

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

## INFORME DE CONCLUSIÓN DE SERVICIO SOCIAL

**EFFECTO DE TRATAMIENTOS EN ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS  
DE EQUINO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PRONÚCLEOS, DESPUÉS DE LA  
ICSI EN OVOCITOS DE RATÓN.**

Prestador de Servicio Social:  
Vega Durán Alejandro  
Matrícula: 2173029548

Asesor:  
Interno: Dr. José Ernesto Hernández Pichardo  
Núm. Económico: 16587



Externo: Dr. José Luís Rodríguez Suástegui.  
Cédula Profesional: 9598993



Lugar de realización:  
Laboratorio "Manejo de la Reproducción", Universidad Autónoma Metropolitana,  
Unidad Xochimilco.

Fecha de inicio y término:  
24 de octubre del 2022 al 24 de abril del 2023.

<b>ÍNDICE</b>	<b>PAGINA</b>
<b>1.- RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>3.- MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Fertilización.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Agentes descondensantes.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2.1 Ditiotritol.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2.2 Glutación.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3 Modelo murino.....</b>	<b>8</b>
<b>4.- OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>9</b>
<b>5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>9</b>
<b>6.- METODOLOGÍA.....</b>	<b>9</b>
<b>6.1 Recuperación de ovocitos en metafase II.....</b>	<b>9</b>
<b>6.2 Preparación de los espermatozoides para ICSI.....</b>	<b>10</b>
<b>6.3 Estado acrosomal, viabilidad y descondensación de los espermatozoides.....</b>	<b>11</b>
<b>6.4 Técnica de la ICSI.....</b>	<b>12</b>
<b>6.5 Determinación de la activación y fertilización mediante pronúcleos</b>	<b>13</b>
<b>6.6 Análisis estadístico.....</b>	<b>13</b>
<b>7.- ACTIVIDADES REALIZADAS.....</b>	<b>14</b>
<b>8.- OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS.....</b>	<b>14</b>
<b>9.- RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>15</b>
<b>9.1 Recuperación de ovocitos en metafase II.....</b>	<b>15</b>
<b>9.2 Estado acrosomal y viabilidad de los espermatozoides.....</b>	<b>16</b>
<b>9.3 Descondensación de los espermatozoides.....</b>	<b>18</b>
<b>9.4 Determinación de la activación y fertilización mediante pronúcleos.....</b>	<b>20</b>
<b>10.- RECOMENDACIONES.....</b>	<b>22</b>
<b>11.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>22</b>

## 1.- RESUMEN

Actualmente, la Inyección intracitoplasmática del espermatozoide es una biotecnología eficiente para la fertilización de ovocitos de caballo *in vitro*, aunque en algunos casos, puede presentarse una descondensación retrasada y/o incompleta de la cabeza del espermatozoide, disminuyendo el porcentaje de ovocitos fertilizados. Para prevenir este inconveniente, se investigó el efecto del DTT y el glutatión en espermatozoides de equino descongelados, sobre la formación de pronúcleos, después de realizar la ICSI en ovocitos de ratón. Se obtuvieron en promedio 19 ovocitos por cada ratona. Al evaluar el estado acrosomal y la viabilidad de los espermatozoides, se observó que en el caso del DTT se registró mayor cantidad de espermatozoides sin presencia del acrosoma al compararlo con el control y el glutatión ( $P < 0.05$ ). Se evaluó la descondensación en los espermatozoides tratados con DTT, después de 15, 30, 45 y 60 minutos de tratamiento, y se obtuvo aproximadamente un 25% que presentaron un aumento del tamaño de la cabeza después de 60 minutos, esto no se observó en el control ni con el glutatión. Por último, los ovocitos activados, o sea, los que presentaron pronúcleo femenino fueron 68%, 64% y 77%, y los fertilizados, es decir, que presentaron los pronúcleos femenino y masculino fueron 6, 5 y 11% para el control, glutatión y DTT respectivamente, sin mostrar diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). Se concluye que el DTT tuvo un efecto descondensante en los espermatozoides después de 60 minutos, aumentando el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma. Se obtuvo el 69% de activación de los ovocitos de ratón, pero no se determinó un efecto significativo en la fertilización en ninguno de los tratamientos, después de la ICSI..

## 2.- INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías de la reproducción son un conjunto de técnicas que van desde la Inseminación Artificial (IA) hasta la clonación, todas ellas encaminadas para aumentar la eficiencia reproductiva de los animales (Ugalde, 2014). El uso de técnicas de reproducción asistida (TRA) ha sido de gran importancia para la producción ganadera, donde las principales TRA que han contribuido para este fin

son: IA, congelación de gametos y embriones, sincronización e inducción del estro, superovulación, sexado de semen y embriones, transferencia de embriones (TE), y la producción de embriones *in vitro* (PEIV) (Hadgu y Fesseha, 2020).

En este contexto, la PEIV se ha convertido en una opción accesible para los productores de carne y leche, además es una herramienta valiosa para aumentar y difundir la cantidad de embriones de animales de alto valor genético (Hansen, 2013; Durand et al., 2019).

La PEIV se define como un proceso de interacción entre los espermatozoides y ovocitos en condiciones de laboratorio. La PEIV se lleva a cabo de dos formas: a) colocando los ovocitos junto con los espermatozoides, para que estos últimos penetren en los ovocitos (FIV), y b) inyección de un espermatozoide en el ovoplasma de un ovocito en metafase II (ICSI por sus siglas en inglés) (Niemann y Seamark, 2018).

A diferencia de la mayoría de las especies de animales domésticos, la FIV en el caballo no ha tenido mucho éxito, aunque las razones siguen sin estar claras, se mencionan que los problemas están relacionados con el endurecimiento de la zona pelúcida (ZP) *in vitro* y la capacitación inadecuada de los espermatozoides, causando ya sea una o ambas; baja fertilización (Sansinena, 2020).

La ICSI por su parte, tiene la ventaja de eludir muchas barreras que existen durante la fertilización al depositar el espermatozoide directamente en el ooplasma. Normalmente durante la fertilización, el proceso de penetración de los espermatozoides en orden de secuencia es a través de las células del cúmulo-corona, ZP y oolema. Las primeras gestaciones en equinos y nacimientos vivos por ICSI se informaron entre el año 1996 y el año 2000 a partir de ovocitos derivados de matadero y ovocitos derivados de OPU de yeguas no preñadas, así como de yeguas preñadas (Sansinena, 2020). Desde entonces, esta técnica se ha seguido empleando y en la actualidad demuestra ser un método repetible y eficiente para la

fertilización de ovocitos de caballo *in vitro*, por lo que se ha convertido en el método de elección para la producción de embriones *in vitro* de esta especie (Hinrichs, 2007).

Sin embargo, en esta técnica pueden llegar a presentarse diversos problemas que afectan el porcentaje de ovocitos en los que se lleva a cabo la fertilización de manera exitosa. Por ejemplo, en el caso de los bovinos muchos de los ovocitos muestran una descondensación retrasada y/o incompleta de la cabeza del espermatozoide (Águila et al., 2017). Y para intentar prevenir este inconveniente, se han usado diferentes agentes descondensantes, como el tratamiento con heparina y glutatión (Sekhavati et al., 2012), para estimular la descondensación de la cromatina del espermatozoide.

### **3.- MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Fertilización**

La fertilización es el proceso por el cual los gametos haploides, el espermatozoide y el óvulo se unen para producir un individuo genéticamente distinto (Florman y Fissore, 2015).

Los espermatozoides comienzan y posiblemente completan la reacción acrosomal durante el tránsito a través del cúmulo, posteriormente los espermatozoides que sufren el proceso de reacción acrosomal total o parcial se adhieren a la zona pelúcida mediante la asociación de sitios de adhesión, ya sea en la membrana acrosomal interna o dentro de la matriz acrosomal, después de la adhesión, los espermatozoides penetran en la zona pelúcida y se fusionan con la membrana plasmática del óvulo; lo que ocasiona un bloqueo a la polispermia por parte del óvulo (Florman y Fissore, 2015).

La reacción espermatozoide-acrosoma expone la membrana interna del acrosoma (IAM), donde ocurren las interacciones iniciales con el oolema, pero es el segmento ecuatorial del espermatozoide y las regiones posteriores de la cabeza las que se asocian estrechamente con la superficie del óvulo y se fusionan con el oolema (Wassarman, 1999).

Los óvulos maduros de mamíferos detienen su meiosis en la metafase II (MII) y esta se reactiva al momento de la fertilización. Los óvulos están detenidos en MII por la actividad del factor promotor de la maduración (MPF), cuyos dos componentes son la quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1) y la ciclina B. En los ovocitos, la activación de MPF promueve la transición de la etapa de vesícula germinal a la metafase I. La activación completa de MPF requiere la asociación de CDK1 con ciclina B, fosforilaciones/desfosforilaciones específicas de CDK1 y concentraciones crecientes de ciclina B. La estabilidad de MPF cesa después de la fertilización, lo que provoca la liberación del arresto de la MII (Hörmanseder et al., 2013).

Siendo en este sentido, la activación del ovocito una serie de eventos que convierten un ovocito detenido en la metafase II en un óvulo fertilizado listo para comenzar la embriogénesis, y se considera que una falla en esta activación es la principal causa de falla en la fertilización después de la ICSI convencional. Varios informes muestran que la mayoría de las parejas humanas que no tienen éxito después de la ICSI, se benefician del uso de la ICSI combinada con la activación asistida del ovocito, es por esto que en reproducción asistida humana se utilizan diversos métodos de activación artificial, incluidos estímulos físicos, mecánicos o químicos, que provocan uno o más aumentos de calcio en el citoplasma del ovocito (Vanden Meerschaut et al., 2014).

Posterior a la activación del ovocito, en la fecundación de los mamíferos, el genoma haploide de cada gameto queda rodeado por su propia envoltura pronuclear, en la que tiene lugar la primera fase mitótica "S" para generar dos copias de cada cromosoma. Por lo tanto, hay dos pronúcleos distintos. Después de esta etapa pronuclear transitoria, la envoltura pronuclear se desarma y la condensación cromosómica vuelve a ocurrir para establecer la primera división mitótica. A pesar de ensamblarse en una sola placa de metafase, los dos conjuntos de cromosomas permanecen separados según el origen, y esta organización se mantiene hasta la etapa de cuatro células en los embriones de ratón (Mayer et al., 2000).

Por su parte, antes de convertirse en un pronúcleo masculino, el núcleo espermático se somete a una reprogramación de varios pasos, que consiste en una fase inicial de dispersión de la cromatina, seguida de una breve recondensación y, finalmente, una descondensación completa en el pronúcleo masculino (Florman y Ducibella, 2006). La pérdida de la envoltura nuclear expone el contenido de la cabeza del espermatozoide al ooplasma, lo que conduce a una descondensación limitada de la cabeza del espermatozoide, que coincide con la reducción de los enlaces disulfuro de las protaminas. Esta relajación del complejo toroidal permite que las histonas del óvulo se asocien con el ADN del espermatozoide, provocando la formación de nucleosomas e induciendo la recondensación del núcleo espermático. Finalmente, una vez que se completa el depósito de histonas, la cromatina paterna se expande por completo en el pronúcleo masculino (Jenkins y Carrel, 2012).

### **3.2 Agentes descondensantes**

La descondensación es el primer cambio visible que se produce en el interior del ovocito, una vez que el espermatozoide ha entrado en el ooplasma tras unirse al oolema. En especies de mamíferos, incluidos los humanos, esta descondensación de la cromatina parece ocurrir en dos etapas diferentes: primero, la reducción de los enlaces disulfuro en las protaminas y, luego, la sustitución de estas protaminas reducidas por histonas de ovocitos. Se han empleado diversos agentes químicos para mejorar esta descondensación, como la heparina, glutatión, DTT, sulfato de heparán, ácido hialurónico, Triton X-100 y dodecil sulfato de sodio (SDS) (Romanato et al., 2018; Hernández et al., 2016).

#### **3.2.1 Ditiotreitól**

El ditiotreitól (DTT, HSCH<sub>2</sub> (CH (OH) 2CH<sub>2</sub>SH) reduce los enlaces disulfuro de mucoproteínas en el esputo e induce la licuefacción de semen humano que ha tenido un proceso de licuefacción incompleta *in vitro* (Barmatz et al., 1994). También, es conocido como un agente reductor de los enlaces disulfuro de las protaminas (Watanabe y Fukui, 2006) reduce estos enlaces intra e interprotamina, y la incubación de núcleos espermáticos con este agente da como resultado la

descondensación nuclear espermática *in vitro* (Zirkin y Naish, 1989). Un ejemplo de esto es la investigación realizada por Tateno y Kamiguchi en 1999, quienes demostraron que, en espermatozoides de hámster chino, el tratamiento con DTT *in vitro* es efectivo en la inducción de la reducción de los enlaces disulfuro.

### **3.2.2 Glutación**

La vaina postacrosómica (PAS) de la teca perinuclear (PT) es el primer compartimento de la cabeza del espermatozoide que se solubiliza en el ooplasma tras la fusión del espermatozoide con el ovocito, lo que implica a sus constituyentes en el desarrollo del cigoto. La glutación-S-transferasa omega 2 (GSTO2) es uno de esos constituyentes, una enzima oxido reductiva que se encuentra en el PAS y las regiones perforatorias del PT. La GSTO2 es importante, ya que promueve la descondensación nuclear utilizando la conjugación de glutación reducido, un donante de electrones que se ha demostrado que es esencial para el desacoplamiento de los espermatozoides dentro del ooplasma (Hamilton et al., 2019).

La capacidad de oxido-reducción que facilita toda la funcionalidad de Glutación-S-Transferasa (GST) proviene principalmente de su tiol conjugado, glutación (GSH). Los tioles actúan como un reservorio natural de capacidad reductora dentro de la célula, facilitando la desintoxicación y la protección contra el estrés oxidativo. En el ovocito recién fertilizado, el uso de GSH como sustrato oxidativo-reductor facilita la descondensación de la cromatina y la formación de pronúcleos, por lo tanto, GSH tiene un papel fundamental durante la reorganización nuclear durante y después de la fertilización. Se ha demostrado que la capacidad de la cabeza del espermatozoide de mamífero para descompartimentar y comenzar la descondensación nuclear dentro del ooplasma depende, al menos parcialmente, de la reducción de los enlaces disulfuro y de la disponibilidad de GSH (Hamilton et al., 2019).

### **3.3 Modelo murino**

La yegua es una especie poliestrica estacional, y debido a las características de sus ovarios está limitado el número de folículos que ovulan que generalmente es uno,

siendo la respuesta a la superovulación casi nula. Debido a lo anterior el número de ovocitos de yeguas disponibles es muy reducido para llevar a cabo investigaciones (Choi et al., 2003; Li et al., 2003), usando espermatozoides previamente tratados para evaluar el porcentaje de la activación del ovocito y la descondensación del ADN del espermatozoide, después de la ICSI.

Por otro lado, el ratón es un modelo para estudiar la fertilización (Stein, 2010) y manipulación de embriones (Ménézo y Hérubel, 2002) de mamíferos, ya que esta especie responde a la superovulación obteniendo de 15 a 47 ovocitos por hembra tratada, dependiendo de la cepa utilizada (Behringer et al., 2018). Debido a esto, en el presente estudio se usaron ovocitos en metafase II obtenidos de ratona, y se realizó la ICSI con espermatozoides descongelados de equinos tratados previamente con DTT y glutatión, para determinar cómo influyen estos tratamientos en la formación de los pronúcleos.

#### **4.- OBJETIVO GENERAL.**

Investigar el efecto de la remoción de las membranas espermática y acrosomal, así como la disolución de las proteínas nucleares de espermatozoides de equino descongelados, sobre la formación de pronúcleos, después de realizar la ICSI en ovocitos de ratón.

#### **5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Recuperación de ovocitos de ratona en metafase II.
- Aplicar tratamientos con agentes descondensantes a los espermatozoides
- Realizar la técnica de la ICSI.
- Determinar la activación y fertilización de los ovocitos mediante pronúcleos.

#### **6.- METODOLOGÍA**

##### **6.1 Recuperación de ovocitos en metafase II.**

Se usaron ratonas prepubescentes CD1, de 6 semanas de edad. La comida y el agua estuvieron a libre acceso, y el fotoperiodo fue de 14 hrs de luz y 10 hrs oscuridad (Vergara et al., 1997).

Para superovular a las ratonas se aplicaron a cada hembra 5 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Novormon 5000, Zoetis, México) por vía intraperitoneal, 44 a 46 horas más tarde se le aplicaron 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Kelley, 2010).

Posteriormente, 13 horas después de la aplicación de hCG, se sacrificó a las hembras, se extrajeron los oviductos y se colocaron en una placa de cultivo de plástico de 35 mm con medio de cultivo M2 (Stein, 2010). Se transfirieron los oviductos a gotas individuales de M2 con 3 mg/mL de hialuronidasa. Usando un par de pinzas, se perforó la parte superior del oviducto (ampolla) con la ayuda de un microscopio estereoscópico (SMZ745T, Nikon, Japón), para liberar los ovocitos en el medio. Los ovocitos reposaron en la solución de hialuronidasa a temperatura ambiente hasta que células del cúmulo se desprendieran, se monitoreó cuidadosamente la disolución de los ovocitos en metafase II de las células del cúmulo. Los ovocitos libres se recuperaron y se lavaron con varias gotas de M2 y fueron transferidos a una placa de cultivo con microgotas de 10-20  $\mu$ L de M16 cubiertas con aceite de parafina. Por último, se colocaron en una incubadora humidificada que contiene 5% de CO<sub>2</sub> en aire a 38.5 °C hasta su uso (Stein, 2010; Kelley, 2010).

## **6.2 Preparación de los espermatozoides para ICSI.**

Para realizar la ICSI se usó semen descongelado de equinos de fertilidad probada. Las pajillas de 0.5 mL con una concentración de  $160 \times 10^6$ , se descongelaron en baño de agua a 37 °C por 30 segundos, para posteriormente colocar 500  $\mu$ L de semen en el fondo de un tubo cónico con 1.5 mL de TALP modificado (Felix et al., 2022) e incubándose durante 20 minutos (técnica de “swim-up”). Posteriormente se tomó 1 mL de la parte superior para centrifugarse a 300 x g por 3 minutos, el sobrenadante se eliminó y el sedimento de espermatozoides se resuspendió en 500

$\mu\text{L}$  de medio TALP (Felix et al., 2022), para luego determinar la concentración espermática y ajustar a una concentración de  $20 \times 10^6/\text{mL}$ .

El tratamiento con Ditionitrito (DTT) y con Glutati3n, se llevaron a cabo por separado adicionando 5 mM de cada agente descondensante por 30 minutos a una suspensi3n de espermatozoides con un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ , para posteriormente enjuagarlos dos veces centrifugandolos a 350 g durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y reemplazando el mismo volumen con TALP (Shirazi et al., 2018; Ba3o, 2016; Galli et al., 2003).

### **6.3 Evaluaci3n del estado acrosomal, viabilidad y descondensaci3n de los espermatozoides.**

Una vez realizado el tratamiento a los espermatozoides, se determin3 su descondensaci3n a los 15, 30, 45 y 60 minutos, as3 como el estado acrosomal y viabilidad despu3s de 30 minutos, evalu3ndose 100 c3lulas por cada tratamiento, por cada periodo de tiempo. Para evaluar lo anterior se us3 una doble tinci3n de Isotiocianato de fluoresce3na con aglutinina de cacahuete (FITC-PNA) (Sigma, L7381) y Ioduro de propidio (IP) (Sigma P4170) (Ortgies et al., 2011; Varesi et al., 2013; Wu et al., 2015), para lo cual se obtuvieron 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra, adicion3ndole 5  $\mu\text{L}$  de FITC-PNA y 5  $\mu\text{L}$  de IP, dej3ndose incubar a 38.5  $^{\circ}\text{C}$ , por 5 minutos. De esta suspensi3n se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de paraformaldehido al 2% para realizar el frotis, que se observ3 con un microscopio de fluorescencia (Eclipse E600, Nikon, Jap3n) a un aumento de 1000X, para observar la FITCPNA se utiliz3 el filtro B2A (Ex 450-490) y para observar el IP se utiliz3 el filtro G2A (Ex 510-560). La descondensaci3n se determin3 mediante un aumento de tama3o de la cabeza de los espermatozoides dividi3ndolos en 3 clases, mientras que el estado funcional se observ3 de acuerdo a los siguientes patrones de tinci3n:

1. Espermatozoides muertos con acrosoma intacto: c3lulas esperm3ticas con tinci3n de FITC-PNA a nivel acrosomal (verde), y con tinci3n nuclear (IP) (rojo).
2. Espermatozoides muertos con RA: c3lulas esperm3ticas sin tinci3n acrosomal (FITC-PNA) y con tinci3n nuclear (IP) (rojo).

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

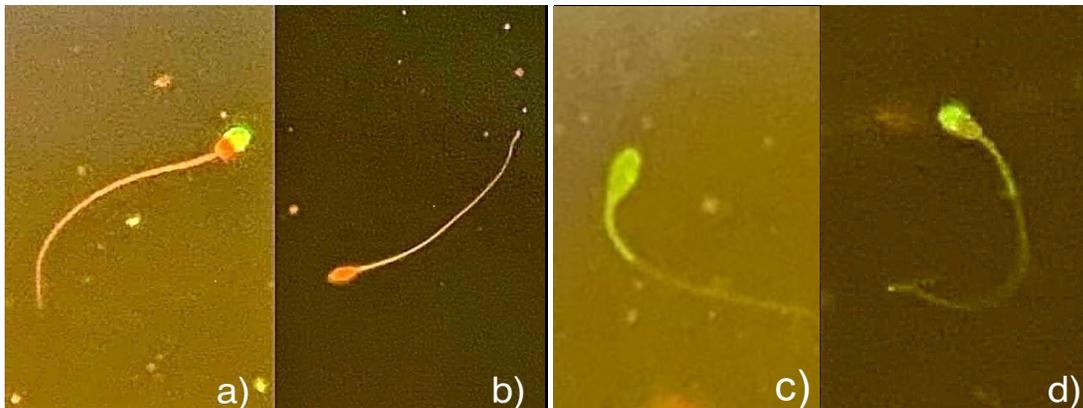


Imagen 1. Espermatozoides teñidos con la doble tinción de Isotiocianato de fluoresceína con aglutinina de cacahuete (FITC-PNA) (Sigma, L7381) y Ioduro de propidio (IP) (Sigma P4170) en el microscopio de fluorescencia (Eclipse E600, Nikon, Japón): a) espermatozoide muerto con acrosoma intacto, b) espermatozoide muerto con reacción acrosomal (RA), c) espermatozoide vivo con reacción acrosomal (RA) y d) espermatozoide vivo con acrosoma intacto.

En los objetivos de la presente investigación no estaban consideradas las mediciones del grado de descondensación de las cabezas de los espermatozoides con el tratamiento de DTT. Sin embargo, al observar que las cabezas de los espermatozoides aumentaban de tamaño en diferente magnitud, se determinó la necesidad de registrar dichas mediciones como un complemento, por lo tanto, se clasificaron en 3 clases, dependiendo el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide: la clase 1:  $\leq 6.53 \mu$  de largo y  $3.87 \mu$  de ancho de la cabeza, la clase 2:  $\leq 7.86 \mu$  de largo y  $6.52 \mu$  de ancho, y la clase 3:  $\leq 14.29 \mu$  de largo y  $11.71$  ancho.

#### 6.4 Técnica de la ICSI.

Las pipetas de Holding (Diámetro externo: 60  $\mu$ ; Diámetro interno: 10  $\mu$ ) e ICSI (Diámetro externo: 10  $\mu$ ; Diámetro interno: 8  $\mu$ ) fueron fabricadas con equipo especializado en la UAM-X (Micropipette puller P-97; Microforge MF-900 y Micropipette Develer BV-10). Para realizar la ICSI se usó la técnica descrita por Hernández et al., en 2016, usando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200, Japón), micromanipuladores (Narishige MO188NE) y microinyectores (Narishige IM-9A y IM-9B). Después de la ICSI los ovocitos fueron lavados tres veces en TCM-H y albúmina sérica bovina 5% (ASB) e incubados en 100 mL de medio de desarrollo

### **6.5 Determinación de la activación y fertilización mediante pronúcleos.**

Después de realizar la ICSI los ovocitos inyectados fueron incubados por 16 horas en medio M16, a 38.5 °C, con 5% de CO<sub>2</sub>, y 95% de humedad. Para posteriormente ser fijados con formaldehído al 2%, y enjuagados tres veces con Imacell y colocados sobre un portaobjetos para ser teñidos con 8  $\mu$ L de DAPI. Para evaluar a los ovocitos se usó un microscopio de fluorescencia (Eclipse E600, Nikon, Japón) con filtro UV-1A a 365 nm y a 200X aumentos, clasificándolos en alguno de los siguientes estadios: ovocitos no activados (ovocito en metafase II), ovocitos activados (presencia del pronúcleo femenino y espermatozoide), y ovocitos fertilizados (presencia del pronúcleo femenino y pronúcleo masculino) (Shirazi et al., 2011).

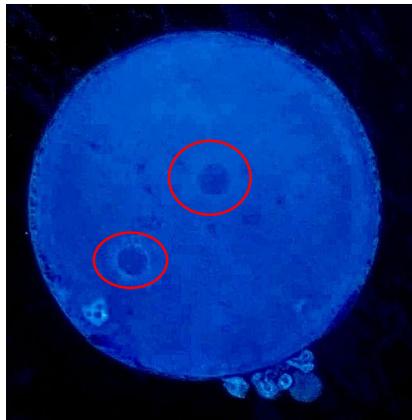


Imagen 2. Ovocito fertilizado teñido con DAPI en el microscopio de fluorescencia (Eclipse E600, Nikon, Japón) con filtro UV-1A a 365 nm y a 200X aumentos en el que se observa la presencia de los dos pronúcleos.

### **6.6 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos del estado acrosomal, y la viabilidad de los espermatozoides (Tabla 2), así como la descondensación del espermatozoide (Tabla 4), se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ). Los resultados de los ovocitos de ratón inyectados con espermatozoides de equinos (Tabla 5), se aplicó la prueba de dos proporciones con ajuste de Bonferroni (Wayne y Chad, 2013), considerando diferencia estadística significativa en ambas pruebas cuando  $P < 0.05$ .

## **7.- ACTIVIDADES REALIZADAS**

- Preparación de medio de cultivo TALP y soluciones 5 Mm de glutatión y DTT.
- Lavado y esterilización de tubos de ensaye, matraces y los instrumentos de disección.
- Alimentación de los ratones, así como la limpieza de sus cajas.
- Aplicación del protocolo hormonal de superovulación a las ratonas.
- Sacrificio y disección de las ratonas para la obtención de los ovarios y oviductos.
- Descongelación de semen de garañón.
- Técnica de “swim-up” con los espermatozoides de garañón.
- Tratamientos con dos agentes descondensantes (Glutatión y DTT) a espermatozoides descongelados de equinos.
- Uso de la doble tinción de Isotiocianato de fluoresceína con aglutinina de cacahuete (FITC-PNA) y Ioduro de propidio (IP), a espermatozoides tratados y el control.
- Determinación del estado acrosomal, viabilidad y descondensación de los espermatozoides.
- Recuperación y desnudación de los ovocitos de ratón en metafase II.
- Inyección intracitoplasmática de espermatozoides de garañón en ovocitos de ratona.
- Tinción DAPI de los ovocitos posterior a la incubación, para determinar: ovocitos no activados, ovocitos activados, ovocitos fertilizados.

## 8.- OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

- Recuperación de ovocitos de ratona en metafase II. Objetivo alcanzado, se recuperó un total de 880 ovocitos maduros.
- Aplicar tratamientos con agentes descondensantes a los espermatozoides. Objetivo alcanzado, se les dio el tratamiento con ambos agentes a los espermatozoides de garañón.
- Realizar la técnica de la ICSI. Objetivo alcanzado, se llevó a cabo la técnica con un total de 169 ovocitos.
- Determinar la activación y fertilización de los ovocitos mediante pronúcleos. Objetivo alcanzado, se determinó la presencia o ausencia de activación y fertilización en 158 de los ovocitos inyectados, ya que 11 de ellos no se pudieron evaluar.

## 9.- RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

### 9.1 Recuperación de ovocitos de ratón en metafase II.

Se utilizaron 45 ratonas de las cuales se recuperaron 880 ovocitos, promediando 19 ovocitos por hembra (Tabla 1).

Tabla 1. Ovocitos obtenidos del total de animales sacrificados.

# Ratonas	Hormona/Dosis	# Ovocitos recuperados	Promedio de ovocitos recuperados por ratona	Rango de ovocitos recuperados por ratona
45	eCG/5UI y hCG/5UI 47 hrs después	880	19	0-69

El ratón es un modelo animal importante en medicina reproductiva, genética y toxicología. La administración de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) combinada con gonadotropina coriónica humana (hCG) es un método simple para inducir la superovulación en ratones para muchos laboratorios (Wu et al., 2013). Los

resultados de un promedio de 19 ovocitos por ratona, exceden los reportados por Takahashi y Liu en 2010. Quienes mencionan que, por lo general, se esperan de 5 a 15 ovocitos utilizables de cada hembra superovulada con este protocolo hormonal.

## 9.2 Estado acrosomal y viabilidad de los espermatozoides.

Las evaluaciones realizadas al estado acrosomal en los dos tratamientos y el grupo control (Tabla 2), se observó que la clasificación muertos sin acrosoma fue donde se registraron mayor cantidad de espermatozoides en comparación de los otros grupos, ( $P < 0.05$ ), siendo significativamente mayor en el grupo DTT en comparación con el control y glutatión.

La cantidad de espermatozoides vivos sin acrosoma del control, DTT y Glutatión fueron iguales ( $P > 0.05$ ) (Tabla 2).

Tabla 2. Estado acrosomal y viabilidad de los espermatozoides después de 30 minutos de tratamiento.

Tratamiento	N	n	Vivos		Muertos	
			C/A	S/A	C/A	S/A
Control	10	100	9/100 (9) <sup>a1</sup>	17/100 (17) <sup>a1</sup>	24/100 (24) <sup>b1</sup>	50/100 (50) <sup>c1</sup>
DTT	10	100	0/100 (0) <sup>a2</sup>	17/100 (17) <sup>b1</sup>	0/100 (0) <sup>a2</sup>	83/100 (83) <sup>c2</sup>
Glutatión	10	100	9/100 (9) <sup>a1</sup>	17/100 (17) <sup>b1</sup>	23/100 (23) <sup>b1</sup>	51/100 (51) <sup>c1</sup>

N: repeticiones; n: espermatozoides analizados por sesión; C/A: con acrosoma; S/A: sin acrosoma.

Diferente literal en línea significa diferencia significativa  $P < 0.05$ .

Diferente número en columna significa diferencia significativa  $P < 0.05$ .

En el grupo tratado con DTT hubo menor cantidad de espermatozoides que presentaron acrosoma intacto en comparación con los otros dos grupos. Estos datos son interesantes y relevantes ya que, en equinos, no existe información respecto a este tema. Sin embargo, nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Arias et al., en el 2014, quienes reportaron un 91.7% de espermatozoides de bovino con reacción acrosomal después de 20 minutos de tratamiento con 5 mM de DTT.

Contrariamente, Başıpınar et al., en 2011, evaluaron la presencia y ausencia del acrosoma en espermatozoides de carnero después de adicionar 1 y 2 mM de DTT al medio de criopreservación y no observaron diferencia significativa entre estos grupos; donde obtuvieron 33.7, 39.1 y 46.9% de espermatozoides que no presentaban el acrosoma en los grupos control, 1 mM y 2 mM, respectivamente. Aunque, esta discrepancia pudo deberse a la menor concentración de DTT que se usó en ese experimento, ya que emplear una concentración de 5 mM puede ocasionar una disminución significativa en la cantidad de espermatozoides con acrosoma intacto.

También se observó que la clasificación muertos sin acrosoma en los tres grupos fue donde se registraron mayor cantidad de espermatozoides en comparación con los muertos con acrosoma y, vivos con y sin acrosoma. Esto debido a que después de la reacción acrosomal, los espermatozoides se mantienen con vida el tiempo que les tomaría llevar a cabo la fertilización, aproximadamente de 5 a 20 minutos (Cole, 2016). Y precisamente los espermatozoides sin el acrosoma intacto, son los que se emplearon para llevar a cabo la ICSI, esperando ver un aumento en la fertilización, similar a lo observado por Zambrano et al., en el 2016, quienes utilizaron tratamientos de Tritón y lisolecitina para la remoción del acrosoma y desestabilización de las membranas en espermatozoides descongelados de bovino, y obtuvieron una mayor tasa división embrionaria para ambos tratamientos (66 y 65% para Tritón y lisolecitina respectivamente, en comparación con 51% para el grupo control) y una mayor formación de blastocistos con el tratamiento de lisolecitina (29%) en comparación con el control (21%).

De acuerdo a nuestro conocimiento, no hay información con respecto a la evaluación de la viabilidad de los espermatozoides de equino con los tratamientos empleados en el presente estudio. Sin embargo, existen reportes de otros autores, donde evaluaron la viabilidad de espermatozoides de garañón descongelados. Los resultados obtenidos de viabilidad en los tres grupos de estudio, fueron menores a los observados por Melo et al., en 2007, quienes evaluaron la viabilidad de los

espermatozoides después de haber sido enfriados por 24 horas en diferentes sistemas de almacenamiento y posteriormente congelados con diferentes crioprotectores, obteniendo alrededor del 48% de espermatozoides viables posterior a su descongelación. Similarmente, Borg et al., en 1997, obtuvieron 46.6% de espermatozoides de garañón viables después de descongelar a 37 °C. Sin embargo, esta diferencia con respecto a nuestros resultados de alrededor del 25% de viabilidad, puede deberse a que se llevó a cabo la evaluación de los espermatozoides aproximadamente 55 minutos después de que se descongeló la muestra de semen.

### 9.3 Descondensación de los espermatozoides.

A partir del grado de descondensación de los espermatozoides con tratamiento de DTT se determinaron 3 clases, se registraron las medidas del largo y ancho de la cabeza de 10 espermatozoides de cada clase y se obtuvieron los promedios (Tabla 3); a) clase 1 (normales): 6.53  $\mu$  y 3.87  $\mu$  de largo y ancho, respectivamente; b) clase 2 (descondensación moderada): 7.86  $\mu$  y 6.52  $\mu$ , largo y ancho, respectivamente; c) clase 3 (muy descondensados): 14.29  $\mu$  y 11.71  $\mu$ , largo y ancho, respectivamente. Tabla 3. Largo y ancho de la cabeza de los espermatozoides de las 3 clases determinadas.

Clase					
1		2		3	
Largo ( $\mu$ ) n=10	Ancho ( $\mu$ ) n=10	Largo ( $\mu$ ) n=10	Ancho ( $\mu$ ) n=10	Largo ( $\mu$ ) n=10	Ancho ( $\mu$ ) n=10
6.53 $\pm$ 0.25	3.87 $\pm$ 0.31	7.86 $\pm$ 1.24	6.52 $\pm$ 1.38	14.29 $\pm$ 3.14	11.71 $\pm$ 0.86

El grado de descondensación de los espermatozoides cultivados con DTT (Tabla 4), se mantuvo significativamente en la clase 1 ( $P<0.05$ ) en comparación a las clases 2 y 3 a los 15, 30, 45 y 60 minutos. Aunque, en la clase 2 fue diferente a la clase 3 ( $P<0.05$ ) a los 45 y 60 minutos de cultivo, respectivamente.

Además, se observa un aumento en los espermatozoides de la clase 2 después de 45 minutos de cultivo ( $P<0.05$ ) en comparación a los 15 y 30 minutos iniciales.

Tabla 4. Descondensación de los espermatozoides tratados con DTT en diferentes lapsos de tiempo.

Tiempo (Minutos)	N	n	Clase		
			1	2	3
15	10	100	97/100 (97) <sup>a1</sup>	3/100 (3) <sup>b1</sup>	0/100 (0) <sup>b1</sup>
30	10	100	91/100 (91) <sup>a1</sup>	9/100 (9) <sup>b1</sup>	0/100 (0) <sup>b1</sup>
45	10	100	80/100 (80) <sup>a2</sup>	18/100 (18) <sup>b2</sup>	2/100 (2) <sup>c1</sup>
60	10	100	75/100 (75) <sup>a2</sup>	22/100 (22) <sup>b2</sup>	3/100 (3) <sup>c1</sup>

N: repeticiones; n: espermatozoides analizados por sesión  
Diferente literal en línea significa diferencia significativa  $P < 0.05$ .  
Diferente número en columna significa diferencia significativa  $P < 0.05$ .

Se llevó a cabo el mismo procedimiento para los espermatozoides tratados con glutatión, sin embargo, no se observó descondensación de estos en ninguno de los periodos de 15, 30, 45 y 60 minutos de tratamiento.

Al evaluarse la descondensación en los espermatozoides tratados con DTT, se obtuvo un 25% de espermatozoides que presentaron un aumento del tamaño de la cabeza después de 60 minutos de tratamiento. Este aumento de tamaño también fue observado Hartley et al., en 2016, quienes obtuvieron descondensación de la cromatina de espermatozoides de garañón al someterlos a un tratamiento con tioglicolato de sodio, otro agente reductor, que evaluaron mediante el aumento de tamaño de la cabeza de los espermatozoides, consideraron espermatozoides descondensados aquellos con un área de la cabeza mayor a  $20 \mu\text{m}^2$ . De acuerdo a nuestros resultados coincidimos con este parámetro donde se calcularon las áreas de las tres clases que se utilizaron en el presente estudio para clasificar a los espermatozoides y se obtuvieron las siguientes áreas de la cabeza de las clases 1, 2 y 3: 19.76, 40.24 y  $131.22 \mu\text{m}^2$  respectivamente.

Sin embargo, valdría la pena llevar a cabo más experimentos con diferentes concentraciones de DTT para disminuir la cantidad de espermatozoides de la clase 1 obtenidos en el presente estudio, donde no se observó una descondensación

evidente, y así aumentar el número de espermatozoides de las clases 2 y 3 para mejorar el porcentaje de ovocitos en los que la cabeza del espermatozoide se descondensa y da lugar al pronúcleo masculino. Como así lo realizó Bugno-Poniewierska et al., en 2010, quien empleó una concentración de 0.25 M, para intentar aumentar el porcentaje de espermatozoides en los que se observa el aumento de tamaño de la cabeza y de esta manera evidenciar, la descondensación de la cromatina espermática.

Por otro lado, en el caso de los espermatozoides tratados con la concentración de 5 mM de glutatión, no se observó el aumento en el tamaño de la cabeza en ninguno de los lapsos de tiempo evaluados de 15, 30, 45 y 60 minutos. Estos valores son de gran importancia, ya que, al no contar con información relacionada al uso de este tratamiento en espermatozoides de equino, pueden ser la base para futuras investigaciones, aumentando la concentración del glutatión, o incluso aumentando el tiempo de incubación para lograr observar el aumento de tamaño de la cabeza de los espermatozoides. Sin embargo, sí existen reportes del uso de glutatión para la descondensación de la cromatina en otras especies, por ejemplo, Zambrano et al., en 2017 aplicaron a espermatozoides descongelados de bovino 3 tratamientos que contenían glutatión 15 mM, uno en el que sólo se utilizó este agente y dos en los que se le combinó con lisolecitina y tritón al 0.05%, y al evaluar la descondensación de la cromatina espermática utilizando la intensidad media de la fluorescencia, mostró que los grupos que se incubaron durante 3 h con estos tratamientos presentaron mayor descondensación, ya que la intensidad media de la fluorescencia para el grupo control (menor a 10,000) fue menor que para los tratamientos (alrededor de 15,000), utilizando el filtro FL2 a 670 nm.

#### **9.4 Inyección Intracitoplasmática de espermatozoide de equino en ovocito de ratón.**

Se inyectaron y evaluaron un total de 169 ovocitos, en donde se observó un mayor porcentaje de ovocitos activados (PNF+SP) cuando se comparó con las demás

clasificaciones de MII+SP, PNF+PNM y no evaluado del control, Glutación y DTT, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Ausencia o presencia de activación y fertilización en 169 ovocitos de ratón, después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoide de equino.

Tratamiento	n	III+SP	PNF+SP	PNF+PNM	No evaluado
Control	51	8/51 (16) <sup>a1</sup>	35/51 (68) <sup>b1</sup>	3/51 (6) <sup>c1</sup>	5/51 (10) <sup>c1</sup>
Glutación	65	17/65 (26) <sup>a2</sup>	42/65 (64) <sup>b1</sup>	3/65 (5) <sup>c1</sup>	3/65 (5) <sup>c1</sup>
DTT	53	3/53 (6) <sup>a3</sup>	41/53 (77) <sup>b1</sup>	6/53 (11) <sup>a1</sup>	3/53 (6) <sup>a1</sup>
Total	169	28/169 (16) <sup>a</sup>	118/169 (69) <sup>b</sup>	12/169 (7) <sup>c</sup>	11/169 (7) <sup>c</sup>

n: número de ovocito de ratón inyectados con espermatozoide de equino.

Diferente literal en línea significa diferencia significativa  $P < 0.05$ .

Diferente número en columna significa diferencia significativa  $P < 0.05$ .

III+sp son ovocitos no activados en los que se observa la metafase II y la cabeza del espermatozoide, PNF+SP son ovocitos activados, se observa pronúcleo femenino y la cabeza del espermatozoide, PNF+PNM son ovocitos fertilizados, ya que se observan el pronúcleo femenino y el pronúcleo masculino. Ovocitos no evaluados son ovocitos deteriorados que no presentan estructuras definidas.

La clasificación de ovocitos activados fueron 68%, 64% y 77% en los grupos control, glutación y DTT respectivamente, sin mostrar diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre ellos, pero los valores son superiores en los tratados con DTT. También se observó en cuanto a la fertilización resultados similares (PNF+PNM), donde se obtuvo un 6, 5 y 11% respectivamente ( $P > 0.05$ ) (Tabla 5), existiendo la misma tendencia en el grupo tratado con DTT.

Los resultados en cuanto a la activación de los ovocitos probablemente se deben a que el estímulo mecánico y la penetración de la zona pelúcida y el oolema durante la ICSI provoca flujo de calcio al interior del ovocito, ocasionando la activación de este (Neri et al., 2014).

Por otra parte, solo un pequeño porcentaje de los ovocitos inyectados logró llevar a cabo la fertilización y llegar a formar los dos pronúcleos. Esto posiblemente debido

a que los tratamientos no favorecieron de la manera esperada la degradación de la membrana plasmática, acrosomal o nuclear (Tremoleda et al., 2003).

Para concluir, se pudo observar que el tratamiento con DTT tuvo un efecto descondensante en las cabezas de los espermatozoides de equino descongelados después de 60 minutos, aumentando el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma. También se observó un porcentaje de activación de los ovocitos de 64 a 77%. Sin embargo, ninguno de los tratamientos tuvo un efecto significativo en la fertilización de los ovocitos después de realizar la ICSI.

## 10.- RECOMENDACIONES

En el caso del tratamiento con glutatión, se recomienda experimentar aplicando el tratamiento por más tiempo, así como combinarlo con otros agentes químicos como la heparina y evaluar si se observa la descondensación de la cromatina o el agrandamiento de las cabezas de los espermatozoides.

En cuanto al tratamiento con DTT, sería interesante llevar a cabo más experimentos probando diferentes concentraciones para aumentar el porcentaje de espermatozoides que sufren la descondensación de la cromatina.

## 11.- BIBLIOGRAFÍA

- Águila, L., Felmer, R., Arias, M. E., Navarrete, F., Martín-Hidalgo, D., Lee, H. C., Visconti, P. E., & Fissore, R. A. (2017). Defective sperm head decondensation undermines the success of ICSI in the bovine. *Reproduction*, 154(3), 307-318. <https://doi.org/10.1530/rep-17-0270>
- Arias, M. E., Sánchez, R., Risopatrón, J., Pérez, L., & Felmer, R. (2014). Effect of sperm pretreatment with sodium hydroxide and dithiothreitol on the efficiency of bovine intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(6), 847-854. <https://doi.org/10.1071/rd13009>
- Baño, D. G. (2016). Efecto antioxidante del glutatión aplicado en el medio de descongelación seminal de tres especies de interés pecuario. En TDR (*Tesis Doctorales* en

Red). <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/47649/1/TESIS%202015%20UNIVERSIDAD.pdf>

- Barmatz, M.J., Karabinus, D.S. & Dalkin, B.L. (1994). Dithiothreitol Effects on Human Sperm Quality. *The Journal of Urology*, 152(6), 2287–2290.
- Başpınar, N., Çoyan, K., Bucak, M. N., & Tuncer, P. B. (2011). Effects of dithioerythritol on RAM semen after the freeze–thawing process. *Cryobiology*, 63(3), 152-156. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.08.004>
- Behringer, R. R., Gertsenstein, M., Nagy, K. V., & Nagy, A. (2018). Administration of gonadotropins for superovulation in mice. *CSH Protocols*, 2018(1), 24-27. [pdb.prot092403. https://doi.org/10.1101/pdb.prot092403](https://doi.org/10.1101/pdb.prot092403)
- Borg, K., Colenbrander, B., Fazeli, A., Parlevliet, J. M., & Malmgren, L. (1997). Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 48(4), 531-536. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00269-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00269-0)
- Bugno-Poniewierska, M., Jabłońska, Z., & Słota, E. (2010). Modification of equine sperm chromatin decondensation method to use fluorescence in situ hybridization (FISH). *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 47(4), 663-666. <https://doi.org/10.2478/v10042-010-0006-2>
- Choi, Y. H., Landim-Alvarenga, F. C., Seidel, G. E., & Squires, E. (2003). Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes1. *Journal of Animal Science*, 81(8), 2080-2087. <https://doi.org/10.2527/2003.8182080x>
- Cole, L. A. (2016). Sperm activation, fertilization, morula, blastocyst formation, and twinning. En *Elsevier eBooks* (pp. 143-150). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809685-7.00019-8>
- Durand, M. G. P., Villalta, B. Q., & Guerra, U. H. P. (2019). Producción de embriones in vitro en una incubadora portátil de dióxido de carbono y

viabilidad in vivo post transferencia a vacas receptoras. *Revista de investigaciones altoandinas*, 21(4), 249-256. <https://doi.org/10.18271/ria.2019.501>

- Felix, M., Turner, R. M., Dobbie, T., & Hinrichs, K. (2022). Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. *Biology of Reproduction*, 107(6), 1551-1564. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac172>
- Florman, H. M., & Fissore, R. A. (2015). Fertilization in mammals. En *Elsevier eBooks* (pp. 149-196). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397175-3.00004-1>
- Florman, H. M., & Ducibella, T. (2006). Fertilization in mammals. En *Elsevier eBooks* (pp. 55-112). <https://doi.org/10.1016/b978-012515400-0/50007-5>
- Galli, C., Vassiliev, I., Lagutina, I., Galli, A., & Lazzari, G. (2003). Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology*, 60(8), 1467-1480. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00133-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00133-x)
- Hadgu, A., & Fesseha, H. (2020). Reproductive Biotechnology Options for Improving Livestock production: A review. *Advances in food technology and nutritional sciences*, 6(1), 13-20. <https://doi.org/10.17140/aftnsoj-6-164>
- Hamilton, L., Suzuki, J., Águila, L., Meinsohn, M., Smith, O. E., Protopapas, N., Xu, W., Šutovský, P., & Oko, R. (2019). Sperm-borne glutathione-S-transferase omega 2 accelerates the nuclear decondensation of spermatozoa during fertilization in mice†. *Biology of Reproduction*, 101(2), 368-376. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz082>
- Hansen, P. J. (2013). Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 1-22). [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8887-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8887-3_1)
- Hartley, R., Aros, P., Bustos-Obregón, E., Romero, F., Alvarenga, M. A., & Ramírez-Reveco, A. (2016). Reevaluating the sperm nuclear chromatin decondensation test by sodium thioglycolate of stallions

- spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 36, 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.10.002>
- Hernández-Pichardo, J. E., Ducolomb, Y., Romo, S., Kjelland, M. E., Fierro, R., Casillas, F., & Betancourt, M. (2016). Pronuclear formation by ICSI using chemically activated ovine oocytes and zona pellucida bound sperm. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0124-6>
  - Hinrichs, K. (2007). In vitro fertilization. En *Elsevier eBooks* (pp. 308-309). <https://doi.org/10.1016/b978-0-7216-0252-3.50052-7>
  - Hörmanseder, E., Tischer, T., & Mayer, T. (2013). Modulation of cell cycle control during oocyte-to-embryo transitions. *The EMBO Journal*, 32(16), 2191-2203. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.164>
  - Jenkins, T. G., & Carrell, D. T. (2012). The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction*, 143(6), 727-734. <https://doi.org/10.1530/rep-11-0450>
  - Kelley, K. (2010). Transport of mouse lines by shipment of live embryos. En *Methods in Enzymology* (pp. 25-36). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(10\)76002-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(10)76002-x)
  - Li, G., Seidel, G. E., & Squires, E. (2003). Intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes with stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 59(5-6), 1143-1155. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01179-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01179-2)
  - Mayer, W., Smith, A., Fundele, R., & Haaf, T. (2000). Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *Journal of Cell Biology*, 148(4), 629-634. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.629>
  - Melo, C. M., Zahn, F. S., Martin, I., Orlandi, C., Dell'Aqua, J., Alvarenga, M. A., & Papa, F. O. (2007). Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(4), 171-175. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2007.02.008>

- Ménézo, Y., & Hérubel, F. (2002). Mouse and bovine models for human IVF. *Reproductive Biomedicine Online*, 4(2), 170175. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61936-0](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61936-0)
- Neri, Q., Lee, B., Rosenwaks, Z., Machaca, K., & Palermo, G. D. (2014). Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium*, 55(1), 24-37. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.10.006>
- Niemann, H., & Seamark, B. (2018). The evolution of farm animal biotechnology. En *Springer eBooks* (pp. 1-26). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7_1)
- Ortgies, F., Klewitz, J., Görgens, A., Martinsson, G., & Sieme, H. (2011). Effect of procaine, pentoxifylline and trolox on capacitation and hyperactivation of stallion spermatozoa. *Andrologia*, 44, 130-138. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01150.x>
- Romanato, M., Calvo, L., & Calvo, J. (2018). Decondensation of sperm chromatin. En *Elsevier eBooks* (pp. 305-308). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64471-9>
- Sansinena, M. (2020). Assisted reproductive biotechnologies in the horse. En *Elsevier eBooks* (pp. 13-30). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817107-3.00002-3>
- Sekhavati, M. H., Shadanloo, F., Hosseini, M., Tahmoorespur, M., Nasiri, M. R., Hajian, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2012). Improved bovine ICSI outcomes by sperm selected after combined Heparin-Glutathione treatment. *Cellular Reprogramming*, 14(4), 295-304. <https://doi.org/10.1089/cell.2012.0014>
- Shirazi, A., Derakhshan-Horeh, M., Pilvarian, A., Ahmadi, E., Nazari, H., & Heidari, B. (2011). Effect of Pre-Treatment of ovine sperm on male pronuclear formation and subsequent embryo development following intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 87-94. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01593.x>

- Shirazi, A., Golestanfar, A., Bashiri, M., Ahmadi, E., & Shams-Esfandabadi, N. (2018). Male Pronuclear Formation and Embryo Development Following Intracytoplasmic Injection of Ovine Pretreated Sperm. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 10(1), 41–48.
- Stein, P. (2010). [Methods in Enzymology] Guide to Techniques in Mouse Development, Part A: Mice, Embryos, and Cells, 2nd Edition Volume 476 || ICSI in the Mouse. 251–262.
- Takahashi, H., & Liu, C. (2010). Archiving and distributing mouse lines by sperm cryopreservation, IVF, and embryo transfer. En *Methods in Enzymology* (pp. 53-69). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(10\)76004-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(10)76004-3)
- Tateno, H., & Kamiguchi, Y. (1999). Dithiothreitol induces sperm nuclear decondensation and protects against chromosome damage during male pronuclear formation in hybrid zygotes between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes. *Zygote*, 7(4), 321-327. <https://doi.org/10.1017/s0967199499000726>
- Tremoleda, J. L., Van Haefen, T., Stout, T., Colenbrander, B., & Bevers, M. (2003). Cytoskeleton and chromatin reorganization in horse oocytes following intracytoplasmic sperm injection: patterns associated with normal and defective fertilization. *Biology of Reproduction*, 69(1), 186-194. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012823>
- Ugalde, J. R. (2014). *Bioteconologías reproductivas para el siglo XXI*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 48(1): 33-34.
- Vanden Meerschaut, F., Nikiforaki, D., Heindryckx, B., & De Sutter, P. (2014). Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reproductive Biomedicine Online*, 28(5), 560-571. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.01.008>
- Varesi, S., Vernocchi, V., Faustini, M., & Luvoni, G. (2013). Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-17>

- Vergara, G., Irwin, M. H., Moffatt, R. J., & Pinkert, C. A. (1997). In vitro fertilization in mice: strain differences in response to superovulation protocols and effect of cumulus cell removal. *Theriogenology*, *47*(6), 1245-1252. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00104-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00104-0)
- Wassarman, P. M. (1999). Mammalian fertilization. *Cell*, *96*(2), 175-183. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80558-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80558-9)
- Watanabe, H., & Fukui, Y. (2006). Effects of dithiothreitol and Boar on pronuclear formation and embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Theriogenology*, *65*(3), 528-539. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.031>
- Wayne, W. D. & Chad, L. C. (2013). *Biostatistics. A foundation for análisis in the health sciences. Tenth edition. Ed. Wiley. USA. Pp 236 y 601.*
- Wu, B., Xue, H., Chen, L., Dai, Y., Guo, J., & Li, X. (2013). Effect of PMSG/HCG superovulation on mouse embryonic development. *Journal of Integrative Agriculture*, *12*(6), 1066-1072. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(13\)60485-2](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(13)60485-2)
- Wu, Z., Zheng, X., Luo, Y., Huo, F., Dai, H., Zhang, G., Yu, W., Tian, F., He, L., & Chen, J. (2015). Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, *163*, 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.020>
- Zambrano, F., Águila, L., Arias, M. E., Sánchez, R., & Felmer, R. (2016). Improved preimplantation development of bovine ICSI embryos generated with spermatozoa pretreated with membrane-destabilizing agents lysolecithin and triton X-100. *Theriogenology*, *86*(6), 1489-1497. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.007>
- Zambrano, F., Águila, L., Arias, M. E., Sánchez, R., & Felmer, R. (2017). Effect of sperm pretreatment with glutathione and membrane destabilizing agents lysolecithin and triton X-100, on the efficiency of bovine intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*(2), 305-311. <https://doi.org/10.1111/rda.12906>

- Zirkin, B. R., & Naish, S. J. (1989). Formation and function of the male pronucleus during mammalian fertilization. En *Elsevier eBooks* (pp. 91-114). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-622595-2.50011-5>