfido se reduce a cisteína y BME dentro de la célula (Bagis *et al.*, 2004). El BME puede escapar de la célula, volver al medio de cultivo y reaccionar después con la cistina (Hashem *et al.*, 2006). También es probable el consumo de disulfidos mixtos cisteína-cisteamina mediante el sistema L. La cisteamina reacciona con la cistina por intercambio sulfhidril-disulfido para producir el disulfido mixto de cisteína y cisteamina, por lo que el aumento de transporte de membrana ocurre por un sistema diferente del empleado

normalmente por la cistina. En este caso, el componente sulfhidrilo funciona como un sistema de distribución trans membrana para la cistina mediante el intercambio sulfhidril-disulfido estimulado por el (Levtchenko *et al.*, 2006).

La enzima unida a la membrana, la γ -glutamil tranpeptidasa, está posiblemente implicada en la síntesis de GSH a través de su función en la captación de aminoácidos. Se cree que esta enzima transfiere el grupo γ -glutamil del GSH extracelular a un aminoácido extracelular. Entonces, el aminoácido γ -glutamil se transporta el interior de la célula (Meister y Anderson, 1983). La actividad de la enzima debe ser un factor tasa-limitante en el transporte de un número de aminoácidos, incluyendo la cisteína y en el mantenimiento de los niveles celulares de GSH.

De igual manera habría que considerar que este ciclo pudiera presentar también como factor limitante la disponibilidad de moléculas de ATP. El ciclo de γ -glutamil requiere el uso de tres moléculas de ATP por cada ciclo (Sastre *et al.*, 2005).

Aún y cuando los resultados no fueron los esperados con respecto a la suplementación de los compuestos tioles al medio definido simple HECM-9, es posible

asumir que el medio *per se* contiene los elementos necesarios para la síntesis de novo de GSH, reduciendo de manera importante el estrés oxidativo del ovocito demostrado por un mayor porcentaje de maduración *in vitro*, si se compara con el medio convencional.

Es necesario realizar estudios en ovocitos que determinen la disponibilidad de cisteína, fuente de energía y la enzima γ -glutamyl transpeptidasa requeridos en el ciclo γ -glutamyl.

LITERATURA CITADA

1. Anderson ME. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*: 113:548-55
2. Anguita B, Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. 2007. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. 67:526-36.
3. Bagis H, Odaman Mercan H. 2004. Effect of chemically defined culture medium supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids on implantation and development of different stage in vivo -or in vitro-derived mouse embryos. *Mol Reprod Dev*. 69:52-9
4. Brad AM, Bormann CL, Swain JE, Durkin RE, Johnson AE, Clifford AL, Krisher RL. 2003. Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 64:492-8.
5. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro. *IUBMB Life*. 51: 57-64
6. Christensen HN. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev*. 70: 43-77
7. Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. 2009. Could oxidative stress influence the in vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online*. 18:864-80.
8. Curnow EC, Ryan J, Saunders D, Hayes ES. 2008. Bovine in vitro maturation as a model for manipulation of the gamma-glutamyl cycle and intraoocyte

- glutathione. *Reprod Fertil Dev.* 20:579-88.
9. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level a developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev.* 42: 432-6.
 10. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matures bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev.* 45: 451-7
 11. de Matos DG, Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology.* 53:761-71.
 12. de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. 2002. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology.* 57:1443-51.
 13. Del Corso A, Cappiello M, Mura U. T. 1994. Thiol dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int. J. Bioche.* 26: 745-50
 14. Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN. 1994. Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod.* 51:633-9
 15. Gardiner SC, Reed DJ. 1995. Glutathione redox cycle-driven recovery of reduced glutathione after oxidation by tertiary-butyl hydroperoxide in pre-implantation mouse embryos. *Arch Biochem Biophys.* 321: 6-12
 16. Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, Zicarelli L. 2006. Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology.* 65:275-287.

17. Gasparri B, Sayoud H, Neglia G, Matos DG, Donnay I, Zicarelli L. 2003. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology*. 60:943-52.
18. Guérin P, El Mouatassim S, Ménéz Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 7:175-89.
19. Guérin P, El Mouatassim, Ménéz Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 7:175-189.
20. Hashem A, Hossein MS, Woo JY, Kim S, Lee SH, Koo OJ, Park SM, Lee EG, Kang S K, Lee BC. 2006. Effect of potassium simplex optimization medium and NCSU23 supplemented with Beta-mercaptoethanol and amino acids of *in vitro* fertilized porcine embryos. *J Reprod Dev*. 52: 591-9
21. Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. 1994. Radical solutions and cultural problems: Could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of pre-implantation mammalian embryos *in vitro*? *Bio Essays*. 16:31-38.
22. Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. 2004. Effect of beta-mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *J Vet Sci*. 5:253-8.
23. Krisher RL, Brad AM, Herrick JR, Sparman ML, Swain JE. 2007. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. *Anim Reprod Sci*. 98:72-96
24. Levtchenko EN, van Dael CM, de Graaf-Hess AC, Wilmer MJ, van den Heuvel LP, Monnens LA, Blom HJ. 2006. Strict cysteamine dose regimen is required to prevent nocturnal cystine accumulation in cystinosis. *Pediatr Nephrol*. 21:110-3

25. Lozada SM, García L. 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes: como mantener el equilibrio. *Rev Asoc Col Dermatol.* 17:172-9
26. Luciano AM, Goudet G, Perazzoli F, Lahuec C, Gérard N. 2006. Glutathione content and glutathione peroxidase expression in in vivo and in vitro matured equine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 73:658-66.
27. Luberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. 2005. *Reprod Biol.* 5:5-17.
28. Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tornanek M. 2204. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology.* 61:329-35.
29. MacKiernan SH, Bavister BD. 2000. Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. *Hum Reprod.* 15:157-64.
30. Mayor P, López-Béjar M, Rodríguez-González E, Paramio MT. 2001. Effects of the addition of glutathione during maturation on in vitro fertilization of pre-pubertal goat oocytes. *Zygote.* 9: 323-30.
31. Meister A. 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science.* 220: 472-77.
32. Meister A. 1991. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; application in search and therapy. *Pharmacol Ther.* 51: 155-194.
33. Mertens MJ, López-Bejar M, Paramio MT. 2005. Intracytoplasmic glutathione levels in heifer oocytes cultured in different maturation media and its effect on embryo development. *Reprod Domest Anim.* 40:126-130.
34. Owens CW, Belcher RV. 1965. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem J.* 94:705-11
35. Oyamada T., Fukui Y. 2004. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev.* 50: 107-17.
36. Rauseell F, Tarín JJ. 2005. Función del glutatión reducido durante la

- maduración y fecundación de ovocitos y desarrollo pre-implantatorio de embriones *in vitro* en mamíferos. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana. 22: 415-29.
37. Rodríguez González E, López-Bejar M, Mertens MJ, Paramio MT. 2003. Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. Mol Reprod Dev. 65:446-53.
38. Sastre, Juan; Pallardo, Federico V; Viña, José. 2005. Glutathione. The Handbook of Environmental Chemistry. Vol 2, Part O: 91-108
39. Sirard MA, Desrosier S, Assidi M. 2007. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. Theriogenology 68S: S71-6
40. Sutovsky P, Schatten G. 1997. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the descondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. Biol Reprod. 56:1503-12.
41. Takahashi M, Naqgai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. 2002. Promoting effect of β -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. Biol Reprod. 66:562-67.
42. Tarín JJ, Rausell. 2005. Función del glutatión reducido durante la maduración y fecundación de ovocitos y desarrollo pre-implantatorio de embriones *in vitro* en mamíferos. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana. 6:415-29
43. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. Mol Reprod Dev. 26: 90-100.
44. Tietze F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem. 27:502-22
45. Urdaneta A, Jimenez AR, Paramio MT, Izquierdo D. 2004.

- Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 12:277-84.
46. Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60:923-32.
47. Ward FA, Lonergan P, Enright BP, Boland MP. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54, 433-46.
48. Whitaker BD, Knight JW. Exogenous gamma-glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology*. 62:311-22.
49. Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perrault SD. 2003. Glutathione. Glutathiones (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes and preimplantation stage embryos. *Mol Reprod Dev.* 64: 106-12.

9. RESUMEN GENERAL DE RESULTADOS

1. Es posible asumir que el TRY puede ser una alternativa de uso en la conservación del espermatozoide caprino refrigerado. El uso del SOF y el TRY como agentes químicos capacitantes pueden mantener una aceptable movilidad y porcentaje de capacitación por un mayor tiempo comparado con la HEP o la CAF.
2. El HECM-9 puede ser utilizado en los procesos de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos en la especie caprina con buenos resultados, no obstante, se precisan estudios adicionales que permitan reforzar los hallazgos encontrados.
3. El HECM-9 *per se*, contiene los elementos necesarios para la síntesis de novo de GSH, reduciendo de manera importante el estrés oxidativo del ovocito demostrado por un mayor porcentaje de maduración *in vitro*, si se compara con el TCM-199. Sin embargo, al adicionar los compuestos tioles, los porcentajes de MIV no fueron los esperados, por lo que es necesario realizar estudios en ovocitos que determinen la disponibilidad de cisteína, fuente de energía (ATP) y la enzima γ -glutamil transpeptidasa requeridos en el ciclo γ -glutamil.

10. CONCLUSIÓN

El HECM-9 en combinación con compuestos tioles no mejoró la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de cabra. No obstante, es posible considerar que el medio *per se* contiene los elementos necesarios para la síntesis de novo de GSH.

11. BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

1. Agarwal A, Grupta S, Sharma RK. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol endocrinol.* 3:28
2. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 79, 829–843.
3. Ali A, Sirard MA. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod.* 66:901-905.
4. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. 2000 The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med.* 45: 314–320.
5. Balasubramanian B, Pogozelski WK, Tullius TD. 1998. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 9738-9743
6. Baldassarre H. 2003. Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Rev Bras Reprod Anim.* 31:274-282
7. Bavister BD, Rose-Hellekant, TA, Pinyopummintr T. 1992. Development of in vitro matured/ in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology.* 37: 127-146.
8. Behar D, Czaspski G, Rabani J, Dorfman ML, Schwarz HA. 1970. Acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical. *J Phys Chem.* 74:3209-3213

9. Brad AM, Bormann CL, Swain JE, Durkin RE, Johnson AE, Clifford AL, Krisner RL. 2003. Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 64:492-498.
10. Breen AP, Murphy JA. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 18: 1033-1077.
11. Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. 2009. Could oxidative stress influence the in vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online.* 18:864-880.
12. Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology.* 59:171-188
13. Curnow EC, Ryan J, Saunders D, Hayes ES. 2008. Bovine in vitro maturation as a model for manipulation of the gamma-glutamyl cycle and intraoocyte glutathione. *Reprod Fertil Dev.* 20:579-588.
14. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods.* 265:49-72.
15. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. 2006. Reactive oxygen species level in follicular fluid –embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod.* 21:2403-2407.
16. de Matos DG, Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology.* 53:761-71.
17. Deleuze S, Goudet G. 2010. Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. *Reprod Domest Anim.* 45:e476-482.

18. Dielman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip T A, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL. 2002. Effect of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 57: 5–20.
19. Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95.
20. Ford WC. 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update.* 10:387-399
21. Fukui Y, Ono H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 86: 501–506.
22. Furnus CC, de Matos DG, Picco S, García PP, India AM, Mattiolo G, Errecalde AL. 2008. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Anim Reprod Sci.* 109:88-99.
23. Goud AP, Goud PT, Diamond MP, gonik B, Abu-Soud HM. 2008. Reactive oxygen species and oocyte ageing: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Rad boil Med.* 44:1295-1304.
24. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 7:175-189.
25. Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lacent.*344: 721-724.

26. Halliwell B, Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142:231-255.
27. Hossein MS, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Koo O, Kim JJ, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. 2007 Effects of thiol compounds on in vitro maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages. *Mol Reprod Dev.* 74: 1213–1220.
28. Kaur H, Halliwell B. 1994. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* 350:9-12.
29. Korhonen K, Matomäki J, Ketoja E, Kananen-Anttila K, Halmekytö B, Rätty M, Peippo J. 2005. The effect of *in vitro* maturation medium on cryosurvival, cell numbers and apoptotic indexes of bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development.* 17: 293 (Abstract 286).
30. Korycka-Dahl M, Richardson T. 1981. Initiation of oxidative changes in food. *J Dairy Sciences.* 63:1181-1208.
31. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi E. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine.* 47:333-343.
32. Krisher RL, Brad AM, Herrick JR, Sparman ML, Swain JE. 2007. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. *Anim Reprod Sci.* 98:72-96
33. Lubberda Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology.* 5-17

34. Martínez-Sánchez G. 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. Rev Cubana Farm. 39 (3).
35. McKiernan SH, Bavister BD. 2000. Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. Human Reproduction. 15: 157- 164.
36. Moran LK, Gutteridge JM, Quinlan GJ. 2001. Thiols in cellular redox signaling and control. Curr Med Che. 8:763-772.
37. Moseley R, Waddington RJ, Embery G.1987. Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Biochim Biophys Acta 1997; 1362: 221-31.
38. Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozobr F, Alberio RH. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch. Med. Vet. 38: 97-104
39. Nair VD, Yuen T, Olanow CW, Sealfon SC. 2004. Early single cell bifurcation of pro- and antiapoptotic states during oxidative stress. J Biol Chem. 279:27494-27501
40. Navarro, M.C., Ducolomb, R.Y., Galindo, R.A., Rosado, G. 2006. Sheep oocytes matured in a simplex medium (HECM-1), an answer to *in vitro* fertilization. Reproduction, Fertility and Development. 18: 275-276.
41. Niemann, H, Wrenzycki C. 2000 Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. Theriogenology. 53: 21–34.

42. Ohmori H, Yamamoto I. 1983. Mechanism of augmentation of the antibody response in vitro by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes.II. A major role of the mixed disulfide between 2-mercaptoethanol and cysteine. *Cell Immunol.* 79:173–185.
43. Oyamada T., Fukui Y. 2004. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev.* 50: 107-117.
44. Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BL. 2004 Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril.* 81: 973–976.
45. Pinyopummintr T, Bavister BD. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in a chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod.* 45:736-742.
46. Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM, Bidani A. 1995. NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radic Biol Med.* 19:553-563.
47. Prinsze C, Dubbelman TMAR, VanStevenick J. 1990. Protein damage induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta.* 1038: 152-7.
48. Rausell F, Tarín JJ. 2005. Función del glutatión reducido durante la maduración y fecundación de ovocitos y desarrollo pre-implantatorio de embriones in vitro en mamíferos. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 22: 415-429
49. Rinaudo P, Schultz R. 2004 Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction.* 128:301-311.

50. Robledo VJM, Herrera CJ, Cajero JM, Navarro MMC, García VA. 2009. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10: 95-99.
51. Rodríguez González E, López-Bejar M, Mertens MJ, Paramio MT. 2003. Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol Reprod Dev*. 65:446-453.
52. Romero FJ, Cadena E. 1987. Hydroperoxide metabolism in vitamin E deficient hepatocytes. Studies on low-level chemiluminescence, lipid peroxidation, and glutathione status. *Pharmacol Ther*. 33:179-186.
53. Sastre Juan, Pallardo Federico V, Viña José. 2005. Glutathione. *The Handbook of Environmental Chemistry*. Vol 2, Part O: 91-108
54. Soberano-Martínez A, Bravo-Patiño A, Olivo-Zepeda I, Toscano-Torres I, Cajero-Juárez M, Herrera-Camacho J, Navarro-Maldonado MC, Segura-Correa JC. 2011. Fertilización de ovocitos caprinos madurados en dos medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agrpecosytem*. 14:301-307
55. Sutovsky P, Schatten G. 1997. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the descondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol Reprod*. 56:1503-1512.
56. Takahashi M, Naqgai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. 2002. Promoting effect of β -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod*. 66:562-567.
57. Tortolero I, Arata-Bellabarba G, Osuna JA, Gomez R, Regadra J. 2005. Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. *Rev Venez Endocrinol Metab*. 3:12-19

58. Venereo GJ. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 31:126-133.
59. Villar-Rojas C, Guzman-Grenfell AM, Hicks JJ. 1996. Participation of oxygen free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Arch Med Res* .27: 1-6.
60. Walker SK, Hill JL, Kleemann DO, Nancarrow CD. 1996. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod.* 55:703-708.
61. Ward JF. 1985. Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res* 1985; 104: S103-111.
62. Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perrault SD. 2003. Glutathione. Glutathiones (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev.* 64: 106-112.

ANEXO 1

BIOQUÍMICA DE LOS GAMETOS REPRODUCTIVOS

Como parte de las actividades académicas del programa de Doctorado se realizó la redacción de una revisión bibliográfica crítica y exhaustiva sobre la bioquímica de los gametos femenino y masculino y de la fertilización.

A continuación se presenta el manuscrito generado de esta revisión el cual está en proceso de ser enviado para su publicación en una revista científica indexada

REVISIÓN. BIOQUÍMICA DE LOS GAMETOS REPRODUCTIVOS

¹Soberano Martínez A, ²Cajero Juárez M, ²Herrera Camacho J, ³ Navarro Maldonado MC,
⁴Segura Correa JC, ¹Bravo Patiño A

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo *morula__2@hotmail.com

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Posta Zootecnia. Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapecuaro. Col. El Trébol. Tarímbaro, Michoacán, México CP 58880.

³Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Av San Rafael Atlixco No.186, Col.Vicentina C.P.09340 Del. Iztapalapa México D.F.

⁴Campus Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 Carr. Mérida-X'matkuil. CP 97100, Mérida, Yucatán.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha hecho un inmenso progreso en el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la maduración del gameto femenino y masculino; así como su tránsito desde la gónada hasta la fertilización del ovocito. In vivo la maduración del complejo cúmulus ovocito sufre diferentes procesos algunos de los cuales son independientes entre sí. Por un lado, la maduración próxima a la ovulación incluye el reinicio de la meiosis hasta la segunda metafase. Por otra parte son necesarios cambios esctrucutrales del control del ciclo celular y de la síntesis proteica para que el ovocito alcance la --

capacidad de ser fecundado.

Por otra parte, a lo largo de este trayecto el espermatozoide también modifica su morfología y sus componentes moleculares especialmente, y además ocurren procesos que conducen a la activación para la entrada al ovocito, para activar a su vez los mecanismos que conducen a la formación del cigoto.

La siguiente revisión presenta en su conjunto de manera detallada los cambios bioquímicos que ocurren en los gamentos reproductivos hasta la fecundación.

MADURACIÓN BIOQUÍMICA DEL OVOCITO.

Los ovocitos de mamíferos experimentan un crecimiento significativo durante la ovogénesis, así como modificaciones en el citoplasma y en el núcleo inmediatamente antes de la ovulación en un proceso conocido como maduración del ovocito (Fissore *et al.*, 2002). Estos cambios tienen como objetivo aumentar el éxito del desarrollo después de la fecundación (Krisner, 2004). Sin embargo, los cambios celulares y moleculares que se producen durante la maduración que optimizan el desarrollo del embrión aún y cuando son transitorios y experimentan un rápido deterioro (Fissore *et al.*, 2002) que representan uno de los grandes desafíos de comprender en la ciencia moderna.

a) Meiosis I y II en el ovocito.

Al nacimiento los ovocitos de las especies mamíferas están bloqueados en la fase G₂, de la profase de la primera división meiótica, por lo que tienen que reiniciar y completar la meiosis y la maduración para que la fecundación pueda llevarse a cabo (Boiso, 2001). Durante la pubertad, la capacidad para reiniciar y completar la meiosis se adquiere progresivamente durante el crecimiento folicular y

ovocitario (foliculogénesis) estando asociado a una serie de cambios nucleares y citoplasmáticos (Sela-Abramovich *et al.*, 2005).

Al inicio de la maduración, el núcleo del ovocito primario se encuentra bloqueado en la profase I (período de dictiotene) de la primera división meiotica, estadio de vesícula germinal (VG) (Shimada *et al.*, 2001). Después de alcanzar la madurez en respuesta a la onda preovulatoria de hormona luteinizante (LH), el ovocito primario del folículo dominante reinicia el proceso de división meiótica. El núcleo del ovocito entra en diacinesis (estadio terminal de la profase de la meiosis I, durante el cual los cromosomas comienzan a disponerse en la placa ecuatorial), y al final de la profase I se disgrega la envoltura nuclear y ocurre la ruptura de la vesícula germinal (VGBD). Al mismo tiempo que se produce una polimerización de los micro-túbulos, desaparecen los nucléolos y los cromosomas se condensan y se orientan formando el huso acromático correspondiente a la metafase I. Los ovocitos carecen de centriolos en los extremos del huso, en lugar de estos se encuentran un material peri-centriolar conocido como: centros organizadores de micro-túbulos (Su *et al.*, 2001).

Completada la metafase I, el ovocito entra rápidamente en anafase I y telofase I, se separan los cromosomas homólogos pero a diferencia de la mitosis, los cromosomas no se descondensan totalmente ya que el ADN no se duplica permitiendo reducir la carga cromosómica de la especie exactamente a la mitad, por lo tanto se produce la extrusión del primer cuerpo polar, se reduce el número de cromosomas a la mitad y se origina el ovocito secundario. La profase II prácticamente no existe, y el ovocito secundario comienza la segunda división meiótica entrando directamente a la metafase II. Ésta se interrumpe y el ovocito es ovulado completándose la metafase II con la penetración de un espermatozoide (Anguita, 2007).

b) Maduración Bioquímica del Ovocito

Aún y cuando no está claro cuál es el detonante del proceso de maduración del ovocito; lo que hasta ahora se conoce y se han descrito son los factores inhibidores del reinicio de la meiosis. El OMI (factor inhibidor de la meiosis), se origina en la pared folicular y se transmite a través de las células del complejo- *cumulus*-corona, este ha sido reportado en cerdos y ratas por Thiabult *et al.* (1987) no siendo demostrado por otros investigadores

(Sirard *et al.*, 1998); otro factor inhibidor son las purinas (hipoxantina, adenina, guanosina, etc) inmersas en el fluido folicular reportado en cerdos y ratones (Eppig, 1993), y por último el factor adenosin-mono-fosfato-cíclico (AMPc); el cual se considera participa de manera directa (Qiang-Su *et al.*, 2001).

El AMPc es producido por las células de la granulosa y transportado al interior del ovocito por las uniones tipo "GAP" (Granot y Dekel 1998, Shimada *et al.*, 2001). Se conoce que tiene un efecto dual por su presencia en el ovocito o en las células de la granulosa (López *et al.*, 2008), es decir que altos niveles al interior del ovocito mantienen su freno meiótico en la profase I; mientras que los altos niveles en las células de la granulosa inducen la continuación de la meiosis (Josefsberg y Dekel, 2002; Thomas *et al.*, 2002; Jones, 2004). La concentración en los niveles de AMPc se hace mayor a raíz del pico preovulatorio de LH y FSH por la presencia de receptores de estas hormonas en las células de la granulosa y del *cúmulus* permitiendo la continuación de la meiosis (Eppig y Downs, 1987; Shimada *et al.*, 2001). Al respecto, en condiciones *in vitro* se ha demostrado que la FSH inhibe a la hipoxantina, una sustancia natural

inhibitoria de la meiosis existe en el fluido folicular (Downs *et al.*, 1988).

Una vez detonado el proceso de maduración, los niveles de AMPc en el

interior del ovocito descienden por tres mecanismos permitiendo la continuación de la profase I (figura 1).

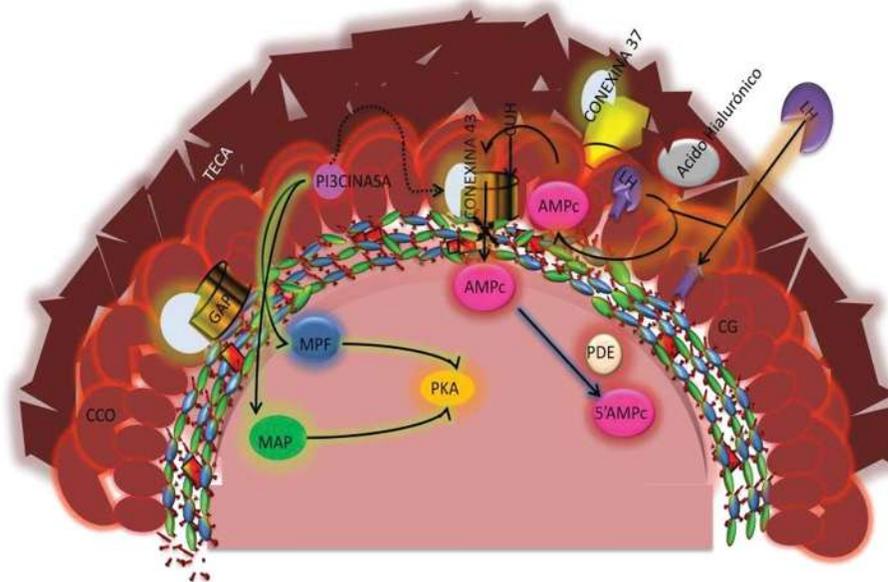


Figura 1. Proceso bioquímico de la maduración del ovocito.

El primero mecanismo es a través de la reducción del flujo de AMPc desde las células de la granulosa hacia el ovocito, originado por el desacoplamiento de las uniones “GAP”. Este desacoplamiento es debido a la fosforilación de serina sobre la conexina 43 (Cx43) estimulada por la vía proteína cinasa C (PKC) y/o vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-Cinasa). Independiente de la activación de la MAPcinasa (Gilula *et al.*, 1978, Shimada *et al.*, 2001), que permite regular el control de apertura o cierre de los CUH (Brañes *et al.*, 2004). Los CUH (canales de las uniones

estrechas), son canales intercelulares permeables a los iones y moléculas pequeñas formados por estructuras hexaméricas de moléculas de Cx43, que comunican el gameto femenino en crecimiento con las células del *cúmulus* y de la granulosa de su entorno en los folículos en desarrollo; por lo que es posible que el AMPc sea la señal inhibitoria de la maduración que pasa a través de los CUH desde las células de la granulosa al ovocito (Brañes *et al.*, 2004).

El segundo mecanismo es consecuencia de la hidrólisis de AMPc a su forma inactiva

5'-AMP, reacción catalizada por fosfodiesterasas (PDE, Phosphodiesterases). La expresión de éstas enzimas es específica de tejido en la unidad folicular, el ovocito de mamífero expresa la PDE tipo 3, mientras que en las células de la granulosa se expresa la PDE tipo 4 (López *et al.*, 2008).

El tercer mecanismo es llevado a cabo por la fosforilación de proteínas (PP) mediada por la presencia de la proteína cinasa A (PKA) (Sela-Abramovich *et al.*, 2005). Esta proteína es activada por la presencia de las MAP cinasas y el MPF (factor promotor de la maduración) que es una proteína cinasa (Nurse, 1990), las que a su vez son activadas por la PI-3 presente en las células del *cúmulus* (Shimada y Terada, 2001). Bajo estas condiciones, es posible la activación del MPF por lo que el ovocito reanuda la meiosis (Sela-Abramovich *et al.*, 2005).

El MPF está constituido por una unidad catalítica, la cinasa dependiente de ciclinas (cyclin-depend cinasas, cdk1 o cdc2 [p34^{cdc2}]) y una unidad regulatoria, la ciclina B1 (Nurse, 2002). Esta última recibe este nombre debido a que su concentración oscila durante el ciclo celular. De esta manera, la cantidad de moléculas de MPF depende de la

disponibilidad de ciclina B1 en el citoplasma capaz de conjugarse con la p34^{cdc2}, unidad que se establece durante el ciclo celular del ovocito. La ciclina B1 es sintetizada durante la maduración ovocitaria. Una vez conjugadas ambas proteínas, son capaces de migrar al núcleo celular donde ejercerán su actividad cinasa. Para ejercer esta actividad cinasa, el complejo es sometido a una serie de fosforilaciones y defosforilaciones realizadas por otras cinasas (Figura 2). Así la cinasa activadora de ciclinas (cyclin activating cinasa, CAK), fosforila a p34^{cdc2} en el sitio correspondiente al amino ácido treonina 161 (Thr 161). Posteriormente otras cinasas, (Wee1 y Myt1) fosforilan a p34^{cdc2} en el sitio correspondiente al amino ácido tirosina 15 (Tyr15) y treonina 14 (Thr14) (Alberio *et al.*, 2001). En este momento el complejo es llamado pre-MPF y se encuentra inactivado. La inactivación por medio del fósforo inhibe sitios específicos de unión al ATP, de manera que la actividad cinasa de la proteína se ve inhibida. A medida que la concentración de pre-MPF aumenta, se produce la activación del mismo a partir de una fosfatasa llamada cdc25, la cual defosforila a Thr14 y a Tyr15 (Gautier *et al.*, 1990 y Palma, 2001),

resultando así la forma activa del factor promotor de la maduración (MPF).

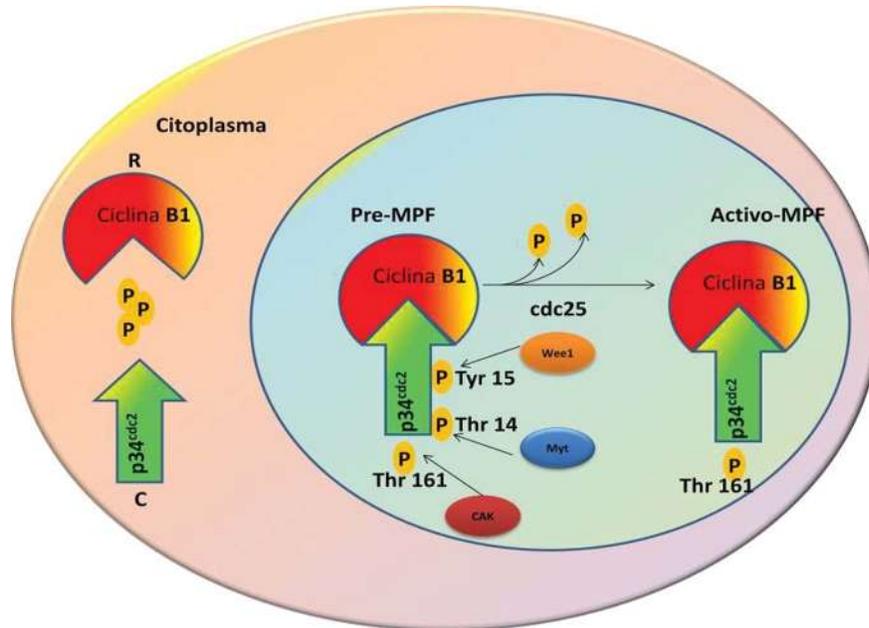


Figura 2. Representación esquemática de las fosforilaciones y desfosforilaciones del factor promotor de la maduración (MPF) en el ovocito que inducen el reinicio de la meiosis.

La activación de MPF se auto-regula por una retroalimentación positiva a partir de las moléculas de MPF activas que se incrementan en el ovocito. Su actividad aumenta para inducir la metafase I y disminuye después de la proteólisis de la subunidad ciclina B1, para permitir el paso del la anafase I y telofase I y posteriormente vuelve a activarse antes de la metafase II (Ciliberto y Tyson, 2000). Estudios realizados en ovocitos de bovinos (Figura 3) muestran relativamente bajos

niveles de MPF en la fase de VG durante las primeras 8 h de maduración. La actividad del MPF incrementa gradualmente posterior al primer pico de actividad que ocurre entre las 12 y 14 h de la maduración (metafase I) la cual es seguida por una brusca reducción en la actividad entre las 16 o 18 h, ocasionado por la proteólisis de la subunidad ciclina B1 para permitir el paso de la anafase I y telofase I (Wu *et al.*, 1997).

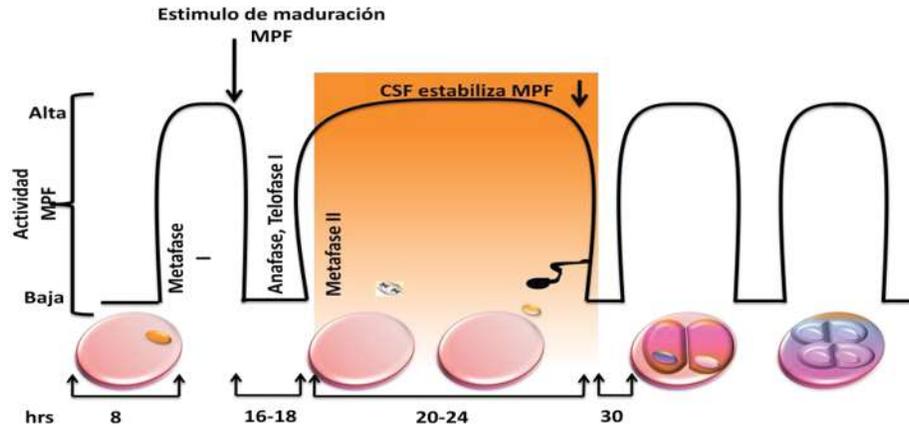


Figura 3. Representación esquemática del comportamiento del MPF en ovocitos bovinos.

La proteólisis de ciclina B1 (Figura 4) ocurre como resultado de una retroalimentación negativa con el complejo promotor de la anafase-ciclosoma (APC/c) y una enzima intermediaria (IE) (Ciliberto y Tyson, 2000). El APC/C es una ubiquitina ligasa E3 compuesta al menos de 11 subunidades que se asocia al menos a dos subunidades activadoras, Cdc20 que es esencial para la degradación de Pds1/Securina durante la transición de metafase a anafase, y Cdh1 necesaria para la degradación de ciclina B1 más tarde en telofase para su posterior degradación por el proteosoma (Peters, 2002). Existen evidencias de que la CaMKII (calmodulina-dependiente de proteína cinasa) es responsable de inducir esta

ubiquitinación (Lorca *et al.*, 1993). El APC/c (figura 5) es regulado por el factor inhibidor de la mitosis (Emi1), previniendo su activación prematura durante las fases S y G2 (Machida y Dutta, 2007). Posteriormente, el MPF vuelve a activarse antes de la metafase II entre las 20-24 h de la maduración. El alto nivel de actividad es mantenido durante varias horas disminuyendo gradualmente después de 30 h de maduración, convirtiéndose apenas detectable a las 48 h (Wu *et al.*, 1997). En la metafase II el MPF es estabilizado por el factor citostático (CSF) el cual está compuesto al menos por cuatro proteínas: por el producto *mos* del proto-oncogen *c-mos*, MAPK p90 Rsk y Emi (Alberio *et al.*, 2001).

al., 1994., Vendrell *et al.*, 2003). MAPK, es una cinasa serina/treonina. Dos isoenzimas MAPK son activadas durante la meiosis (proteína cinasa 1 y 2) (Alberio *et al.*, 2001). Esta enzima se activa a través de señales extracelulares específicas y mediante diferentes vías de traducción (factores de crecimiento y neurotransmisores). La MAPK es activada por la MAPK-cinasa (MAPKK), la cual es a su vez fosforilada por varias cinasas aunque, en los ovocitos, el producto del proto-oncogen c-mos es probablemente el que juega el principal papel. En bovinos y en porcinos se ha observado que cuando la MAPK es inhibida a través de la aplicación de MPK-1 mRNA, se manifiesta una desorganización en el huso meiótico y una expulsión afectada del cuerpo polar (Gordo *et al.*, 2001). De igual manera la disminución de la actividad de la MAPK se ha asociado con la formación nuclear después de la activación partenogénica (Moss *et al.*, 1995). Las Rsk (p90Rsk) son serinas/treoninas-cinasas de 90kDa y son las únicas entre las cinasas, que contienen dos dominios funcionales, un dominio N-terminal que fosforila los substratos de Rsk y un dominio C terminal implicado en el mecanismo de activación de la Rsk (Chaib, 2004). El EMI (Inhibidor mitótico

temprano) es una proteína conservada de F box que contiene zinc, una región que inhibe el APC (Reimann, 2001). La inmunodepresión de Emi1 (*Xenopus*) retrasa la acumulación de Ciclina B y subsecuentemente la entrada a la mitosis.

El CSF inhibe la activación del APC/C por la activación de otros componentes, particularmente Bub1 (Schmidt *et al.*, 2006) y de esta manera bloquea la progresión del ciclo celular en la metafase II (Peters, 2002).

Una vez alcanzada la MII, el ovocito permanece bloqueado hasta su activación por un espermatozoide. Durante la fecundación, la unión del espermatozoide a la membrana plasmática provoca en el ovocito una onda de oscilaciones en la concentración intracelular del Ca^{++} . Estas oscilaciones activan las enzimas capaces de degradar el factor citostático CFS (mediante una proteasa ubiquitina dependiente) y la ciclina B (a través de una proteína cinasa dependiente de calmodulina) haciendo que el factor MPF se inactive y ocasione la degradación de la ciclina B1 y de c-mos mediada por el proteosoma. El anterior evento ocurre simultáneamente con la descondensación de la cromatina espermática en el citoplasma del ovocito (Gil *et al.*, 2007).

Así mismo causa la exocitosis de los gránulos que se localizan en la región cortical del ovocito, debajo de la membrana plasmática, los cuales contienen enzimas que se liberan en el espacio perivitelino, que originan modificaciones de la zona pelúcida del ovocito las cuales previenen la penetración poliespérmica. Además de las modificaciones bioquímicas, tras la elevación preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) y la acción de la hormona folículo estimulante (FSH), el ovocito sufre cambios morfológicos (Moor *et al.*, 1998). Cuando el ovocito se encuentra en estado de vesícula germinal (VG) posee un citoplasma ocupado por vesículas y elementos del retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias ubicadas en la periferia (Urdaneta, 2005).

Durante este estadio, las mitocondrias uniformemente distribuidas en el citoplasma del ovocito se agregan alrededor del núcleo, momento que coincide con ruptura de la vesícula germinal (BDVG) (Thibault *et al.*, 1987). Al mismo tiempo el RER desaparece y se forman gotas de lípidos y cisternas de retículo endoplásmico liso (REL) denominadas “unidades metabólicas”. El agrupamiento mitocondrial y la posterior dispersión en el estadio de anafase/telofase,

es microtúbulo dependiente y es necesario para la progresión de la maduración. Mientras que las mitocondrias migran para alcanzar una posición peri-nuclear durante el periodo de maduración, los gránulos corticales (GC) migran y se sitúan inmediatamente debajo de la membrana citoplasmática (región cortical) del ovocito, formando una mono-capa irregular (Cran y Cheng, 1986, About y Ducibella, 2001). A menudo se forma una zona desprovista de organelos cerca de esta mono-capa de GC, mientras que una delgada capa de filamentos de actina se interpone entre los GC y el oolema. Los GC representan una forma especial de lisosomas primarios esféricos, limitados por una membrana, con un tamaño variable y compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Estos se originan a partir del aparato de Golgi (AG) y el REL, y se forman durante el crecimiento folicular mediante un crecimiento continuo hasta que se produce la ovulación. Una onda de calcio (Ca^{++}) proveniente del RE es la que ocasiona la fusión de los GC. Este RE también adquiere una posición cortical (García, 2005). Los ribosomas aumentan en número y el AG se alarga y se transforma en cisternas dilatadas situadas en el córtex del ovocito, donde será activo en la

exportación de glicoproteínas a la ZP (Picton *et al.*, 2008) y en la formación de gránulos corticales necesarios en la fecundación.

MADURACIÓN BIOQUÍMICA DEL ESPERMATOZOIDE

El transporte de los espermatozoides en el tracto genital masculino (epidídimo) involucra alteraciones tanto en la membrana plasmática como en la estructura de ciertos orgánulos celulares, la estabilización de la cromatina, de los componentes del flagelo y cambios relacionados con la adquisición de la capacidad de movimiento (Yanagimachi, 1994).

El movimiento flagelar del espermatozoide se activa cuando éste es liberado del epidídimo caudal después de la eyaculación (Wade *et al.*, 2003). Este proceso es conocido como activación del espermatozoide y consiste en un bateo simétrico del flagelo que hace que el espermatozoide se desplace en forma progresiva (Olivera *et al.*, 2006). Lo anterior surge por la diferencia de concentración de iones y osmolaridad del fluido oviductal con el plasma seminal; es decir, en la región caudal del epidídimo el

espermatozoide es almacenado en un ambiente que contiene altas concentraciones de K^+ , y bajas concentraciones de Na^+ y HCO_3^- (bicarbonato). Esas concentraciones iónicas cambian radicalmente cuando los espermatozoides son eyaculados, primero en el fluido seminal y después en el tracto genital femenino, donde el K^+ se reduce significativamente y el Na^+ y el HCO_3^- incrementan significativamente (Brooks, 1983; Setchell *et al.*, 1994; Yanagimachi, 1994).

El sitio de deposición de los espermatozoides difiere entre las especies, en el bovino el semen es depositado en el segmento craneal de la vagina en donde pierde el líquido seminal, manteniendo la superficie espermática únicamente aquellas proteínas o factores discapacitantes (mucopolisacáridos y proteínas) (Caballero, 2007) para dirigirse hacia el útero y desde ahí pasar a la región del oviducto, aproximadamente en 4 min, apoyado por las contracciones del miometrio (Rodríguez y Martínez 2007). En estudios *in vitro*, la pérdida del líquido seminal puede ser mimetizada eliminando el plasma por distintos sistemas de lavado e incubando a los espermatozoides en medios de composición comparables con el fluido

oviductal (Visconti *et al.*, 2002; Gadella, 2008).

Los espermatozoides que atraviesan esta barrera se vuelven temporalmente inactivos una vez que llegan a la porción inferior del itsmo del oviducto. El tiempo que permanecen en esta región depende en parte del intervalo entre el apareamiento y la ovulación (Smith *et al.*, 1987). Durante este período de residencia en el itsmo inferior, los espermatozoides se "adhieren" a la mucosa de la pared de las criptas oviductales a través de la membrana plasmática donde pierden los factores discapacitantes (Flesch y Gadella, 2000; Companyó *et al* 2007).

En condiciones *in vitro* se ha observado que la incubación continua de los espermatozoides con el plasma seminal previene la pérdida de estos factores por el continuo contacto con las sustancias estabilizadoras (Muiño *et al.*, 2008). Alrededor del momento de la ovulación, ya sea en respuesta a señales derivadas del ovocito o a hormonas esteroides transportadas por el sistema de contracorriente ovario-uterino, los espermatozoides experimentan el proceso final de maduración (capacitación), se desprenden de la pared del oviducto y comienzan a nadar activamente hacia el

ovocito. Solo una pequeña fracción de los espermatozoides que se encuentran presentes en el itsmo continúan con su migración (Smith y Yanagimachi, 1991). En este momento los espermatozoides cambian el patrón de movilidad (hiperactivación); logrando una propulsión muy eficiente en los fluidos viscosos del oviducto (Suárez *et al.*, 1991; Suarez, 1996). Los primeros espermatozoides que llegan a las cercanías del ovocito son aquellos que tienen más probabilidades de fecundarlo (Cummins y Yanagimachi, 1982).

a) **Modificación de la superficie del espermatozoide**

La estructura básica y celular de la membrana consiste en una bicapa lipídica en la cual se fijan las proteínas. Algunas de estas proteínas tienen una función estructural, otras son receptoras de enzimas y moléculas transportadoras que se involucran en el mantenimiento de la homeostasis y transmite las señales extracelulares a través de la membrana (Nelxon y Cox, 2005).

La composición lipídica de la membrana plasmática de espermatozoides maduros de mamíferos es marcadamente diferente a la de las células somáticas (Companyo, 2004). Los fosfolípidos son en conjunto

alrededor del 70% de los lípidos totales en el espermatozoide de algunos **animales** como el verraco, siendo en su mayoría fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina y esfingomielina.

La relación molar entre colesterol y fosfolípidos (esfingomielinas) es de 0.12, lo que hace a la membrana mucho más espesa (Killian, 1998). Los ácidos grasos libres se encuentran en baja cantidad. Con respecto a la relación fosfolípidos-proteínas, se estima en un 1.0 aproximadamente, sugiriendo que la cantidad total de cada una de estas moléculas es constante. En el toro se observa que la cantidad total de esteroides en el acrosoma anterior es alrededor de cuatro veces superior a la presente en la región post-acrosómica.

b) **Capacitación espermática**

Hace ya más de 50 años que se descubrió el concepto de capacitación espermática; sin embargo, este proceso sigue sin ser comprendido en su totalidad (Chang, 1984). Austin (1952) descubrió que el espermatozoide necesita un período de residencia en el tracto genital femenino antes de adquirir la capacidad de penetrar al ovocito.

Actualmente se ha demostrado que la capa-

citación espermática conlleva una cascada de reacciones bioquímicas que llevan a una desestabilización y reorganización de los lípidos y proteínas de la membrana plasmática (Rodríguez y Martínez, 2007), que terminará con la exocitosis del acrosoma cuando el espermatozoide entre en contacto con la ZP (Flesch y Gadella, 2000). Sin embargo, el mecanismo por el cual se promueve la capacitación sigue siendo motivo de estudio. Parte del proceso ha podido ser identificado (Figura 5), ya que se ha determinado una correlación entre la capacitación y la salida de colesterol de la membrana plasmática, lo que permite que ésta posea un incremento en la fluidez apropiado para su actividad (Visconti *et al.*, 2002; García *et al.*, 2005; Companyó *et al.*, 2007); entre las que se encuentra el pasaje selectivo de sustancias entre el medio extracelular e intracelular, que desencadena la cascada bioquímica del proceso de capacitación (Sleight *et al.*, 2005; Boarelli *et al.*, 2007). Esto incluye la modulación en las concentraciones de iones intracelulares (Ca^{+2} , HCO_3^- , K^+ y Na^+), la hiper-polarización de la membrana plasmática del espermatozoide (-80 mv) asociado con el eflujo de K^+ (Vega *et al.*, 2002), el incremento del pH (Muñoz-Garay *et al.*, 2001; Felix, 2005) y el aumento de la

deferente, que al ser removido ocasiona un desajuste hidrofóbico (Sleight *et al.*, 2005). El colesterol en la membrana plasmática se orienta con su grupo polar (OH) próximo a las cabezas polares de los fosfolípidos, mientras que los anillos esteroides (cuatro) interactúan con las regiones más cercanas a la cabeza polar de las cadenas hidrocarbonadas de las colas de los fosfolípidos, el resto de la cadena de colesterol queda flexible al igual que el resto del fosfolípido. Por su disposición, éste limita el movimiento aleatorio de las cabezas de fosfolípidos que sobresalen en el exterior, restringiendo también el movimiento de las colas largas de los fosfolípidos, manteniendo con ello una rigidez y disminución de la fluidez en la membrana plasmática. Por lo que cuando el colesterol es retirado, los anillos esteroides se separan y dispersan la cola de los fosfolípidos causando un desajuste hidrofóbico y aumento en la fluidez (Killan, 1998; Lodish *et al.*, 2003).

Por otro lado, la eliminación del colesterol conlleva a pequeños cambios en el espesor de la membrana y consecuentemente posibles adaptaciones de las proteínas (los posibles mecanismos de adaptación se muestran en la Figura 6) (Killian, 1998). El aumento en la fluidez permite la

activación de los canales de Ca^{++} y de HCO_3^- al citosol (Vega *et al.*, 2002, Companyo *et al.*, 2007). Estudios recientes indican que el Ca^{++} citosólico es activamente transportado dentro del acrosoma por una ATPasa-dependiente (Dragileva *et al.*, 1999), por lo que el aumento en la concentración intracelular de Ca^{++} es dado por la pérdida de afinidad de la enzima ATPasa, localizada en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide a la Calmodulina (CaM). El papel de esta enzima es mantener bajos los niveles intracelulares de Ca^{++} mediante el bombeo de este catión al interior del acrosoma (Felix *et al.*, 2005; Colás *et al.*, 2009). Por otra parte, aunque se conoce que existe un intercambio de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ en el espermatozoide de los mamíferos, su importancia en el control intracelular del Ca^{++} durante la capacitación no es claro. De manera similar se ha demostrado la presencia de canales dependientes de voltaje de Na^+ , Ca^{++} y K^+ en espermatozoides de mamíferos, pero el papel de estos en la regulación intracelular de iones durante la capacitación aún se desconoce en su totalidad (Baldi *et al.*, 2000; Zhang y Gopalakrishnan, 2005). En este contexto, existe evidencia que sugiere que canales Tipo-T a través de su apertura

podieran contribuir a la fijación de Ca^{++} en potencial de reposo, y por lo tanto influir en la capacitación del espermatozoide (Felix, 2005).

Al respecto, Espinosa *et al.*, (2000) utilizando células espermatogénicas, demostraron que el suero de albúmina induce un aumento de apertura de canal de Ca^{++} . Como no hay pruebas de que estos canales estén presentes en los espermatozoides maduros, la BSA (albúmina sérica) podría facilitar la entrada y subsecuentemente el incremento de Ca^{++} , un prerequisite para la capacitación (Darszon *et al.*, 2001). Otro mecanismo que podría regular los canales de Ca^{++} incluye la fosforilación (Ficarro *et al.*, 2003). Además del Ca^{++} , un incremento en el pH por el eflujo de iones de H^+ , ha sido reportado (Muñoz-Garay, 2001; Olds-Clarke, 2003).

Otro aspecto aún desconocido y que causa discrepancia en el proceso de capacitación espermática, es el cambio de potencial de la membrana (E_m) de $-35\text{mV}/-45\text{mV}$ (espermatozoides no capacitados) a -80mV (espermatozoides en proceso de capacitación). Por un lado, Muñoz-Garay *et al.* (2001), mencionan que el cambio de pH pudiera regular uno o más tipos de canales de K^+ (K_{ir}) en la membrana plasmática, de

modo que intensifican la permeabilidad a este ión, causando la hiperpolarización del potencial de membrana. Mientras que Darszon *et al.* (2007), indican que los canales de K^+ son regulados por la ATP (KATP canales) y canales epiteliales de Na^+ (ENaCs): El cierre de los canales KATP y activación de ENaCs mantienen el potencial de membrana en un estado depolarizado, mientras que la activación de los canales KATP y el cierre de ENaCs produce hiperpolarización de la membrana. Aún y cuando no se conoce con certeza cual es la señal que induce el cierre de ENaCs, se ha planteado una vía dependiente de AMPc/PKA (Darszon *et al.*, 2006).

El bicarbonato entra a la célula por la vía de co-transporte $\text{HCO}_3^- \text{Na}^+$ (Boerke *et al.*, 2008). El ingreso del HCO_3^- al citosol, regula y estimula la actividad de la adenilciclase (ACs), pero el mecanismo exacto por el cual esos iones activan a la ACs no es claro (Visconti *et al.*, 1990, Chen *et al.*, 2000). La ACs aumenta las concentraciones de AMPc activando a su vez a la proteína cinasa A1 (PKA1). Esta última fosforila algunas proteínas en los residuos de serina (PSP) como la proteína cinasa de anclaje (AKAP-3), y desencadena la fosforilación de las

tirosinas (PTP) y de otras proteínas cistólicas. La PKA1 también activa en la membrana acrosomal externa un canal de Ca^{++} , con el consecuente aumento de las concentraciones cistólicas de este catión, las cuales gradualmente activan la fosfolipasa $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) acoplada al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF). El EGF estimula la fosforilación de tirosina de varias proteínas, activa la $\text{PLC}\gamma$ y aumenta la polimerización de actina durante la capacitación (Breitbart, 2002; Breitbart *et al.*, 2005).

La polimerización de actina conduce a la rápida formación de filamentos de actina-F localizados entre la membrana plasmática y en la membrana acrosomal externa, cuya función es mantener separadas ambas membranas, evitando que se fusionen y se libere el contenido del acrosoma (Breitbart *et al.*, 2005).

En la reacción acrosomal el EGF es casi completamente bloqueado por los inhibidores de la tirosina cinasa (Lax *et al.*, 1994).

La $\text{PLC}\gamma$ participa en mecanismos catalíticos que generan inositol trifosfato (IP_3), y diacilglicilglicerol (DAG) y las vías calcio-dependientes de la señalización celular (Baldi *et al.*, 2000; Olivera *et al.*, 2006). Breitbart (2002) reportó que la

inhibición de $\text{PLC}\gamma$ por neomycin inhibe la reacción acrosomal.

El diacilglicerol (DAG) es generado por la hidrólisis del polifosfoinositido (PIP_2) después de la entrada del Ca^{++} (Roldan, 1998). Este factor causa la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Williams, 2002), quien fosforila diversas proteínas diana que controlan el crecimiento y la diferenciación celular (Newton, 1995).

c) Balsas Lipídicas o Rafts.

Es sabido que los glicolípidos se asocian por sus largas cadenas ascil formando agrupaciones muy compactas estabilizadas por los puentes de hidrógeno que se producen entre sus cabezas azucaradas.

El colesterol se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas donde provoca una disminución de su flexibilidad y de esta forma compacta la bicapa lipídica. Este empaquetamiento lateral de los esfingolípidos y el colesterol conduce a la formación de dominios dispersos que se encuentran en una fase similar a la fase líquida ordenada, que se denominan balsas o “rafts” (Figura 7), dentro de la bicapa de las membranas (Belmonte-Martín y Millán, 2001).

Estas balsas de lípidos contienen una cantidad elevada de dos clases de proteínas integrales de membrana, las que están

ancladas mediante dos ácidos grasos saturados (de las balsas de esfingolipidos-colesterol) de cadena larga unidos de forma covalente (scr cinasa) y las proteínas ancladas en los radicales

glicosilfosfatidilinositol (GPI), proteínas transmembranales, que la atraviesan precisamente en estos micro-dominios (Joven, 2001).

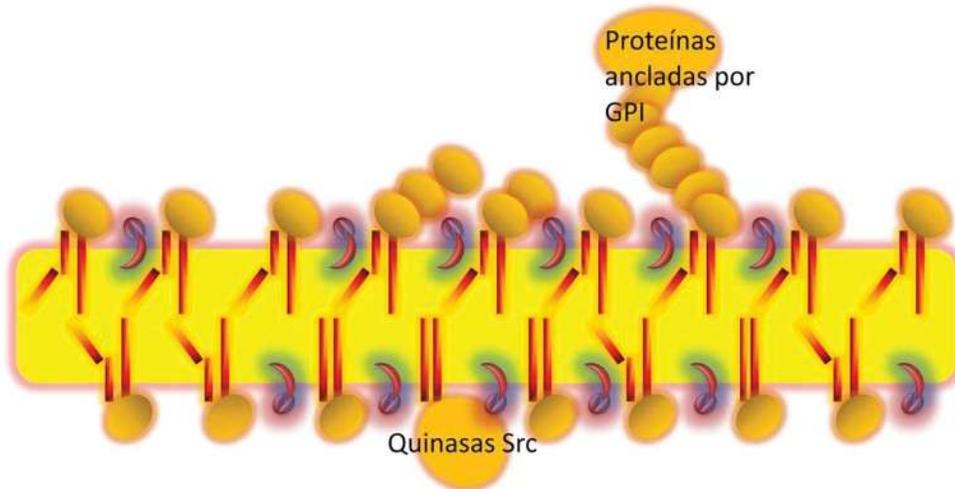


Figura 7. Modelo de estructura de los rafts o balsas lipídicas. La bicapa es asimétrica en los rafts, con la esfingomielina y los glicoesfingolípidos enriquecidos en la cara exoplasmática de la membrana y los glicerofosfolípidos (p.e fosfatidilcolina) en la cara citoplásmica. El colesterol está presente en las dos caras y se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas.

Los dominios de la balsa no están separados de manera rígida, las proteínas de la membrana pueden desplazarse hacia dentro y hacia afuera en una escala de tiempo y segundos (microsegundos). Existen varios tipos de “rafts”, siendo los asociados a la caveolina los mejor caracterizados. Ciertos receptores de membrana y proteínas de señalización, parecen estar segregados conjuntamente en las balsas de membrana, por lo que se han hecho experimentos que demuestran que se

puede interferir en la señalización a través de estas proteínas mediante manipulaciones que eliminan el colesterol de la membrana plasmática y destruyen las balsas lipídicas (Belmonte-Martín y Millán, 2001).

d) **Caveolina y Caveolas**

Las caveolinas son una familia de proteínas integrales de membrana de 21-25 kDa. Se han identificado 3 tipos de caveolinas: Las caveolinas 1 (caveolina 1 α y caveolina 1 β) y 2 se expresan ubicuamente.

Mientras que la la expresión de caveolina 3 es específica de las células musculares y astrocitos. La caveolina 1 se une al colesterol directamente, lo que estabiliza la formación de complejos de homooligómeros (Killan, 1998; Thomas y Smart, 2008)

Las caveolas fueron identificadas originalmente como invaginaciones de la membrana plasmática en células endoteliales y epiteliales con un tamaño de 50-100 nm (Killan, 1998). En realidad, las caveolas pueden ser invaginaciones de estructuras lisas dentro del plano de la membrana plasmática (cuando carecen de colesterol) o pueden formar vesículas de transporte o estructuras tubulares. (Thomas y Smart, 2008). Su función es la de transportar Ca^{++} , colesterol y el inicio de determinadas vías de señalización. Hay evidencias que sugieren que la familia de miembros de la caveolina funciona como proteínas de andamiaje que organizan y concentran determinados lípidos (colesterol-glicoesfingolípidos) y moléculas señalizadoras modificadas por lípidos. La caveolina presenta un dominio de andamiaje (caveolin scaffolding domain o CSD) por el que interaccionan directamente con las proteínas señalizadoras, como las cinasas de la

familia Src, la óxido nítrico sintasa, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) o las subunidades $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas, y las mantiene en una conformación inactiva (Mayoral *et al.*, 2007).

e) Reacción acrosomal

Desde el punto de vista bioquímico, la cabeza del espermatozoide contiene una gran vesícula secretoria denominada acrosoma. El acrosoma cubre el núcleo espermático por la región apical; la membrana subyacente al núcleo es la membrana acrosómica interna (MAI) la membrana subyacente a la membrana plasmática es la membrana acrosómica externa (MAE) (Baldi *et al.*, 2000). La RA se define como la unión de la MAE con la MP, con formación de vesículas híbridas, exposición de la MAI y liberación de enzimas contenidas en el acrosoma, requerimiento absoluto para la penetración de la zona pelúcida por el espermatozoide y por ende, la fertilización (Cardona y Cadavid, 2004). La exocitosis de las enzimas produce una asociación laxa entre las membranas de la vesícula a la MP, punto donde sucederá la fusión (Tomes, 2004). El tiempo necesario para que se produzca dicho proceso varía según las condiciones y la especie. En ratón oscila

desde 2 minutos, utilizando ZP solubilizada para la estimulación y hasta 130 minutos con ZP intacta (Lee y Storey, 1989; Rockwell y Storey, 2000). En humanos, Morales *et al* (1994) observaron tiempos entre 15 y 60 minutos utilizando ZP intacta. Durante la RA, es necesario que se produzca la despolimerización de la F-actina, para que la MAE y la parte interna de la MP puedan ponerse en contacto y fusionarse. Lo anterior ocurre debido a que los altos niveles de Ca^{++} intracelular (sobre 500 nM), provocan la activación de proteínas cortadoras de actina que inducen la ruptura de los filamentos de la misma provocando el desmantelamiento de la estructura de sostén entre ambas membranas (Breitbart y Spungin, 1997; Breitbart 2002; Tomes, 2004; Breitbart *et al.*, 2005). Para que se detone el proceso de RA es necesario que la MP externa del espermatozoide se una a la ZP3, mediante oligosacáridos (Tomes *et al*, 2004). Una gran variedad de moléculas han sido propuestas como receptores candidatos de la zona pelúcida en la superficie

espermática (Cuadro 1). Estas moléculas han sido evaluadas en diferentes especies y ninguna ha podido ser reconocida como el receptor único que permita la interacción entre ambos gametos (Cardona-Maya y Cadavid, 2005). Aunque los oligosacáridos de la ZP son los que se unen al espermatozoide, dichos oligosacáridos o pequeños glicopéptidos de la ZP3 aislados son incapaces de inducir la RA (Leyton y Saling, 1989), implicando la necesidad de la porción proteica del espermatozoide.

Bioquímicamente la RA (Figura 8) se lleva a cabo porque uno de los receptores (R “Galtasa”) está acoplado a una proteína G_i que se une a la N acetil glucosamina de la ZP3, la cual activa la fosfolipasa β_1 (PLC_{β_1}). El otro receptor de 95 KDa del espermatozoide (TK) es una tirosina cinasa acoplada a una fosfolipasa γ (PLC_{γ}). PLC_{β_1} glucosamina de la ZP3, la cual activa la fosfolipasa regula la actividad de la AC para producir una elevación de AMPc y activar la proteína cinasa A (PKA).

Cuadro 1. Proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide y su receptor en el ovocito en diferentes especies.

ESPECIE	RECEPTORES ESPERMÁTICOS	OLIGOSACÁRIDO ZP	REFERENCIA
TORO	β -1,4 galactosiltransferasa	Glicoproteínas y glicolípidos con residuos terminales acetil-glucosamina N- Unidos	Miller <i>et al.</i> , 2002
CERDO	APz Zonadhesina (p105/45) AQN-1(espermadhesina β -1,4 galactosiltransferasa PSP-I/PSP-II	Polisacáridos Sulfatados Desconocido Manosa Desconocido Desconocido	Peterson <i>et al.</i> , 1991 Hardy and Garbers, 1994 Töpfer-Petersen <i>et al.</i> , 2002 Parillo <i>et al.</i> , 2003 Calvete <i>et al.</i> , 1995
RATÓN	Proteína 95 (p95) β -1,4-galactosiltransferasa Tripsina (proteínasa) α -D-manosidasa SLIP1 Proteína de 15 kDa Sp56	Desconocido N-acetilglucosamina ZP3 Desconocido Manosa u oligosacáridos ricos en manosa Sulfoglicolípidos Desconocido α -D-galactosa	Kalab <i>et al.</i> , 1996 Miller <i>et al.</i> , 1992 Cornwall <i>et al.</i> , 1991 Tanphaichitr <i>et al.</i> , 1993 Aarons <i>et al.</i> , 1991 Kim <i>et al.</i> , 2001
COBAYO	Ligando de L-fucosa PH 20 α -1,4-galactosiltransferasa	α -L-fucosa Desconocido Desconocido	Huang and Yanagimachi, 1985 Primakoff <i>et al.</i> , 1985 Larson and Miller, 1997
CONEJO	RSA (54KDa) RSA (sp17)	Carbohidratos sulfatados Carbohidratos sulfatados	Abdulah <i>et al.</i> , 1991 Richardson <i>et al.</i> , 1994
CABALLO	β -1,4-galactosiltransferasa	Desconocido	Fayrer-Hosken <i>et al.</i> , 1991

La PKA activa un canal dependiente de voltaje de Ca^{++} (Cav) (Tipo T) situado a nivel de la membrana acrosomal externa (MAE), que liberará Ca^{++} desde el interior del acrosoma hacia el citosol, aproximadamente de 150nM a 400 nM (Darszon *et al.*, 2001, Cardona-Maya and Cadavid, 2005). Los CAV son proteínas transmembranales que abren en respuesta a la depolarización de la membrana y permiten la entrada de iones de Ca^{++} a la

célula (Feliz, 2005). Este es el primer aumento de Ca^{++} intracelular, relativamente pequeño, el cual permite la activación de la $\text{PLC}\gamma$. La activación de la $\text{PLC}\beta_1$ y la $\text{PLC}\gamma$ (mediante el ligero aumento de Ca^{++} por movilización desde el acrosoma), generan la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) quien mediante una PLC específica de fosfoinosítoles forma inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Fukami *et al.*, 2003).

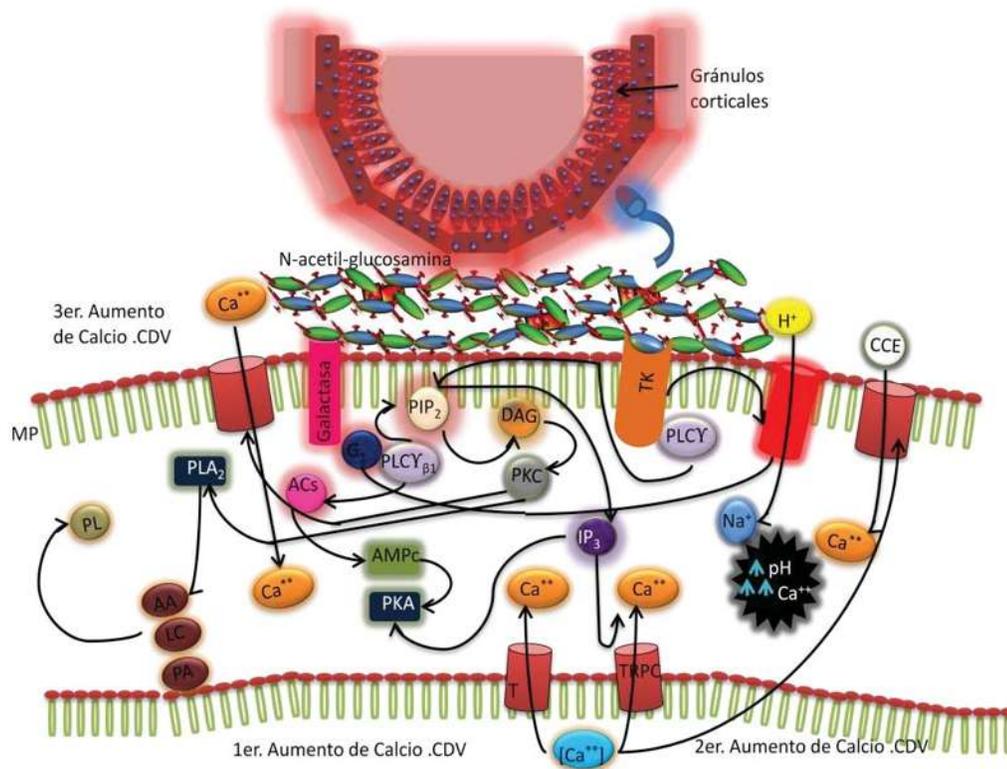


Figura 8. Bioquímica de la reacción acrosomal.

La PKA y el IP_3 activan los Cav TRPC en la MAE provocando un segundo aumento

de calcio intracelular mediante la movilización desde el acrosoma. Por otro

lado, el DAG activa la PKC, la cual provoca la apertura de los canales de Ca^{++} dependientes del voltaje en la MP, permitiendo por tercera ocasión la entrada de Ca^{++} extracelular al citosol. Al aumentar la concentración de este metabolito a nivel intracelular, por ende la concentración en la región acrosomal disminuye dando lugar a la apertura de los Cav de los almacenes, mecanismo denominado SOC (Store Opens Channels), lo que provoca un aumento sostenido de la concentración de Ca^{++} citosólico (Breitbart, 2002).

La G_i y la TK también pueden activar el intercambio de Na^+/H^+ conduciendo a la alcalinización del citosol (Breitbart y Spungin, 1997). La PKC también activa a la fosfolipasa A_2 (PLA_2), la cual genera ácido araquidónico (AA), lisofosfatidilcolina (LC) y ácido fosfatídico (PA) para los fosfolípidos de membrana (PL). El AA pudiera ser convertido a prostaglandinas (PG) y leucotrenos (LT) por las enzimas ciclo-oxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOC) respectivamente (Baldi *et al.*, 2000). El incremento de Ca^{++} y pH permite la fusión de la membrana y la exocitosis acrosomal (Berridge, 1997). Este aumento de pH es causado por el intercambio iónico que se establece entre los compartimentos intra y extracelular,

liderado por un rápido flujo de Ca^{++} que puede estar regulado por cinasas. El aumento intracelular de bicarbonato y peróxido de hidrógeno contribuye también a elevar el pH intracelular.

Luego que tiene lugar la RA y el espermatozoide penetra la ZP, la MP del óvulo y el espermatozoide con el acrosoma reaccionado se unen y posteriormente se fusionan.

RECONOCIMIENTO ENTRE GAMENTOS

En condiciones *in vivo*, este proceso se lleva a cabo en las criptas del istmo donde se adosan los espermias, y termina con la liberación del mismo hacia el ámpula (Olivera *et al.*, 2006). Para que se inicie el reconocimiento entre gametos, el *cumulus oophorus* (COO) estructura que rodea a los ovocitos, formado por un conjunto de células y una matriz extracelular que une las células entre sí, debe ser atravesado por el espermatozoide, gracias a su movilidad y a la presencia de hialuronidasa, PH-20, del inhibidor de la tripsina, de la proteoglicano sulfato y la proteína PTX3 en el COO (Meyers and Rosenberger, 1999; Relucenti *et al.*, 2005). Recientemente, Kim *et al.* (2005), han descrito la presencia

de una proteína, “Hyal5”, que también participa en la penetración de las células del COO.

Una vez atravesadas estas células, el espermatozoide interacciona con el ovocito. Este proceso de interacción se produce a tres niveles: La ZP, que induce la exocitosis del contenido acrosomal, la membrana plasmática del ovocito, con la que se fusiona, y finalmente el citoplasma, donde se produce la descondensación del espermatozoide (Canovas, 2007).

a) **Modificaciones en la zona pelúcida (ZP)**

La ZP es una envoltura externa, localizada en la superficie del ovocito y las células de la granulosa. Es una estructura porosa formada durante el crecimiento del ovocito, conformada principalmente por tres clases de glucoproteínas (Bleil y Wassarman, 1980; Avilés *et al.*, 2000; Wassarman, 2008) denominadas ZP1, ZP2 y ZP3 consistentes en polipéptidos glicosados heterogéneamente con oligosacáridos unidos a aspargina (N-) ó serina-treonina (O-), pero también posee polisacáridos, mucopolisacáridos y otras proteínas. Son el producto de tres familias de genes mayores, denominados ZP A, ZP B y ZP C respectivamente, de acuerdo al tamaño de sus ADN mensajeros (Harris *et al.*, 1994).

Recientemente se ha descrito la presencia de una cuarta proteína en la ZP de humanos (Lefievre *et al.*, 2004) y de ratas (Hoodbhoy *et al.*, 2005). En la mayoría de las especies la ZP es secretada morfológicamente en capas asimétricas (Figura 9). La capa interna está localizada cerca del ovocito, desde la membrana plasmática hasta la mitad de la ZP, mientras que la zona externa sería la que se ubica cerca de las células del COO y mediaría en la unión con el espermatozoide (Familiari *et al.*, 2006). Todos los ovocitos de mamíferos poseen una ZP aunque el grosor (~1-25 μm) y el contenido de proteínas (~1-30 ng) varía considerablemente para las diferentes especies. La ZP en el ratón es de ~6.2 μm de grosor y contiene ~3.5 ng de proteína; en el cerdo el grosor es de 10 μm , 20 μm en la especie humana y 27 μm en la vaca (Dunbar *et al.*, 1994; Pelletier *et al.*, 2004; Wassarman, 2008). La ZP2 y la ZP3 se unen por enlaces no covalentes, intercaladamente, formando largos filamentos (de 14-15 μm), siendo estos filamentos conectados por la ZP1. La maduración de la ZP implica cambios en su estructura, en el desarrollo de numerosos poros en su cara externa, los cuales son llenados con proteoglicanos secretados por

las células del COO, estos ayudarán al espermatozoide en la penetración

(Wassarman and Litscher, 2008).

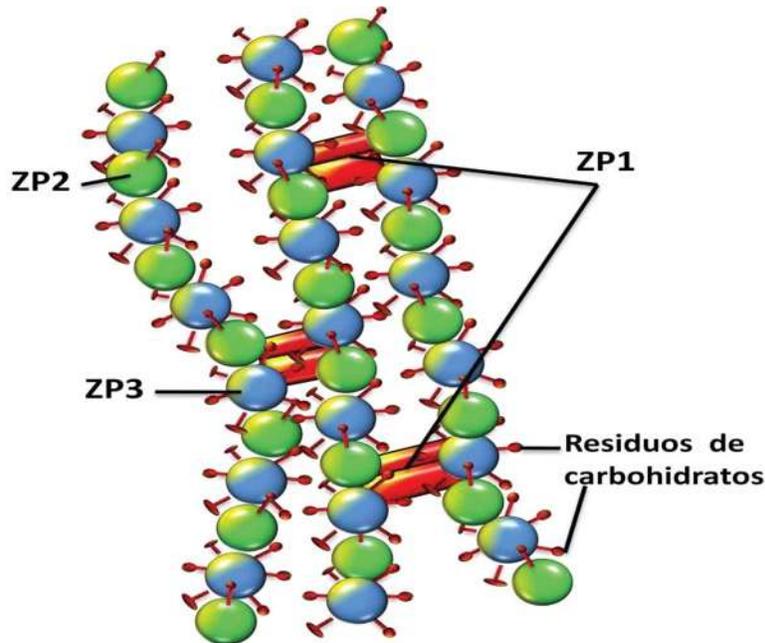


Figura 9. Estructura química de la zona pelúcida.

Su función la adquiere con la unión espermatozoide-ovocito, lo anterior debido al incremento oscilatorio en el nivel intracelular de Ca^{++} . La elevación intracelular del Ca^{++} causa la exocitosis de GC que son localizados entre la región cortical del ovocito y de la membrana plasmática. Esos gránulos contienen enzimas que son liberadas dentro del espacio perivitelino, ocasionando modificaciones de la ZP que previenen la polispermia (Abou-Haila and Tulsiani, 2000; Williams, 2002).

Se plantean dos mecanismos por los cuales el bloqueo en la membrana ocurre, uno inmediato que es el cambio de potencial de membrana del ovocito, que a su vez cambia la polaridad interna de la ZP; y otro subsiguiente que es la remodelación de la ZP, que ocurre por exocitosis del contenido enzimático de los gránulos corticales al espacio perivitelino (Canovas, 2007). Esta exocitosis está regulada por la PKC dependiente de factores lipídicos e independiente de los iones de Ca^{++} .

Se han identificado dos poblaciones de gránulos corticales que son liberados a tiempos y en lugares diferentes: El primer

grupo se libera durante la expulsión del primer cuerpo polar y el segundo muy cerca del sitio en donde comienza la citoquinesis de la primera división celular (Olivera *et al.*, 2006).

La glucoproteína ZP1, parece jugar un papel importante en la organización de la matriz de la ZP. Sin embargo, es necesario destacar que sin la presencia de ZP3 no se produciría la formación de la ZP durante la foliculogénesis (Dean, 2004). La ZP2, actúa como receptor secundario de reconocimiento, facilitando la penetración del espermatozoide reaccionado a través de la zona y activando procesos importantes para la prevención de la polispermia (Wassarman, 2008). Mientras que en la ZP3, los oligosacáridos actúan como receptores primarios de reconocimiento espermático de especie (Clark y Dell, 2006), desencadenando la ruta bioquímica de la reacción acrosomal (RA) en espermatozoides (Yanagimachi, 1994). Aunque los oligosacáridos de la ZP son los

ADHESIÓN ESPERMATOZOIDE- OVOCITO

Una vez que el espermatozoide atraviesa la ZP y ha sufrido la RA, el siguiente proceso es contactar con el ovocito, mediante la interacción entre ambas membranas

que se unen al espermatozoide, dichos oligosacáridos o pequeños glicopéptidos de la ZP3 aislados son incapaces de inducir la RA (Leyton y Saling, 1989), implicando la necesidad de la porción proteica. Se admite que la ZP es la principal barrera que impide la fecundación interespecífica (Yanagimachi, 1994; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Wassarman, 2008), aunque las secreciones oviductales también han sido implicadas en el establecimiento de la especificidad de especie (Slavík and Fulka, 1999). Una de las pruebas de que la ZP actúa como barrera, es que cuando ésta se elimina, los ovocitos pueden ser penetrados por espermatozoides de numerosas especies heterólogas (Zhao *et al.*, 2002; Sinowatz *et al.*, 2003). En la actualidad no existe un modelo único en el que se determinen las bases moleculares de la unión del espermatozoide con la ZP en los mamíferos, a pesar de las múltiples investigaciones realizadas (Dean, 2004).

plasmáticas. Tras la RA se provoca una remodelación de la superficie del espermatozoide, quedando además expuesta una nueva superficie de membrana, la MAI, que es la que establece el primer contacto con las microvellosidades del ovocito (Gadella, 2008). A

continuación se produce la unión y fusión entre la membrana plasmática del ovocito y la del espermatozoide a nivel del segmento ecuatorial.

Aún y cuando en los últimos quince años se ha tratado de dilucidar un modelo que sugiera la unión espermatozoide-oolema, los resultados presentados hasta ahora son discrepantes. El modelo que más aceptación tiene es el que presenta a las integrinas existentes a nivel del ovocito y los ligandos de estas integrinas en el espermatozoide (Hynes, 1992).

a) Proteínas espermáticas

Las proteínas espermáticas son miembros de una familia de moléculas, conocida

como MDC (Metalloprotease, Disintegrin, Cysteine-rich) y ADAM (A Disintegrin And a Metalloprotease).

Las moléculas MDC reflejan la estructura del dominio conservado. Esos dominios incluyen una señal secuencia (no presentado), un prodominio, y un dominio metaloproteasa (MP), un dominio desintegrina, un dominio rico en cisteína (Cys-rich), un repetido EGF-like (EGF), un dominio transmembranal (TM) y una cola corta citoplásmica (Figura 10). Todas las proteínas ADAM/MDC tienen dominios de desintegrina de aproximadamente 80-90 aminoácidos. (Evans, 1999).



Figura 10. Representación esquemática de MDC

Las proteínas de la familia MDC que participan en el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito son: La proteína 1 secretora rica en cisteína (CRISP1) o también conocida como proteína epididimal (EP) en ratas, la glicoproteína ácida epididimal (AEG) en ratones y la proteína espermática humana epididimal (ARP). La proteína 2 secretora

rica en cisteína (CRISP2) o también conocida como proteína testicular (Tpx-1) se ha descrito en humanos, roedores, equinos y cerdos (Busso *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2006); y la proteína CRISP3 ha sido descrita en humanos, equinos y ratones (Udby *et al.*, 2005).

CRISP1, 2 y 3 son miembros de la familia CRISPs, la cual es un grupo de proteínas secretadas con un peso molecular de 20-30 kDa que se caracteriza por la presencia de un alto contenido de residuos de cisteína (16 de un total de 220 a 230 aminoácidos), diez de los cuales se agrupan en el dominio C-terminal de la molécula (Udby *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2008). CRISP1 es secretada de forma andrógeno-dependiente en la región proximal del epidídimo, asociándose en la superficie del espermatozoide durante la maduración. Esta proteína se localiza en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide migrando al segmento ecuatorial durante la capacitación (Guo *et al.*, 2005). Se ha demostrado que CRISP1 se une a la superficie del ovocito y que la presencia de CRISP1 exógena bloquea la fusión espermatozoide-ovocito, posiblemente por inhibición de la capacitación (Cohen *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2008;).

La CRISP2 es expresada y secretada por los espermatozoides y es mediadora de la

unión de éstos a las células de **Sertoli** (Guo *et al.*, 2005). La CRISP3 ha sido identificada en el plasma seminal siendo secretada en el ámpula, los conductos deferentes y la vesícula seminal. Aunque su función no ha sido completamente establecida en la reproducción, se ha demostrado en equinos una correlación con el proceso de fertilización (Figura 11) (Udby *et al.*, 2005).

Los miembros de la familia ADAM son fertilina α (ADAM1), fertilina β (ADAM2), ciritestina (ADAM3; tMDCI), ADAM5 (tMDC II), ADAM6, ADAM 16 (xMDC16), ADAM 18 (tMDC III), ADAM20, ADAM21, ADAM 24 (testease 1), ADAM 25 (testease 2), ADM 26 (testease 3), ADAM 29 y ADAM 30. Siendo sólo cinco de esas ADAMs (fertilina β , ciritestina, ADAM5, ADAM16, ADAM 18) las que expresan como proteínas presentes en las células germinales del macho y/o espermatozoides de varias especies.

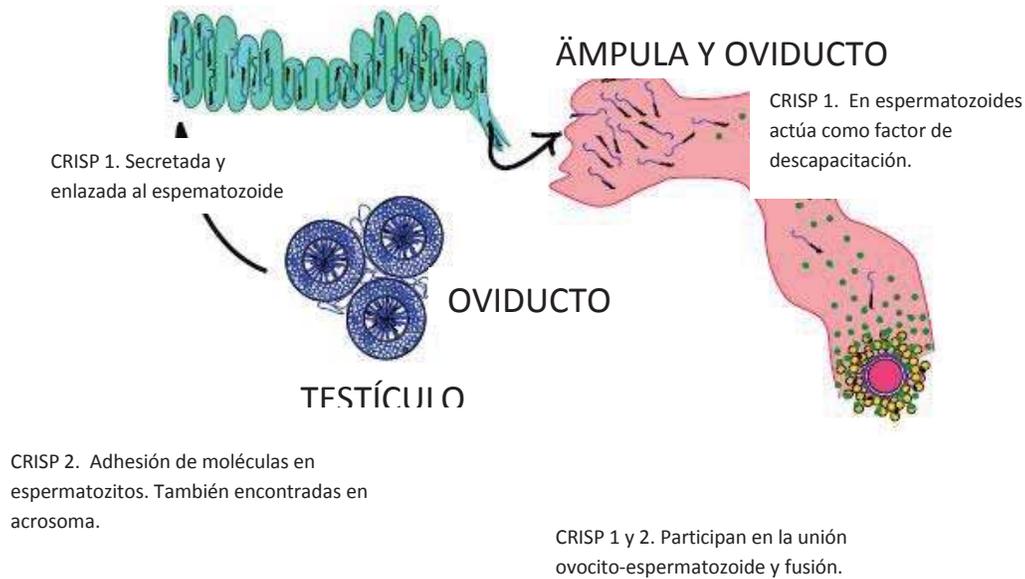


Figura 11. Diagrama de la función de las proteínas CRISPs en el tracto reproductivo de mamíferos (Burnett *et al.*, 2008).

Las ADAMs median algunos eventos de adhesión celular. En el aspecto reproductivo participan mediante la interacción entre las membranas plasmáticas de los gametos de mamíferos. En el espermatozoide de ratones se han reportado tres ADAMs que participan en el enlace espermatozoide-ovocito: Fertilina α (ADAM1), fertilina β (ADAM2) y cirstetina (ADAM3) (Suri, 2004).

La fertilina, es un heterodímero compuesto de dos subunidades α y β N-glicosilados (también conocida como PH-30), contienen un dominio metalo-proteasa y otro dominio desintegrina (Figura 12). Ambas fertilinas son procesadas durante el desarrollo espermático. La fertilina α en el testículo y

la fertilina β durante el tránsito epididimal (Evans, 1999; Yuan *et al.*, 1997).

Estudios en cerdos indican que la tripsina-like serina proteasa es responsable del proceso proteolítico de la fertilina β ; mientras que la fertilina α es dividida intracelularmente, posiblemente por subtilysin-type pro-proteína convertasa. Los productos de estas proteólisis se unen a las integrinas del óvulo. La fertilina α posee una secuencia hidrofóbica de 17 a 25 aminoácidos con un dominio rico en cisteína que tiene una función de péptido de fusión (Zhu and Evans, 2002). Evidencias de la participación específica de fertilina α no son claras. Blobel *et al.* (1992), mencionan que la fertilina α puede

tener un papel en la adhesión, debido a que posee un dominio rico en cisteína, pudiendo participar sobre la adhesión celular como ha sido reportado también para ADAM.

La ciritestina es un proteína de 100 kD, la cual es proteolíticamente procesada a una forma más pequeña (55kD) consecuente al proceso de maduración del espermatozoide

(paso a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo). Ha sido localizada en la MAI del acrosoma-reaccionado y en la región ecuatorial del acrosoma intacto y reaccionado del espermatozoide de ratones (Evans, 1999). La fertilina β y la ciritestina tienen un secuencia de aminoácidos similares en sus asas de desintegrina.

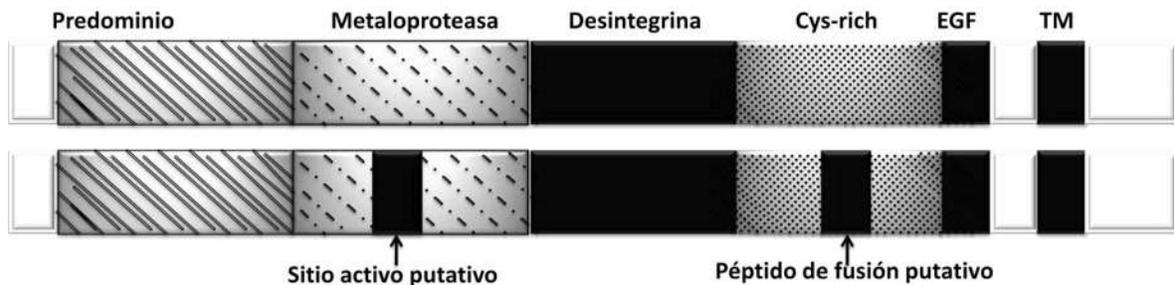


Figura 12. Diagrama de las estructuras de dominio de la proteína fertilina β y α .

Por otro lado, también se ha destacado la presencia de otra molécula en el espermatozoide llamada Izumo. Este complejo multi-molecular pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), como EWI-2 y EWI-M que están directamente relacionadas con la tetraspanina CD9. Es una proteína de membrana tipo I con un dominio extracelular de inmunoglobulina que al parecer contiene un sitio de glicosilación, la cual se expresa específicamente en los testículos y en los espermatozoides. Sin

embargo, en estos últimos sólo se expresa posteriormente a un evento denominado reacción acrosomal. Esta proteína fue encontrada en un gen homólogo al Izumo de ratón en el humano, el cual codifica para una proteína de 37.2 kDa, la cual también pudo ser identificada en el tejido de testículos y en espermatozoides humanos mediante western blot. Se cree que este pudiera servir como enlace entre las proteína de superficie y proteínas MTC (Radaxina, moesina y “ezrin”) (Inoue *et al.*, 2005).

b) Proteínas ovocitarias

Respecto al ovocito, las proteínas que se consideran implicadas en esta interacción son las integrinas y las *tetraspaninas* (Evans, 2002; Kaji and Kudo, 2004).

Las integrinas son una familia de receptores α (120-180kD) y β (90-110 kD) que forman heterodímeros unidos de forma no covalente. Las cadenas α contienen aproximadamente entre 1000 y 1200 residuos, en cambio las cadenas β tienen entre 760 y 790 residuos. Ambas subunidades son proteínas de tipo I transmembrana con dominios grandes extracelulares y dominios cortos citoplásmicos de 700-1100 y 30-50 residuos respectivamente (Humphries, 2000). La asociación de las dos subunidades puede formar proteínas con diferentes especificidades de ligación y consecuentemente con diferentes actividades biológicas (Aparecida, 2008). La integrina $\alpha6\beta1$ es una de ellas, y se expresa en las células de la granulosa, regulando la luteinización de GC en

concordancia con su ligando laminina (Takao *et al.*, 1999). En el ovocito esta integrina es responsable de mediar la adhesión entre la fertilina β del espermatozoide (Aparecida, 2008).

Las tetraspaninas (Figura 13) son un grupo de proteínas hidrófobas que poseen como característica estructural peculiar cuatro dominios transmembranales, regiones N- y C-terminales intra-citoplásmicas, y dos asas extracelulares de distinto tamaño: SEL (asa extracelular corto) o EC1 (dominio extracelular 1) y LEL (asa extracelular largo o EC2 (dominio extracelular 2). También poseen 4-6 cisteínas conservadas, una secuencia CCG (cisteína-cisteína-glicina) en el asa extracelular mayor, así como residuos polares conservados en los dominios transmembranales. Las colas citoplásmicas N y C terminales contienen proteínas de señalización, como la PKC y/o fosfatil inositol-4cinasa (PI4-K) (Ovalle *et al.*, 2007). Algunas tetraspaninas son específicas de células y otras son muy ubicuas.

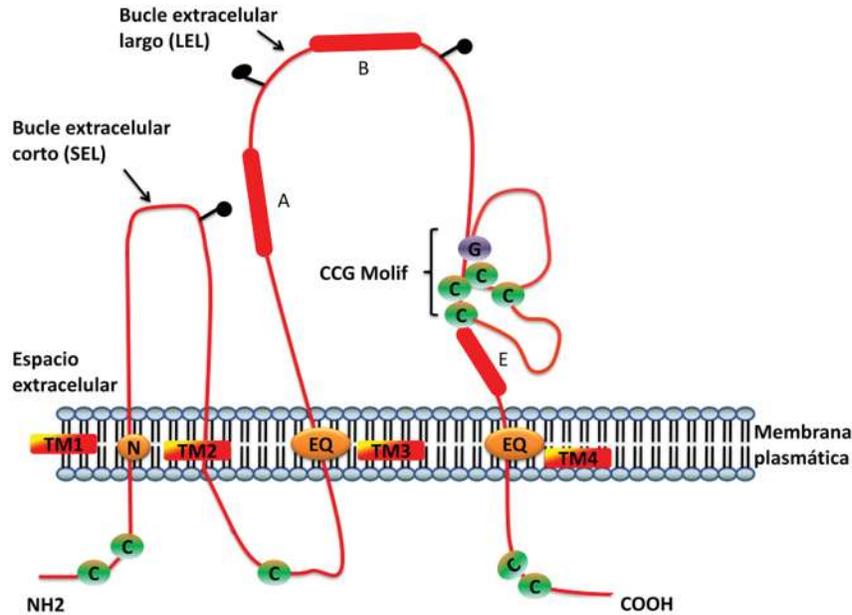


Figura 13. Estructura general de la tetraspanina.

Las Tetraspaninas presentan cuatro dominios de membrana (TM), que contienen residuos polares conservados (óvalos verdes) y dos asas delimitadas de tamaño desigual (Asa extracelular corto (SEL) y asa extracelular larga (LEL), respectivamente. Ambas asas pueden contener uno o varios sitios de glicosilación (Varillas “rods”negras), dependiendo de la tetraspanina considerada. Los residuos de cisteína conservados son representados por los círculos de color azul. Debido a la formación de lazos de disulfuro (líneas negras) entre la cisteína de CCG y otras cisteínas conservadas en LEL, este dominio se pliega y adopta una forma de “hongo”.

El número de lazos de disulfuro oscila de 2 a 5 entre las diferentes tetraspaninas. Varias cisteínas conservadas también están presentes en el asa intracelular así como en el terminal N y C, la cual representa sitios potenciales de palmitilación, la cual contribuye a la interacción tetraspanina-tetraspanina. Las tetraspaninas interactúan con diferentes tipos de proteínas, tales como las integrinas, los receptores de membrana así como las moléculas de señalización intracelular. Pueden interactuar también con otras tetraspaninas para formar un complejo más grande, cuyo núcleo esté formado por seis tetraspaninas, rodeado de varias proteínas asociadas (tetraspaninas).

Estos complejos más globales pueden comportarse como un microdominio de membrana (TEMs, “Tetraspanin-enriched microdomains”, por sus siglas en inglés) denominados “red de tetraspaninas”, funcionalmente distintos a las balsas lipídicas. La gran heterogeneidad en su composición y la dinámica de los complejos de tetraspaninas hace que se identifiquen como proteínas “adaptadoras” o “facilitadoras”, permitiendo su participación en la regularización de la señalización del factor de crecimiento y en la modulación de la integrina, mediando las células después de los acontecimientos de fusión celular, adhesión, migración de la diferenciación y transducción de señales (Hemler 2003; Yunta y Lazo, 2003; Ovalle *et al.*, 2007).

La CD9 es una tetraspanina de 21-24 kDa, que se encuentra en la membrana plasmática de los ovocitos en folículos antrales como en folículos preovulatorios (Chen *et al.*, 1999). La CD9 parece ser crítica para el proceso de fusión de gametos, aunque el mecanismo de esta proteína en la fusión de membranas no es claro (Le Naour *et al.*, 2000; Miyado *et al.*, 2000). Al respecto Olivera *et al.* (2006),

mencionan que la mayor de las asas de CD9 se fijan a los complejos de fusión del espermatozoide. Mientras que un estudio realizado por Barraud *et al.* (2007), indicó que la CD9 causa modificaciones en la membrana del ovocito.

No obstante, a pesar de tales discrepancias del modo de actuar de CD9, se sabe con seguridad que existe una asociación entre la $\alpha 6\beta 1$ y CD9 (Figura 14), mencionando al respecto que la presencia o ausencia de esta última influye en la elevación intracelular de Ca^{++} y la fosforilación de tirosinas (Takahashi *et al.*, 2001).

Hoy en día Barraud *et al.* (2007), han planteado la hipótesis de que la tetraspanina es transferida del ovocito (dentro de proceso de fertilización) al espermatozoide en el momento que éste ocupa el espacio perivitelino antes de la fertilización. La adquisición de CD9 por el espermatozoide resulta de la transferencia de fragmentos de membrana de la membrana plasmática del ovocito, en un proceso similar a trogocitosis, un mecanismo recientemente descrito de intercambio intercelular de parches de membranas.

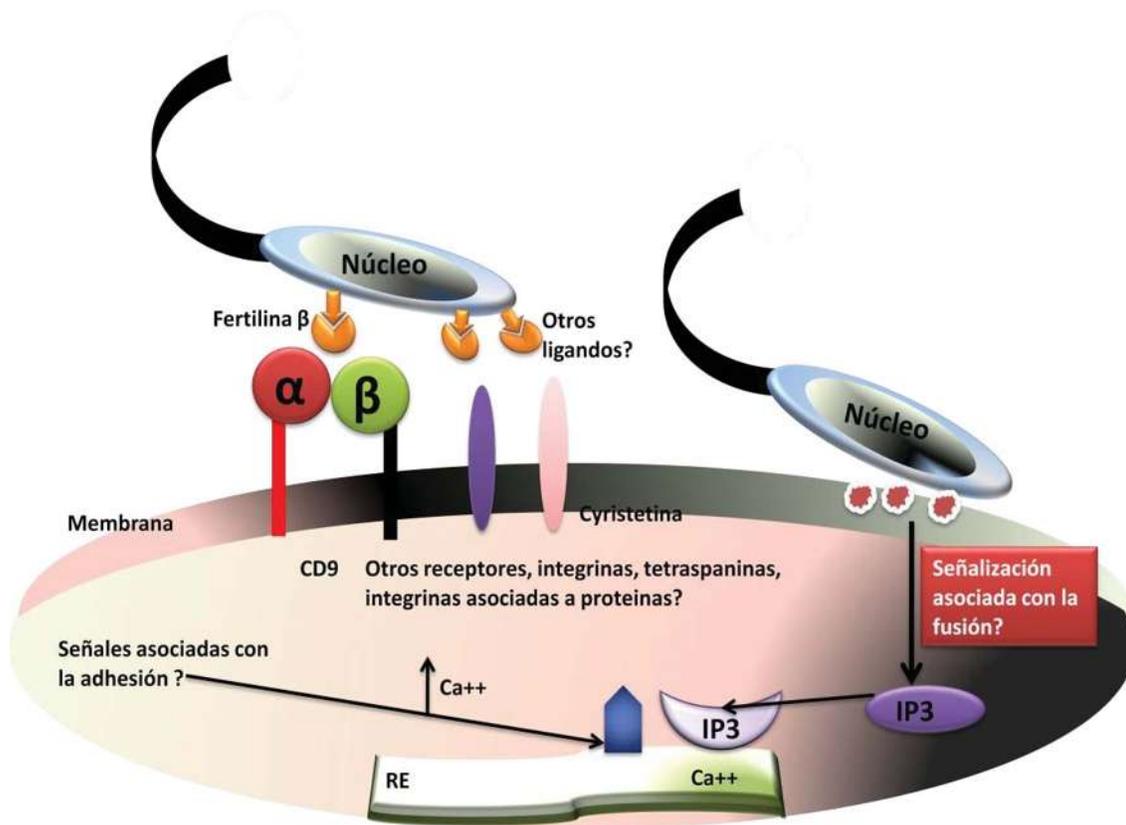


Figura 14. Adhesión espermatozoide-ovocito.

La adquisición de CD9 por el espermatozoide puede ser crucial para la reorganización de la membrana que el espermatozoide requiere para fusionarse con el ovocito. (Figura 14). Estos mismos investigadores recientemente han encontrado que la integrina $\alpha 1\beta 6$ es también expresada sobre la membrana del espermatozoide y es transferida del ovocito al espermatozoide pre-fertilización, junto con otra tetraspanina llamada CD81.

FUSION ESPERMATOZOIDE OVOCITO

La fusión entre el espermatozoide y el ovocito permite la liberación de un factor espermático (SF) en el interior del ooplasma que es capaz de inducir los eventos tempranos de la cascada de la activación (Swann, 1990). Este factor, que se dispone en la cabeza espermática debe inducir oscilaciones de

Ca^{++} (50 a 100-600 nmol/litro) similares a las producidas durante la fecundación y debe inducir la liberación de Ca^{++} del RE vía InsP3-R (Perry *et al.*, 2000). Aún y cuando se han propuesto varias proteínas candidatas al factor espermático entre ellas Oscillina y Receptor c-kit, se han considerado con mayor posibilidad una PLCZ (fosfolipasa C isoforma Z) y una proteína presente en la teca peri-nuclear llamada PT32 (Williams, 2002; Shoji, 2006).

La PLCZ (70 kDa) es una nueva isoforma de la familia de PLC identificada en el testículo de ocho especies mamíferas (Saunders *et al.*, 2002; Kurokawa *et al.*, 2004; Swann y Yu, 2008). Ésta es capaz de inducir oscilaciones del Ca^{++} que activan al ovocito (Shoji, 2006). Se ha demostrado que la PLCZ se acumula en el pronúcleo (Larman *et al.*, 2004) y que al ser aislada cesa las oscilaciones de Ca^{++} (Marangos *et al.*, 2003) lo cual la hace un excelente candidato para ser el SF (Fujimoto *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha clonado una proteína de la estructura que rodea el núcleo del espermatozoide (teca perinuclear [PT]), conocida como PT32 (32kDa) la cual se presenta también como candidato para ser el SF (Perry *et al.*, 2000; Oko *et al.*, 2001; Williams, 2002).

La PT32 contiene una secuencia de amino ácidos que ata a dominios WW, proteínas moduladoras relacionadas con los dominios homólogos de Src (Sudol *et al.*, 1995). Esta proteína tiene localización post-acrosomal (PAS, postacrosomal sheath, por sus siglas en inglés), una de las primeras regiones de la PT expuestas al ooplasma del ovocito después de que éste penetra la ZP, su solubilización es un proceso rápido. Aún y cuando la PT32 pudiera iniciar la activación del ovocito, y de las moléculas con las cuales interacciona dentro de éste, el mecanismo es aún desconocido. Lo que se sabe hasta ahora es que la presencia de esta proteína conduce al inicio de las ondas de Ca^{++} , que a su vez induce a la activación del ovocito, que termina con la formación de los pro-núcleos (Williams, 2002).

La superficie de los ovocitos está cubierta con microvellosidades con excepción de la región sobrepuesta al huso meiótico. La cabeza del espermatozoide se fusiona con el ovocito en la región que precede al huso meiótico (Kaji y Kudo, 2004). Una vez dentro del oolema, la incorporación del espermatozoide es detenida por microfilamentos con citocalasina B (CB), pero ello no impide la activación de los ovocitos (Zheng, 2008). De hecho, el ovocito conserva su capacidad para

fusionarse con la membrana de los espermatozoides y por consiguiente, el SF se libera y disuelve en el oolema (Sutovski *et al.*, 2003).

En los mamíferos, los niveles del Ca^{++} intracelular oscilan repetitivamente hasta varias horas después de la fusión espermatozoide-ovocito (Miyazaki *et al.*, 1993), cesando aproximadamente al tiempo de la formación perinuclear (Kurokawa *et al.*, 2004). Sin embargo, no se sabía si el largo período de las oscilaciones del Ca^{++} era debido a la lenta liberación del SF o a la persistente actividad del factor (Kurokawa *et al.*, 2004).

Actualmente se sabe que la liberación del SF se completa entre 1-2h después de que el espermatozoide entra al ovocito (Knott *et al.*, 2003). La elevación intracelular de Ca^{++} causa la exocitosis de los gránulos corticales que contienen enzimas tales como la serina-proteasa y la acrosina, que modifican a la ZP. Se cree que en este proceso podría estar implicada la CAMKII (calcmodulina-dependiente de proteína-cinasas) (Abou-Haila y Tulsiani 2000; Abbott y Ducibella, 2001), la que contribuye además en el reordenamiento del citoesqueleto que ocurre durante la activación del ovocito (Johnson *et al.*,

1998). Aunque también se ha considerado la presencia de la PKC tanto en la exocitosis así como en la extrusión del segundo cuerpo polar y el reordenamiento interno del citoesqueleto (Williams, 2002). En los cambios bioquímicos (Figura 15) que ocurren en el ovocito para que se libere el Ca^{++} intracelular y se produzcan los eventos corriente abajo, podrían estar involucradas las cinasas de la familia de las Src-tirosina cinasa (Giusti *et al.*, 2000). Entre éstas, la c-Fyn (Talmor *et al.*, 1998), y la c-Yes (Sutovsky *et al.*, 2001) están distribuidas en la corteza del ovocito. La c-Fyn también se encuentra alrededor del huso mitótico; la activación de esta cinasa resulta en la activación de la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la hidrólisis del PIP2 a DAG e IP3. La IP3 actúa en el receptor de IP3 (IP3R) que se encuentra en el retículo endoplásmico y hace liberar el Ca^{++} . La continua producción de IP3 se cree que mantiene la persistencia de las oscilaciones (Ross *et al.*, 2008). Una vez que se produce la fusión entre ambos gametos, se desencadena la activación del ovocito (Yanagimachi, 1994). Dicha activación lleva como consecuencia la reanudación de la meiosis (Ben-Yosef y Shalgi, 2001).

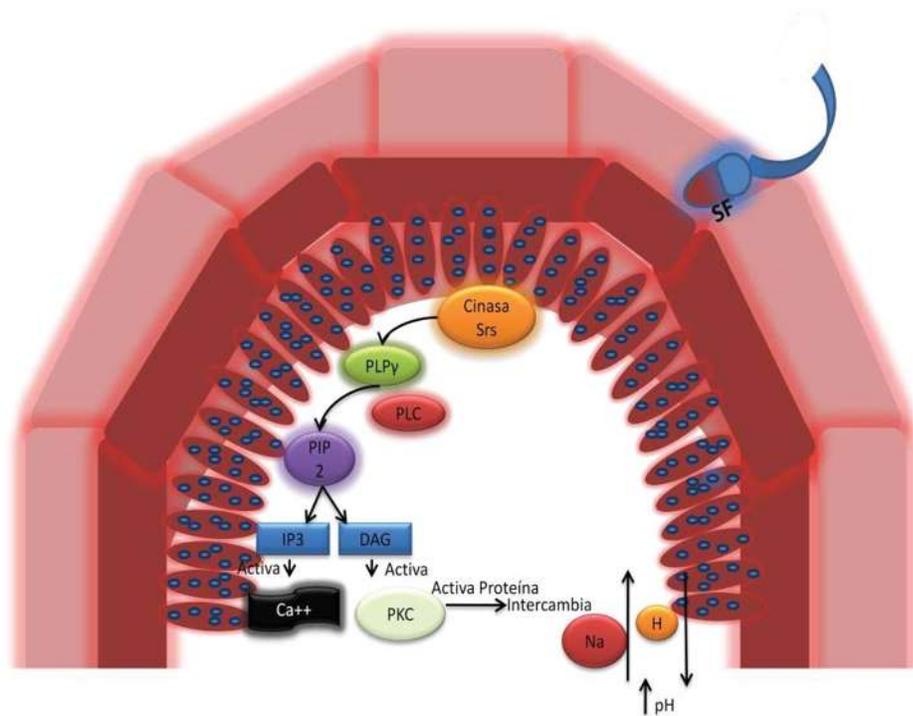


Figura 15. Cascada bioquímica en el ovocito para la liberación de Ca^{++} .

Cuando el citoplasma ovocitario integra al genoma y al centriolo del espermatozoide; se suscitan una serie de eventos que incluyen: 1) La decondensación de la cromatina del espermatozoide, el ingreso al espacio nuclear espermático y ovocitario de sustancias necesarias para los cambios inmediatos y expulsión el segundo corpúsculo polar; 2) El reemplazo de las proteínas cromatínicas espermiales por histonas ovocitarias; 3) La duplicación del centriolo del espermio; 4) La absorción de la carioteca del espermio y construcción de

una nueva; 5) La modificación de la carioteca y del núcleo del ovocito; 6) La modificación del *imprinting* genómico de ambos genomas; 7) El inicio de la transcripción de ARNs; y 8) El inicio de la duplicación de ambos genomas nucleares. Con el proceso de decondensación de ambas cromatinas, reconstitución de ambas cariotecas y modificación de ambos ambientes nucleares, se realiza la construcción de ambos pronúcleos para la formación del embrión (Valenzuela, 2007).

LITERATURA CITADA.

1. Aarons D, Boettger-Tong H, Holt G, Poirier GR. 1991. Acrosome reaction induced by immunoaggregation of a proteinase inhibitor bound to the murine sperm head. *Mol Reprod Dev.* 30:258-264.
2. Abbott AL, Ducibella T. 2001. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci.* 6:D792-806.
3. Abdullah M, Widgren, EE, O'Roand MG. 1991. A mammalian sperm lectin related to the rat hepatocyte lectin-2/3. Purification from rabbit testis and identification as a zona binding protein. *Mol Cell Biochem.* 103: 155-161.
4. Abou-Haila A, Tulsiani DR. 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function. *Arch Biochem Biophys.* 379:173-182.
5. Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J, Wolf E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int J Dev Biol.* 45: 797-809.
6. Anguita BB. 2007. Tesis doctoral. Estudio molecular y de apoptosis en ovocitos de cabras prepúberes y su relación con el desarrollo embrionario. Unidad de Producción Animal del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universidad Autònoma de Barcelona. Pp. 201.
7. Aparecida CM. 2008. Dissertação submetida ao corpo docente do laboratório nacional de computação científica como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Ciências em Modelagem Computacional. Estudo por modelagem e dinâmica molecular da interação da integrina $\alpha 6\beta 1$ com o domínio tipo-disintegrina de ADAM2 e ADAM9 humanas. Petrópolis, RJ – Brasil. Pp-165.
8. Austin CR. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature.* 170:326.
9. Aviles M, Okinaga T, Shur BD, Ballesta J. 2000. Differential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 57:296-308.
10. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. 2000. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci.* 5:E110-123.

11. Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Bomsel M, Wolf, JP, Ziyat A. 2007. Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *FASEB J.* 21: 3446-3449.
12. Belmonte-Martín F, Millán J. 2001. Revisión. Estructura y función de las balsas lipídicas (“rafts”), dominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol. *Inmunología* 4:216-224
13. Ben-Yosef D, Shalgi R. 2001. Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends Mol Med.* 7: 163-169.
14. Berridge MJ. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol.* 200:315-319.
15. Bleil JD, Wassarman PM. 1980. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20:873-882.
16. Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature.* 356:248-252.
17. Boarelli, P.V., Cattaneo, C.B., Monclus, M.A., Fornés, M. 2007. Detección de la capacitación espermática basada en la visualización de los componentes lipídicos de microdominios de membrana. *Revista Medica Universitaria* 3:1-10.
18. Boerke A, Tsai PS, García-Gil, N, Brewis IA., Gadella BM. 2008. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology.* 70:1188-1196.
19. Boiso FI. 2001. Efecto de la criopreservación sobre la estructura del huso meiótico de ovocitos humanos madurados *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra España. 161 p
20. Brañes, OMC, Sáez RA, Villalón BMJ, Saéz CJC. 2004. Uniones en hendidura y su papel funcional en el tracto reproductivo femenino. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 69:60-66.
21. Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 129:263-268.
22. Breitbart H, Spungin B. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod.* 3:195-202.

23. Breitbart H. 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol.* 187:139-144.
24. Brooks DE. 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci.* 36: 205-221.
25. Burnett LA, Xiang X, Bieber AL, Chandler DE. 2008. Crisp proteins and sperm chemotaxis: discovery in amphibians and explorations in mammals. *Int J Dev Biol.* 52: 489-501.
26. Busso D, Cohen DJ, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicú PS. 2005. Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction. *Mol Hum Reprod.* 11:299-305.
27. Caballero PI. 2007. Estudio del plasma seminal y la espermadhesina PSP-I/PSP-II sobre la funcionalidad de los espermatozoides de verraco. Facultad de Veterinaria. Departamento de medicina y cirugía animal. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. 215 p
28. Calvete JJ, Sanz L, Dostalova Z, Töpfer-Petersen E. 1995. Spermadhesins: sperm-coating protein involved in capacitation and zona pellucida binding. *Fertilität.* 11:35-40.
29. Canovas BS. 2007. Interacciones homólogos y heterólogos *in vitro* de gametos porcinos, bovinos y humanos, y sus aplicaciones en el estudio de la fecundación. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. 203 p.
30. Cardona MWD, Cadavid JAP. 2004. Complementariedad intergametos: Breve revisión. *Arch Esp Urol.* 57: 1107-1112.
31. Cardona-Maya WD., Cadavid AP. 2005. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urol Esp.* 29:676-684.
32. Chaib OI. 2004. Modulación de la transducción de la señal asociada a receptores tirosina quinasa por el fragmento C-terminal de la toxina tetánica en tejido nervioso. Doctorado en Bioquímica. Tesis Doctoral. Barcelona, España. 214 p
33. Chang MC. 1984. The meaning of sperm capacitation. *J Androl.* 5:45-50.
34. Chen MS, Tung, KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC, White, JM. 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in

- binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 11830-11835.
35. Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Bucks J. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289: 625-628.
 36. Ciliberto A, Tyson JJ. 2000. Mathematical model for early development of the sea urchin embryo. *Bull Math Biol*. 62:37-59.
 37. Clark GF, Dell A. 2006. Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem* 281:13853- 13856.
 38. Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, Cuasnicu PS. 2008. Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *Int J Dev Biol*. 52: 737-742.
 39. Cohen DJ, Da-Ros V, Busso D, Maldera J, Goldweic N, Cuasnicu PS. 2006. Molecular mechanisms involved in gamete interaction. *Anim Reprod*. 3:127-129.
 40. Cohen DJ, Ellerman DA, Busso D, Morgenfeld MM, Piazza AD, Hayashi M, Young ET, Kasahara M, Cuasnicu PS. 2001. Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg. *Biol Reprod*. 65:1000-1005.
 41. Colás C, Grasa P, Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 2009. Changes in calmodulin immunocytochemical localization associated with capacitation and acrosomal exocytosis of ram spermatozoa. *Theriogenology* 15:789-800.
 42. Companyó M, Iborra A, Villaverde J, Martínez P, Morros A. 2007. Membrane fluidity changes in goat sperm induced by cholesterol depletion using beta-cyclodextrin. *Biochim Biophys Acta*. 1768:2246-2255.
 43. Companyo, CM. 2004. Paper dels lípids de membrana en la capacitació i reacció acrosòmica e l' espermatozoide de Boc: Estudis biofísics. Unitat de Biofísica. Memòria presentada per a optar al grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular. Departament de bioquímica i Biologia Molecular. Tesis Doctoral. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona.

44. Cornwall GA, Tulsiani DR, Orgebin-Crist MC. 1991. Inhibition of the mouse sperm surface alpha-D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol Reprod.* 44: 913-921.
45. Cran DG, Cheng WTK. 1986. The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization. *Gamete Research* 13:241-251.
46. Cummins JM, Yanagimachi R. 1982. Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Research* 5: 239-256.
47. Darszon A, Treviño CL, Wood C, Galindo B, Rodríguez-Miranda E, Acevedo JJ, Hernandez-González EO, Beltrán C, Martínez-López P, Nishigaki T. 2007. Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 65: 229-244.
48. Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Treviño CL, Wood C, Beltrán C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131: 977-988.
49. Darszon A, Beltrán C, Felix R, Nishigaki T, Treviño CL. 2001. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol.* 240:1-14.
50. Dean J. 2004. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays.* 26:29-38.
51. Downs SM, Daniel SA, Eppig JJ. 1988. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J Exp Zool.* 245:86-96.
52. Dragileva E, Rubinstein S, Breitbart H. 1999. Intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod.* 61:1226-1234.
53. Dunbar BS, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel D, Skinner S, Wilkins B. 1994. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod Fertil Dev.* 6:331-347.
54. Eppig JJ. 1993. Regulation of mammalian oocyte maturation. In the ovary. Leung CKP & Adashi YE, (editors). Leung Raven Press, New York, USA, 185-208 pp.
55. Eppig JJ, Downs SM. 1987. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Dev Biol.* 119:313-321.

56. Espinosa F, López-González I, Muñoz-Garay C, Felix R, De la Vega-Beltrán JL, Kopf GS, Visconti PE, Darszon A. 2000. Dual regulation of the T-type Ca(2+) current by serum albumina and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FBS Lett.* 475: 251-256.
57. Evans JP. 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod Update* 8:297-311.
58. Evans, P.J. 1999. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front Biosci.* 4:D114-131.
59. Familiari G, Relucenti M, Heyn R, Micara G, Correr S. 2006. Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microsc Res Tech.* 69:415-26.
60. Fayrer-Hosken RA, Caudle AB, Shur BD. 1991. Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Mol Reprod Dev.* 28:74-78.
61. Felix R. 2005. Molecular physiology and pathology of CA2+ conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm. *Reproduction* 129:251-262.
62. Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, Marto JA, Shabanowitz J, Herr JC, Hunt DF, Visconti PE. 2003. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem.* 278: 11579-11589.
63. Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta.* 1469:197-235
64. Fissore RA, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction.* 124:745-754.
65. Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amanai M, Isobe T, Itagaki C, Izumi T, Perry AC. 2004. Mammalian phospholipase Czeta induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev Biol.* 274:370-383
66. Fukami K, Yoshida M, Inoue T, Kurokawa M, Fissore RA, Yoshida N, Mikoshiba K, Takenawa T. 2003. Phospholipase Cdelta4 is required for Ca 2+ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol.* 161: 79-88.

67. Gadella BM. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci.* 107:229-236
68. García RE. 2005. Análisis de diferentes factores que afectan al rendimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
69. Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL. 1990. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60: 487-494.
70. Gil Villa AM, Cardona-Maya WD, Cadavid Jaramillo AP. 2007. Early embryos death: does the male factor play a role? *Arch Esp Urol.*60: 1057-1068.
71. Gilula NB, Epstein ML, Beers WH. 1978. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol.* 78: 58-75.
72. Giusti AF, Xu W, Hinkle B, Terasaki M, Jaffe LA. 2000. Evidence that fertilization activates starfish eggs by sequential activation of a Src-like kinase and phospholipase cgamma. *J Biol Chem.* 275: 16788-16794.
73. Gordo AC, He CL, Smith S, Fissore RA. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 59:106-114.
74. Granot I, Dekel N. 1998. Cell-to-cell communication in the ovarian follicle: development and hormonal regulation of the expression of connexin 43. *Hum. Reprod.* 13: 85-97. Suppl 4.
75. Guo M, Teng M, Niu L, Liu Q, Huang Q, Hao Q. 2005. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold. *J Biol Chem.* 280: 12405-12412.
76. Hardy DM, Garbers DL. 1994. Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. *J Biol Chem.* 269:19000-19004.
77. Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* 4:361-393.
78. Hemler ME. 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:397-422.

79. Hoodbhoy T, Joshi S, Boja ES, Williams SA, Stanley P, Dean J. 2005. Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J Biol Chem.* 280:12721-12731.
80. Huang TT Jr, Yanagimachi R. 1985. Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. *Am J Anat.* 174: 249-268.
81. Humphries JD, Askari JA, Zhang XP, Takada Y, Humphries MJ, Mould AP. 2000. Molecular basis of ligand recognition by integrin $\alpha 5 \beta 1$. II Specificity of arg-gly-Asp binding is determined by Trp157 of the α subunit. *J Biol Chem.* 275: 20337-20345.
82. Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
83. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 434:234-238.
84. Johnson J, Bierle BM, Gallicano GI, Capco DG. 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and calmodulin: regulators of the meiotic spindle in mouse eggs. *Dev Biol.* 204:464-477.
85. Jones KT. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod.* 10:1-5.
86. Josephsberg LB, Dekel N. 2002. Translational and post-translational modifications in meiosis of the mammalian oocyte. *Mol Cell Endocrinol.* 187:161-171.
87. Joven J. 2001. Mecanismos de entrada y salida del colesterol de las células y del organismo: implicaciones para el tratamiento farmacológico. *Cardiovascular risk factors.* 10:135-142.
88. Kaji K, Kudo A. 2004. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127:423-429.
89. Kalab P, Kubiak JZ, Verlhac MH, Colledge HW, Maro B. 1996. Activation of p90^{rsk} during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and dependent activation. *Development* 122: 1957-1964.
90. Killan JA. 1998. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1376:401-415.

91. Kim KS, Cha MC, Gerton GL. 2001 Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol Reprod.* 64:36-43.
92. Kim, E., Baba, D., Kimura, M., Yamashita, M., Kashiwabara, S., Baba, T. 2005. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *P. Natl. Acad. Sci. USA*; 102:18028-18033.
93. Knott JG, Kurokawa M, Fissore RA. 2003. Release of the Ca (2+) oscillation inducing sperm factor during mouse fertilization. *Dev Biol.* 260:536-547.
94. Krisher RL. 2004. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci.* 82 E-Suppl:14-23.
95. Kulanand J, Shivaji S. 2001. Capacitation-associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hiperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa. *Andrologia* 33:95-104.
96. Kurokawa M, Sato K, Fissore AR. 2004. Mammalian fertilization: from sperm factor to phospholipase Czeta. *Biol Cell.* 96:37-45.
97. Larman MG, Saunders CM, Carroll J, Lai FA, Swann K. 2004. Cell cycle-dependent Ca²⁺ oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. *J Cell Sci* 117: 2513-2521.
98. Larson JL, Miller DJ. 1997. Sperm from a variety of mammalian species express beta 1,4-galactosyltransferasa on their surface. *Biol Reprod.* 57:442-453.
99. Lax Y, Rubinstein S, Breitbart H. 1994. Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. *FEBS Lett.* 339:234-238.
100. Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin, C, Prenant M, Boucheix C. 2000. Severely reduced female fertility in CD9- deficient mice. *Science*; 287: 319–321
101. Lee MA, Storey BT. 1989. Endpoint of first stage of zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa characterized by acrosomal H⁺ and Ca²⁺ permeability: population and single cell kinetics. *Gamete Res.* 24:303-326.
102. Lefièvre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod.* 19:1580-1586.
103. Leyton L, Saling P. 1989. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol.* 108:2163-2168.

104. Lodish, H., Berk, A., Lawrence, Z., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2003. Molecular Cell Biology. 5ta. Edición. Edi. Panamericana. Chapter 5. Pp 147-195
105. López, SY, Mejía, MA, Escobar, EE, Agudelo, JB., Vázquez ANA., Echavarría H, Zoot MS. 2008. Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa tipo 4-rolipram, sobre la maduración *in vitro* de oocitos bovinos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 21: 59-65
106. Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Méry J, Means A, Dorée M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. Nature 366: 270-273
107. Machida YJ, Dutta A. 2007. The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. Genes Dev. 21:184-194.
108. Marangos P, FitzHarris G, Carroll J. 2003. Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. Development 130: 1461-1472.
109. Mayoral R, Fernández MA, Roy R, Boscá L, Martín, SP. 2007. Papel de la caveolina-1 en la regeneración hepática tras hepatectomía parcial. Mecanismos de señalización y función en la regulación de la proliferación hepática. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia 73: 1093-1126.
110. Meyers SA, Rosenberger AE. 1999. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. Biol Reprod. 61:444-451.
111. Miller DJ, Macek MB, Shur BD. 1992. Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. Nature; 357:589-593.
112. Miller DJ, Shi X, Burkin H. 2002. Molecular basis of mammalian gamete binding. Recent Prog Horm Res. 57:37-73.
113. Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. Science. 287: 321-324.
114. Miyasaki SI, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. 1993. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. Dev Biol. 158: 62-78.

115. Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J Jr. 1998. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update* 4: 223-236.
116. Morales P, Vigil P, Franken DR., Kaskar K, Coetzee K, Kruger TF. 1994. Sperm-oocyte interaction: studies on the kinetics of zona pellucida binding and acrosome reaction of human spermatozoa. *Andrologia* 26:131-137.
117. Moss J, Visconti PE, Moore GD, Schultz RM, Kopf GS. 1995. Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse egg. *Biol Reprod.* 53: 692-99.
118. Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Domest Anim.* 43:18-31.
119. Muñoz-Garay C, De la Vega-Beltan JL, Delgado R, Labarca P, Felix R, Darszon A. 2001. Inwardly rectifying K⁽⁺⁾ channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol.* 234: 261-274.
120. Newton AC. 1995. Protein kinase C: structure, function and regulation. *J Biol Chem.* 270: 28495-28498.
121. Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:503-508.
122. Nurse PM. 2002. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Bioscience Report* 22:487-499.
123. Oko R, Aul RB, Wu A, Sutovski P. 2001. The sperm head cytoskeleton. In Robaire, B., Chemes, H., Morales, C.R. (editors) *Andrology in the 21 st Century*. Medimond Publishing Co. Englewood, NJ, USA, 37-51 pp.
124. Olds-Clarke P. 2003. Unresolved issues in mammalian fertilization. *Int Rev Cytol.* 232: 129-184.
125. Olivera M, Ruíz T, Tarazona A, Giraldo C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Colom Cienc Pecua.* 19: 426-436.
126. Ovalle S, Gutiérrez-López M.D., Monjas, A., Cabañas, C. 2007. Implication of the tetraspanin CD9 in the immune sytem and cancer. *Inmunología.* 26: 65-72.
127. Palma GA. 2001. *Biotechnology de la Reproducción*. Primera Ed. Edi. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Impreso Argentina. Octubre 2001. pp 695.

128. Parillo F, Dall'Aglio C, Verini Supplizi A, Ceccarelli P, Gargiulo AM. 2003. Immunogold study on lectin binding in the porcine zona pellucida and granulosa cell. *Eur J Histochem.* 47: 353-58.
129. Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR. 2004. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril.* 81:850-856 Suppl 1.
130. Perry AC, Wakayama T, Cooke IM, Yanagimachi R. 2000. Mammalian oocyte activation by the synergistic action of discrete sperm head components: induction of calcium transients and involvement of proteolysis. *Dev Biol.* 217: 386-393.
131. Peters JM. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* 9:931-943.
132. Peterson RN, Campbell P, Hunt WP, Bozzola JJ. 1991. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis characterization of APz, a sperm protein involved in zona binding in the pig and evidence for its binding to specific zona glycoproteins. *Mol Reprod Dev.* 28: 260-271.
133. Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL. 2008. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction* 136:703-715.
134. Primakoff P, Hyatt H, Myles D.G. 1985. A role for the migrating sperm surface antigen PH20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol.* 101:2239-2244.
135. Reimann JD, Freed E, Hsu JY, Kramer ER, Peters JM, Jackson PK. 2001. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* 105:645-655
136. Relucenti M, Heyn R, Correr S, Familiari G. 2005. Cumulus oophorus extracellular matrix in the human oocyte: a role for adhesive proteins. *Ital J Anat Embryol.* 110:219-224 Part 2, Suppl 1.
137. Richardson RT, Yamasaki N, O'Rand MG. 1994. Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Dev Biol.* 165: 688-701.
138. Roberts KP, Johnston DS, Nolan MA, Wooters JL., Waxmonsky NC, Piehl LB, Ensrud-Bowlin KM, Hamilton DW. 2007. Structure and function of epididymal protein cysteine-rich secretory protein-1. *Asian J Androl.* 9:508-514.

139. Rockwell PL, Storey BT. 2000. Kinetics of onset of mouse sperm acrosome reaction induced by solubilized zona pellucida: fluorimetric determination of loss of pH gradient between acrosomal lumen and medium monitored by dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide and of intracellular Ca(2+) changes monitored by fluo-3. *Mol Reprod Dev.* 55:335-349.
140. Rodríguez-Martínez H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68: 138-146. Suppl 1.
141. Roldan ER. 1998. Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 3:D1109-1119.
142. Ross JP, Beyhan Z, Iager EA., Yoon SY, Malcuit C, Schellander K, Fissore RA, Cibelli JB. 2008. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C zeta. *BMC Dev Biol.* 8:16-28.
143. Saunders CM, Larman MG, Parington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129: 3533-3544.
144. Schmidt A, Rauh NR, Nigg EA, Mayer TU. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J Cell Sci.* 119:1213-1218.
145. Sela-Abramovich S, Chorev E, Galiani D, Dekel N. 2005. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology.* 146: 1236-1244.
146. Sleight SB., Miranda PV, Plaskett NW, Maier B, Lysiak J, Scrable H, Herr CJ., Visconti PE. 2005. Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol Reprod.* 73: 721-729.
147. Setchell, BP., Maddocks, S., Brooks, DE. 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In *The physiology of reproduction.* Knobil E. and Neill J.D. (Editors), 2nd edition. 1063-1175 pp. Raven Press, New York USA.
148. Shimada M, Maeda T, Terada T. 2001. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cell are regulated by PKC and PI3-Kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol Reprod.* 64: 1255-1263.

149. Shimada M, Terada T. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells and oocytes is responsible for activation of oocyte mitogen-activated protein kinase during meiotic progression beyond the meiosis I stage in pigs. *Biol Reprod* 64:1106-1114.
150. Shoji Oda. 2006. Mammalian sperm factor and phospholipase C Zeta. *J Mamm Ova Res.* 23: 2-9.
151. Sinowatz F, Wessa E, Neumüller C, Palma G. 2003. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod Domest Anim.* 38:141-146.
152. Sirard MA, Richard F, Mayes M. 1998. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* 49: 483-497.
153. Slavík T, Fulka J. 1999. Oviduct secretion contributes to the establishment of species specific barrier preventing penetration of oocytes with foreign spermatozoa. *Folia Biol* 45:53-58.
154. Sleight SB., Miranda PV, Plaskett NW, Maier B, Lysiak J, Scrable H, Herr CJ., Visconti PE. 2005. Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol Reprod.* 73: 721-729.
155. Smith TT, Koyanagi F, Yanagimachi R. 1987. Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after natural mating and artificial insemination. *Biol Reprod.* 37: 225-234.
156. Smith TT, Yanagimachi R. 1991. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil.* 91: 567-573.
157. Su YQ, Rubinstein S, Luria A, Lax Y, Breitbart H. 2001. Involvement of MEK-mitogen-activated protein kinase pathway in follicle-stimulating hormone-induced but not spontaneous meiotic resumption of mouse oocytes. *Biol Reprod.* 65: 358-365.
158. Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL. 1991. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod.* 44: 375-381.
159. Suarez SS. 1996. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl.* 17:331-335.
160. Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P. 1995. Characterization of a novel protein-binding module- the WW domain. *FEBS Lett.* 369: 67-71.
161. Suri A. 2004. Sperm specific proteins-potential candidate molecules for fertility control. *Reprod Biol Endocrinol.* 10:2-10.

162. Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. 2003. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc Res Tech.* 61: 362-378.
163. Sutovsky, P., Wu, A.T.H., Takahashi, D., Benmusa, A., Schatten, G., Dominko, T., Oko, R. 2001. Oocyte activation by mammalian sperm perinuclear theca proteins PT 32 and tyrosine kinase c-Yes. 42. In: Program of the American Society of Cell Biology Annual Meeting; 2002; San Francisco, CA. Abstract 114.
164. Swann K, Yu Y. 2008. The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *Int J Dev Biol.* 52: 585-594.
165. Swann K. 1990. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 110:1295-1302.
166. Takahashi, Y, Bigler D, Ito Y, White JM. 2001. Sequence-specific interaction between the desintegrin domain of mouse ADAM3 and murine eggs: role of beta 1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell* 12: 809-820.
167. Takao Y, Fujiwara H, Yamada S, Hirano T, Maeda M, Fujii S, Ueda M. 1999. CD9 is expressed on the cell surface of human granulosa cells and associated with integrin alpha6beta1. *Mol Hum Reprod.* 5: 303-310.
168. Talmor A, Kinsey WH, Shalgi R. 1998. Expression and immunolocalization of p59c-fyn tyrosine kinase in rat eggs. *Dev Biol.* 194: 38-46.
169. Tanphaichitr N, Smith J, Mongkolsirikieart S, Gradil C, Lingwood CA. 1993. Role of a gamete-specific sulfoglycolipid immobilizing protein on mouse sperm-egg binding. *Dev Biol.* 156: 164-175.
170. Thibault C, Szöllösi D, Gérard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev.* 27: 865-896.
171. Thomas CM, Smart EJ. 2008. Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med.* 12:796-809.
172. Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. 2002. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol* 244:215-225.

173. Tomes CN, De Blas GA, Michaut MA, Farré EV, Cherhitin O, Visconti PE, Mayorga LS. 2004. alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Mol Hum Reprod.* 11:43-51.
174. Tomes C. 2004. Mecanismo de fusión de membranas durante la exocitosis acrosomal. *Medicina* 64: 33-35 (Supl. II). Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas. Noviembre 16-20, 2004. Mar de Plata, Argentina.
175. Töpfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundrieser M, Waberski D, Drommer W. 2002. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *J Expe Zool.* 292: 210-215.
176. Udby L, Bjartell A, Malm J, Egesten A, Lundwall A, Cowland JB, Borregaard N, Kjeldsen L. 2005. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J Androl.* 26:333-342.
177. Urdaneta VAE. 2005. Utilización de compuestos tiol en la producción in vitro de embriones a partir de ovocitos de cabras prepúberes.. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. . Facultad de Veterinaria. 196p.
178. Valenzuela Carlos Y. 2007. Sobre el origen ontogénico del ser humano. La solución científica. *Rev Méd Chile* 135:121-126.
179. Vega HA, Treviño LC, Félix R. 2002. Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *Avance y Perspectiva* 21:89-95.
180. Vendrell J, Bonada M, Marqueta J, Torres M, Roses A, Idrobo J. 2003. Relación entre el cultivo de los embriones “sobrantes” y la tasa de implantación: una reflexión acerca de la calidad intrínseca de los embriones. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 20:89-98
181. Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, Tezon JG. 1990. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1054: 231-236.
182. 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.
183. Wade MA, Jones RC, Murdoch RN, Aitken RJ. 2003. Motility activation and second messenger signalling in spermatozoa from rat cauda epididymidis. *Reproduction* 125: 175-183.

184. Wang XM, Yew, N, Peloquin JG, Vande Woudet GF, Borisy GG. 1994. Mos oncogene product associates with kinetochores in mammalian somatic cells and disrupts mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:8329-8333.
185. Wassarman PM, Litscher SE. 2008. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucid. *Int J Dev Biol* 52: 665-676.
186. Wassarman PM. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *J Biol Chem*. 283:24285-24289.
187. Williams CJ. 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod Update* 8:313-321.
188. Wu B, Igotz G, Curreie WB, Yang X. 1997. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod*. 56: 253-259.
189. Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In *The physiology of reproduction*. (E. Knobil and J.D. Neill, Editors), Second edition. Raven Press, New York, USA. 189-317 pp.
190. Yuan R, Primakoff P, Myles DG. 1997. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J Cell Biol*. 137:105-112.
191. Yunta M, Lazo PA. 2003. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal* 15:559-564.
192. Zhang D, Gopalakrishnan M. 2005. Sperm ion channels: molecular targets for the next generation of contraceptive medicines? *J Androl*. 26:643-653.
193. Zhao XM, Songa XX, Kawai Y, Niwa K. 2002. Penetration in vitro of zona-free pig oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. *Theriogenology* 58:995-1006.
194. Zheng, Q. 2008. Contribution of a sperm protein, pawp, to the signal transduct pathway during vertebrate fertilization. Thesis submitted in conformity with the requeriments for the degree of Master of Sciece. Quee's University, Kingston, Ontario, Canada. 81 Pp.
195. Zhu X, Evans JP. 2002. Analysis of the roles of RDG-binding integrins, alpha4/alpha9 integrins, alpha-6 integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin beta (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane. *Biol Reprod*. 66:1193-1202.

La abundancia de palabras y la ignorancia predominan en la mayor parte de los hombres; si quieres sobresalir de la mayoría inútil, cultiva tu conocimiento y envuélvelo en nubes de silencio.