



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
CAMPO DE CONOCIMIENTO: REPRODUCCIÓN

**CARACTERIZACIÓN DE GAMETOS, FERTILIZACIÓN *IN VITRO* Y DESARROLLO
EMBRIONARIO EN DOS ESPECIES DE MURCIÉLAGOS FILOSTÓMIDOS**
(*Artibeus jamaicensis* y *Sturnira lilium*)

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA
ALMA LILIA ÁLVAREZ GUERRERO

TUTORA PRINCIPAL: DRA. NORMA ÁNGELICA MORENO MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. SALVADOR ROMO GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MÉXICO, D.F. OCTUBRE DEL 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Ana María y Jesús Benjamín

Por su amor, trabajo y sacrificios en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Es un privilegio ser su hija. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Agly y Benjamín

Por su apoyo, amor y porque cada día me enseñan que los obstáculos se pueden vencer.

A mis sobrinos Ben y Damían

Por que desde que llegaron a mi vida esta llena de alegrías, de juegos, de abrazos y de mucho amor. Porque cuando estoy con ustedes me olvido de los problemas.

A Ricardo

Por todo tu amor y confianza. Por compartir alegrías y tristezas, por cada una de las palabras y consejos que me diste en todos estos años. Por estar conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Por la ayuda brindada por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas y la Facultad de Veterinaria y Zootecnia por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A mi tutora, la Dra. Norma Moreno Mendoza por la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por todos sus consejos, por la confianza que deposito en mí para realizar este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Francisco González y a la Dra. Rosalba Soto por que me apoyaron cuando lo más lo necesitaba, por sus consejos y por su amistad.

Al comité tutorial formado por el Dr. Horacio Merchant Latios y el Dr. Salvador Romo García por sus observaciones y consejos.

Al Dr. Alfredo Medrano por todo su apoyo y su amistad.

A los miembros del jurado, los doctores Javier Valencia, Miguel Betancourt, Alfredo Medrano y Oscar Gutiérrez por sus observaciones durante la revisión de este trabajo.

A Alejandro Marmolejo por enseñarme a hacer los cortes semifinos, por su apoyo y su amistad.

A la Dra. Alina Ordoñez por sus consejos, por su apoyo, pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. Maricela Villagran por sus consejos, por su apoyo y amistad.

Al Dr. Héctor Magadán por su apoyo y comentarios durante la escritura de la tesis.

A Andrea, Lupita, Rocio, Sandy, Tania, Barbara, Adriana, Eva, Claudia, Rosalía, Lorena, Erika, Israel, Beto y Daniel gracias por brindarme su amistad, por su apoyo y compañía.

A todos los que hicieron posible la realización de este trabajo, por ser parte de mi vida, por su amor y amistad. **GRACIAS**

RESUMEN

La caracterización de gametos y la fertilización *in vitro* en fauna silvestre tiene gran importancia por su aplicación en distintas áreas de investigación. A este respecto, muestran especial interés las características reproductivas de los murciélagos, en particular las especies de la familia Phyllostomidae, quienes presentan algunas similitudes con la reproducción humana y algunos primates. El semen fue colectado de ambas colas del epidídimo y conductos deferentes. Los ovocitos se evaluaron en base a características morfológicas de acuerdo a la clasificación de De Loos *et al.* (1989). *A. jamaicensis* presentó un diámetro escrotal 1.62 ± 0.39 cm; concentración espermática $4.26 \pm 2.05 \times 10^6$ espermatozoides/ml; motilidad $34.55 \pm 25.83\%$; viabilidad $73.23 \pm 20.49\%$; anormalidades de cabeza, pieza media y flagelo $12.50 \pm 6.35\%$, gotas citoplasmáticas, cabezas y flagelos sueltos $12.61 \pm 9.25\%$. Longitud de la cabeza 6.26 ± 0.69 μm , pieza media 18.61 ± 2.92 μm y flagelo 70.92 ± 9.00 μm . *S. liliium*, presentó un diámetro escrotal 1.39 ± 0.35 cm; concentración espermática $5.15 \pm 1.88 \times 10^6$ espermatozoides/ml; motilidad $60.00 \pm 14.14\%$; viabilidad $83.82 \pm 8.37\%$; anormalidades de cabeza, pieza media y flagelo $13.77 \pm 9.35\%$, gota citoplasmática, cabeza y flagelos sueltos $5.77 \pm 3.01\%$. Longitud de la cabeza 7.01 ± 0.89 μm , pieza media 20.33 ± 4.59 μm y flagelo 70.50 ± 8.31 μm . Se recuperaron 12.8 ± 7.3 ovocitos del ovario derecho y 9.9 ± 4.9 ovocitos del ovario izquierdo de *A. jamaicensis*, de calidad excelente hasta mala. Para *S. liliium* se recuperaron 10.7 ± 4.6 ovocitos del ovario derecho y 10.9 ± 5.5 ovocitos del ovario izquierdo, de calidad excelente hasta mala. La capacitación y la reacción acrosomal fue inducida en espermatozoides de *A. jamaicensis* utilizando diferentes temperaturas y progesterona. Para evaluar la funcionalidad del espermatozoide se realizó la prueba CTC, Lectinas (PSA-FITC) y por Microscopía Electrónica de Transmisión. Los espermatozoides presentaron fluorescencia uniforme en toda la cabeza (no capacitado). Se observaron espermatozoides que mostraron una banda oscura sin fluorescencia en el segmento ecuatorial y la porción anterior de la cabeza presentó fluorescencia (capcitados). Se observaron espermatozoides que no presentaron fluorescencia en la cabeza (reacción acrosomal). Para la maduración *in vitro* de ovocitos *A. jamaicensis*, se emplearon dos temperaturas (37°C y 38.5°C) y dos tiempos de incubación (24 y 44 horas). El medio de maduración fue suplementado con Estradiol, FSH, LH y se observó la expansión de las células de la granulosa y la presencia del primer cuerpo polar. A 37°C con hormonas y 24 horas de cultivo, se obtuvo el mayor porcentaje de maduración *in vitro* (91.6%). Se realizaron los primeros ensayos sobre fertilización *in vitro* en el murciélago *A. jamaicensis*. Se utilizaron dos medios de fertilización (TALP y HTF), la incubación de espermatozoides y ovocitos fue de 22 horas. Los espermatozoides recuperados del epidídimo de *A. jamaicensis* y *S. liliium* presentaron altos porcentajes de viabilidad y motilidad y bajos porcentajes de anormalidades. Los ovocitos de categorías 1, 2 y 3 podrían utilizarse en estudios de maduración y fertilización *in vitro*. Los espermatozoides *A. jamaicensis* se capacitaron y llevaron a

cabo la reacción acrosomal en un periodo de entre 6 y 8 horas Los ovocitos madurados *in vitro* a 37°C durante 24 horas y el medio con hormonas presentaron expansión de células de la granulosa a diferencia de los otros tratamientos. A pesar de que los ovocitos se observaron rodeados de espermatozoides, ninguno de ellos pudo penetrar la zona pelúcida.

PALABRAS CLAVES: *A. jamaicensis*, *S. liliun*, espermatozoides, ovocitos, capacitación, maduración *in vitro*, fertilización *in vitro*.

ABSTRACT

Characterization of gametes and *in vitro* fertilization in wildlife is of great importance for their application in different areas of research. For this, the semen was collected from the tail of the epididymis. The oocytes were recovered from both ovaries and evaluated based on morphological characteristics according to the classification of De Loos *et al.* (1989). *A. jamaicensis* had a scrotal diameter of 1.62 ± 0.39 cm, sperm concentration $4.26 \pm 2.05 \times 10^6$ sperm/ml, motility $34.55 \pm 25.83\%$; viability $73.23 \pm 20.49\%$; head, tail and mid-piece abnormalities $12.50 \pm 6.35\%$, cytoplasmic drops and isolated heads and tails $12.61 \pm 9.25\%$. Head length was 6.26 ± 0.69 μm , mid-piece 18.61 ± 2.92 μm and tail 70.92 ± 9.00 μm . *S. liliium*, had a scrotal diameter of 1.39 ± 0.35 cm, sperm concentration $5.15 \pm 1.88 \times 10^6$ sperm/ml, motility $60.00 \pm 14.14\%$; viability $83.82 \pm 8.37\%$; head, tail and mid-piece abnormalities $13.77 \pm 9.35\%$, cytoplasmic drops and isolated heads and tails $5.77 \pm 3.01\%$. Head length was 7.01 ± 0.89 μm , mid-piece 20.33 ± 4.59 μm and tail 70.50 ± 8.31 μm . 12.8 ± 7.3 oocytes of right ovary and 9.9 ± 4.9 oocytes of left ovary of *A. jamaicensis* were recovered, ranging in quality from excellent to poor. For *S. liliium*, 10.7 ± 4.6 oocytes from the right ovary and 10.9 ± 5.5 oocytes of left ovary were recovered, ranging in quality from excellent to poor. Capacitation and acrosome reaction was induced in sperm of *A. jamaicensis* applying different temperatures and progesterone. To assess sperm functionality, CTC and lectin PSA-FITC test were performed by Transmission Electron Microscopy. Sperm presented uniform fluorescence throughout the head and mid-piece (non-capacitated). Subsequently we observed sperm with a dark band and no fluorescence in the equatorial and post-equatorial segment, while the anterior portion of the head and mid-piece the sperm showed fluorescence (capacitated). Sperm with not fluorescence in the head, but undergoing in the mid-piece (acrosome reaction) were also observed. For *in vitro* oocyte maturation of *A. jamaicensis*, two temperatures 37°C and 38.5°C and two incubation times (24 and 44 hours) were used. The maturation medium was supplemented with Estradiol, FSH and LH and the expansion of granulosa cells and the presence of the first polar body was observed. At 37°C with hormones and 24 hours of culture, the highest percentage of *in vitro* maturation (91.6%) was obtained. The first *in vitro* fertilization in *A. jamaicensis* was performed. Two medium cultures (TALP and HTF) were used; the incubation of sperm and oocytes was 22 hours. The recovered epididymal sperm of *A. jamaicensis* and *S. liliium* showed high percentages of viability and motility and low percentages of abnormalities. Oocytes of categories 1, 2 and 3 in *A. jamaicensis* and *S. liliium* could be used in studies of *in vitro* maturation and fertilization. Sperm *A. jamaicensis* were trained and conducted the acrosome reaction in a period of between 6 and 8 hours. Oocytes mature *in vitro* at 37°C for 24 hours and the medium with hormones had expansion of granulosa cells in contrast to the other treatments. Although oocytes surrounded sperm were observed, neither was able to penetrate the zona pellucida.

KEY WORDS: *A. jamaicensis*, *S. liliium*, sperm, oocytes, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization.

INDICE

	PAG
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
INDICE DE CUADROS.....	9
INDICE DE FIGURAS... ..	10
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. ANTECEDENTES.....	14
2.1 MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA.....	14
2.2. MORFOLOGÍA DEL COMPLEJO OVOCITO CÚMULO (COC).....	17
2.3. CARACTERIZACIÓN DE ESPERMATOZOIDES.....	20
2.3.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.....	21
2.3.1.1. Medición de la circunferencia o diámetro escrotal.....	21
2.3.1.2. Volumen.....	21
2.3.1.3. Color.....	22
2.3.1.4. pH.....	22
2.3.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.....	23
2.3.2.1. Motilidad espermática.....	23
2.3.2.2. Concentración espermática.....	24
2.3.2.3. Viabilidad espermática.....	24
2.3.2.4. Morfología espermática (anormalidades).....	25
2.4. CARACTERIZACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE.....	27
2.5. CARACTERIZACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MURCIÉLAGOS.....	28
2.6. CARACTERIZACIÓN DE OVOCITOS.....	29
2.7. CARACTERIZACION DE OVOCITOS EN ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE... ..	33
2.8. REPRODUCCIÓN ASISTIDA: FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i>	34
2.8.1 COLECCIÓN DE OVARIOS Y DE OVOCITOS.....	34
2.8.2 MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>	35
2.8.3. FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i>	37
2.8.4. DESARROLLO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i>	39
2.9. FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i> EN ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE.....	40
2.10. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL EN MURCIÉLAGOS.....	41
2.11. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO.....	42
2.11.1. <i>Artibeus jamaicensis</i>	44
2.11.2. <i>Sturniralilium</i>	46
III. JUSTIFICACIÓN.....	47
IV. HIPÓTESIS.....	48
V. OBJETIVO GENERAL.....	48
VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	48
VII. MATERIAL Y METODO.....	49
7.1. LUGAR DE COLECTA.....	49
7.2. ANIMALES.....	49
7.3. CARACTARIZACIÓN DE GAMETOS.....	50
7.3.1. Obtención de ovarios y testículos.....	50
7.4. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.....	50
7.4.1. Tamaño de los organismos y diámetro escrotal.....	50

7.5. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.....	50
7.5.1. Concentración espermática.....	50
7.5.2. Porcentaje de motilidad espermática.....	51
7.5.3. Morfometría espermática.....	51
7.5.4. Porcentaje de viabilidad espermática.....	51
7.5.5. Porcentaje de anomalías espermáticas.....	51
7.6. CARACTERIZACIÓN DE OVOCITOS.....	52
7.7. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL <i>IN VITRO</i>	52
7.7.1. Obtención de espermatozoides.....	52
7.7.2. Prueba CTC.....	53
7.7.3. Prueba lectinas (PSA-FITC) para evaluar la integridad del acrosoma.....	54
7.7.4. Morfología espermática.....	54
7.7.5. Porcentaje de motilidad.....	54
7.7.6. Porcentaje de viabilidad.....	54
7.8. MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>	55
7.8.1. Obtención de ovarios.....	55
7.8.2. Colección de ovocitos.....	55
7.8.3. MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>	55
7.9. FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i>	56
7.10. DESARROLLO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i>	57
7.11. ULTRAESTRUCTURA DE ESPERMATOZOIDES Y OVOCITOS.....	57
7.12. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	58
VIII. RESULTADOS.....	59
8.1. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES DE <i>A. jamaicensis</i> y <i>S. liliun</i>	59
8.2. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE OVOCITOS DE <i>A. jamaicensis</i> y <i>S. liliun</i>	70
8.3. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL EN EL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO <i>A. jamaicensis</i>	74
8.4. MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS DEL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO <i>A. jamaicensis</i>	84
8.5. FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i> EN EL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO <i>A. jamaicensis</i>	92
8.6. DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO <i>IN VITRO</i> EN EL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO <i>A. jamaicensis</i>	97
IX. DISCUSIÓN.....	98
X. CONCLUSIONES.....	120
XI. REFERENCIAS.....	122

INDICE DE TABLAS

	PAG
Tabla 1. Volumen del eyaculado, número de espermatozoides en diferentes especies.....	22
Tabla 2. Anormalidades espermáticas comúnmente encontradas en muestras de animales domésticos.....	26
Tabla 3. Características macroscópicas del organismo y microscópicas del espermatozoide de murciélago de <i>A. jamaicensis</i> y <i>S. liliium</i>	60
Tabla 4. Número de ovocitos obtenidos de diferentes calidades en el ovario derecho y ovario izquierdo de murciélagos de <i>A. jamaicensis</i> y <i>S. liliium</i>	72
Tabla 5. Porcentaje de Maduración <i>in vitro</i> (MIV) de ovocitos del murciélago <i>A. jamaicensis</i> . A diferentes temperaturas, tiempo de incubación y la adición de hormonas al medio de maduración.....	92

INDICE DE FIGURAS

		PAG
Figura 1.	Morfología espermática en <i>A. jamaicensis</i> y <i>S. liliium</i>	61
Figura 2.	Morfología espermática de <i>A. jamaicensis</i>	63
Figura 3.	Morfología espermática de <i>S. liliium</i>	64
Figura 4.	Anormalidades espermáticas en <i>A. jamaicensis</i>	68
Figura 5.	Anormalidades espermáticas en <i>S. liliium</i>	69
Figura 6.	Ovarios de <i>A. jamaicensis</i> y <i>S. liliium</i>	70
Figura 7.	Ovocitos <i>A. jamaicensis</i> y <i>S. liliium</i>	73
Figura 8.	Patrones de fluorescencia observados en la cabeza de <i>A. jamaicensis</i> , por CTC.....	76
Figura 9.	Porcentajes de espermatozoides de <i>A. jamaicensis</i> no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal por medio de la prueba de CTC. A 32°C y 37°C con y sin P ₄ a diferentes horas de incubación.....	78
Figura 10.	Porcentajes de espermatozoides de <i>A. jamaicensis</i> con acrosoma intacto por medio de la prueba de Lectinas (PSA-FITC). A 32°C y 37°C con y sin P ₄ a diferentes horas de incubación.....	80
Figura 11.	Cambios en la morfología del espermatozoide de <i>A. jamaicensis</i>	81
Figura 12.	Morfología del espermatozoide de <i>A. jamaicensis</i> (porcentaje de flagelos enrollados) a 32°C y 37°C con y sin P ₄ a diferentes horas de incubación.....	81
Figura 13.	Porcentajes de viabilidad del espermatozoides de <i>A. jamaicensis</i> a 32°C y 37°C con y sin P ₄ diferentes horas de incubación.....	83
Figura 14.	Complejo-ovocito-cúmulo de <i>A. jamaicensis</i> madurados <i>in vitro</i> durante 24 horas sin hormonas.....	85
Figura 15.	Cortes semifinos de un complejo-ovocito-cúmulo de <i>A. jamaicensis</i> teñido con azul de toluidina. Madurado <i>in vitro</i> durante 24 horas a 37°C y sin hormonas en el medio de maduración.....	86
Figura 16.	Complejo-ovocito-cúmulo de <i>A. jamaicensis</i> madurados <i>in vitro</i> durante 24 horas a 37°C con hormonas.....	86
Figura 17.	Complejo-ovocito-cúmulo de <i>A. jamaicensis</i> madurados <i>in vitro</i> durante 24 horas a 37°C con hormonas.....	87

Figura 18.	Complejo-ovocito-cúmulo de <i>A. jamaicensis</i> madurados <i>in vitro</i> durante 24 horas a 37°C, suplementado el medio con hormonas, teñidos con azul de toluidina.....	88
Figura 19.	Complejo-ovocito-cúmulo de <i>A. jamaicensis</i> madurado <i>in vitro</i> 44 horas a 37°C con hormonas.....	89
Figura 20.	Complejo-ovocito-cúmulo de <i>A. jamaicensis</i> madurados <i>in vitro</i> 24 horas a 38.5°C sin hormonas.....	89
Figura 21.	Complejo-ovocito-cúmulo de <i>A. jamaicensis</i> madurados <i>in vitro</i> 24 Y 44 horas a 38.5°C con hormonas.....	90
Figura 22.	Complejos-ovocito-cúmulo en fresco y cortes semifinos de ovocitos de <i>A. jamaicensis</i> teñidos con azul de toluidina.....	91
Figura 23.	Ovocitos de calidad 4 de <i>A. jamaicensis</i> madurados <i>in vitro</i> 24 y 44 horas a 37°C con hormonas.....	91
Figura 24.	Fertilización <i>in vitro</i> de complejos-ovocitos-cúmulo y espermatozoides de <i>A. jamaicensis</i> con medio TALP durante 22 horas a 37°C.....	94
Figura 25.	Fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos y espermatozoides de <i>A. jamaicensis</i> con medio HTF durante 22 horas a 37°C.....	95
Figura 26.	Fertilización <i>in vitro</i> de complejos-ovocitos-cúmulo y espermatozoides de <i>A. jamaicensis</i> con medio TALP durante 22 horas a 37°C.....	96
Figura 27.	Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> de <i>A. jamaicensis</i> durante un periodo de 48 horas en medio de desarrollo.....	97

I. INTRODUCCIÓN

Los quirópteros constituyen el segundo orden más diverso de mamíferos con aproximadamente 1000 especies en el mundo (Kunz, 1982; Altringham, 1999; Simmons 2005), de las cuales cerca de 135 habitan en México (Sánchez y Romero, 1995; Ceballos *et al.* 2005). Los murciélagos representan entre el 40 y 50% de las especies de mamíferos que habitan en ecosistemas tropicales (Fenton *et al.* 1992; Cosson *et al.* 1999; Estrada y Coates-Estrada, 2001). Son extremadamente importantes para la agricultura ya que ayudan al control de plagas de insectos, así como también polinizan las flores y ayudan a esparcir las semillas. Son los únicos mamíferos que pueden volar y presentan un sistema de ecolocación muy avanzado.

Los gametos de muchas especies de mamíferos, incluida la humana, han sido manipulados empleando una gran variedad de estrategias que tienen que ver especialmente con la infertilidad humana y en la producción de animales domésticos y silvestres, y también para entender los eventos fisiológicos y moleculares de los procesos reproductivos y del desarrollo. También pueden ser utilizados como una herramienta para evaluar las condiciones de cultivo, las técnicas empleadas durante procedimientos de inseminación artificial y fertilización *in vitro* y en programas de conservación. La morfología de los gametos refleja la salud del aparato reproductor del macho y de la hembra.

La evaluación de la morfología del complejo ovocito-cúmulo (COC) es el método más empleado como un indicador del potencial de desarrollo de los ovocitos utilizados en protocolos de fertilización *in vitro* (Hinrichs y Williams, 1997; De Loos *et al.* 1989). El grado de expansión de las células del cúmulo se considera como un indicador de la calidad de los ovocitos (Sutton-McDowall *et al.* 2004; Yokoo y Sato, 2004; Bertoldo *et al.* 2011). La expansión del cúmulo se ha demostrado que influye en la fertilización al promover la penetración de los espermatozoides en el ovocito mediante la inducción de la reacción acrosomal (Areekijserree y Vejaratpimol, 2006). Los ovocitos que no están rodeados de células del cúmulo o que presentan un citoplasma fragmentado o dañado son considerados de baja calidad ya que no logran completar la maduración meiótica *in vitro* (Siriaroonrat, *et al.* 2010).

Los espermatozoides proporcionan información valiosa sobre la salud de los testículos y epidídimos (Freneau *et al.* 2010), así como de los procesos relacionados con eventos celulares en la espermatogénesis, motilidad e interacciones celulares (Eliasson, 2010).

El estudio sobre la morfología de los espermatozoides es importante para la comprensión de la biología reproductiva tanto de humanos como de animales domésticos y silvestres. En las diferentes especies existe una gran variación en el estudio sobre el análisis de semen (volumen del semen, el pH, la concentración espermática, el número total de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales) ya que se ha observado que los espermatozoides al presentar alguna anomalía no pueden capacitarse ni llevar a cabo la reacción acrosomal y por lo tanto no logran penetrar al ovocito y llevar a cabo la fertilización o un desarrollo adecuado del embrión (Eliasson, 2010). La información de estos estudios se pueden utilizar para investigar problemas reproductivos y para determinar la eficacia de los métodos en tecnologías de reproducción asistida (De Jong *et al.* 2005; Brito *et al.* 2010).

Durante los últimos años y para la mayoría de las especies domésticas de interés zootécnico, se han desarrollado diferentes métodos de maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y desarrollo embrionario *in vitro* (DIV) (Cheng *et al.* 1986; Bavister *et al.* 1992; Bavister, 1995) mientras que en especies de fauna silvestre, los porcentajes de desarrollo se encuentran todavía en fase experimental (Pope, 2000; Wirtu *et al.* 2009).

La fertilización *in vitro* en fauna silvestre tiene gran importancia por su posible aplicación en distintas áreas de investigación. Sin embargo, en comparación con los resultados obtenidos en rumiantes y humanos, hasta la fecha las experiencias con la fertilización *in vitro* en fauna silvestre ha tenido mucho menos éxito (Loskutoff, 2003) y en murciélagos no existen reportes relacionados con estos temas.

II. ANTECEDENTES

2.1. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

El espermatozoide es el producto final del proceso de espermatogénesis, donde las células germinales pasan a través de una serie de fases mitóticas, meióticas y de diferenciación dentro del túbulo seminífero del testículo (Behre *et al.* 2000; Sutovsky y Manandhar, 2006). Los componentes principales de un espermatozoide son la cabeza, el acrosoma, la pieza media y el flagelo.

CABEZA

Los espermatozoides de muchas especies de mamíferos presentan una cabeza en forma de espátula, con el núcleo y el acrosoma aplanado en un plano antero-posterior, el acrosoma y núcleo son estructuras simétricas. En contraste, el espermatozoide de algunos roedores presenta una cabeza de forma falciforme, con el acrosoma que recubre el borde convexo del núcleo. En general, dentro de muchas especies de mamíferos los espermatozoides son uniformes en tamaño y forma (Senger, 2003).

Núcleo

En el núcleo, el ácido desoxirribonucleico (ADN) está condensado y las histonas han sido parcialmente reemplazadas durante la espermiogénesis por protaminas haciendo que la cromatina esté hipercondensada, lo que también le proporciona una forma hidrodinámica a la cabeza (Brewer *et al.* 2002; Dadoune, 2003) permitiendo que se desplace por las diferentes estructuras del aparato reproductor de la hembra. Al igual que las células somáticas, el núcleo está cubierto por una envoltura nuclear reducida (Sutovsky y Manandhar, 2006).

Citoesqueleto

El citoesqueleto en la cabeza del espermatozoide de mamífero se encuentra dividido en dos regiones: la región subacrosomal localizada entre el acrosoma y el núcleo. La región postacrosomal que se encuentra entre el núcleo y la membrana plasmática posterior al acrosoma (Brewer *et al.* 2002; Eddy, 2006). La región subacrosomal y postacrosomal se conoce como teca perinuclear. En organismos donde el

espermatozoide tiene una cabeza en forma falciforme tienen una región más de citoesqueleto, la cual se conoce como la región para-acrosomal que está presente entre la punta anterior del acrosoma y la membrana plasmática en espermatozoides que tienen una cabeza falciforme (Eddy, 2006).

El citoesqueleto tiene un rol estructural ya que define la forma y la simetría de la cabeza del espermatozoide (Clermont *et al.* 1955; Yanagimachi y Noda, 1970). La teca perinuclear proporciona rigidez y apoyo a la parte posterior de la cabeza del espermatozoide previniendo su flexión durante el movimiento; además permite la unión y la estabilidad entre la membrana plasmática, el acrosoma y el núcleo (Courtens *et al.* 1976; Lalli y Clermont, 1981; Bellvé y Brien, 1983; Longo *et al.* 1987)

Acrosoma

Se origina del aparato de Golgi durante la espermiogénesis y cubre dos terceras partes de la parte anterior del núcleo. El acrosoma consta de la membrana acrosomal externa, que se encuentra cerca de la superficie interior de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide y de la membrana acrosomal interna, que se encuentra muy cerca de la envoltura nuclear (Eddy, 2006). La forma, distribución y tamaño del acrosoma están altamente conservadas a lo largo de la evolución y es distintivo de los espermatozoides de animales de diferentes filos (Eddy, 2006).

El acrosoma delimita dos secciones de la cabeza: El acrosoma anterior y el segmento ecuatorial. Durante la reacción acrosomal, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan y forman vesículas, para liberar el contenido del acrosoma. La membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial persisten hasta la fusión del espermatozoide con el óvulo (Sutovsky y Manandhar, 2006). Esta vesícula contiene enzimas hidrolíticas como acrosina, hialuronida, lisina, esterases e hidrolasas ácidas (Sutovsky y Manandhar, 2006) necesarias para la penetración de las capas de células de la granulosa y la zona pelúcida del ovocito para poder fertilizarlo (Senger, 2003).

FLAGELO

Los espermatozoides de mamífero presentan diferencias especie-específicas en la forma y longitud del flagelo. El espermatozoide de humano es de aproximadamente 60 μm de longitud total, mientras que el flagelo presenta una longitud aproximada de 55 μm (Baccetti, 1984), el espermatozoide de conejo mide 46 μm de largo, el de ratón 120 μm de largo, el de rata 190 μm de largo y el espermatozoide de hámster mide aproximadamente 250 μm de largo (Phillips, 1972).

El flagelo de espermatozoides de mamífero consiste de 4 segmentos distintos: El de conexión (cuello), la pieza media, la pieza principal y la pieza final. Los principales componentes estructurales dentro del flagelo en los espermatozoides son el axonema, las mitocondrias arregladas en forma en espiral, las fibras densas externas y la vaina fibrosa (Eddy, 2006).

Pieza media

La longitud de la pieza media y la disposición de las mitocondrias en el espermatozoide ha sido determinada en varias especies de mamíferos (Phillips, 1977). La pieza media está formada por pares de mitocondrias alargadas dispuestas en un patrón helicoidal alrededor de las fibras densas exteriores de la cola. La pieza media difiere considerablemente en longitud; pero la organización de las mitocondrias es poco variable entre las especies. La longitud de la pieza media está relacionada con la longitud de los espermatozoides y en la mayoría de los mamíferos está entre 8 y 12 micras pero en la rata es de 64 μm y 100 μm en el hámster chino (Phillips, 1972).

El número de giros mitocondriales de la pieza media varía entre las especies. En conejo, las mitocondrias están organizadas en alrededor de 41 giros dispuestos en una hélice cuádruple, 40 giros dispuestos en una doble hélice en el mono Rhesus y cerca de 64 giros en el espermatozoide de toro. Hay alrededor de 362 giros mitocondriales en el espermatozoide de rata, donde las mitocondrias en espiral se encajan en patrones intrincados alrededor de las fibras densas externas (Phillips, 1977)

El anulus delimita la unión entre la pieza media y la pieza principal del flagelo. La pieza principal constituye la mayor parte del flagelo y continúa casi hasta el final del flagelo, donde continúa como microtúbulos que terminan en la pieza final (Senger, 2003).

Pieza final

El axonema se origina a partir del centriolo distal y se compone de un complejo de 9 + 2 de microtúbulos; esto es, 9 pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. Alrededor de este arreglo de 9+2 hay 9 fibras densas externas que están adyacentes al axonema y se extienden desde el cuello hasta la parte final de la pieza principal (Zamboni y Stefanini, 1971; Oura, 1971; Senger, 2003).

El flagelo proporciona la fuerza necesaria para que el espermatozoide alcance la superficie del ovocito y logre fertilizarlo. Los diferentes elementos del flagelo generan y dan forma a las ondas de flexión que producen esta fuerza y propagan las ondas desde la cabeza hasta la punta del espermatozoide (Baccetti, 1984; Eddy, 2006). El flagelo, al igual que la cabeza, está herméticamente cerrado por la membrana plasmática y contiene una escasa cantidad de citoplasma.

2.2. MORFOLOGÍA DEL COMPLEJO OVOCITO CÚMULO (COC)

El complejo ovocito-cúmulo es una estructura que consta en su interior de dos células, una pequeña llamada primer cuerpo polar y la más grande llamada ovocito, ambos están encerrados en una matriz extracelular de glicoproteínas, denominada la zona pelúcida (ZP). Entre el ovocito y la ZP hay un espacio llamado perivitelino (Florman y Ducibella, 2006). La zona pelúcida está cubierta por varias capas foliculares conocidas como células de la granulosa o del cúmulo (*cumulus oophorus*). Un COC de humano tiene un diámetro aproximado de entre 116.9 a 130 μm , pero puede variar entre las especies (Goyanes *et al.* 1990; Trounson *et al.* 2001).

Citoplasma

El ovocito contiene una gran cantidad de citoplasma, en el cual se almacenan diversas proteínas que permitirán mantener la nutrición del ovocito y del embrión, ya que los primeros estadios de desarrollo embrionario necesitan un suministro de energía y aminoácidos para mantener su desarrollo y viabilidad (Albertini *et al.* 2001). En la mayoría de los organismos, el citoplasma contiene una gran cantidad de ARN mensajeros (ARNm), para la producción de proteínas durante el desarrollo temprano. También contiene una gran cantidad de ribosomas y de ARN de transferencia (ARNt), necesarios

para la síntesis de proteínas después de la fertilización del ovocito, además de factores morfogenéticos, localizados en diferentes regiones del citoplasma para la posterior diferenciación de las células en diferentes linajes (Trounson *et al.* 2001; Florman y Ducibella, 2006)

Núcleo

Al final del periodo de crecimiento y antes de la maduración meiótica, el núcleo del ovocito es grande, pálido y en relativa inactividad transcripcional conocido como vesícula germinal (GV) (Gonzales-Santander y Clavero Nuez, 1973). Después de la ovulación, la maduración de los ovocitos se realiza en varias etapas, iniciando con la ruptura de la membrana nuclear de la vesícula germinal, la primera división meiótica incluyendo extrusión del primer cuerpo polar, la formación del segundo huso meiótico y la detención de la segunda meiosis en metafase (Sathananthan, 1985; Florman y Ducibella, 2006).

Otros orgánulos

Hay una gran cantidad de mitocondrias de forma alargada, las cuales se encuentran distribuidas cerca de la membrana plasmática del ovocito, en el citoplasma y cerca de la envoltura nuclear (Familiari *et al.* 2006)

El ovocito maduro tiene pocos ribosomas, no tiene retículo endoplásmico rugoso y también se observan algunas membranas formando el aparato de Golgi (Sathananthan *et al.* 1990).

Membrana plasmática

La membrana plasmática está formada por una doble capa de lípidos y en su superficie presenta una gran cantidad de microvellosidades (Sathannanthan *et al.* 1990). Esta membrana regula el flujo de ciertos iones durante la fertilización y debe ser capaz de fusionarse con la membrana plasmática del espermatozoide.

Gránulos corticales

Estos son pequeños gránulos de secreción con un diámetro de 0.2 a 0.6 μm que aumentan en número durante el crecimiento de los ovocitos y migran hacia la corteza, colocándose a una distancia de 0.4 a 0.6 μm por debajo de la membrana plasmática (Ducibella *et al.* 1994).

Los gránulos corticales contienen glicosaminoglicanos, proteasas, fosfatasa ácida y peroxidasa (Hoodbhoy y Talbot, 1994; Familiari *et al.* 2006; Florman y Ducibella, 2006). Se ha observado que existe una correlación entre la translocación de los gránulos corticales y la placa metafásica; debido a un cambio de concentración de Ca^{+} y de que los microtúbulos probablemente están implicados en la translocación correcta de los gránulos corticales durante el bloqueo de la polispermia y la extrusión del segundo cuerpo polar durante la fertilización (Abbott *et al.* 2001).

Zona pelúcida

Es una matriz extracelular especializada que es sintetizada y secretada por el ovocito en crecimiento (Bleil y Wassarman 1980; Wassarman *et al.* 2001). Está compuesta por varias glicoproteínas designadas como ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Bleil y Wassarman 1980; Wassarman *et al.* 2001; Lefievre *et al.* 2004). La proteína ZP4 no está presente en ratón. Sin embargo está presente en humano y rata (Lefievre *et al.* 2004; Hoodbhoy *et al.* 2005). Estas proteínas forman una malla reticular que rodea al ovocito. En el ratón, donde esta matriz ha sido examinada por métodos microscópicos y bioquímicos, la zona se compone de ZP2/ZP3 filamentos que se mantienen unidos por interacciones no covalentes, los cuales se entrelazan a intervalos por ZP1 (Florman y Ducibella, 2006).

Células del cúmulo o de la granulosa

Las células del cúmulo son subpoblaciones de células de la granulosa que proveen de nutrientes al ovocito durante su crecimiento por medio de uniones que atraviesan la zona pelúcida y se conectan con el citoplasma del ovocito. Estas células son las responsables de la maduración citoplasmática ya que por medio de las uniones GAP secretan hacia el ovocito AMPc, purinas, pirimidinas, metabolitos y aminoácidos. Además existen señalizaciones parácrinas de factores de crecimiento (GDF-9, GDF-9B, FGF) y activinas del citoplasma del ovocito hacia las células de la granulosa que son necesarias para su óptimo desarrollo y maduración (Albertini *et al.* 2001; Dadashpour *et al.* 2012). Por otra parte, el cúmulo sintetiza una matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juega un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto favoreciendo la unión del espermatozoide para la fertilización. Sin embargo las funciones de las células de la granulosa o del cúmulo durante la fecundación en mamíferos aún necesita mayor investigación (Tanghe *et al.* 2002).

Hay estudios que muestran cómo las células del cúmulo pueden actuar como una barrera selectiva, deteniendo a los espermatozoides con morfología anormal o que no están capacitados así como aquellos que han completado la reacción acrosomal, permitiendo que solo los espermatozoides con un acrosoma intacto puedan penetrar y participar en las etapas posteriores de la fertilización (Cummins y Yanagimachi, 1986; Yanagimachi, 1994).

Las células del cúmulo pueden proporcionar factores que regulan la función de los espermatozoides ya que se ha observado en estudios *in vitro* que espermatozoides mantenidos en medios de cultivo con células del cúmulo incrementan la duración de la motilidad, la velocidad y la fuerza generada por el flagelo (Westphal *et al.* 1993; Yanagimachi, 1994; Fetterolf *et al.* 1994). Además, se ha sugerido que las células del cúmulo liberan un quimioatrayente para acercar al espermatozoide hacia el ovocito (Sun *et al.* 2005).

2.3. CARACTERIZACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Como se mencionó anteriormente, los espermatozoides pueden proporcionar información valiosa sobre la salud de los testículos y epidídimos (Freneau *et al.* 2010), así como de los procesos relacionados con eventos celulares como la espermatogénesis, motilidad e interacciones celulares (Eliasson, 2010). De manera que la evaluación del semen es de suma importancia, ya que existen características que se asocian con la infertilidad.

La calidad del semen depende de factores que usualmente no pueden ser modificados, tales como la producción espermática por los testículos, las secreciones de las glándulas y órganos accesorios (Björndahl y Kvist, 2003), de enfermedades, la edad, la temperatura, la alimentación (Pound *et al.* 2002), así como otros factores, tales como el tiempo de abstinencia y el método con el que fue obtenida la muestra de semen. Todos estos factores deben ser registrados y tomados en cuenta para la interpretación de los resultados (Correa-Perez *et al.* 2004; De Jonge *et al.* 2004)

El estudio de las características del semen, puede dividirse en dos grupos: las macroscópicas que pueden ser evaluadas a simple vista enseguida de la eyaculación en el tubo colector y las microscópicas que requieren de un equipo mínimo de laboratorio (de Lucas y Arbiza, 2004).

2.3.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

2.3.1.1. Medición de la circunferencia o diámetro escrotal

La importancia de esta medición radica en la correlación del peso testicular y la producción espermática, ya que proporciona una estimación aproximada de la producción de espermatozoides (Handelsman *et al.* 1984; WHO, 2010; Senger, 2003; Behre *et al.* 2000; Andersen *et al.* 2000; Holstein *et al.* 2003).

2.3.1.2. Volumen

El volumen del eyaculado varía entre las especies y es producto de las glándulas accesorias (glándula prostática, glándulas bulbouretrales y del epidídimo: WHO, 2010; Senger, 2003). La precisa medición del volumen es esencial en la evaluación del semen, porque esto permite calcular el total del número espermático y de células no espermáticas en el eyaculado (WHO, 2010)

Se mide directamente en el tubo donde se hace la colección. Este suele poseer un rango muy variable como puede apreciarse en la Tabla 1, pudiendo deberse a la especie, al individuo, edad, estación del año, número de eyaculaciones, cansancio, tiempo de abstinencia y enfermedades (de Lucas y Arbiza, 2004).

Tabla 1: Volumen del eyaculado, número de espermatozoides en diferentes especies (Hafez y Hafez, 2002).

Especie	Volumen del eyaculado (ml)	Número de espermatozoides (millones)
Bovino	2.0-10	4,000-5,000
Porcino	150-500	5,000
Ovino	0.7-2.0	800
Canino	1.0-2.5	125
Humano	2.0-6.0	125
Conejo	0.4-6.0	250-500
Ratón	0.15	80
Rata	0.10	80

2.3.1.3. Color

El color normal de un eyaculado debe ser blanco cremoso. Las variaciones pueden indicar una serie de anomalías, por ejemplo: un color de lechoso o acuoso está asociado generalmente a baja concentración de espermatozoides, el caso contrario sería un color cremoso intenso; una coloración roja o rosada, indica la presencia de sangre; un color amarillo puede estar asociado con la presencia de orina o pus. Estas características, aunque algo subjetivas, pueden ser un buen indicador de lo que se podrá encontrar en la observación microscópica (de Lucas y Arbiza, 2004; WHO, 2010).

2.3.1.4. pH

El pH del semen es un balance entre el pH de las diferentes secreciones de las glándulas accesorias, principalmente las secreciones alcalinas de las vesículas seminales y las secreciones acidas de la glándula prostática. El pH tiende a incrementarse cuando existe alta mortalidad de espermatozoides, cuando se efectúan eyaculados sucesivos o bien cuando se extrae el semen con electroeyaculador (Behre *et al.* 2000; Andersen *et al.* 2000; WHO, 2010).

2.3.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

La observación del semen al microscopio completa la evaluación que se inició en forma macroscópica. Las principales características analizadas son: motilidad, concentración, viabilidad (porcentaje de vivos y muertos) y morfología espermática.

2.3.2.1. Motilidad espermática

La medición de la motilidad consiste en colocar una gota de semen en un portaobjetos previamente calentado a 37°C en una platina y observar en un microscopio con el objetivo de 10X. El mantenimiento de la temperatura a 37°C es fundamental para la evaluación, ya que los cambios pueden dar lecturas equivocadas y alteraciones en el comportamiento o movimiento de los espermatozoides (Hafez y Hafez, 2002; WHO, 2010). Se ha detectado que a 32°C sólo el 75% de los espermatozoides tiene movilidad y a 20°C menos del 35%. Además, hay una baja sensible en la velocidad y pueden observarse movimientos circulares o en reversa (de Lucas y Arbiza, 2004).

En la actualidad, el desarrollo de métodos electrónicos, como los aparatos de análisis vinculados a programas de computadora como los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) está permitiendo análisis más rápidos y eficientes. Sin embargo, por el momento el costo de los mismos es muy elevado, lo que limita su uso.

Un sistema simple para evaluar la motilidad consiste en distinguir en la observación microscópica a los espermatozoides con motilidad progresiva y no progresiva de los inmóviles.

MOTILIDAD PROGRESIVA. Espermatozoides activos, su desplazamiento es lineal o en círculos grandes, independientemente de la velocidad.

MOTILIDAD NO PROGRESIVA. Todos los otros patrones de motilidad sin avance en su posición. Por ejemplo nadando en círculos pequeños, la fuerza del flagelo apenas lo desplaza o cuando el bateo del flagelo se puede observar.

INMOVILES. No presentan movimiento.

Jouannet *et al.* (1988), Larsen *et al.* (2000) y Zinaman *et al.* (2000) concluyen que la motilidad progresiva del espermatozoide de humanos se encuentra relacionada con las tasas de gestación. Esto es, espermatozoides que presentan una motilidad progresiva podrán fertilizar al ovocito y por lo tanto la hembra quedará gestante.

2.3.2.2. Concentración espermática

Esta puede ser medida básicamente por dos métodos, uno directo y otro indirecto. El método directo consiste en el conteo de espermatozoides en una cámara de Neubauer. Tiene como inconveniente lo lento y laborioso de la técnica.

Un método indirecto para medir la concentración consiste en la utilización de colorímetros o espectrofotómetros, que determinan la densidad o capacidad de la transmisión de luz a través de una muestra del semen diluido, al cual se le atribuye un valor estándar según tablas preparadas acordes con la calibración del aparato. Así se puede estimar la concentración del semen (de Lucas y Arbiza, 2004; Bernal, 2008).

La concentración espermática está relacionada con la capacidad y producción testicular, la disminución de la concentración en un grado severo puede indicar signos de patología testicular (Cuevas y Ruiz, 1972).

El número total de espermatozoides por eyaculado y la concentración espermática están relacionados con el volumen testicular (Handelsman *et al.* 1894; Andersen *et al.* 2000. Behre *et al.* 2000) y es una forma de medir la capacidad de los testículos para producir espermatozoides (McLeod y Wang, 1979). Además está relacionada con las tasas de fertilización y de gestación (Eliasson, 1975).

2.3.2.3. Viabilidad espermática

El porcentaje de espermatozoides vivos es analizado por la identificación de estos con membrana celular intacta, ya sea por la exclusión de un colorante o por una prueba hipoosmótica. La exclusión del colorante es un método basado en el principio de que si la membrana plasmática está dañada el colorante penetrará (espermatozoides no vivos). En la prueba hipoosmótica se basa en que solamente las células con membranas intactas (espermatozoides vivos) los flagelos se enrollarán al ser expuestos a soluciones hipoosmótica (Jeyendra *et al.* 1984; Bart y Oko, 1989).

La viabilidad espermática debe ser analizada tan pronto como sea posible, para prevenir la observación de efectos perjudiciales de deshidratación o cambios en la temperatura sobre la viabilidad.

2.3.2.4. Morfología espermática (anormalidades)

El semen contiene normalmente cierta proporción de espermatozoides morfológicamente anormales, sin embargo cuando sobrepasa cierto límite influye en forma negativa sobre la fertilidad (Silva, 1989) ya que el espermatozoide puede realizar sus funciones biológica solo cuando está cualitativa y morfológicamente bien constituido (Holy, 1983). Los espermatozoides anormales son incapaces de fecundar al ovocito, debido a que se encuentran imposibilitados para desplazarse dentro del aparato reproductor de la hembra, quedando atrapados en su gran mayoría en los anillos cervicales (Montes, 1984).

Se pueden detectar anormalidades en la cabeza, pieza media y flagelo, existiendo dos tipos de anormalidades espermáticas: las primarias, generalmente resultado de fallas durante la espermatogénesis, y las secundarias, que se atribuyen principalmente a una función anormal del epidídimo o del plasma seminal (de Lucas y Arbiza, 2004; Tabla 2).

Tabla 2: Anormalidades espermáticas comúnmente encontradas en muestras de animales domésticos.

Anormalidades primarias	Anormalidades secundarias
Espermatozoides no desarrollados	Cabezas normales sueltas
Cabezas dobles	Flagelos sueltos
Defecto del acrosoma	Gotas citoplasmática distal
Cabezas alargadas	Flagelo abaxial
Cabezas piriformes	
Cabezas anormales pequeñas	
Cabezas normales sueltas	
Cabezas dobles	
Pieza media anormal, gruesas o irregulares	
Flagelos fuertemente dobladas o enrolladas	
Flagelos dobles	
Gota citoplasmática proximal	
Cabeza con vacuolas	

La presencia de porcentajes mayores al 50% de anormalidades espermáticas en el eyaculado de bovinos es un reflejo de lesiones o cambios degenerativos en los testículos y/o en los epidídimos. Con frecuencia es difícil determinar si tales cambios son transitorios o permanentes, lo cual se complica aún más si consideramos que los espermatozoides que aparecen en el eyaculado son producto de un proceso que inició meses antes (Montes, 1984). Algunas agresiones en los testículos pueden inducir porcentajes altos de anormalidades, por ejemplo, cuando los machos son expuestos a temperaturas muy altas, ya sea ambiental o causada por fiebres severas debidas a procesos infecciosos, disminuye la motilidad y aumenta el porcentaje de anormalidades espermáticas y, por tanto, la fertilidad es reducida (Hafez, 1980; Silva, 1989; Senger, 2003; WHO, 2010).

En ocasiones, en el eyaculado pueden aparecer otros tipos de células como: eritrocitos, leucocitos, células epiteliales de la uretra o del pene, las cuales son más frecuentes cuando la concentración espermática es baja o existe algún proceso infeccioso en alguna parte del aparato reproductor (de Lucas y Arbiza, 2004; WHO, 2010).

Los espermatozoides anormales, también pueden tener ADN anormal. Los defectos morfológicos han sido asociados con un aumento en la fragmentación del ADN (Gandini *et al.* 2000), en la incidencia de aberraciones cromosómicas (Lee *et al.* 1996), de cromatina inmadura (Dadoune *et al.* 1988) y aneuploidía (Devillard *et al.* 2002; Martin *et al.* 2003).

2.4. CARACTERIZACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE

En los últimos años se ha generado un mayor interés por comprender la biología reproductiva de especies de fauna silvestre como en la cabra *Capricornis sumatraensis* (Suwanpugdee *et al.* 2009) donde evaluaron la calidad del eyaculado y caracterizaron la morfología espermática. Ellos concluyen que los resultados obtenidos son similares a lo reportado en otros bóvidos. Su estudio promovió la generación de una base de datos para comenzar a implementar programas de conservación de especies en peligro de extinción debido a la pérdida de su hábitat y la excesiva caza. También se han creado bases de datos en el Leopardo de las Indias (*Panthera pardus*; Jayaprakash *et al.* 2001) y en el leopardo de Arabia evaluando el semen en diferentes épocas del año (*Panthera pardus nimr*; Haas van Dorsser y Strick, 2005). Permitiendo entender la estrategias reproductivas en animales silvestres y poder ayudar en el manejo de su conservación (Wild *et al.* 1995).

También se ha descrito la ultraestructura, morfometría y anomalías espermáticas para el empleo de técnicas de reproducción asistida como inseminación artificial y fertilización *in vitro* para especies como el oso negro (*Ursus americanus*; Brito *et al.* 2010); marsupiales (*Dasyprocta aguti*; Ferraz *et al.* 2011); perros salvajes africanos (*Lycaon pictus*; Johnston *et al.* 2007); Koalas (*Phascolarctos cinereus adustus*; Jonhston *et al.* 1994) y musarañas pertenecientes a la familia Soricidae (Parapanov *et al.* 2009).

Además de lo anterior, el análisis de semen también sirve para realizar estudios comparativos entre las especies que pertenecen a la misma familia como los trabajos de Ambriz *et al.* (2003). Estos autores realizaron un estudio comparativo de los órganos reproductivos y de la morfometría del espermatozoide de tres especies de lagomorfos silvestres de Norteamérica: El conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*), la liebre de cola negra (*Lepus californicus*) y el conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*). No obstante existe una variación especie-específica en la evaluación del semen en cuanto al volumen, pH, concentración espermática, porcentaje de motilidad y anormalidades; por lo que ha sido difícil realizar estudios comparativos.

Además, las investigaciones sobre la evaluación de los espermatozoides permite entender las relaciones filogenéticas entre especies, como los estudios realizados por Robson *et al.* (1997) en primates de la especie *Tarsius bancanus*.

El uso de técnicas de reproducción asistida en animales de vidas silvestre ha incrementado considerablemente durante los últimos años, no solamente para propósitos de conservación, sino también porque varias de estas especies han llegado a ser importantes para la ganadería y la caza. El ciervo rojo ha recibido gran atención para los ganaderos e investigadores (Martínez *et al.* 2008) debido a la necesidad de crear programas para el manejo de éstas y para los sitios donde se caza esta especie.

2.5. CARACTERIZACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MURCIÉLAGOS

Se han descrito los espermatozoides de alrededor de 35 especies de murciélagos pertenecientes a la familia Phyllostomidae (Forman y Genoways, 1979). Beguelini *et al.* (2011) mencionan que la ultraestructura del espermatozoide del murciélago *Platyrrhinus lineatus* muestra un patrón relacionado con las células espermáticas de humanos y otros primates. Así como también Beguelini *et al.* (2014) menciona que la ultraestructura del espermatozoide del murciélago *Carollia perspicillata*, perteneciente a la familia Phyllostomidae, es similar al de otros murciélagos ya descritos con anterioridad y que presenta las características típicas del espermatozoide de mamífero; sin embargo la morfología de la cabeza del espermatozoide de esta especie de murciélago difiere a lo observado en marsupiales y roedores.

Cummins y Woodall (1985) reportan las dimensiones espermáticas de diferentes órdenes y de 284 especies, incluyendo las medidas de la cabeza, pieza media y flagelo de las especies *A. jamaicensis* y *S. liliium*. Sin embargo, existe poca información acerca de la morfología espermática en éstas dos especies.

En un estudio morfológico realizado por Forman y Genoways (1979) se observó que los espermatozoides de *A. jamaicensis* están formados por una cola corta y la cabeza es casi circular y carece de un cuello. Las dimensiones de la cabeza del espermatozoide van del rango 4,28 a 4,65 mm de longitud y 3,16 a 3,44 μm de ancho.

Se han realizado estudios en otras familias y especies de microquirópteros basándose en la descripción del espermatozoide en *Myotis lucifugus* y *Eptisicus fuscus* (Fawcett e Ito, 2005), *Miniopterus shreiberssi* (Bernand y Hodgson, 2005) y en el género *Rinolophus* (Gatti 1984) ya que en estas especies los espermatozoides pueden ser almacenados días o hasta meses en el tracto reproductor de la hembra durante los meses de hibernación que les permite mantenerse viables.

En Yinpterochiroptera se ha reportado la obtención y características del semen de tres especies del género *Pteropus* (*P. alecto*, *P. poliocephalus* y *P. scapulatus*). La descripción se basa en la calidad de semen en lo que se refiere a anomalías, viabilidad, motilidad y acrosoma intacto (De Jong *et al.* 2005).

2.6. CARACTERIZACIÓN DE OVOCITOS

Como se mencionó arriba, la evaluación de la morfología del complejo ovocito-cúmulo (COC) es el método más común empleado como un indicador del potencial de desarrollo de los ovocitos utilizados en protocolos de fertilización *in vitro* (De Loos *et al.* 1989; Hinrichs y Williams, 1997).

La evaluación está basada en la directa visualización de la apariencia de los complejos ovocito-cúmulo (COC) bajo un microscopio estereoscópico. Estas observaciones pueden ser hechas rápidamente mientras se busca ovocitos en los aspirados que se obtienen en el líquido folicular (Sharpe-Timms y Zimmer, 2000).

El método para discriminar entre los ovocitos competentes e incompetentes para el desarrollo embrionario es analizar la morfología del citoplasma y de las células del cúmulo. La calidad de las envolturas celulares que rodean el ovocito y la apariencia del citoplasma son los mejores indicadores del potencial que éste posee para la maduración y fertilización *in vitro* (Gordon y Lu, 1990)

Cada laboratorio establece un tipo de clasificación para los ovocitos recuperados que se van a someter a procedimientos *in vitro*. Los ovocitos pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células del cúmulo y la apariencia del citoplasma.

El grado de expansión de las células del cúmulo se considera como un indicador de la calidad de los ovocitos (Sutton-McDowall *et al.* 2004; Yokoo y Sato, 2004; Bertoldo *et al.* 2011). La expansión del cúmulo se ha demostrado que influye en la fertilización al promover la penetración de los espermatozoides en el ovocito mediante la inducción de la reacción acrosomal (Areekijserree y Vejaratpimol, 2006) y por lo tanto el desarrollo posterior. Por otro lado, Shioya *et al.* (1989) y Siriarronrat *et al.* (2010) demostraron que los ovocitos desnudos (aquellos que no presentan células del cúmulo alrededor del ovocito) presentan una capacidad reducida para la maduración, fertilización y posterior desarrollo embrionario.

Diversos criterios han sido empleados por los diferentes autores para evaluar la calidad del ovocito siguiendo diferentes esquemas de clasificación. Sin embargo, la mayoría de los autores se basan en la selección de ovocitos siguiendo parámetros visuales de valoración de la morfología de los COC, el aspecto del citoplasma del ovocito, además la expansión de las células de la granulosa y de la corona radiada está correlacionado directamente con la madurez del ovocito (Laufer *et al.* 1984; Mahadevan y Fleetham, 1990; Hammitt *et al.* 1993; Greenblatt *et al.* 1995).

Se considera que un ovocito es maduro o de buena calidad, cuando el citoplasma es claro, brillante, de color y granularidad uniforme y ocupa más espacio del espacio perivitelino. La zona pelúcida debe estar intacta y simétrica. Las células de la granulosa o del cúmulo que están asociadas al ovocito, deben ser claras, brillantes y con un tamaño uniforme entre ellas (Sharpe-Timms y Zimmer, 2000).

Los ovocitos con células del cúmulo y corona radiada expandidas son considerados ovocitos maduros en meiosis II, metafase II. Ovocitos que presentan las

células del cúmulo expandidas pero la corona radiada no, indica que son ovocitos menos maduros que se encuentran en meiosis I u ovocitos intermedios en metafase I. La ausencia de células del cúmulo o la no expansión representa a ovocitos inmaduros en Profase I (Albertini *et al* 2001; Familiari *et al.* 2006).

Los ovocitos considerados de mala calidad presentan un citoplasma oscuro y con gran cantidad de gránulos y vacuolas, una zona pelúcida fragmentada y de un espesor menor a la que presentan los ovocitos considerados de buena calidad, en algunos ovocitos hay ausencia de la corona radiada o de varias capas de células de la granulosa. Los ovocitos degenerados o atrésicos, presentan un amplio espacio perivitelino, el citoplasma es de forma irregular muy oscuro y granulado, además de que pueden presentar o no un cuerpo polar (Albertini *et al.* 2001).

Por otro lado, es posible encontrar ovocitos pos-maduros y que no son aptos para ser utilizados en programas de reproducción asistida. Estos presentan aglutinación y oscurecimiento de las células de la granulosa y de la corona radiada, pueden tener un gran espacio perivitelino y muestran un cuerpo polar ligeramente degenerado (Albertini *et al.* 2001).

Estas diferencias estructurales han sido encontradas en ovocitos con diferentes estados de madurez y que se han madurado tanto *in vivo* como *in vitro*. En ovocitos con una apariencia normal se han observados estructuras con signos de degeneración (Yang *et al.* 2009).

En ovocitos humanos se ha estudiado la degeneración de los ovocitos por medio de las tasas de apoptosis en las células de la granulosa. Yang *et al.* (2009) observaron que las células de cúmulo que tenían una apariencia anormal presentaron una alta frecuencia de células en apoptosis y esta fue significativa, comparada con los ovocitos con apariencia normal. Ellos concluyen que los ovocitos que muestran una apariencia normal madurados *in vitro*, presentaron una mejor dispersión de las células del cúmulo comparada con los ovocitos anormales; incluso bajo condiciones óptimas, siempre existirá cierta proporción de células del cúmulo que sufrirán apoptosis durante el desarrollo.

Muchos investigadores han tratado de relacionar la calidad de un ovocito por la morfología de las células de la granulosa y del citoplasma (Liebfried y First, 1979; De Loos *et al.* 1989). Sin embargo aún no es posible predecir con exactitud que la morfología de

los COC puede afectar la competencia y desarrollo de los ovocitos. Numerosos autores han descrito que la presencia de un cúmulo intacto alrededor del ovocito y una apariencia homogénea del citoplasma son indicadores de ovocitos inmaduros con capacidad para madurar y desarrollarse (Liebfried y First, 1980; Xu, 1987; Gordon y Lu, 1990).

En humanos, Veck (1980,1990, 1991) y Wolf (1988) describieron la morfología de los ovocitos basándose en las características de las células de la granulosa, la apariencia del citoplasma y de la zona pelúcida. Ellos concluyen que la evaluación y la calidad de los ovocitos ayuda a determinar en qué etapa de madurez se encuentran, además de que permite predecir si esto podría afectar la fertilización y posteriormente el desarrollo y calidad del embrión, así como las tasas de gestación en los laboratorios de reproducción asistida

De Loos *et al.* (1989) adaptaron la clasificación de Liebfried y First (1979) y usaron un esquema de clasificación que comprende cuatro categorías de ovocitos basados en la compactación, número de capas y transparencia de las células de la granulosa. En las cuales, las categorías 1, 2 y algunos de la 3 los ovocitos al someterlos a la maduración *in vitro* mostraron la misma capacidad para alcanzar la etapa de Metafase II. Los de categoría 3 y 4 los ovocitos presentaron señales de degeneración y principalmente los de categoría 4 mostraron una disminución en su capacidad para alcanzar la etapa de Metafase II. Ellos concluyen que existe una gran variación en la apariencia de los ovocitos inmaduros y que los ovocitos que presentan avanzados signos de degeneración demuestran un bajo potencial para que puedan madurar *in vitro*.

Madison *et al.* (1992) Realizarón una investigación similar y concluyen que los ovocitos que están cubiertos de células de la granulosa y se encuentran en forma compacta rodeando al ovocito tendrán un mayor porcentaje de maduración *in vitro* que los ovocitos que presentan una serie capas de células de la granulosa incompletas o sin expandir.

Blondi y Sirard (1995) adaptaron la clasificación de Hazeleger *et al.* (1993). Ellos presentan 6 categorías basándose en la cantidad de capas de células de la granulosa o del cúmulo que rodean al ovocito, en la expansión de éstas células y la textura del citoplasma. Ellos mencionan que los ovocitos con más de 5 capas de células de la

granulosa, compactas y con un citoplasma homogéneo, ligeramente granulados son de mejor calidad que aquellos que no presentan ninguna capa de células de la granulosa.

Estos estudios confirman que la morfología y calidad de los COC son factores clave que influyen en la eficiencia de la producción de embriones *in vitro*. Hallazgos similares respecto a la morfología de los COC para predecir que durante la maduración, fertilización y desarrollo *in vitro* se puedan obtener embriones que lleguen hasta la etapa de blastocistos, esto se ha reportado en el ganado (Hanada *et al.* 1986; Goto *et al.* 1988; Gordon y Lu, 1990; Tiffin *et al.* 1991; Vassena *et al.* 2003) en ovejas (Cheng *et al.* 1986; Dadashpour *et al.* 2012), en cerdas (Mattioli *et al.* 1989; Duclomb *et al.* 2005) y cabras (Katsa-Ksiezkievicz *et al.* 2007).

2.7. CARACTERIZACIÓN DE OVOCITOS EN ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE

La selección de los COC en animales de fauna silvestre se ha realizado de acuerdo a métodos descritos en animales domésticos y en humanos. La evaluación de los COC en animales de fauna silvestre se realiza considerando la apariencia y la expansión de las células de la granulosa. En rinoceronte negro (*Diceros bicornis*; Hermes *et al.* 2009), eland (*Taurotragus oryx*) y bongo (*Tragelaphus eurycerus isaaci*; Wirtu *et al.* 2009), gacelas (*Gazella dama mhorr*, Berlinguer *et al.* 2008), gato montés (*Lynx rufus*; Gañán *et al.* 2009), burro catalán (Taberner *et al.* 2010), macacos (*Macaca nemestrina*) (Kubisch *et al.* 2006) y mono reshus (Bavister *et al.* 1983). Estos autores concluyen que solo aquellos ovocitos que están rodeados por varias capas de células de la granulosa, con un citoplasma uniforme de color homogéneo y que no presentaron expansión de las células de la granulosa fueron considerados inmaduros y aptos para madurarlos y fertilizarlos *in vitro*, obteniendo altas tasas desarrollo embrionario *in vitro*.

2.8. REPRODUCCIÓN ASISTIDA: FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

La fertilización *in vitro* es una técnica de reproducción asistida (ART) que hace posible que los ovocitos se puedan madurar, fertilizar y desarrollar bajo condiciones de laboratorio. Comprende varias fases: Colección de ovarios y de ovocitos, la maduración *in vitro* (MIV), la fertilización *in vitro* (FIV) y el desarrollo embrionario *in vitro* (DIV).

2.8.1. COLECCIÓN DE OVARIOS Y DE OVOCITOS

La materia prima utilizada generalmente para la producción de embriones en animales domésticos ha sido de ovarios obtenidos en el rastro. Los ovarios de animales sacrificados son la fuente más barata y más abundante de ovocitos para la producción a gran escala de embriones con para la maduración y fertilización *in vitro*.

Los ovarios obtenidos son llevados al laboratorio en solución salina fisiológica (SSF) o solución tampón de fosfatos a una temperatura de entre 30°C-35°C (Pugh *et al.* 1991), 20°C o a temperatura ambiente (Wani *et al.* 2000) sin ningún efecto perjudicial sobre la maduración de los ovocitos.

El intervalo de tiempo entre la recolección de ovarios y la recolección de los ovocitos también varía de 1 a 4 horas (Pugh *et al.* 1991; Wani *et al.* 2002) sin ningún tipo de efectos perjudiciales en la maduración de ovocitos.

Por otro lado, los ovocitos también se obtienen de los oviductos poco después de la ovulación, o de folículos antrales, de 6 a 8 milímetros (mm) de diámetro, ya que los folículos mayores de 6 mm poseen ovocitos con mayor potencial para formar blastocistos que los folículos pequeños menores de 3 mm de los cuales regularmente se obtienen ovocitos incompetentes (Pavlok *et al.* 1992; Arlotto *et al.* 1992; Crozet *et al.* 1995; Fair *et al.* 1995).

La mayoría de los investigadores que trabajan con ovocitos seleccionan los ovocitos para la maduración con un criterio similar a lo publicado por De Loos *et al.* (1989). Los ovocitos que están rodeados por un cúmulo compacto y formado por varias capas de células de la granulosa, presentarán mayores porcentajes de maduración, fertilización y de desarrollo hasta la etapa de blastocisto, que los que carecen de células del cúmulo (Xu *et al.* 1986; Lonergan *et al.* 1994; Stojkovic *et al.* 2001).

2.8.2. MADURACIÓN *IN VITRO*

Una vez que el ovocito se ha separado de su entorno folicular, los ovocitos son colocados en medio de maduración para que reinicien la meiosis hasta la Metafase II. Morfológicamente, en un ovocito mantenido en medio de cultivo se observa la expansión de las células del cúmulo y la expulsión del primer cuerpo polar, indicando que el ovocito se encuentra en Metafase II.

La maduración *in vitro* constituye una etapa decisiva en el proceso de producción de embriones *in vitro*. Consiste en cultivar durante 22 a 24 horas los ovocitos inmaduros en medio de cultivo: TCM-199 (Medio de Cultivo para Tejidos), SOF (Fluido de oviducto sintético) y HTF (Fluido tubal humano); suplementado con suero fetal, gonadotropinas (FSH y LH) y 17 β -estradiol a una temperatura de 38.5 °C en una atmósfera con 20 o 5 % de CO₂ en aire.

Existen 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 desfavorables, se observa el bloqueo de la meiosis y de la fecundación. Se ha comprobado que el cultivo de gametos y embriones en condiciones inapropiadas induce cambios epigenéticos en el embrión (Nieman y Wrenzycki, 2000) y en la expresión genética (Rinaudo y Schultz, 2004).

Los medios utilizados durante la MIV de los ovocitos han sido suplementados con diversos componentes proteicos, destacando el suero fetal bovino (SFB), la albumina sérica bovina (BSA) y algunas hormonas. Se ha comprobado que el suero favorece la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario (Leibfried-Rutledge *et al.* 1986).

Se han atribuidos efectos negativos al uso de suero en los medios de cultivo como excesiva producción de lactato, presencia de células oscuras y granuladas en la masa celular interna (Bavister *et al.* 1992; Krisher *et al.* 1999) y menor síntesis proteica (Kuran *et al.* 2001).

El control de la maduración de ovocitos *in vitro* incluye tanto, un componente endocrino que implica el eje hipofisario-ovárico, como reguladores autocrinos o paracrinos locales, que operan a nivel folicular. Mediante la adición de gonadotropinas y esteroides al

medio de cultivo se ha obtenido un aumento en el número de ovocitos que alcanzaron la metafase II así como en el número de embriones viables (Galli y Moor, 1991).

Algunos estudios indican que El 17 β -estradiol favorece la segmentación cuando se añade un medio libre de suero, suplementado con FSH y LH (Saeki *et al.* 1991). Sin embargo, la adición de hormonas sigue siendo controversial, ya que en algunos estudios no se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos que alcanzaron la metafase II, y en aquellos que formaron blastocistos en presencia o ausencia de hormonas gonadotropinas (Wani, 2002).

Otros estudios indican que los estrógenos afectan negativamente a la maduración nuclear de los ovocitos bovinos (Beker *et al.* 2002), provocando una disminución de la proporción de ovocitos que alcanzan la metafase II y de blastocistos obtenidos. Sin embargo la presencia de suero y FSH en el medio neutraliza el efecto negativo de los estrógenos (Beker *et al.* 2002)

Las condiciones durante la MIV y el DIV son diferentes a los que se realizan en condiciones naturales, siendo la concentración de oxígeno uno de los factores críticos en que los ovocitos y embriones son cultivados (Karja *et al.* 2004). La concentración de O₂ en el oviducto y en el útero es más baja que en el aire ya que es solamente del 2% a 8% cuando los gametos están presentes (Fisher y Bavister, 1993; Kea *et al.* 2007). Bajo condiciones de cultivo *in vitro* la concentración de oxígeno va de 20% a 5% o menos, soportando exitosamente el desarrollo *in vitro* de embriones de ratón (Umaoka *et al.* 1992), hámster (McKiernan y Bavister 1992), ovino (Thompson *et al.* 1992) y bovino (Van Soom *et al.* 2002). La concentración de oxígeno mayor al 20% es conocida por ejercer efectos perjudiciales sobre el desarrollo en embriones de mamífero, probablemente debido a la formación de radicales libres (Karja *et al.* 2004).

Las altas concentraciones de oxígeno empleadas para el cultivo *in vitro* son responsables de un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales inducen efectos adversos sobre las células, tales como daño al ADN, peroxidación de los lípidos y modificaciones de proteínas, pudiendo causar daño celular y conduciendo a la muerte en últimas consecuencias (Luvoni *et al.* 1996).

Células del cúmulo

La maduración de los ovocitos de mamífero está influenciada por varios factores, muchos de los cuales se derivan desde el folículo. Las células foliculares producen señales de instrucción y compuestos nutritivos, que entran en el ovocito mediante el transporte de membrana y por pinocitosis. La comunicación entre el ovocito y el folículo es proporcionada por las células del cúmulo, que penetran en la zona pelúcida y proporcionan una ruta para la comunicación intercelular directa entre las células somáticas y el ovocito (Albertini *et al.* 2001). La presencia de células del cúmulo ha demostrado ser importante para el desarrollo y la maduración de los ovocitos. Las células de la granulosa o del cúmulo parecen jugar un papel regulador durante la maduración de un ovocito *in vitro* (Pugh *et al.* 1991).

2.8.3. FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

Una vez que tenemos ovocitos maduros que se encuentran en Metafase II y con una gran expansión de las células del cúmulo, el siguiente paso es lograr la fertilización de los mismos. Para ello, los ovocitos se incuban junto con espermatozoides capacitados y que hayan llevado a cabo la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1994) en un medio suplementado con fuentes energéticas (piruvato, lactato) y BSA. El medio utilizado para la fertilización, la temperatura y la concentración de espermatozoides, al momento de la co-incubación del ovocito y del espermatozoide, juegan un papel importante para que la FIV sea exitosa.

Para realizar la FIV, los espermatozoides son lavados por medio de las técnicas de swim-up (Slavik *et al.* 1992; Watson *et al.* 1994; Wani *et al.* 2000) o por gradientes de Percoll (Wani *et al.* 2000). Estas técnicas permiten separar el plasma seminal, eliminan sustancias inhibitoras de la capacitación y permite seleccionar a los espermatozoides de mejor calidad para colocarlos con los ovocitos durante la FIV.

Capacitación y reacción acrosomal

La capacitación ocurre durante el paso de los espermatozoides a través de las estructuras del aparato reproductor de la hembra. Consiste de una serie de modificaciones morfológicas y bioquímicas, entre las que se encuentran; aumento en la

fluidez de la membrana plasmática, disminución del contenido del colesterol, aumento en la concentración del calcio y aumento en la motilidad del espermatozoide (Bedford, 1983; Yanagimachi, 1994; del Río *et al.* 2007). Una vez que el espermatozoide se une a la zona pelúcida, éste lleva a cabo la reacción acrosomal que implica la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa para liberar las enzimas que contiene el acrosoma y poder penetrar al ovocito (Rathi *et al.* 2001; Rodríguez-Martínez, 2007).

Estudios *in vitro*, muestran que la capacitación y la reacción acrosomal pueden llevarse a cabo en espermatozoides mantenidos en medios artificiales, en condiciones apropiadas y por inductores no fisiológicos (ionóforos de calcio A23187) y espontáneos o fisiológicos (glicoproteínas de la zona pelúcida, líquido folicular y progesterona) (Patrat *et al.* 2000; Neild *et al.* 2005). El medio de cultivo puede influir en la motilidad del espermatozoide, la capacitación, integridad acrosomal y la capacidad del espermatozoide para penetrar al ovocito. La mayoría de los procedimientos de fertilización *in vitro* se llevarán a cabo entre un pH de 7,4 y 8,0. (Parrish *et al.* 1989)

La heparina se utiliza para la capacitación de los espermatozoides *in vitro*, estimula la tasa de fertilización ya que mejora de la eficiencia de la capacitación del espermatozoide (Parrish *et al.* 1989). También la cafeína aumenta y/o prolonga la motilidad de los espermatozoides en los mamíferos y actúa sinérgicamente con la heparina en la capacitación de los espermatozoides bovinos (Niwa y Oghoda, 1998). Se ha observado que los espermatozoides de ratón requieren Na^+ extracelular para la capacitación y la reacción acrosomal (Fraser *et al.* 1993).

Se ha reportado que la progesterona (P_4) secretada por el líquido folicular y las células del cúmulo también induce la reacción acrosomal (Witte y Somi-Schäfer, 2007) en humanos (Osman *et al.* 1989; Patrat *et al.* 2000), ratón (Melendrez *et al.* 1994), cerdos (Lösel *et al.* 2004; Jui-Te *et al.* 2006; Oh *et al.* 2010), caballos (Meyers *et al.* 1995; Cheng *et al.* 1998; McPartlin *et al.* 2006), hámster (Llanos y Anabalón 1996), perros (Brewis *et al.* 2001), cabras (Somanath *et al.* 2000; Somanath y Gandhi, 2002), bovinos (Thérien y Manjunath, 2003) y chinchillas (Ponzio *et al.* 2007). Este esteroide estimula la reacción acrosomal, mediante la interacción con receptores membranales (Sabeur *et al.* 1996; Somanath y Gandhi, 2002; Cheng *et al.* 2005; Jui-Te *et al.* 2006; Witte y Somi-Schäfer, 2007) estimulando un incremento rápido de calcio intracelular (Llanos y Anabalón, 1996; García y Meizel 1999).

Después de que el semen ha sido capacitado, se procede a calcular la concentración adecuada para llevar a cabo la FIV. La concentración adecuada para la fertilización va de 0.5×10^6 a 1×10^6 espermatozoides por ml en medio de fertilización (Ward *et al.* 2002).

2.8.4. DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*

Una vez realizada la fertilización *in vitro*, inicia el desarrollo embrionario *in vitro* hasta la etapa de blastocisto que puede presentarse entre 5 a 7 días de cultivo. Para el cultivo de los embriones se emplean varios medios como TCM-199 (Slavik *et al.* 1992; Wani *et al.* 2000), Hams (Wani *et al.* 1996), fluido de oviducto sintético (SOF), fluido tubal humano (HTF: Kaneo *et al.* 2009), KSOM (Summer *et al.* 1995) suplementados con proteínas, sustratos energéticos, aminoácidos esenciales y no esenciales. (Kaneo *et al.* 2009). Por otro lado, El uso de suero fetal bovino (SFB) en el medio de cultivo embrionario como fuente proteica ha sido considerado como el responsable de anomalías fetales y placentarias, así como el nacimiento de becerros con peso excesivo que son causa de distocias (Hoshi, 2003).

Se ha observado que al cultivar embriones de oveja en grupos, en comparación con el cultivo individual hay un aumento en la formación de blastocistos, ya que los embriones de oveja producen factores paracrinos y autocrinos, que estimulan el desarrollo embrionario *in vitro* (Gardner *et al.* 1994).

En los primeros intentos de cultivar embriones *in vitro* en varias especies, observaron que en el desarrollo del embrión se detenía, situación que fue denominada "bloqueo del desarrollo" (Eyestone y First, 1999). Estos bloqueos se producen en diferentes etapas de desarrollo embrionario y es característico de cada especie. Por ejemplo, en embriones de cerda cultivados *in vitro*, el desarrollo embrionario se bloquea en la etapa de 4 células. En los de bovino y de ovejas este bloqueo se presenta en etapas de 8 a 16 células y en los embriones de roedores se presenta en etapas de 2 células. Estos eventos durante el desarrollo de los embriones *in vitro* no suelen ser evidentes en algunas especies de primates y conejos (Bavister, 1995).

El bloqueo del desarrollo embrionario tiene como consecuencia un retardo en el desarrollo del embrión, una reducción en el número de blastómeros o incluso la pérdida de viabilidad por el aumento de la duración del cultivo (Kirsher *et al.* 1999). Las causas de estos bloqueos han dado lugar a numerosos avances en la comprensión de la regulación epigenética durante el desarrollo del embrión. En general, estos bloqueos parecen coincidir con el momento de la activación del genoma embrionario, creyendo que se producen en las etapas equivalentes en las diferentes especies (Kirsher *et al.* 1999).

Existen otros estudios que no apoyan la teoría de Kirsher, por ejemplo: En primer lugar, es muy poco probable que la activación del genoma tenga lugar de repente y de forma masiva en cualquier etapa particular de desarrollo; la activación del genoma embrionario se produce progresivamente durante el periodo de preimplantación, con muy poca actividad transcripcional hasta después de algunas divisiones en la segmentación (Rinaudo y Schultz, 2004).

En segundo lugar, la aparición de bloqueos en el desarrollo de diferentes especies coincide con la transición del embrión desde el oviducto hacia el útero. En los animales domésticos, estos eventos se producen en la fase de 4 células (cerda) o de 8 a 16 células (bovinos y ovinos) (Bavister 1995). En embriones de hámster entran al útero en etapas de 2 de 4 células (Bavister, 1992).

2.9. FERTILIZACIÓN *IN VITRO* EN ESPECIES DE FAUNA SILVESTRE

La fertilización *in vitro* se ha utilizado en varias especies de fauna silvestre con pocos éxitos. La mayoría de los estudios sobre fertilización *in vitro* han sido en pumas (Miller *et al.* 1990), tigres (Donoghue *et al.* 1990), chitas (Donoghue *et al.* 1992), zorros (Farstad *et al.* 1993), gaur (Johnston *et al.* 1994), borrego rojo de Armenia (Coonrod *et al.* 1994), llamas (Del Campo *et al.* 1994), elefantes africanos (Kidson *et al.* 1995), gorilas (Pope *et al.* 1998), zebras (Meintjes *et al.* 1997), marmoseta (Gilchrist *et al.* 1997), ballena de minke (Fukui *et al.* 1997), bongos (Pope *et al.* 1998; Wirtu *et al.* 2009), gatos salvajes africanos (Pope *et al.* 2000), jaguares (Morato *et al.* 2000; Morato y Barnabe, 2002), ciervo (Locatelli *et al.* 2005), ocelotes y tigrinas (Swanson *et al.* 2002), búfalos, marsupiales, antílopes (Herrick *et al.* 2004; Wirtu *et al.* 2009), muflón (Ptak *et al.* 2002; Berlinguer *et al.* 2005).

Nacimientos de organismos vivos solamente han sido reportados en tigres, gatos indios del desierto, borrego rojo de Armenia, gorilas, muflones (Pukazhenthí y Wild, 2004) y macacos (Kubish *et al.* 2006), gaur (Johnston *et al.* 1994), borregos rojos de Armenia, llamas (Pope y Loskutoff 1999), muflón (Ptak *et al.* 2002) y ciervos rojos (Locatelli *et al.* 2005). La tasa de éxito de la fertilización *in vitro* depende de los suplementos de cultivo, de la edad y salud de las hembras que van a donar los ovocitos (Christensen *et al.* 1993) y esto solo ha sido mediante la transferencia de embriones intra o interespecies, debido a la escasa información sobre la biología reproductiva de las especies de interés.

Otra aplicación potencial de la fertilización *in vitro* en especies de fauna silvestre es la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos para salvar el germoplasma de hembras que murieron inexplicablemente o accidentalmente; por ejemplo, en las gacelas (Pukazhenthí y Wild, 2004; Berlinguer *et al.* 2008).

En la investigación con fauna silvestre hay retos que están asociados a la producción de embriones tales como: Un aumento en la incidencia de problemas ultraestructurales y citogenéticos; más abortos espontáneos, pérdidas perinatales y anomalías fetales; y por último, se ha observado un aumento en la incidencia de partos distócicos debido al tamaño de los fetos (Loskutoff, 2003). Todas estas limitaciones, problemas o retos, enfatizan la importancia de emplear investigaciones relacionadas con la ciencia básica de las especies para el manejo y la creación de iniciativas de conservación de las especies de fauna silvestre.

2.10. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL EN MURCIÉLAGOS

La información sobre la preparación de los espermatozoides para el proceso de fecundación en los murciélagos es limitada y existen pocos datos al respecto. Por otro lado, Crichton *et al.* (1993) y Crichton (2000) mencionan que los espermatozoides de especies de murciélagos que hibernan y los almacenan por periodos largos de tiempo los vuelven células muy resistentes, por lo que los intentos de inducir la reacción acrosomal con agentes usados para otras especies de mamíferos no han dado los resultados deseados.

Crichton *et al.* (1993) propusieron que al someter el semen a cambios de temperatura de 0 a 37°C, podrían desestabilizar la membrana plasmática y llevar a cabo la capacitación y la reacción acrosomal y por lo tanto la fertilización del ovocito. Estos autores concluyen que el espermatozoide de murciélago quizás presenta diferentes concentraciones de lípidos en la membrana plasmática lo que le permite que ésta no se modifique y se mantenga viable; debido a que tanto la hembra como el macho presentan mecanismos reproductivos especializados para mantener la viabilidad de los gametos.

Lambert (1981) realizó pruebas de fertilización *in vitro* usando espermatozoides de murciélago de la especie *Myotis lucifugus lucifugus* expuestos a Ionóforo de Calcio para llevar a cabo la capacitación y la reacción acrosomal, posteriormente fertilizó ovocitos de hámster sin zona pelúcida, pero ningún espermatozoide logró penetrar el citoplasma de los ovocitos.

Sin embargo, otros estudios revelan que la temperatura es un factor importante para que el espermatozoide de murciélago *Myotis lucifugus lucifugus* pueda llevar a cabo la capacitación, Lambert (1981) mantuvo espermatozoides en medio BWB (Biggers Whitten and Whittingham) diferentes temperaturas (4°C, 24°C, 32°C, 42°C y 55°C) de 0 a 24 horas, la activación del espermatozoide fue confirmada por el cambio de movimiento visto a través del microscopio de luz y por el porcentaje de fertilización en ovocitos de hámster sin zona pelúcida. Cuando la temperatura fue incrementada a 32°C los espermatozoides se activaron y los resultados mostraron altas tasas de fertilización.

La reacción acrosomal también fue inducida en espermatozoides del zorro volador de cabeza gris (*Pteropus poliocephalus*), usando el ionóforo de Calcio A23187. Cummins *et al.* (1988) observaron cambios en la ultraestructura y en la motilidad del espermatozoide a 0, 10 y 120 minutos de exposición al ionóforo de calcio. Ellos observaron que el primer signo de la reacción acrosomal fue el hinchamiento de la membrana plasmática seguida por la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en la parte apical de la cabeza del espermatozoide. Después de la reacción acrosomal a cada lado del segmento ecuatorial observaron dos estructuras en forma de gancho. Ellos sugieren que estas estructuras pueden jugar un papel específico en la penetración de la zona pelúcida o en la protección de la cabeza del espermatozoide (Cummins *et al.* 1988).

En México se ha estudiado la capacitación y la reacción acrosomal de espermatozoides de la especie *Corynorhinus mexicanus* (Cervantes *et al.* 2008). En este estudio mantuvieron espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo durante 6 h a 39°C bajo una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de aire y una concentración de progesterona de 3.18 µM. Bajo estas condiciones, se observó un incremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados y que lograron llevar a cabo la reacción acrosomal ($p < 0.05$) comparados con los obtenidos a partir de la cabeza y del cuerpo del epidídimo.

En lo que respecta a los murciélagos que habitan zonas tropicales y sobre todo de las especies que pertenecen a la familia Phyllostomidae no existe información en relación a la capacitación y reacción acrosomal.

2.11. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO

Artibeus jamaicensis y *Sturnira lilium* son murciélagos que pertenece al orden Chiroptera, suborden Yangoquiroptera (Agnarsson *et al.* 2011) y pertenecen a la familia Phyllostomidae (Sánchez y Romero 1995).

La familia Phyllostomidae es exclusiva de América y la de mayor diversidad en las regiones tropicales de este continente. Son de tamaño pequeño a grande; las orejas son de tamaño y formas variables, por lo común son estrechas y tienden a ser puntiagudas (León, 2004). Los miembros de esta familia se distinguen principalmente por presentar un apéndice en forma de hoja en la nariz. Además presentan incisivos superiores centrados y el tercer dedo de la mano bien desarrollado (Villa, 1976). El patrón reproductivo varía de monoestro o poliestro estacional, a poliestro continuo sincrónico o asincrónico, y pueden ser monógamos o polígamos (Balmori, 1999).

En México, esta familia está representada por 27 especies agrupadas en cinco subfamilias: *Desmodontine*, *Glossophaginae*, *Phyllostominae*, *Carollinae* y *Stenodermatinae* (Sánchez y Romero 1995).

A. jamaicensis y *S. lilium* se distribuyen en México desde Sinaloa a Tamaulipas, hacia el sur va desde Ecuador, Venezuela, Trinidad y Tobago, Antillas Mayores y Menores, Cayos de Florida, Brasil y en el noroeste de Argentina (Mares *et al.* 1981; Redford y Eisenberg, 1992).

Como todos los murciélagos neotropicales, estas especies son de costumbres nocturnas. Se alimentan de frutas, entre las cuales incluye higos, guayabas, papayas y plátanos. En épocas en que estos son difíciles de conseguir también puede alimentarse de néctar y polen. Los frutos los toman con la boca y los llevan a un sitio de percha donde los come. Cuando el fruto contiene semillas grandes, estos no son comidos completamente, pero si tienen semillas pequeñas estas son generalmente consumidas con todo el fruto. Estas semillas generalmente son defecadas en poco tiempo, sin que hayan sido digeridas y por lo tanto tienen gran oportunidad de germinar. Lo que contribuye a la dispersión de semillas y por lo tanto a la regeneración del lugar donde habitan (León, 2004).

El aparato reproductor de las hembras, consta de dos ovarios, dos oviductos, útero, cérvix y vagina. Sin embargo, dentro de este esquema tradicional se pueden presentar diversas adaptaciones anatómicas y fisiológicas (Wimsatt, 1979, Hood y Smith, 1983).

El aparato reproductor de los machos comprende un par de testículos, varios pares de glándulas accesorias, un sistema de conductos y el órgano copulador. Los testículos descienden al escroto, el epidídimo tiene gran tamaño y su extremo sirve de reservorio espermático, desembocando en un largo conducto deferente que se continúa con la vesícula seminal, el conducto eyaculatorio y la uretra. Los murciélagos al igual que los primates, tienen el pene colgante cuando no se encuentra erecto. Posen báculo y el glande tiene un cuerpo cavernoso (Balmori, 1999).

2.11.1. *Artibeus jamaicensis*

Se caracteriza por presentar un arco zigomático completo, ausencia de cola y tiene una membrana interfemoral estrecha en forma de U (Jones y Carter, 1976). Pesa de 45 a 50 g y tiene un altura entre 78-89 mm, 20-27 mm de largo de las orejas, 52-67.4 mm de largo de antebrazo. La máxima longevidad de esta especie es de 9 años en vida silvestre (Gander *et al.* 1991).

La diferencia más notable de *A. jamaicensis* es que posee dos líneas faciales blancas y tenues, el dorso es de color moreno grisáceo y el vientre pálido marrón (Jones,

1978). En general, las orejas son anchas y triangulares en la punta. La hoja nasal está bien desarrollada con un grupo de glándulas sebáceas (León, 2004). El labio inferior tiene una verruga central con pequeñas verrugas alrededor.

De acuerdo con Fleming (1971) el patrón reproductor de *A. jamaicensis* en Panamá, presenta dos picos reproductores a lo largo del año (poliéstrico bimodal); el primero durante los meses de Marzo a Abril y el segundo de Julio a Agosto. Los embriones del primer periodo se desarrollan hasta blastocisto antes de que ocurra la implantación y las crías nacen después de cuatro meses de gestación en Julio o Agosto. Posteriormente, las hembras pasan al estado de estro; los embriones concebidos en este apareamiento se implantan en el útero en forma de blastocisto y detienen su crecimiento a mediados de Septiembre hasta mediados de Noviembre, retardando su desarrollo hasta siete meses y nacen entre Marzo y Abril del año siguiente. De esta manera, los embriones del primer periodo postparto tienen un desarrollo precoz hasta blastocisto antes de entrar al útero y los embriones del segundo periodo muestran un desarrollo embrionario retardado. De acuerdo con Sánchez-Hernández *et al.* (1990), los registros sobre la actividad reproductiva de *A. jamaicensis* en México, sugieren un comportamiento reproductivo continuo dentro de nuestro país.

El comportamiento de este murciélago es variable; de tal forma que existen en la literatura numerosos registros sobre sus condiciones reproductivas en diferentes tipos de vegetación y latitudes. Heithaus *et al.* (1975) registraron que para esta especie un patrón poliéstrico bimodal. Por otra parte Sánchez-Hernández *et al.* (1990) señalan un patrón poliéstrico continuo para individuos de la costa del Pacífico mexicano.

Los machos llegan a la madurez sexual al año y a los ocho meses en las hembras (Keast y Handley, 1991). En los machos adultos los testículos alcanzan dimensiones de 3.5-10 mm (Forman y Genoways, 1979). Las hembras adultas presentan un útero con lumen simple y trompas uterinas que desembocan directamente al mesometrio. De esta manera, la implantación del blastocisto se da en la porción final del útero y es favorecida por la fusión uterina con el lumen interno (Hood y Smith, 1983). Posteriormente se desarrolla una placenta de tipo discoidal corioalantoidea - hemocorial (Wislocki y Fawcett, 1941).

El periodo de gestación se estima de 3.5 a 4 meses. Sin embargo, en individuos de Panamá se han registrado periodos de gestación de hasta siete meses, en los cuales hay un periodo de diapausa embrionaria o periodo de retraso en el desarrollo embrionario, que consiste en el lento desarrollo del blastocisto después de ocurrida la implantación (Bernard, 1989).

2.11.2. *Sturnira lilium*

Es un murciélago de tamaño mediano con una longitud total de 62 a 65 mm, longitud de antebrazo de 26.6 a 45.0 mm (Gannon *et al.* 1989). El dorso de *Sturnira lilium* varia de gris oscuro a marrón rojizo, la cabeza, el cuello y los hombros son más amarillentos. El vientre es más pálido que el dorso y el patagio es de color marrón. El uropatagio es reducido con pelo abundante y se presenta al borde interior de las extremidades posteriores.

La mayoría de los machos poseen en los hombros glándulas que producen un característico color amarillento o rojizo, tienen un olor almizclado fuerte y dulce. La presencia o ausencia de estas glándulas puede ser correlacionado con la madurez reproductiva, estado reproductivo, o la temporada de cría, están generalmente ausentes en los juveniles.

Este murciélago exhibe un patrón reproductivo poliéstrico bimodal (Fleming *et al.* 1972). También presenta un patrón bimodal de picos de embarazo y lactancia, pese a que el embarazo se ha registrado en todos los meses del año (Nowak, 1991). Se han reportado picos de actividad reproductiva en tres periodos durante todo el año, generalmente de Febrero hasta Junio, Octubre y Diciembre (Fleming *et al.* 1972). El tiempo exacto de gestación se desconoce (Grzimek, 1990). Las hembras dan a luz una cría, pero los nacimientos se producen dos veces al año, una vez hacia el final de la estación seca y una vez en la temporada de lluvias (Stoner, 2001). Los jóvenes alcanzan la madurez sexual entre los 8 y 11 meses de edad (Fleming *et al.* 1972; Nowak, 1991; Stoner, 2001).

III. JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta que la mayoría de los hallazgos relacionados con la biología del tracto reproductor de los mamíferos, especialmente la caracterización y evaluación de los gametos se han descrito principalmente en roedores, primates y animales domésticos, resulta interesante considerar estos aspectos en animales de fauna silvestre. A este respecto, muestra especial interés las características reproductivas de los murciélagos, en particular las especies de la familia Phyllostomidae, quienes presentan algunas similitudes con la reproducción humana y otros primates, aspecto importante para considerar a dichos ejemplares potenciales como sujetos de estudio.

Los murciélagos pueden utilizarse como modelo para estudios de investigación básica, permitiendo adquirir nuevos conocimientos sobre los sistemas reproductivos; en investigación biomédica para realizar estudios sobre el efecto de contaminantes, drogas, agroquímicos y problemas relacionados con la infertilidad. En un futuro, se podrían crear programas de conservación de gametos y embriones, para que en algún momento puedan ser transferidas o crear bancos de germoplasma y lograr que aumente el número de especies en resguardo y disminuir de esta manera la amenaza de extinción.

Hay un creciente interés en la aplicación de técnicas de reproducción asistida como por ejemplo: la maduración y fertilización *in vitro* en la propagación de especies raras y en peligro de extinción. La mayoría de los intentos de producir embriones viables en especies de fauna silvestre han tenido un éxito limitado, debido al menos en parte a que se utilizan técnicas desarrolladas en especies domésticas.

El desarrollo de protocolos específicos para cada especie requiere de estudios detallados sobre como los gametos de cada especie responden a lo establecido en métodos *in vitro*. Sin embargo, la oportunidad de realizar este tipo de estudios se ve obstaculizada por la disponibilidad de gametos que es un factor importante que obstaculiza el desarrollo y aplicación de técnicas de reproducción asistida en especies de fauna silvestre.

IV. HIPÓTESIS

Considerando que las características morfológicas y fisiológicas de los gametos de los murciélagos filostómidos *A. jamaicensis* y *S. liliium* son similares a las descritas en otros mamíferos, la fertilización *in vitro* es viable en estas especies de Yangoquirópteros.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y evaluar los gametos, así como, la fertilización *in vitro* y el desarrollo embrionario temprano en dos especies de murciélagos filostómidos (*Artibeus jamaicensis* y *Sturnira liliium*).

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener ovocitos y espermatozoides de dos especies de murciélagos filostómidos (*Artibeus jamaicensis* y *Sturnira liliium*).
2. Analizar las características microscópicas del espermatozoide de las dos especies de murciélagos (longitud del espermatozoide, viabilidad, motilidad progresiva, anormalidades, concentración espermática)
3. Caracterizar las propiedades morfológicas en ovocitos de las dos especies de murciélagos.
4. Evaluar el porcentaje de capacitación y reacción acrosomal *in vitro* de los espermatozoides de las dos especies de murciélagos.
5. Evaluar el porcentaje de maduración *in vitro*.
6. Evaluar el porcentaje de fertilización *in vitro*.

VII. MATERIAL Y MÉTODO

7.1. LUGAR DE COLECTA

La colecta se realizó en el municipio de Yautepec ubicado en la parte norte del estado de Morelos en las coordenadas geográficas 18° 53' de latitud norte y 99° 04' de longitud oeste, a una altura aproximada de 1,210 msnm; tiene un clima caliente subhúmedo con lluvias en verano y la vegetación es subtropical (INEGI, 2010).

7.2. ANIMALES

Machos y hembras de la especie *A. jamaicensis* y *Sturnira liliium* fueron capturados durante el anochecer, en el poblado de Yautepec-Tetlama, Morelos bajo los lineamientos y permisos otorgados por la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT; Permiso SGPA/DGVS/007901/11). Para su captura se usaron redes tipo niebla colocadas entre la vegetación.

Estos organismos fueron identificados por sus características morfológicas de acuerdo a lo reportado por Medellín *et al.* (2008). Se seleccionaron los organismos que presentaron una osificación completa de las placas de crecimiento de la epífisis de la cuarta articulación metacarpal-falángica, ya que se consideran machos y hembras maduros sexualmente (Anthony, 1988). Una vez en el laboratorio los organismos se mantuvieron en jaulas cubiertas con fondos oscuros y se alimentaron con frutas y agua *ad libitum* hasta el día de su análisis.

Los murciélagos colectados para esta investigación no se encuentran en ningún estatus de conservación. Son considerados de menor preocupación y las poblaciones de murciélagos se mantienen estables dentro de su hábitat natural (IUCN 2013).

Todos los procedimientos en el laboratorio fueron llevados a cabo siguiendo las normas éticas de experimentos con animales dirigido por el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Research Council, 1996) y el CICUAE (Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales)

7.3. CARACTERIZACIÓN DE GAMETOS

7.3.1. Obtención de ovarios y testículos

Los animales fueron sacrificados empleando una sobredosis de pentobarbital (0.7 ml/20 g: SEDAL-VET, México) administrado via intraperitoneal y los ovarios y testículos fueron removidos para su análisis y procesamiento. Para la parte de caracterización de gametos se utilizaron 11 machos y 10 hembras.

7.4. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

7.4.1. Tamaño de los organismos y diámetro escrotal

Antes de la disección del aparato reproductor. Cada macho fue pesado, usando una balanza semianalítica (± 0.00 g: Setra, EEUU) y se midió de la cabeza a las patas con un vernier (± 0.01 mm). El diámetro escrotal fue determinado midiendo ambos testículos con un vernier (± 0.01 mm). En seguida, los testículos, con su respectivo epidídimo y conducto deferente, fueron disectados. Las regiones del epidídimo fueron cortadas para separar la cola del epidídimo con el conducto deferente. Los espermatozoides contenidos en la cola del epidídimo y conducto deferente fueron recuperados por retro-perfusión con 100 μ l de solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% (PiSA, México) a 37°C y una jeringa con aguja de 30 G (BD, México). Una vez recuperado el contenido espermático se mantuvo en un baño termostático (Labnet, EEUU) a 37°C e inmediatamente fue evaluada microscópicamente.

7.5. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

7.5.1. Concentración espermática

Para determinar la concentración espermática, se realizó una dilución del semen 1:20 (v/v) con solución salina formolada al 4%. Se tomaron 10 μ l de la solución y se colocó en una cámara de Neubauer (VWR, EEUU). Los espermatozoides fueron contados

utilizando un contador de células (VWR, EEUU) usando un microscopio óptico a 400 X (Nikon, Japón).

7.5.2. Porcentaje de motilidad espermática

Para observar el desplazamiento de los espermatozoide y siguiendo los lineamientos de la organización Mundial de la Salud (WHO, 2010), los espermatozoides recuperados se mantuvieron en un baño termostático a 37°C (Labnet, EEUU). Se colocó una gota de 10 µl de semen en un portaobjetos atemperado a 37°C y en seguida se observó al microscopio óptico a 400 X (Nikon, Japan).

7.5.3. Morfometría espermática

Para evaluar el tamaño y forma de los espermatozoides, se tomó una alícuota de 10 µl y se realizó un frotis y se fijó en alcohol al 96%. Para cada individuo se obtuvieron imágenes de 100 espermatozoides con un microscopio óptico (Nikon, Japón) a 1000 X, usando una cámara digital (Olympus, EEUU). Las imágenes obtenidas de los espermatozoides se utilizaron para calcular la longitud de la cabeza, pieza media y flagelo, usando el analizador de imágenes "Image Pro Express 4.5".

7.5.4. Porcentaje de viabilidad espermática

La viabilidad de los espermatozoides se determinó mediante la tinción con Eosina-Nigrosina al 5% de un frotis siguiendo el protocolo de Barth y Oko, (1989). El frotis se observó al microscopio óptico a 400 X (Nikon, Japón). Los espermatozoides considerados viables no incorporaron los colorantes, mientras que los espermatozoides considerados como no viables se observaron con la cabeza teñida de color rosa. Para cada individuo se analizaron por triplicado 200 espermatozoides de cada laminilla.

7.5.5. Porcentaje de anomalías espermáticas

Para el estudio de las anomalías, se tomaron 10 µl y se realizó un frotis y se fijó en alcohol al 96%. El frotis se observó al microscopio óptico a 1000 X (Nikon, Japón).

Se analizaron 200 espermatozoides por laminilla y por triplicado de cada individuo. Las anomalías espermáticas se clasificaron por presentar defectos en la cabeza del espermatozoide, defectos en su pieza media (doblada, delgada, gruesa), flagelos enrollados e inclusiones de gotas citoplasmáticas que pudieran estar localizadas en la pieza media de manera proximal, media o distal, cabeza y flagelos aislados. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital (Olympus, EEUU).

7.6. CARACTERIZACIÓN DE OVOCITOS

El ovario derecho y el ovario izquierdo fueron disectados y se mantuvieron en PBS a 1X a una temperatura de 20°C a 25°C en cajas de Petri (35 x 10 mm, Falcon, EEUU). Los ovocitos se obtuvieron por punción folicular con ayuda de una aguja de 27 G (BD, México) y se observaron bajo al microscopio estereoscópico (Zeiss, EEUU) a 7 X para localizar los complejos ovocitos-células del cúmulo (COC), los COC se evaluaron con base al aspecto del citoplasma y al número de capas de células de la granulosa que cubrían al ovocito usando un microscopio invertido (Zeiss, USA) a 20 X, de acuerdo al criterio establecido por De Loos *et al.* (1989). Las imágenes de los COC fueron tomadas con una cámara digital (Sony Cyber-shot, EEUU).

7.7. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL *IN VITRO*

7.7.1. Obtención de espermatozoides

Se colectaron un total 10 organismos entre los meses de Enero y Diciembre del 2011. Los animales fueron sacrificados empleando una sobredosis de pentobarbital (0.7 ml/20 g: SEDAL-VET, México) administrado via intraperitoneal.

Las regiones del epidídimo fueron cortadas para separar la cola del mismo con el conducto deferente. Los espermatozoides contenidos de ambas colas del epidídimo y conductos deferentes fueron recuperados en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% (PiSA, México) a 37°C, con una jeringa y aguja de 30 G (DB, México). Una vez recuperado el contenido espermático se ajustó a 1 ml con SSF y se mantuvo en un baño temoregulado (Labnet, USA) a 37 °C.

Posteriormente, la muestra de semen se centrifugó durante 4 minutos a 2500 rpm. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 ml de Medio TALP. Posteriormente fue dividida en dos muestras, a una se le agregó 1 ml de Medio TALP y a la segunda se le adicionó 1 ml de Medio TALP + 4 μ M/ml de progesterona (P_4). Este procedimiento se realizó con cada uno de los 5 machos colectados y se mantuvieron a 37°C. Lo mismo sucedió con otros 5 machos que se mantuvieron a 32°C.

Todos los tratamientos se mantuvieron en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de aire, obteniendo muestras a las 0, 4, 6 y 8 horas con la finalidad de monitorear la capacitación, reacción acrosomal, el movimiento, la viabilidad y anomalías de los espermatozoides.

Para evaluar la funcionalidad de los espermatozoides en cuanto a la capacitación y reacción acrosomal *in vitro*, se realizaron dos pruebas de fluorescencia: Clortetraciclina (CTC) y con lectinas conjugadas con FITC (PSA-FITC). La primera ha sido usada para una directa identificación de espermatozoides capacitados y su habilidad para experimentar reacción acrosomal. La segunda es utilizada para analizar la integridad del acrosoma y confirmar la prueba de CTC. Ambas pruebas se validaron por medio de micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (MET).

7.7.2. Prueba CTC

Los cambios en la membrana plasmática del espermatozoide se determinaron empleando la prueba de la Clortetraciclina (CTC; Ward y Storey, 1984). El procedimiento para la preparación de CTC fue realizado según Mattioli *et al.* (1995). Brevemente, 100 μ l de CTC (750 μ M) fueron preparados en un buffer de 20 mM de Tris, 130 mM de NaCl y 5 mM de Cisteína (pH final de 7.8). Tomamos 100 μ l de cada muestra y se les añadió 5 μ l de CTC, se mezclaron durante 30 segundos y posteriormente se agregó 22 μ l de glutaraldehído al 0.2%. Se prepararon laminillas con 10 μ l de la mezcla anterior y se agregó una gota de 1,4-diaza-biciclo-octano (DABCO) y se colocó un cubreobjetos, ejerciendo presión suave. Las laminillas se observaron al microscopio de fluorescencia (Leica, Alemania) a una amplificación de 1000 X, evaluando 200 células por laminilla. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital (Canon, EEUU).

7.7.3. Prueba lectinas (PSA-FITC) para evaluar la integridad del acrosoma

Se utilizó la Lectina del chícharo (PSA-*Pisum sativum agglutinin*) unida al flouorocoromo FITC. De cada tratamiento se tomó una muestra de 10 μ l y se realizaron frotis que fueron secados a temperatura ambiente, posteriormente fueron fijadas durante 1 hora en etanol al 96% a temperatura ambiente. A los frotis se les añadió 50 μ l de PSA-FITC (100 μ g/ml en PBS) por 10 min. Enseguida, las muestras se lavaron con agua bidestilada y se dejaron secar. Se agregó una gota de DABCO y se colocó un cubreobjetos, ejerciendo presión suave. Finalmente, se examinaron al menos 100 células por laminilla en un microscopio de fluorescencia (Leica, Alemania) a una amplificación de 1000 X, Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital (Canon, EEUU).

7.7.4. Morfología espermática

Con el fin de observar cambios morfológicos principalmente en la pieza media y flagelo de los espermatozoides se realizaron frotis con 10 μ l de muestra de cada tratamiento. Estos frotis fueron secados al aire y a temperatura ambiente y se observaron al microscopio óptico a 600 X de magnificación (Nikon E200). Se analizaron 200 espermatozoides por laminilla. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital (Canon, EEUU).

7.7.5. Porcentaje de motilidad

Se realizó de la misma forma como se mencionó en la sección 7.5.2.

7.7.6. Porcentaje de viabilidad

Se realizó de la misma forma como se mencionó en la sección 7.5.4.

7.8. MADURACIÓN *IN VITRO*

7.8.1. Obtención de ovarios

Se disectaron el ovario derecho y el izquierdo, ambos se lavaron con 2 ml de solución TL-HEPES (Gibco) a una temperatura de 20°C a 25°C en cajas de Petri (35 x 10 mm; Falcon, EEUU).

7.8.2. Colección de ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron a partir de los folículos de mayor tamaño y que se encontraron en la corteza del ovario. Cada folículo fue puncionado con una aguja de calibre de 30 G (BD, México). Se observó bajo al microscopio estereoscópico (Zeiss, EEUU) a 7 X para buscar los complejos ovocito-células del cúmulo (COC).

Usando un microscopio invertido (Zeiss, USA) a 20 X, los COC se evaluaron con base al aspecto del citoplasma y al número de capas de células de la granulosa que cubrían al ovocito de acuerdo al criterio establecido por De Loos *et al.* (1989).

7.8.3. MADURACIÓN *IN VITRO*

Los COC obtenidos (de todas las calidades; n=85) se lavaron dos veces con 1 ml de solución TL-HEPES (Gibco). Posteriormente de 3 a 5 ovocitos se transfirieron a cajas de cuatro pozos (Nunc, Dinamarca) que contenían 500 µl de medio de maduración (TCM-199 con bicarbonato y sales Earle: Gibco) suplementado con 10% de suero de ternera neonato (STN: IN VITRO, México), 5 µl/ml de FSH (Folligon, INTERVET), 5 µl/ml de LH (Chorulon, INTERVET), 5 µl/ml de Estradiol (Sigma), 10 µl/ml de piruvato de sodio (Sigma) y 5 µl/ml de Penicilina/estreptomicina (P/E: IN VITRO, México), cada pozo fue cubierto con 200 µl de aceite mineral (Sigma). Debido a que no existe información al respecto sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de murciélago de *A. jamaicensis*, en el presente proyecto se emplearon dos temperaturas (37°C y 38.5°C) y dos tiempo de incubación (24 y 44 horas). El medio de maduración utilizado se probó con hormonas y sin hormonas con la finalidad de establecer el más apropiado para la expansión de las células de la granulosa. El criterio para evaluar la maduración *in vitro* fue la expansión de las células de la granulosa y la presencia de un cuerpo polar.

7.9. FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

Una vez madurados los ovocitos *in vitro* se evaluaron en un microscopio estereoscópico a 20 X (Zeiss, EEUU), aquellos cuyas células del cúmulo mostraron expansión fueron colocados en diferentes medios de cultivo para observar cual era el más apropiado para la fertilización *in vitro*. Antes de la fertilización los ovocitos se lavaron dos veces con 1 ml de medio de fertilización y posteriormente se transfirieron de 1 a 3 ovocitos en cajas de 4 pozos, que contenían 490 μ l de medio de fertilización. Cada pozo fue cubierto con 200 μ l de aceite mineral (Sigma).

Para el cultivo se colocaron 20 ovocitos al azar en dos medios de fertilización diferentes: El medio TALP (IN VITRO, México) y el medio HTF (IN VITRO, México). Cada medio fue suplementado con 5% de Albumina Sérica Bovina Fracción V al 4% (Sigma), 0.5 ul/ml de P/E y 0.5 ul/ml de piruvato de sodio (Sigma), a 37°C con 5% de CO₂, 95% de aire.

La muestra de semen se obtuvo a partir de la cola del epidídimo y conducto deferente de machos maduros. Los espermatozoides fueron recuperados con SSF al 0.9% (Pisa, México) previamente atemperada a 37°C. Una vez recuperado el contenido espermático se realizó un lavado por centrifugación a 500 g por 5 minutos. El sobrenadante fue desechado y el paquete espermático se resuspendió en tubo Eppendorf de 1.5 ml añadiendo 1 ml de medio TALP para capacitar (IN VITRO, México) previamente a temperado a 37°C. Se tomó una muestra de 10 μ l y se colocó en un portaobjetos atemperado a 37°C, la muestra se observó en un microscopio óptico a 200 X (Nikon, Japón) para observar la motilidad. Si la muestra presentaba un porcentaje mayor al 50% de espermatozoides motiles era considerada de buena calidad y podría utilizarse para fertilizar.

Para determinar la concentración espermática de la muestra se utilizó un tubo Eppendorf de 500 μ l, se hizo una dilución 1:20 en agua; la mezcla se homogenizó y se tomaron 10 μ l que fueron colocados en una cámara de Neubauer (VWR, EEUU) y contados bajo un microscopio óptico a 400 X (Nikon, Japón), utilizando un contador de células. Una vez determinada la concentración de la muestra espermática, se ajustó la concentración de semen necesaria para realizar la inseminación con 1×10^6 espermatozoides/ml.

A cada pozo se le añadieron 10 µl de la suspensión de espermatozoides. La incubación de COC y espermatozoides se realizó a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% CO₂, 95% de aire y humedad a saturación por 22 horas.

Una vez transcurrido las 22 horas se observaron al microscopio estereoscópico a 20 X (Zesis, EEUU). Las imágenes de los fueron tomadas con una cámara digital (Sony Cibershot, EEUU).

7.10. DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*

Los posibles cigotos se lavaron 2 veces en medio de desarrollo HTF (*IN VITRO*, México), suplementado con albúmina sérica bovina Fracción V al 4% (Sigma), 10% de SFB (*IN VITRO*, México) y 0.5 ul/ml de P/E (*IN VITRO*, México), a 37°C con 5% de CO₂, 95% de aire. Posteriormente de 1 a 3 cigotos se transfirieron a cajas de 4 pozos que contenían 500 µl de medio de desarrollo, cubierto con 200 µl de aceite mineral (Sigma).

7.11. ULTRAESTRUCTURA DE ESPERMATOZOIDES Y OVOCITOS

Para llevar a cabo el análisis ultrafino de los espermatozoides y de los COC, ambos se fijaron en solución de Karnovsky por 24 horas, posteriormente fueron colocados en buffer de cacodilato de sodio al 0.1 M. y postfijados en tetroxido de osmio al 1% durante 1 hora. Después las muestras se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales de manera creciente (70% al 100%). Posteriormente se colocaron en acetonitrilo durante 20 min y se incluyeron en Epon puro (Pelco Internacional, México) en un molde de plástico dejándose polimerizar a 60°C.

Se realizaron cortes semifinos de 1µm con un ultramicrotomo (LKB, EEUU) y se tiñeron con azul de toluidina al 1% para determinar el área donde se realizarían los cortes finos. Hicimos cortes finos de 800 nm (ULTRACUT, EEUU) las rejillas fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2.5% y citrato de plomo al 0.3%. Finalmente Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010, Japón).

7.12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos obtenidos fueron presentados con media \pm DS. Estos datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Friedman (ANOVA) para evaluar las diferencias entre las dos temperaturas y la adición de P₄ al medio. También se aplicó una prueba no paramétrica de Wilcoxon para comparar entre las medias de las muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre las dos temperaturas y la adición de P₄.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar los tiempos de maduración, la temperatura y la suplementación del medio de maduración con hormonas. Los resultados obtenidos como porcentaje se normalizaron por medio de una transformación a arcoseno para posteriormente realizar los análisis estadísticos. La significancia estadística establecida fue de $p < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados mediante el programa Statistica 5.0 versión 5 (Stats Soft, Reino Unido, 1997).

VIII. RESULTADOS

8.1. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES DE *A. jamaicensis* y *S. liliium*.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Tamaño de los organismos y diámetro escrotal

Los organismos colectados de ambas especies presentaron una talla promedio de la cabeza a las patas de 8.77 y 7.71 cm para *A. jamaicensis* y *S. liliium* respectivamente. Su tamaño se encuentra dentro del rango considerado para machos adultos de la misma familia.

A. jamaicensis presentó un mayor diámetro escrotal con respecto a la especie *S. liliium* (Tabla 3).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Concentración espermática

Respecto a los datos observados sobre concentración espermática de los murciélagos *A. jamaicensis* y *S. liliium* no existen reportes al respecto. Al recuperar los espermatozoides de la cola del epidídimo y del conducto deferente obtuvimos una concentración espermática de 4.26 ± 2.05 y 5.15 ± 1.88 espermatozoides/ml respectivamente; la concentración espermática fue mayor en *S. liliium* que en *A. jamaicensis* (Tabla 3).

Morfometría espermática

Respecto al tamaño de los espermatozoides, encontramos que el de *S. liliium* fue ligeramente más grande al de *A. jamaicensis* (Tabla 3). Las dimensiones del espermatozoide de *S. liliium* fueron: Longitud de la cabeza ($7.01 \pm 0.89 \mu\text{m}$); longitud de la pieza media ($20.33 \pm 4.59 \mu\text{m}$) y la longitud del flagelo ($70.50 \pm 8.31 \mu\text{m}$). Mientras que el de *A. jamaicensis* fueron: Longitud de la cabeza fue de $6.26 \pm 0.69 \mu\text{m}$; longitud de la pieza media fue de $18.61 \pm 2.92 \mu\text{m}$ y la longitud del flagelo fue de $70.92 \pm 9.00 \mu\text{m}$ (Tabla 3: Figura 1).

Tabla 3: Características macroscópicas del organismo y microscópicas del espermatozoide de murciélago de *A. jamaicensis* y *S. liliu*m. (Los datos obtenidos se muestran con .Media \pm Desviación Estándar.)

CARACTERÍSTICAS	<i>A. jamaicensis</i> (n=11)		<i>S. liliu</i> m (n=10)	
MACROSCÓPICAS				
Tamaño del organismo (cm)	8.77	\pm 0.97	7.71	\pm 0.81
Peso del organismo (gr)	42.66	\pm 3.38	20.20	\pm 1.46
Diámetro escrotal (cm)	1.62	\pm 0.39	1.39	\pm 0.35
MICROSCÓPICAS				
Concentración espermática ($\times 10^6$)	4.26	\pm 2.05	5.15	\pm 1.88
Longitud (μ M)				
Cabeza	6.26	\pm 0.69	7.01	\pm 0.89
Parte media	18.61	\pm 2.92	20.33	\pm 4.60
Flagelo	70.92	\pm 9.00	70.50	\pm 8.31
Motilidad Progresiva (%)				
Progresivos	34.55	\pm 25.83	60.00	\pm 14.14
No Progresivos	35.45	\pm 14.40	27.50	\pm 13.18
Inmóviles	30.00	\pm 20.00	13.00	\pm 9.19
Viabilidad (%)				
Espermatozoides vivos	73.23	\pm 20.49	83.82	\pm 8.37
Anormalidades (%)				
Normales	61.98	\pm 13.82	70.53	\pm 17.48
Cabeza, flagelo y pieza media	12.50	\pm 6.35	13.77	\pm 9.35
Gotas citoplasmática, cabezas y flagelos aislados	12.61	\pm 9.25	5.77	\pm 3.01
Flagelo abaxial	12.83	\pm 8.90	9.90	\pm 3.21

Morfología espermática

El espermatozoide de ambas especies *A. jamaicensis* (Figura 1A y 1B) y *S. liliu*m (Figura 1C y 1D) está conformado de una cabeza y de una cola o flagelo. El flagelo es la parte más larga del espermatozoide y está formado por la pieza media, la pieza principal y la pieza final.

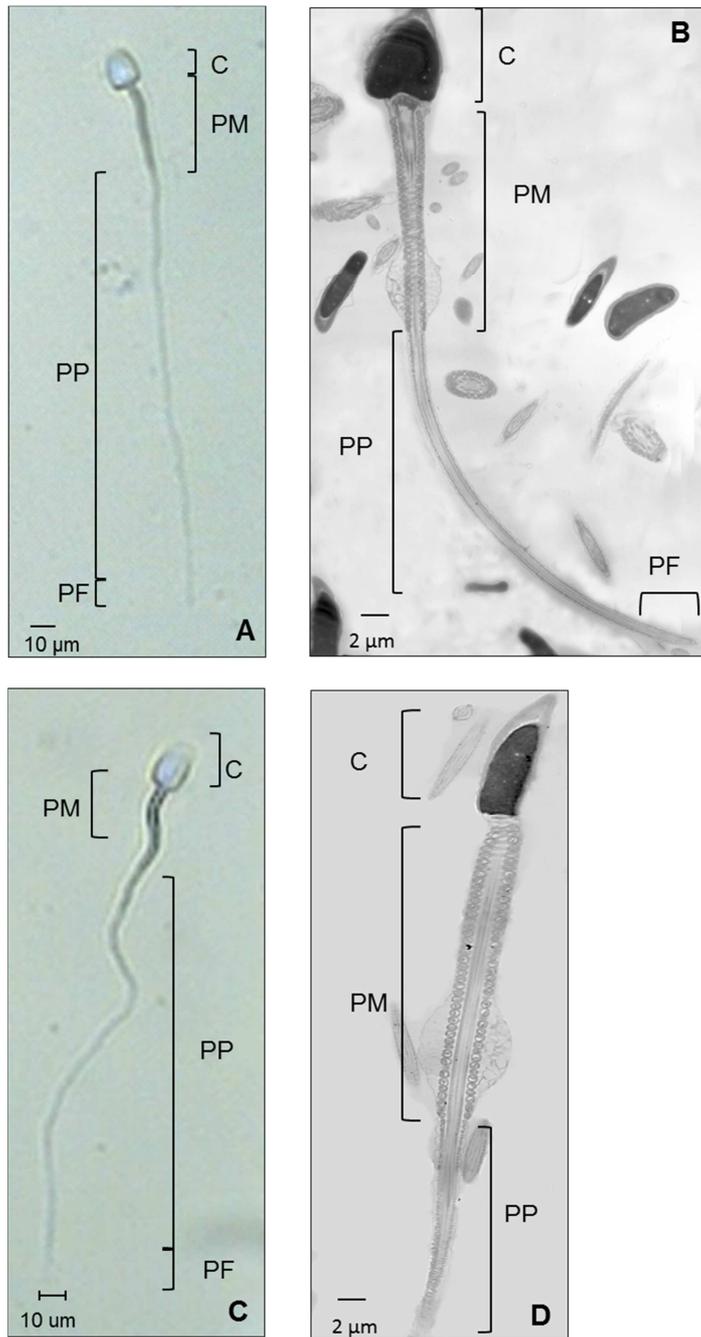


Figura 1: Morfología espermática en *A. jamaicensis* y *S. liliium* (A y B) *A. jamaicensis* A) Microscopía de campo claro. B) Microscopía electrónica de transmisión. (C y D) *S. liliium*. Microscopía de campo claro. D) Microscopía electrónica de transmisión. C: Cabeza. PM: Pieza media. PP: Pieza principal. PF: Pieza final.

CABEZA

La cabeza del espermatozoide de *A. jamaicensis* y *S. liliium* presentó una forma aplanada y redondeada en forma de espátula. La cabeza está formada por el acrosoma, el núcleo y el segmento ecuatorial. Presentó una membrana plasmática que rodea toda la cabeza del espermatozoide; la cual se encuentra separada de la membrana acrosomal externa en la región anterior, comenzando a unirse en la parte media o distal, formando el segmento ecuatorial (Figuras 2A y 3A).

Acrosoma

Abarca tres 3 cuartas partes de la cabeza. Consiste de una membrana externa e interna que emergen en la parte distal de la cabeza. El acrosoma puede dividirse en tres partes: A) La parte apical del acrosoma, siendo la parte más gruesa formando un capuchón donde se encuentran las enzimas necesarias para penetrar la zona pelúcida y se encuentra por arriba del núcleo. B) el segmento principal, tanto la membrana interna como externa comienzan a adelgazarse. C) La porción caudal es donde se encuentra el segmento ecuatorial. La unión entre el segmento principal y el segmento ecuatorial es marcado por un abrupta disminución en el grosor entre la membrana acrosomal interna y externa (Figura 2A y 3A).

Entre la membrana acrosomal interna y la membrana nuclear se extiende un espacio en forma de pico conocida como espacio subacrosomal (Figura 2A y 3A).

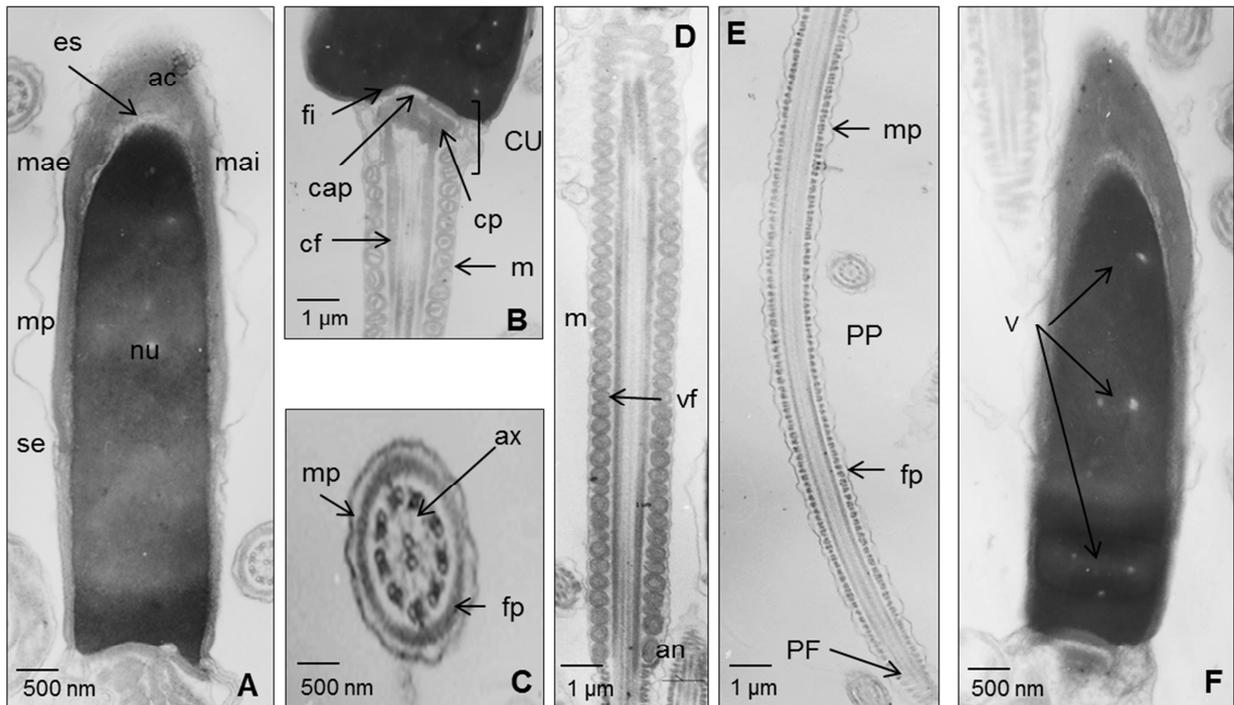


Figura 2: Morfología espermática de *A. jamaicensis*: ac: acrosoma. ax: axonema. an: anulus. cap: capitulum. cf: columna de fibras. cp: centriolo proximal es: espacio subacrosomal. fi: fosa de implantación. fp: fibras de proteína. m: mitocondrias mp: membrana plasmática. mae: membrana acrosomal externa. mai: membrana acrosomal interna. nu: núcleo. se: segmento ecuatorial. vf: vaina fibrosa. V: Vacuolas. PP: Pieza principal. PF: Pieza final.

El núcleo cubre la mayor parte de la cabeza (Figura 2A y 3A), presenta material muy electrodenso porque la cromatina está altamente condensada debido al cambio de histonas por Protaminas El núcleo presentó pequeñas vacuolas distribuidas al azar (Figura 2F y 3F).

FLAGELO

Cuello

El cuello del espermatozoide de *A. jamaicensis* y *S. liliun* es pequeño y es la pieza conectora entre la cabeza y el flagelo, permitiéndole cierta articulación. Está unido a la cabeza ya que la parte final del núcleo presenta una estructura de forma convexa conocida como fosa de implantación. A partir del capitulum se observaron una serie de

fibras densas que van desde la pieza media hasta la pieza final de la cola del espermatozoide (Figura 2B, 2E, 3B y 3E).

El cuello está compuesto de una estructura de fibras densas segmentadas llamadas capitulum, Próximo al capitulum está el centriolo proximal. Del centriolo distal parten dos series de columnas de filamentos que se extienden desde la pieza media hasta la pieza principal del espermatozoide (Figura 2C y 3D).

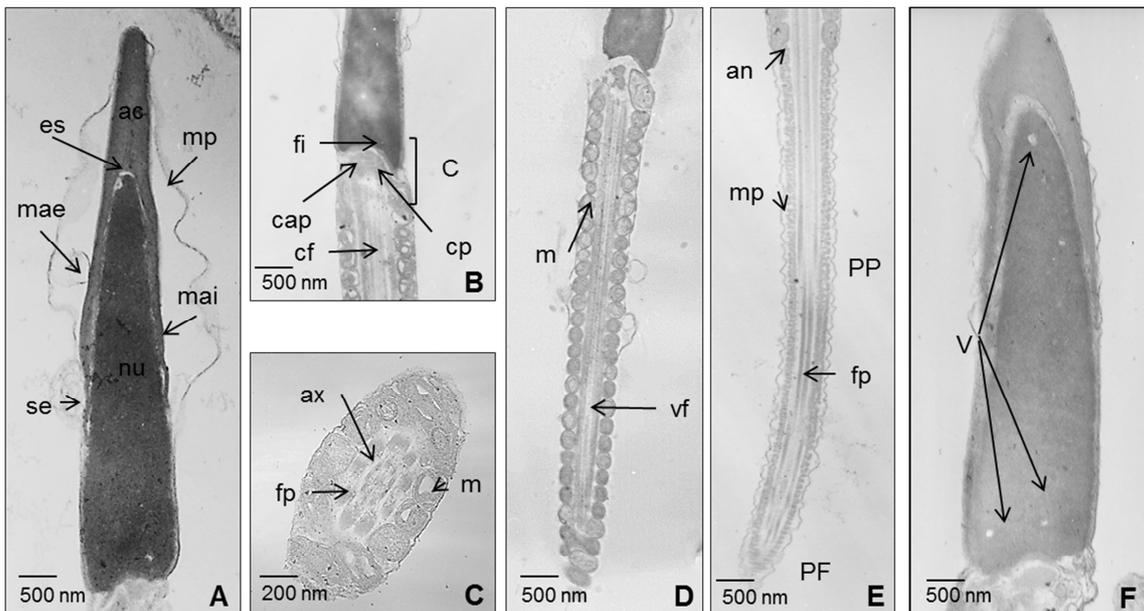


Figura 3: Morfología espermática de *S. liliium*: ac: acrosoma. ax: axonema. an: anulus. cap: capitulum. cf: columna de fibras. cp: centriolo proximal es: espacio subacrosomal. fi: fosa de implantación. fp: fibras de proteína. m: mitocondrias mp: membrana plasmática. mae: membrana acrosomal externa. mai: membrana acrosomal interna. nu: núcleo. se: segmento ecuatorial. vf: vaina fibrosa. V: Vacuolas. PP: Pieza principal. PF: Pieza final.

PIEZA MEDIA

La pieza media de *A. jamaicensis* y *S. liliium* es larga y contiene aproximadamente 35 pares de mitocondrias. El arreglo de las mitocondrias es similar a lo descrito en otros espermatozoides de mamífero, donde un par de mitocondrias forma una hélice. Haciendo que la pieza media y las mitocondrias formen un espiral (Figura 2D y 3D).

Este espiral rodea al axonema, las 9 fibras densas y a los grupos fibrosos que son los elementos que conforman el citoesqueleto del flagelo (Figura 2C y 3C).

El anulus se encuentra al final del último par de mitocondrias en forma de hélice en la pieza media, permitiendo distinguir cuando termina la pieza media y cuando comienza la pieza principal, en esta parte el diámetro de la pieza principal comienza a disminuir (Figura 2D y 3E). Además, esta estructura divide la pieza media y da lugar al comienzo de la pieza principal, donde se observan fibras densas externas que están cubriendo el axonema.

PIEZA PRINCIPAL

La pieza principal de *A. jamaicensis* y *S. liliium* es más larga que la pieza media y esta principalmente formada por el axonema, de 9 grupos fibras densas y otros grupos de fibras. El axonema es similar a lo descrito en otros mamíferos. Consiste de un par central de dos microtúbulos que está rodeado por un haz cilíndrico uniforme de 9 microtúbulos dobles. (Figura 2C y 3C). El par de microtúbulos centrales se une a los otros microtúbulos por puentes pequeños. Cada par de microtúbulos está compuesto por una subunidad A de forma circular completa y se encuentra unido a la subunidad B incompleta en forma de C. En la subunidad B se encuentran pequeñas estructuras en forma de gancho que pudieran ser los brazos de dineína. En cada par de túbulos está asociado con un grupo de fibras densas. Las 9 fibras densas externas se encuentran rodeando al axonema, tienen forma ovalada y diferente tamaño. 4 de estos grupos de fibras son alargadas y grandes en comparación con las otras 5 (Figura 3C). Estos grupos de fibras densas fácilmente se observan en la pieza media y parte de la pieza principal, dejando de distinguirse cerca de la pieza final.

PIEZA FINAL

La transición entre la pieza principal y la pieza final de *A. jamaicensis* y *S. liliium* no es distinguible ya que ambas presentan el mismo diámetro. Desde donde comienza el anulus hasta el final de la pieza final se observan los grupos de fibras que rodean al

axonema y los 9 grupos de fibras densas. Tanto la pieza principal como la final están cubiertas por la membrana plasmática (Figura 2E y 3E).

Porcentajes de viabilidad y motilidad

Tanto para el murciélago zapotero (*A. jamaicensis*) como para el murciélago de charreteras (*S. liliium*), se observaron porcentajes de viabilidad mayores al 50% (Tabla 3). Además, al mantener los espermatozoides de ambas especies a una temperatura de 37°C, se observó que los espermatozoides de *A. jamaicensis* presentaron un bajo porcentaje de desplazamiento lineal y progresivo, detectándose cierta inmovilidad de algunos espermatozoides. Sin embargo, los espermatozoides de *S. liliium*, mantenido a las mismas condiciones, presentaron valores mayores al 50% de espermatozoides que se desplazaron de forma lineal, comportándose similar a lo reportado en los lineamientos de la OMS (2010) (Tabla 3).

Porcentaje de anomalías

Ambas especies presentaron altos porcentajes de espermatozoides con apariencia normal. Es interesante observar que ambas especies presentaron valores por debajo del 50% de anomalías (Tabla 3). Las anomalías o defectos encontrados con mayor frecuencia en los espermatozoides de *A. jamaicensis* fueron: Diferentes arreglos de flagelos enrollados (Figura 4A-4C y 4L), piezas medias dobladas (Figura 4E-4G y 4K), defectos en la pieza media principalmente representados por la presencia de gotas citoplasmáticas en diferentes posiciones (Figura 4H, 4K y 4M) y flagelos y cabezas sueltas (Figura 4L y 4N).

Una característica interesante en estos espermatozoides fue la presencia del flagelo con inserción abaxial (Figura 4J y 4O); el cual en algunos animales domésticos es considerado como una anomalía, sin embargo en animales de vida silvestre no existe una clasificación que permita catalogar a este tipo de flagelo como un defecto o simplemente como una característica de la especie (Tabla 3).

Las anomalías o defectos que se encontraron con mayor frecuencia en *S. liliium* fueron diferentes arreglos de flagelos enrollados (Figura 5A-5D y 5N), En poca proporción se encontraron piezas medias dobladas (Figura 5E, 5F y 5M). Defectos en la pieza media caracterizados principalmente por la presencia de gotas citoplasmáticas en diferentes posiciones: distal (la gota citoplasmática se encuentra en la parte final de la pieza media; Figura 5G y 5M); media (la gota citoplasmática se encuentra en la parte media; Figura 5H) y proximal (la gota citoplasmática se encuentra en la parte final de la cabeza y comienzo de la pieza media; Figura 5I y 5N) y flagelos y cabezas sueltas (Figura 5J). Una característica interesante, que también se detectó en algunos espermatozoides de *S. liliium*, fue la presencia de un flagelo con inserción abaxial (Figura 5K, 5L y 5Ñ).

La posición de la gota citoplasmática es variable y se presentó principalmente en la pieza media, esta se pudo observar entre la fosa de implantación y el capitulum o en la pieza media y en la parte final muy cercana al anulus. Está formada de citoplasma, abundantes vacuolas y membranas (Figura 4H, 4K, 4M, 5G, 5H, 5I, 5M y 5N).

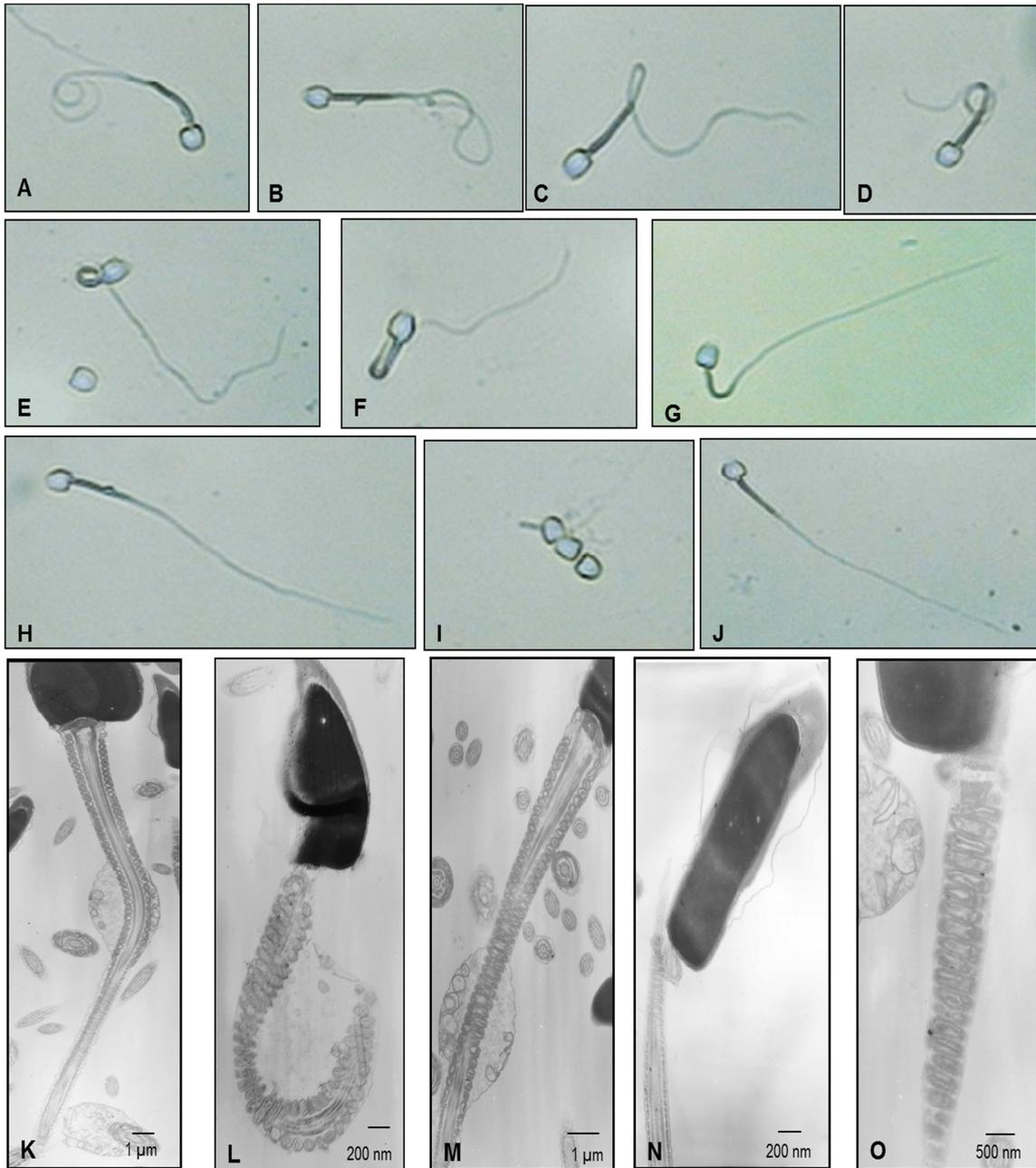


Figura 4: Anormalidades espermáticas en *A. jamaicensis*. (A-D, L) Diferentes arreglos de flagelos enrollados. (E-G, K) Piezas medias dobladas. Gotas citoplasmáticas. H) Media. K,M) Distal. (I,N) Flagelos y cabezas aisladas. (K,J,O) Flagelo abaxial. 100X.

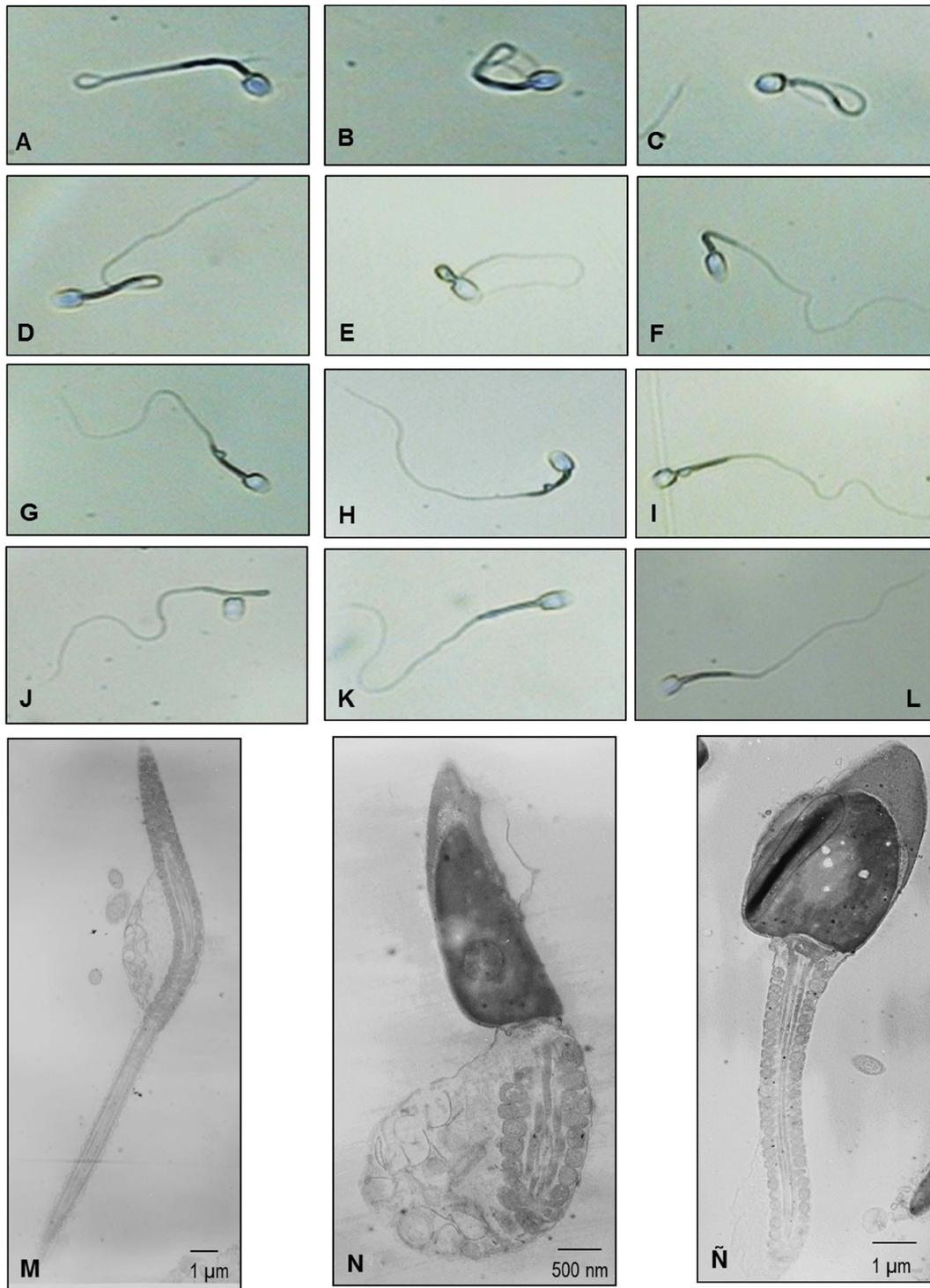


Figura 5: Anormalidades espermáticas en *S. lilium*. (A-D, N) Diferentes arreglos de flagelos enrollados. (E, F, M) Piezas medias dobladas. Gotas citoplasmáticas. G y M) Distal. H) Media. I y N) Proximal. (J) Flagelos y cabezas aisladas. (K, L, Ñ) Flagelo abaxial. 100X.

8.2. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE OVOCITOS DE *A. jamaicensis* Y *S. liliium*.

Los ovarios derecho e izquierdo de *A. jamaicensis* y *S. liliium* tienen un tamaño aproximado de 3 mm de longitud; para ambas especies el ovario derecho fue un poco más grande y se encontró más irrigado (Figura 6).

Una vez realizada la punción para extraer los folículos grandes y visibles del ovario derecho y del ovario izquierdo; los ovocitos fueron clasificados de acuerdo a su morfología. En ambos ovarios pudimos obtener ovocitos de diferentes calidades según la clasificación de De Loos *et al.* (1989). Aunque esta clasificación fue realizada en bovinos, los ovocitos de murciélagos pudieron ser clasificados de la misma forma (Tabla 4).

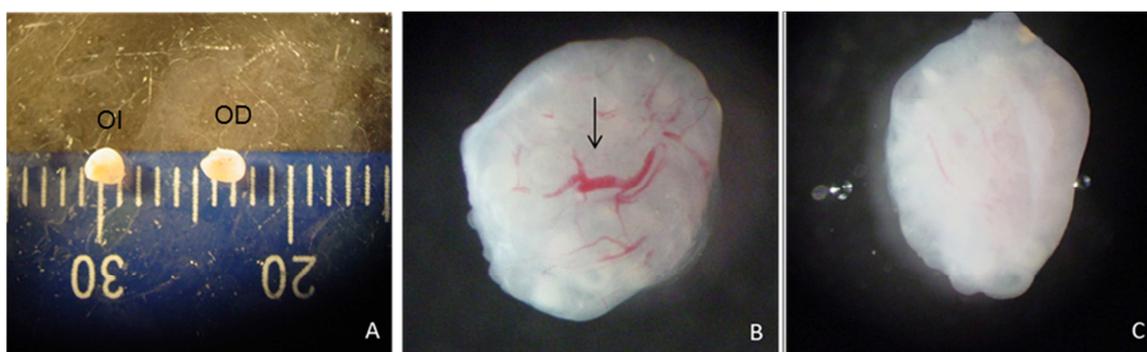


Figura 6: Ovarios de *A. jamaicensis* y *S. liliium*. A) Longitud del ovario derecho (OD) y del izquierdo (OI) de *S. liliium*. 2x. B) Ovario derecho de *A. jamaicensis*. Se observa la irrigación en el ovario (Flecha). C) Ovario izquierdo de *A. jamaicensis*. B y C) 5x.

Al realizar la punción folicular en ambos ovarios ($n=10$) de la especie *A. jamaicensis* se obtuvieron en promedio 12.8 ovocito del ovario derecho y 9.9 del ovario izquierdo (Tabla 4). En el caso de los ovarios obtenidos de *S. liliium* ($n=10$), se obtuvieron en promedio 10.7 ovocitos del ovario derecho y 10.9 ovocitos del ovario izquierdo (Tabla 4). Cabe mencionar que para *A. jamaicensis* se recuperaron un mayor número de ovocitos del ovario derecho que del izquierdo. Mientras que para *S. liliium* se recuperó la misma cantidad de ovocitos del ovario derecho que del ovario izquierdo. Tanto para *A. jamaicensis* y *S. liliium* podemos obtener ovocitos de todas las calidades y características en ambos ovarios. Lo que podríamos decir que ambos ovarios son funcionales en *S. liliium* y *A. jamaicensis*.

De acuerdo a la clasificación de De Loos *et al.* (1989) para *A. jamaicensis* y *S. liliium* se obtuvieron ovocitos de categorías 1 (excelente) hasta categoría 4 (mala) (Tabla 4 y Figura 7). Los ovocitos de categoría 1, para *A. jamaicensis* (Figura 7A y 7I) y para *S. liliium* (Figura 7E) se observaron esféricos y simétricos, de estructura, color y textura uniforme y con citoplasma homogéneo. Otra característica importante dentro de esta categoría es que los ovocitos se encontraron rodeados de tres a cinco capas completas de células del cúmulo. No se observó con detalle la zona pelúcida ya que las células de la granulosa o del cúmulo lo están cubriendo.

Dentro de la categoría 2, correspondiente a ovocitos de buena calidad para *A. jamaicensis* (Figura 7B) y para *S. liliium* (Figura 7F), los ovocitos fueron esféricos y simétricos; de color y textura uniforme, criterios semejantes a la categoría 1; sin embargo estos estaban rodeados de solo tres o menos capas completas de células del cúmulo que corresponden a la corona radiada.

Dentro de la categoría 3 (calidad regular) para *A. jamaicensis* (Figura 7C y 7K) y para *S. liliium* (Figura 7G) los ovocitos también presentaron una forma esférica y simétrica con un tamaño, color y textura uniforme, pero estaban parcialmente desnudos. En estos ovocitos claramente pudimos observar la zona pelúcida que era delgada y transparente rodeando al ovocito, no presentaban un espacio entre el citoplasma y la zona pelúcida que pudieran demostrar que el ovocito tiene alguna anomalía en cuanto a su tamaño o que pudiera afectar la unión del espermatozoide con el ovocito durante la fertilización lo que pudiera ser una señal de la salud o calidad del ovocito. Esto también se observó en ovocitos con muchas capas o con solo rodeados por la corona radiada.

Tabla 4: Número de ovocitos obtenidos de diferentes calidades en el ovario derecho y ovario izquierdo de murciélagos de *A. jamaicensis* y *S. liliium*. (Los datos obtenidos se muestran con Media \pm Desviación Estándar).

		<i>A. jamaicensis</i> (n= 10)				<i>S. liliium</i> (n=10)			
		OVARIOS				OVARIOS			
		DERECHO		IZQUIERDO		DERECHO		IZQUIERDO	
Categoría 1	(Excelente)	5.0	\pm 3.8	3.5	\pm 2.2	3.3	\pm 2.0	2.8	\pm 1.8
Categoría 2	(Buena)	2.8	\pm 2.5	2.2	\pm 1.9	1.5	\pm 0.8	2.3	\pm 1.5
Categoría 3	(Regular)	1.9	\pm 0.7	1.7	\pm 0.9	2.3	\pm 1.8	1.7	\pm 1.5
Categoría 4	(Mala)	3.1	\pm 1.4	2.6	\pm 1.2	3.6	\pm 2.1	4.2	\pm 1.9
TOTAL		12.8	\pm 7.3	9.9	\pm 4.9	10.7	\pm 4.6	10.9	\pm 5.5

En *A. jamaicensis* (Figura 7D y 7L) y en *S. liliium* (Figura 7H), los ovocitos considerados ovocitos de mala calidad o de categoría 4, fueron aquellos que no estaban cubiertos por células del cúmulo y que no presentaron forma esférica. En algunos ovocitos, la zona pelúcida era delgada transparente, pero en otros era gruesa y de color oscuro. El ovocito, en estos casos, también presentó un citoplasma homogéneo de color claro a café. Se observaron ovocitos con algunas irregularidades o con alteraciones en el color del citoplasma observándose oscuro lo que pudiera ser el resultado de procesos apoptóticos, Algunos ovocitos con estas características presentaron una forma esférica pero otros estaban ovalados o deformes. Pudiéndose considerar a estos ovocitos como no viables.

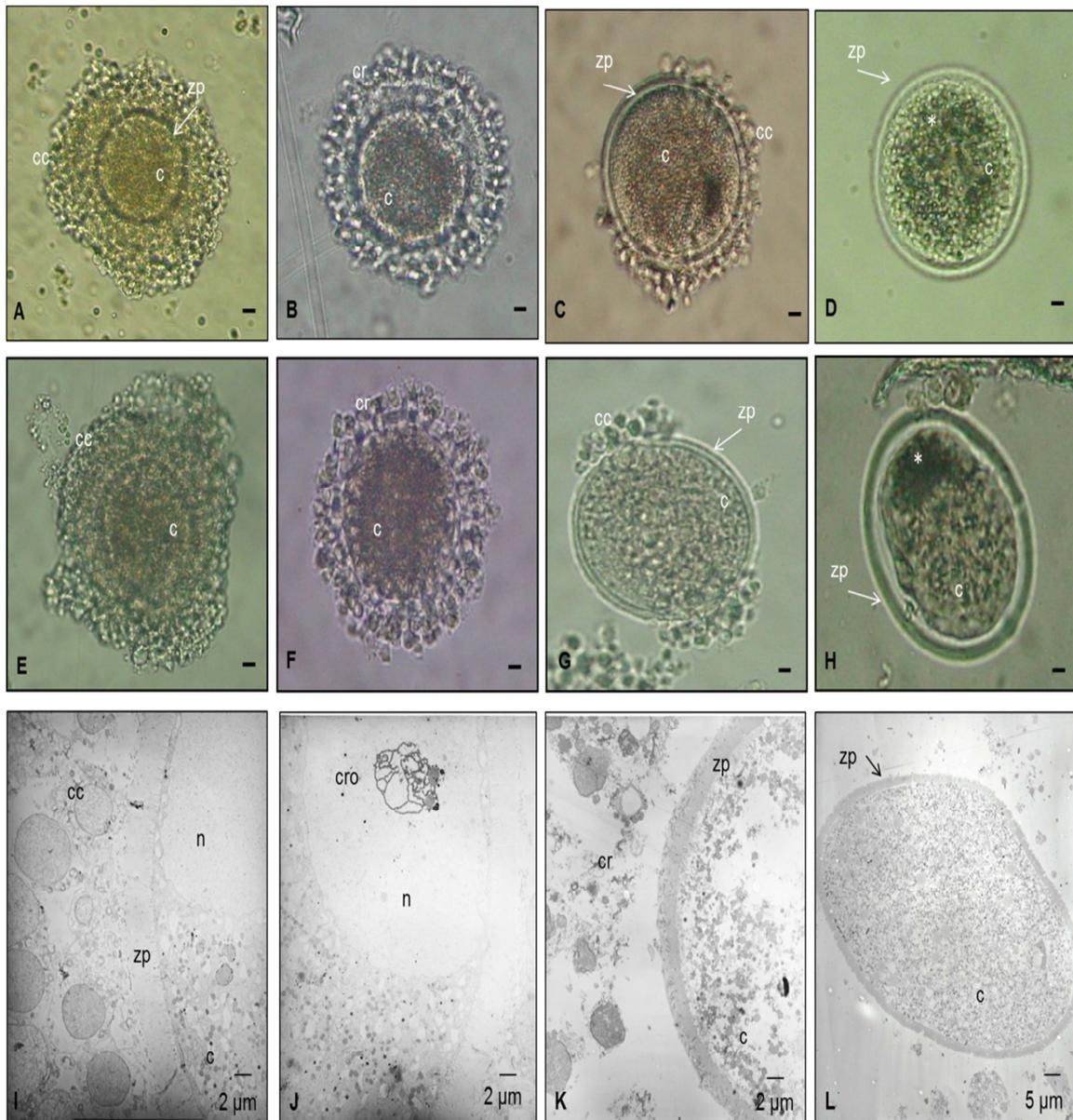


Figura 7: Ovocitos *A. jamaicensis* y *S. liliium*. (A-H) Microscopía de campo claro. (I-L) Microscopía electrónica de transmisión. (A-D, I, K, L) Ovocitos de *A. jamaicensis*. (E-F, J) Ovocitos de *S. liliium*. (A, E, I) Ovocitos categoría 1. (B,F) Ovocitos categoría 2. (C, G, K) Ovocitos categoría 3. (D, H, L) Ovocitos categoría 4. c: Citoplasma. cc: Células del cúmulo. zp: Zona Pelúcida. cr: Corona radiada. n: Núcleo. cro: Cromatina. * Manchas en el citoplasma (cuerpos apoptóticos).

8.3. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL EN EL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO *A. jamaicensis*

Prueba CTC y ultraestructura espermática

Incubamos los espermatozoides de *A. jamaicensis* en medio TALP suplementado con o sin progesterona (4 μ M) a 37°C y 32°C a diferentes horas, y de acuerdo a los patrones de fluorescencia obtenidos por parte de Ward y Storey (1984). Se observó que para todos los tratamientos y a las 0 horas de incubación, los espermatozoides presentaron fluorescencia uniforme en toda la cabeza y pieza media, correspondiente al patrón F, que está asociado a células no capacitadas (Figura 8A). La ultraestructura de los espermatozoides no capacitados, correspondió a espermatozoides morfológicamente normales. Los cuales estaban constituidos por una cabeza formada por el acrosoma, el núcleo y el segmento ecuatorial. La membrana plasmática cubrió toda la cabeza del espermatozoide y se encontró separada de la membrana acrosomal externa pero cuando esta llega a cubrir tres cuartas partes de la cabeza hacia la parte distal o final comienza a unirse con la membrana acrosomal externa y no se distingue, formando el segmento ecuatorial. El contenido del acrosoma separa la membrana acrosomal externa de la interna permitiendo que la cabeza tenga una forma de espátula (Figura 8D).

Al comienzo de la incubación, el porcentaje de espermatozoides no capacitados fue de entre el 80 al 90% en nuestras diferentes variables (Figura 9). Este porcentaje fue disminuyendo conforme pasaron las horas de incubación. A las 8 horas se observó un porcentaje del 20% de espermatozoides no capacitados para los tratamientos de 32°C con y sin P_4 y a 37°C sin P_4 . Sin embargo a 37°C con P_4 el porcentaje de espermatozoides no capacitados fue del 10 % diferente a los otros tratamientos (Figura 9). Hubo diferencias significativas entre las horas de incubación de los diferentes tratamientos ($p < 0.05$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas para ninguna de los porcentajes obtenidos de espermatozoides no capacitados ($p > 0.05$).

Conforme se incrementaba el tiempo de incubación, este porcentaje de espermatozoides no capacitados fue disminuyendo, permitiendo que los espermatozoides pasaran al siguiente estado, es decir capacitados, correspondiente al patrón B (Figura

8B). La cabeza del espermatozoide mostró una banda oscura sin fluorescencia en el segmento ecuatorial y postecuatorial, mientras que la porción anterior de la cabeza y pieza media del espermatozoide presentaron fluorescencia (Figura 8B). Los primeros cambios ultraestructurales que se pudieron observar en el espermatozoide considerado como capacitado fueron que la membrana plasmática comenzó a hincharse o a separarse más de la cabeza y del segmento ecuatorial. Esto también se observó en la parte apical de la cabeza, ya que la membrana acrosomal externa e interna y el contenido del acrosoma comenzaron a alargarse (Figura 8E).

Al evaluar este tipo de patrón, se observó que para todos los tratamientos, a las 0 horas, aproximadamente el 10% de espermatozoides estaban capacitados. Sin embargo estos porcentajes fueron aumentando conforme fueron aumentando las horas de incubación. Su valor más alto fue a las 6 horas para todos los tratamientos (Figura 9). Para 32°C con o sin P₄, el porcentaje de espermatozoides a esta hora fue aproximadamente del 43%, mientras que para 37°C con y sin P₄ el porcentaje fue del 48%. Estos porcentajes fueron disminuyendo conforme pasaron las horas de incubación, a las 8 horas a 32°C con o sin P₄ se observó una notable disminución en los porcentajes de espermatozoides capacitados. Mientras que a 37°C con y sin P₄ los porcentajes se mantuvieron constantes ($p > 0.05$) (Figura 9).

Hubo diferencias significativas entre las horas de incubación de los diferentes tratamientos ($p < 0.05$). Pero no hubo diferencias significativas entre la temperatura y con y sin P₄ en los porcentajes obtenidos de espermatozoides capacitados ($p > 0.05$).

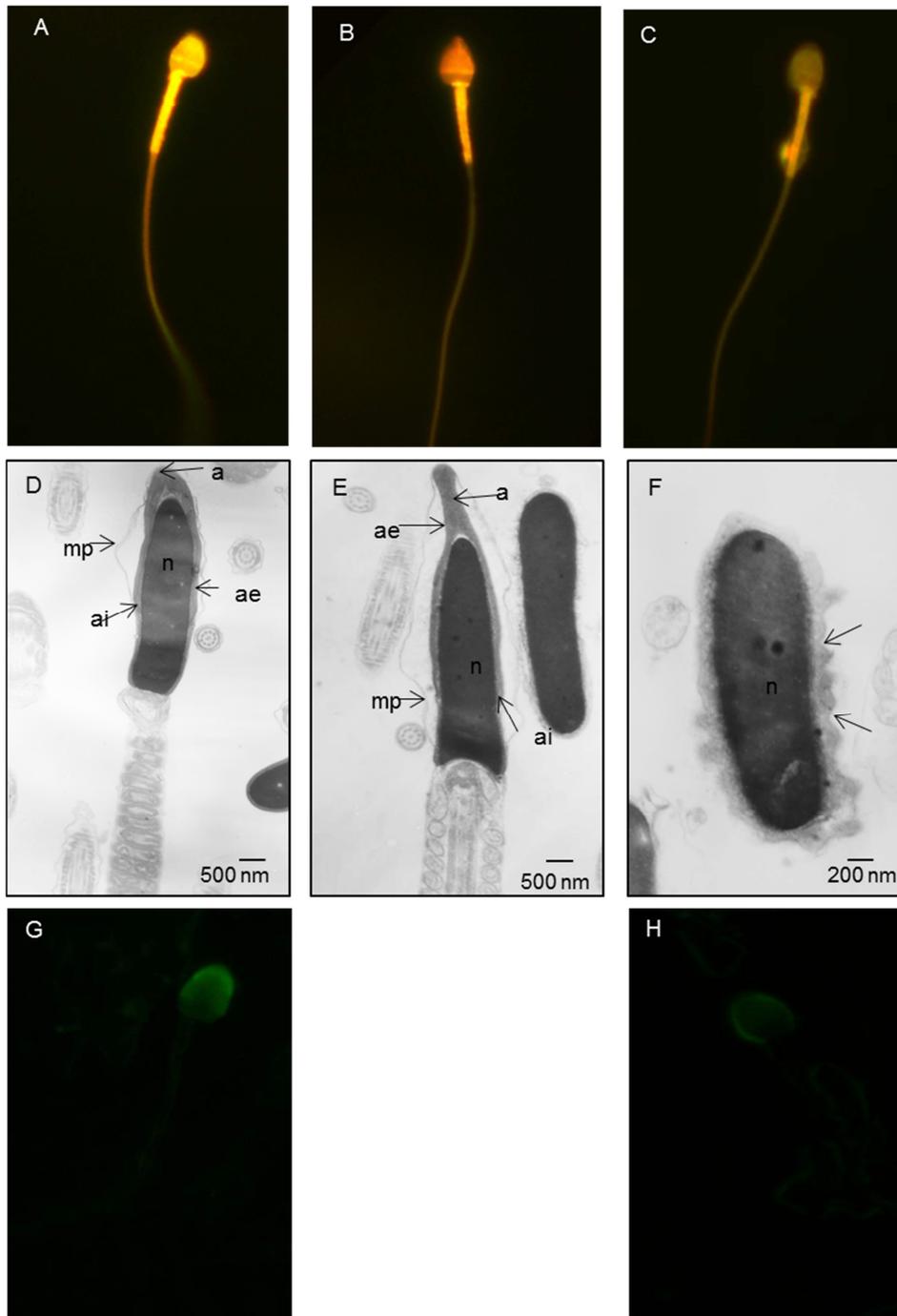


Figura 8: Patrones de fluorescencia observados en la cabeza de *A. jamaicensis*, por CTC (A) Patrón F, no capacitado. (B) Patrón B, capacitado (C) Patrón AR, reacción acrosomal. 100 X. Cambios morfológicos del espermatozoide por Microscopía electrónica. (D) Espermatozoide no capacitado. (E) Espermatozoide capacitado. (F) Espermatozoide con reacción acrosomal (las flechas muestran puntos de fusión entre las membranas) Patrones de fluorescencia por Lectinas (G) Espermatozoide con acrosoma intacto. (H) Espermatozoide capacitado y reaccionado. mp: membrana plasmática. a: acrosoma. ae: membrana acrosomal externa. ai: membrana acrosomal interna. n: núcleo

Lo que podría estar sucediendo es que la temperatura de 32°C está influyendo para que los espermatozoides tengan reacción acrosomal y por eso encontramos bajos porcentajes de espermatozoides capacitados. Ya que se observaron espermatozoides que no presentaban fluorescencia en la cabeza pero si en la pieza media, lo que corresponde al patrón AR (reacción acrosomal) (Figura 8C). A las 8 horas de incubación los espermatozoides presentaron cambios en su morfología, ya no fue posible distinguir las membranas plasmática y acrosomales. Alrededor de toda la cabeza se observaron puntos de fusión entre estas membranas, permitiendo llevar a cabo la reacción acrosomal y así poder liberar las enzimas necesarias para penetrar la zona pelúcida (Figura 8F).

Analizamos la muestra en diferentes tiempos de incubación para todos los tratamientos, y se observó que conforme iban disminuyendo los porcentajes de espermatozoides no capacitados y aumentando los porcentajes de espermatozoides capacitados, también aumentaron los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal (Figura 9). A las 0 horas se observó que sólo entre el 0 y 5% de espermatozoides presentaban con reacción acrosomal. Sin embargo estos porcentajes aumentaron proporcionalmente al tiempo de incubación, teniendo un porcentaje mayor de espermatozoides con reacción acrosomal a las 8 horas de incubación (Figura 9). En los cultivos A 32°C Con P₄ se obtuvo el porcentaje más alto de espermatozoides con reacción acrosomal (53%). Hubo diferencias significativas entre las horas de incubación de los diferentes tratamientos ($p < 0.05$). Pero no se observaron diferencias significativas entre la temperatura y el tratamiento con o sin P₄ en los porcentajes obtenidos de espermatozoides con reacción acrosomal ($p > 0.05$).

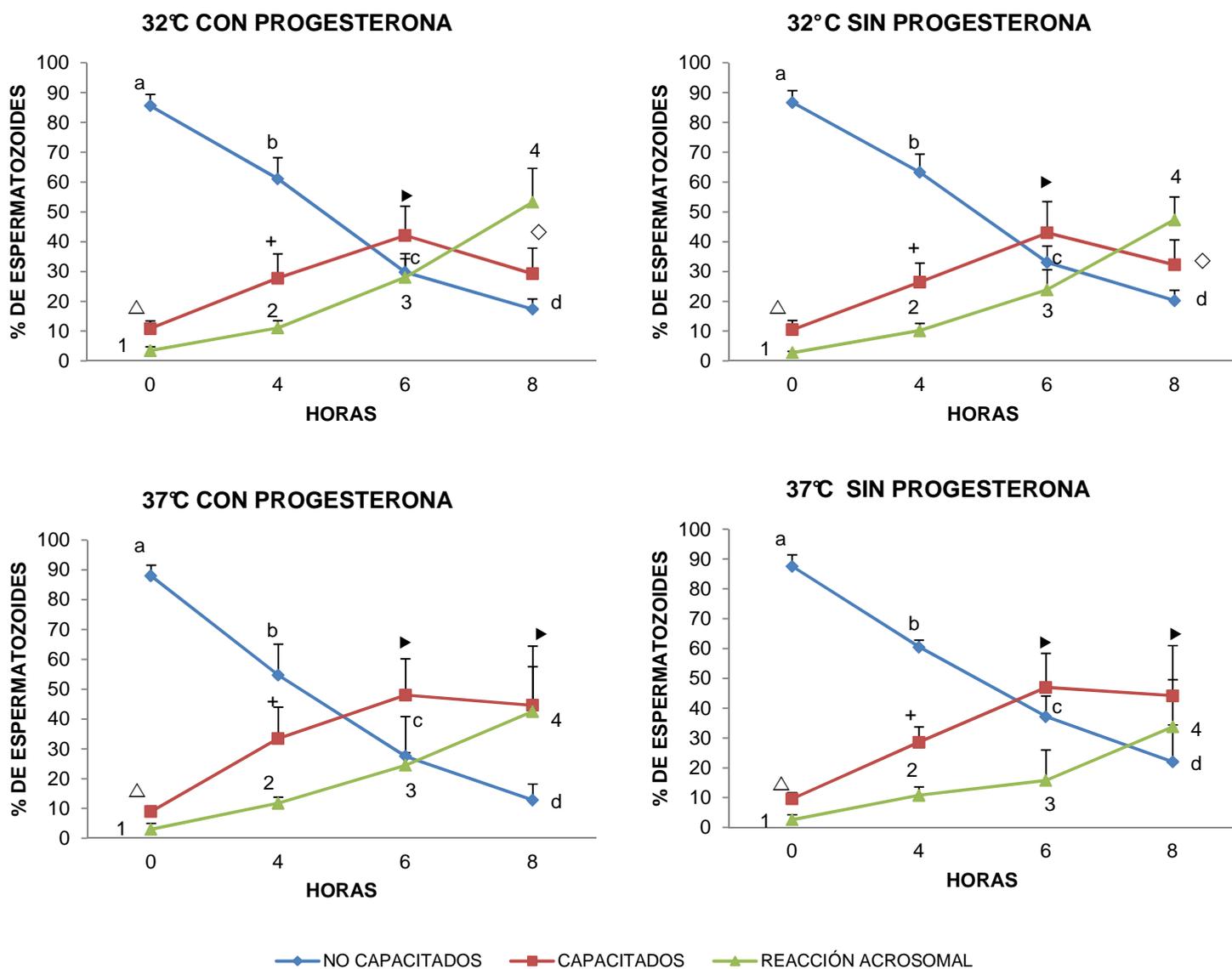


Figura 9: Porcentajes de espermatozoides de *A. jamaicensis* no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal por medio de la prueba de CTC. A 32°C y 37°C con y sin P₄ a diferentes horas de incubación. Diferentes letras, símbolo o número denota diferencias ($p < 0.05$). Se graficaron las Medias \pm Desviación Estándar.

Prueba de lectinas (PSA-FITC) para evaluar la integridad del acrosoma

Para todos los tratamientos y al inicio de la incubación, hubo un porcentaje del 80% espermatozoides con acrosoma integro o intacto (Figura 10). Los espermatozoides con acrosoma intacto presentaron fluorescencia en toda la cabeza hasta el segmento ecuatorial, considerados como espermatozoides no capacitados (Figura 8G). Esta fluorescencia fue de mayor intensidad en la parte apical de la cabeza, donde se encuentra el mayor contenido acrosomal y el acrosoma se observó claramente.

Conforme se incrementaba el tiempo de incubación, este porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó (Figura 10) ya que los espermatozoides comenzaron a presentar poca o ausencia de fluorescencia en la cabeza y el acrosoma no fue claramente visible, solo se observó fluorescencia en el contorno de la cabeza del espermatozoide. Este tipo de espermatozoides fue considerado como espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal, debido que ya perdieron la mayor parte o todo el contenido del acrosoma. (Figura 8H). A las 8 horas de cultivo, se observó con el tratamiento a 32°C Sin y Con P₄ el porcentaje más bajo de espermatozoides con acrosomas intactos (30%). Sin embargo, para el tratamiento a 37°C Sin P₄ este porcentaje fue ligeramente mayor, teniendo un porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos aproximadamente del 50% (Figura 10). Todos los valores obtenidos a diferentes temperaturas con y sin progesterona fueron diferentes entre sí con significancia estadística ($p < 0.05$).

El análisis de la integridad del acrosoma realizado con PSA-FITC (Figura 10) mostró que la proporción de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal fue casi la misma a la de los espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal por la prueba de CTC (Figura 9). Concluyendo que las pruebas de CTC y la de Lectinas son adecuadas para la detección de la capacitación del espermatozoide de murciélago.

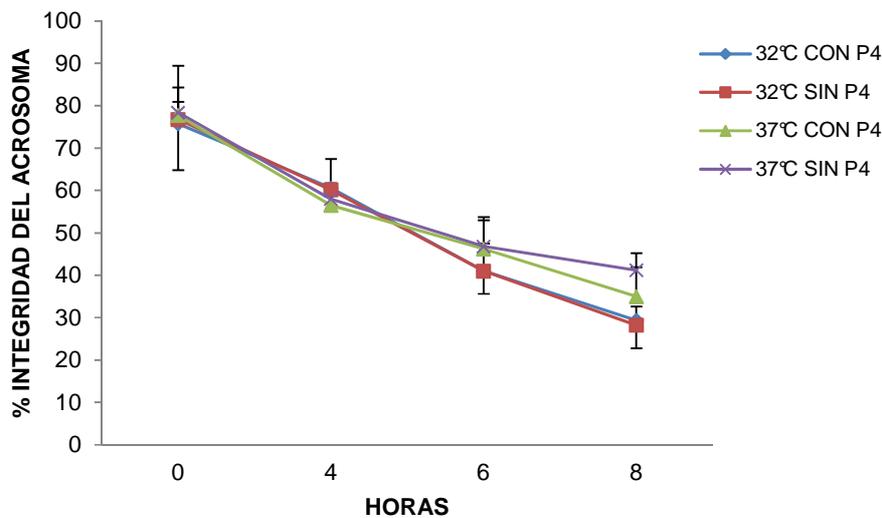


Figura 10: Porcentajes de espermatozoides de *A. jamaicensis* con acrosoma intacto por medio de la prueba de Lectinas (PSA-FITC). A 32°C y 37°C con y sin P₄ a diferentes horas de incubación. Todos los valores medidos a diferentes tiempos y tratamientos son diferentes entre sí ($p < 0.05$). Se graficaron las Medias \pm Desviación Estándar.

Cambios en la morfología del espermatozoide

Se tomaron muestras para observar los cambios en la morfología del espermatozoide de *A. jamaicensis* respecto a las horas de incubación con los diferentes tratamientos (Figura 11A). A 32°C y 37°C con y sin P₄ se observó que conforme pasaron la horas de incubación el flagelo de los espermatozoides comenzó a enrollarse o doblarse por la parte final (Figura 10B) y este enrollamiento procedió hacia la pieza media y cabeza (Figura 11C). Este efecto también se ha observado en otros mamíferos, señalando que son espermatozoides comenzando a hiperactivarse.

En nuestras 4 condiciones de cultivo y a las 8 horas de incubación se obtuvieron porcentajes de entre el 40% y 45% de espermatozoides con flagelos enrollados. Sin embargo, este porcentaje fue ligeramente mayor en los tratamientos donde el medio fue suplementado con P₄. Todos los valores obtenidos a diferentes temperaturas con y sin progesterona muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 12).

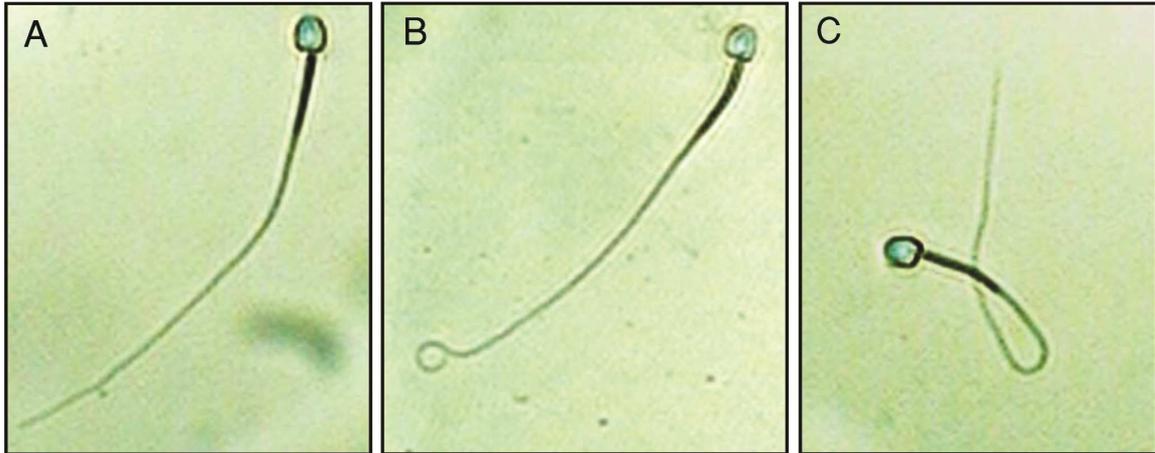


Figura 11: Cambios en la morfología del espermatozoide de *A. jamaicensis*. (A) Espermatozoide normal. (B) Espermatozoide con la pieza final del flagelo enrollado. (C) Espermatozoide con el flagelo enrollado. 1000 X.

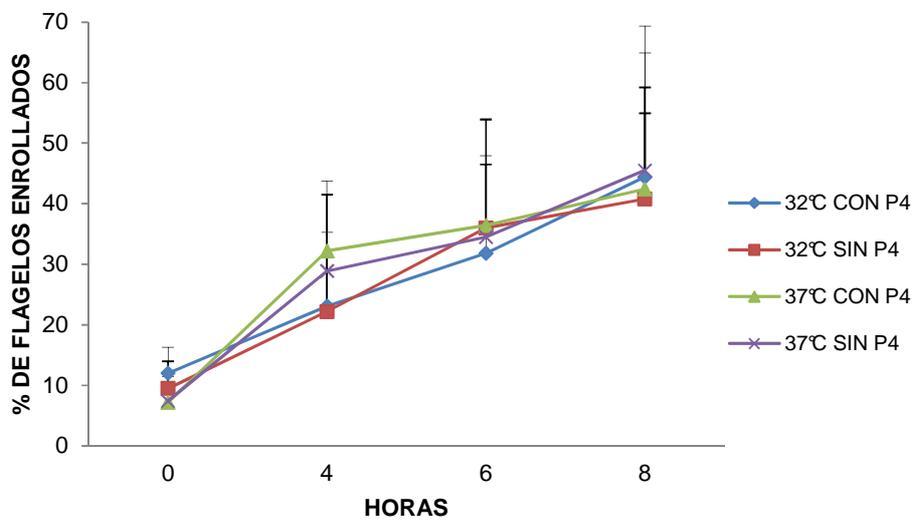


Figura 12: Morfología del espermatozoide de *A. jamaicensis* (porcentaje de flagelos enrollados) a 32°C y 37°C con y sin P₄ a diferentes horas de incubación. Todos los valores medidos a diferentes tiempos y tratamientos tienen diferencias significativas ($p < 0.05$). Se graficaron las Medias \pm Desviación Estándar.

Motilidad del espermatozoide

Al inicio del cultivo y para los cuatro tratamientos los espermatozoides presentaron un movimiento lineal progresivo, sin hiperactivación. Sin embargo a 37°C, con y sin progesterona este movimiento fue disminuyendo conforme pasaron las horas de incubación. A las 4 horas de incubación más del 60% de los espermatozoides se observaron prácticamente inmóviles y aunque no se desplazaban, los espermatozoides comenzaron a vibrar de un lado hacia el otro. A 32°C, con y sin P₄, a las 4 horas de incubación se observó un 40% de espermatozoides con una gran amplitud en el bateo del flagelo, su desplazamiento ya no era en línea recta; este porcentaje fue disminuyendo conforme pasaron las horas de incubación. A las 8 horas, en todos los tratamientos los espermatozoides se desplazaban en línea recta vibrando de un lado hacia el otro.

Porcentajes de viabilidad

Se tomaron muestras para observar si conforme pasaban las horas de incubación a 32°C y 37°C sin y con P₄ los espermatozoides de *A. jamaicensis* se mantenían viables. Encontramos que Los porcentajes de viabilidad fueron disminuyendo conforme pasaron las horas de incubación. A las 0 horas aproximadamente el 85% de los espermatozoides eran viables, Sin embargo este porcentaje fue disminuyendo hasta un 75% a las 8 horas de incubación. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$) (Figura 13).

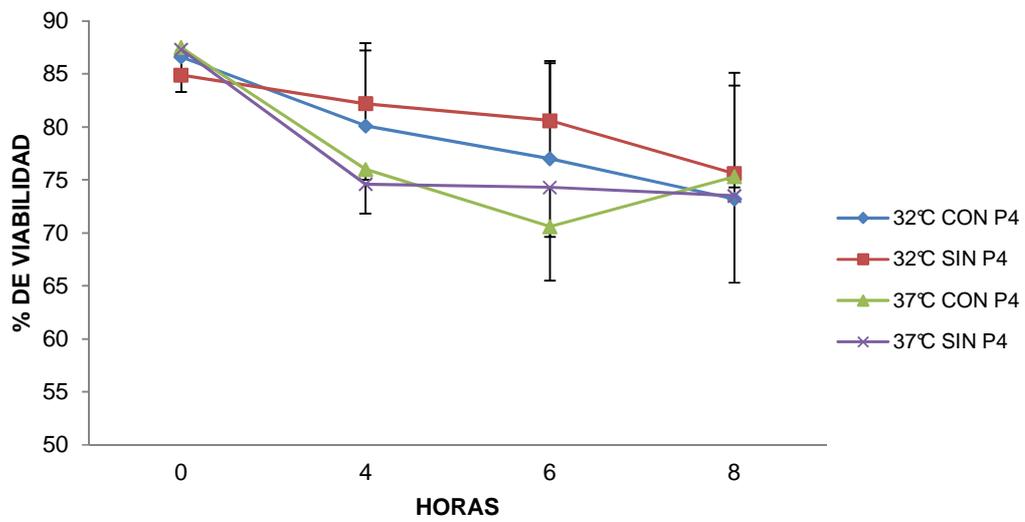


Figura 13: Porcentajes de viabilidad del espermatozoides de *A. jamaicensis* a 32°C y 37° C con y sin P₄ diferentes horas de incubación. Todos los valores obtenidos a diferentes tiempos y tratamientos son iguales ($p > 0.05$). Se graficaron las Medias \pm Desviación Estándar.

8.4. MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DEL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO

A. jamaicensis

Debido a que no existe información al respecto sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de murciélago de *A. jamaicensis*, en el presente proyecto se emplearon dos temperaturas (37°C y 38.5°C) y dos tiempo de incubación (24 y 44 horas) para este propósito. El medio de maduración utilizado se probó con y sin hormonas (Estradiol, FSH y LH) con la finalidad de establecer cual tratamiento resultaba más apropiado para la expansión de las células de la granulosa.

De acuerdo con este protocolo, se observó que los complejos-ovocitos-cúmulo (COC) a las 24 horas de cultivo a una temperatura de 37°C y sin adición de hormonas al medio de maduración, no presentaron expansión de las células de la granulosa o del cúmulo en ovocitos de calidad 1 hasta calidad 3, teniendo un porcentaje de maduración del 0% ($P > 0.05$) (Figura 14B y 14D; Tabla 5). El ovocito presentó un citoplasma homogéneo, de color uniforme, la zona pelúcida estaba intacta y las células de la granulosa presentaron una forma redonda; todas las capas que cubrían al ovocito presentaron un color claro uniforme.

Al realizar los cortes semifinos, se observaron ovocitos con citoplasma uniforme, con vesícula germinal situada hacia un extremo del ovocito. La zona pelúcida estaba intacta, no dañada y las células de la granulosa o del cúmulo presentaron un núcleo grande, redondo y con uno o dos nucléolos. Estas células contenían poco citoplasma. Entre las células de la granulosa no se observaron espacios, se observan muy unidas entre sí, tenían un espacio perivitelino reducido y uniforme (Figura 15).

A las 24 horas a una temperatura de 37°C y con hormonas se observó que algunos COC presentaron una ligera expansión de células de la granulosa (Figura 16). Los ovocitos a las 0 horas de cultivo presentaron un citoplasma uniforme, está rodeado por lo menos de 3 a 5 capas de células de la granulosa que presentaron una coloración pálida (Figura 16A); al pasar las horas de cultivo los COC se observaron con una ligera expansión y las células de la granulosa se encontraron muy unidas, haciendo que el

citoplasma y la zona pelúcida ya no fueran claramente visibles bajo el microscopio. Estas células debido a su expansión se observaron de color oscuro (Figura 16B).

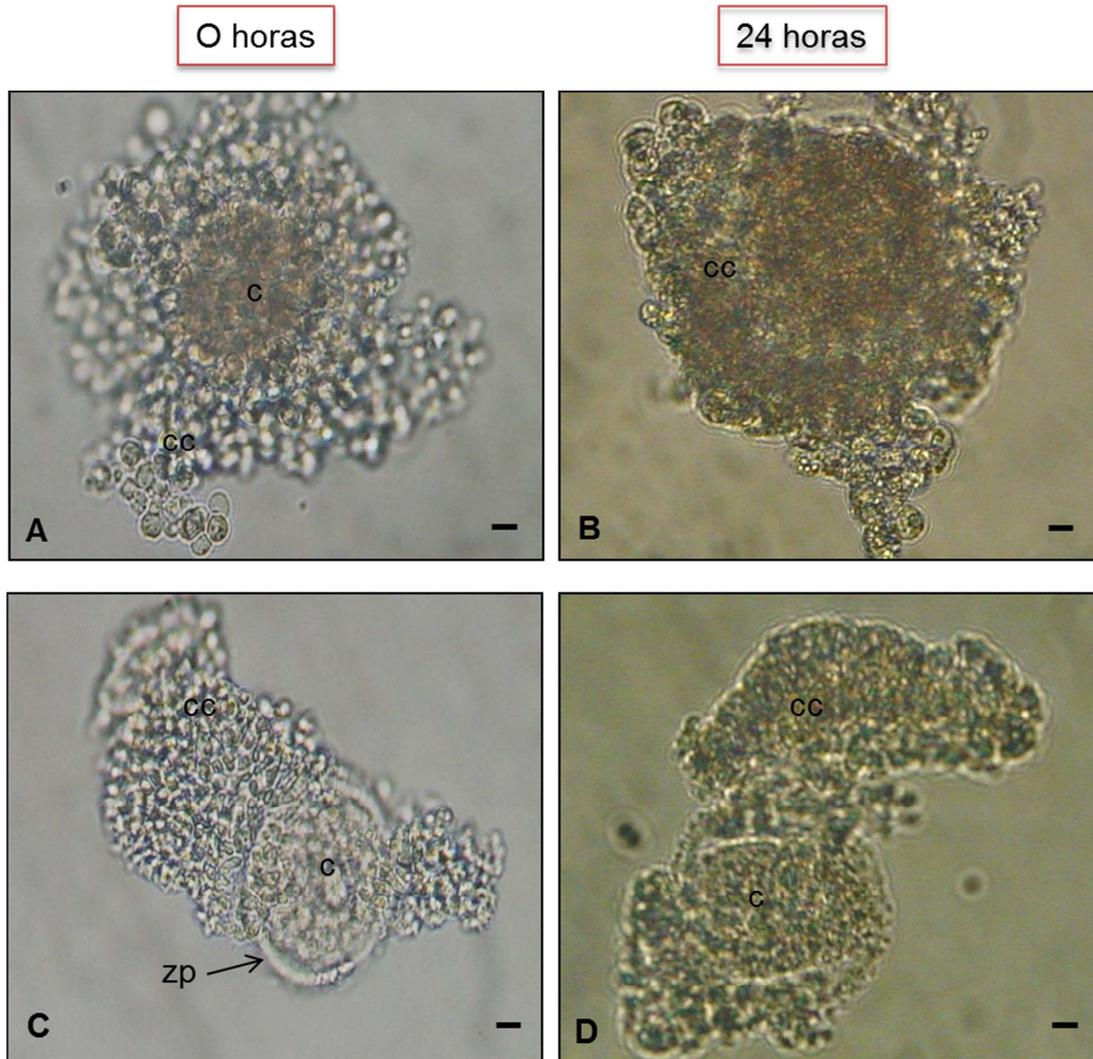


Figura 14: Complejo-ovocito-cúmulo de *A. jamaicensis* madurados *in vitro* durante 24 horas sin hormonas. A y B) ovocito de calidad 1. 20 X. C y D) ovocito de calidad 3. 20 X. Barra 10 μm . c: citoplasma. cc: células del cúmulo o de la granulosa. zp: zona pelúcida

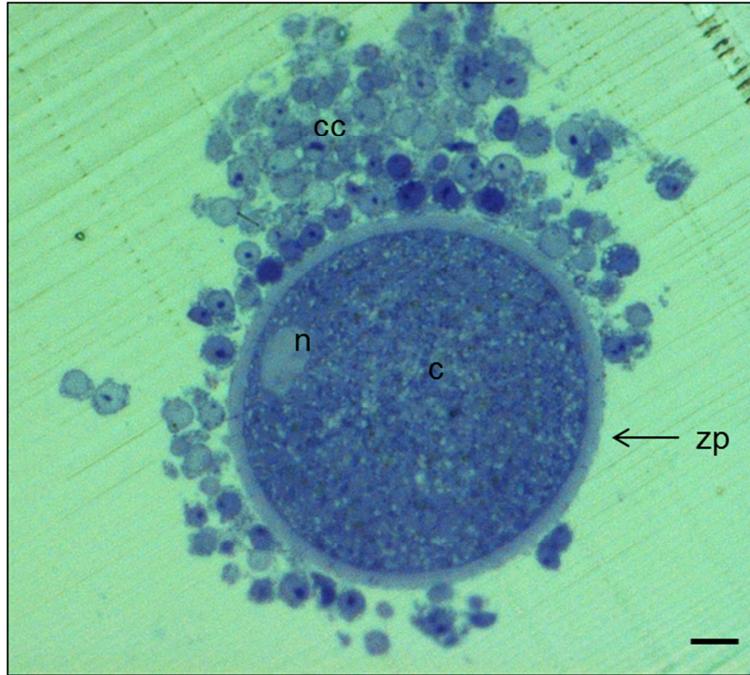


Figura 15: Cortes semifinos de un complejo-ovocito-cúmulo de *A. jamaicensis* teñido con azul de toluidina. Madurado *in vitro* durante 24 horas a 37°C y sin hormonas en el medio de maduración. 100 X. Barra 10 µm. n: núcleo. c: citoplasma. zp: zona pelúcida. cc: células del cúmulo o de la granulosa.

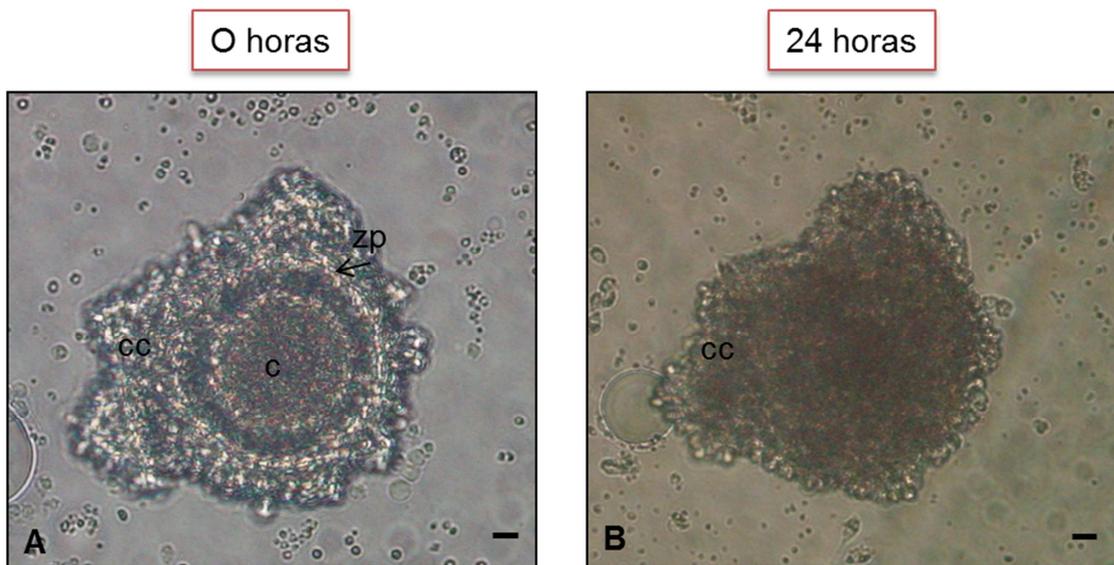


Figura 16: Complejo-ovocito-cúmulo de *A. jamaicensis* madurados *in vitro* durante 24 horas a 37°C con hormonas. A y B) 20 X. Barra 10 µm. c: citoplasma. cc: células del cúmulo o de la granulosa. zp: zona pelúcida.

Sin embargo, otros COC se observaron con una mayor expansión de células de la granulosa (Figura 17A). Se observó claramente el citoplasma con arreglo uniforme y de color oscuro y la zona pelúcida. Uno de esos ovocitos presentó en el citoplasma una pequeña protuberancia, la cual pensamos que puede ser la extrusión de un cuerpo polar (Figura 17B). El porcentaje de maduración fue del 91%, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) en relación con los demás tratamientos (Tabla 5).

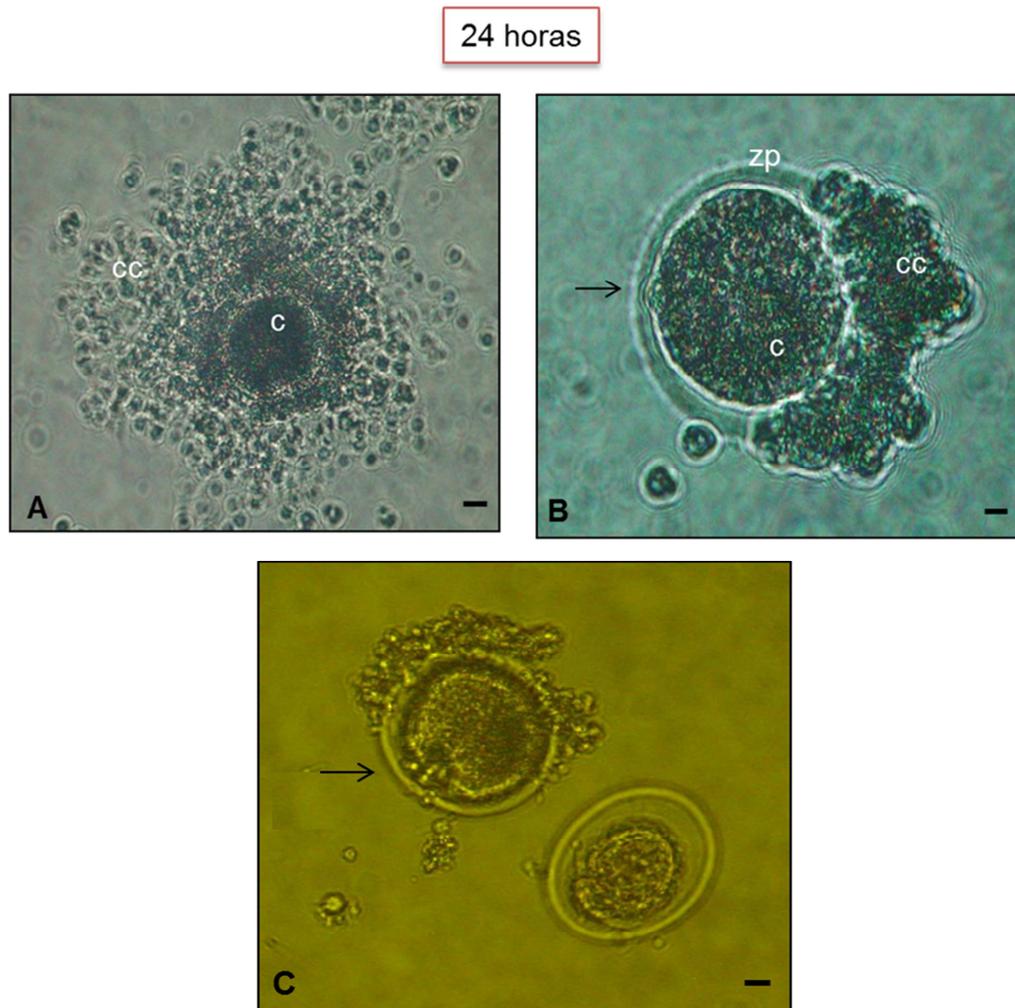


Figura 17: Complejo-ovocito-cúmulo de *A. jamaicensis* madurados *in vitro* durante 24 horas a 37°C con hormonas. A) ovocito con gran expansión de las células del cúmulo. 20 X. B y C) ovocito con posible extrusión del cuerpo polar (flecha) 32 X y 20 X. Barra 10 μm . c: citoplasma. cc: células del cúmulo o de la granulosa. zp: zona pelúcida. Flecha indica la extrusión del cuerpo polar.

Al observar los cortes semifinos, en los COC cultivados *in vitro* 24 horas a 37°C y al suplementar el medio con hormonas, se observó que las células de la granulosa o del cúmulo presentaron un núcleo grande y redondo, claramente se pudo observar el nucléolo (algunas de estas células presentan de dos a tres nucléolos) y mayor cantidad de citoplasma (Figura 18B). Las células de la granulosa estaban separadas unas de otras (Figura 18A). La capa de células de la granulosa que se encontraba más cercana a la zona pelúcida se observaron ciertas proyecciones que la atraviesan hasta llegar al espacio perivitelino. Hubo un gran espacio entre el espacio perivitelino y el ovocito, sin embargo este espacio no fue uniforme en todo el ovocito. El ovocito se observó de color homogéneo (Figura 18A). No se observó un cuerpo polar bien diferenciado (Figura 18B).

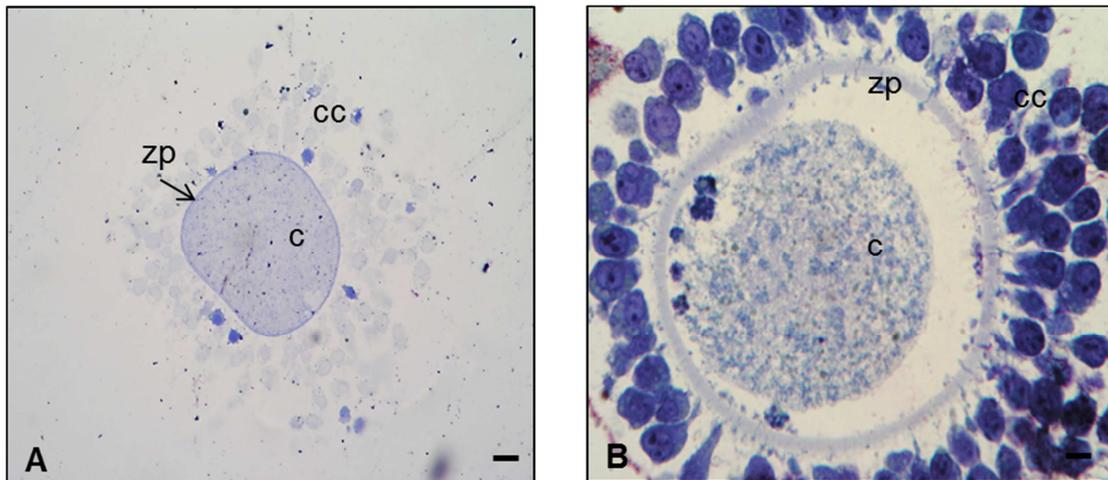


Figura 18: Complejo-ovocito-cúmulo de *A. jamaicensis* madurados *in vitro* durante 24 horas a 37°C, suplementado el medio con hormonas, teñidos con azul de toluidina. A) 40 X. B) 100 X. La flecha indica quizás la extrusión del cuerpo polar. Barra 10 μ m. c: citoplasma. cc: células del cúmulo o de la granulosa. zp: zona pelúcida.

A las 44 horas y a 37°C con hormonas se observó que algunos COC mantenidos en cultivo bajo estas condiciones expandieron las células de la granulosa, con un porcentaje del 30% ($p > 0.05$), sin embargo estas se observaron sin una forma definida, su coloración fue transparente, no se observaron de forma redondeada, pareciera que solo está el contorno de estas células y que en su interior no hay citoplasma (Figura 19).

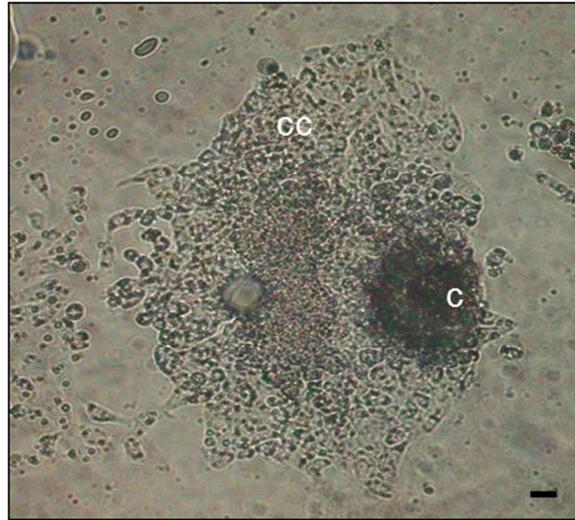


Figura 19: Complejo-ovocito-cúmulo de *A. jamaicensis* madurado *in vitro* 44 horas a 37°C con hormonas. 20 X. Barra 10 µm. c: citoplasma. cc: células del cúmulo o de la granulosa.

A las 24 horas a 38.5°C sin hormonas, tampoco se observó expansión de las células de la granulosa o del cúmulo en los ovocitos cultivados bajo estas condiciones. Tampoco hubo cambios en la morfología del ovocito y en el color del citoplasma. (Figura 20B).

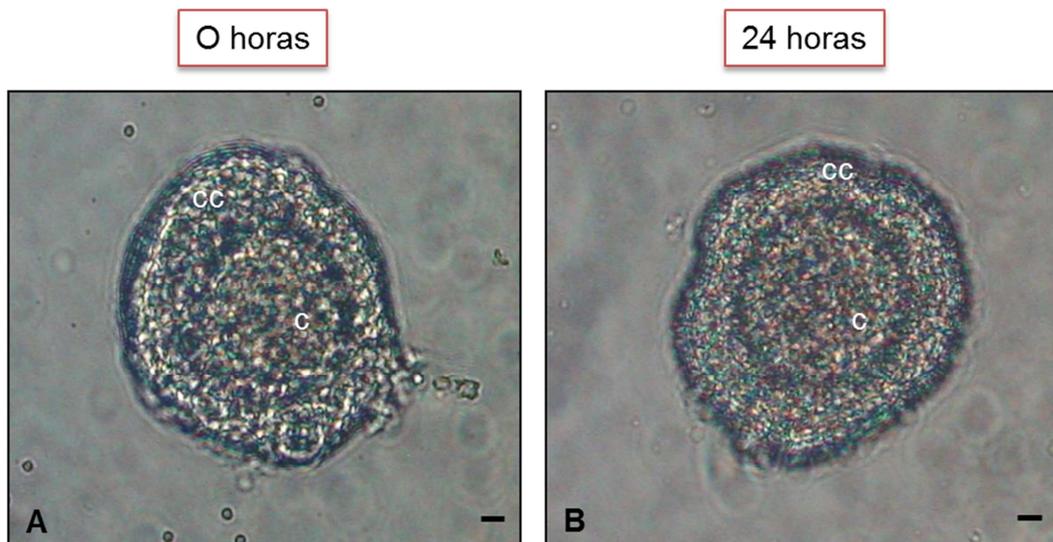


Figura 20: Complejo-ovocito-cúmulo de *A. jamaicensis* madurados *in vitro* 24 horas a 38.5°C sin hormonas. A y B) 20 X. Barra 10 µm. c: citoplasma. cc: células del cúmulo o de la granulosa.

Sin embargo, se observó que en ovocitos de calidad 2 y 3 madurados *in vitro* a 38.5°C con hormonas y mantenidos a 24 y 44 horas hubo una ligera expansión de las células de la granulosa (27.3% y 20% respectivamente: $p > 0.05$). En los ovocitos de calidad 2 se observó que las dos primeras capas de células de la granulosa mantuvieron una morfología y coloración normal pero sin expansión, las siguientes capas de células de la granulosa se observaron sin una morfología normal, aparentando que están células están vacías y solo quedan vestigios de ellas (Figura 21A). Lo mismo sucedió en los ovocitos de calidad 3 (Figura 21B).

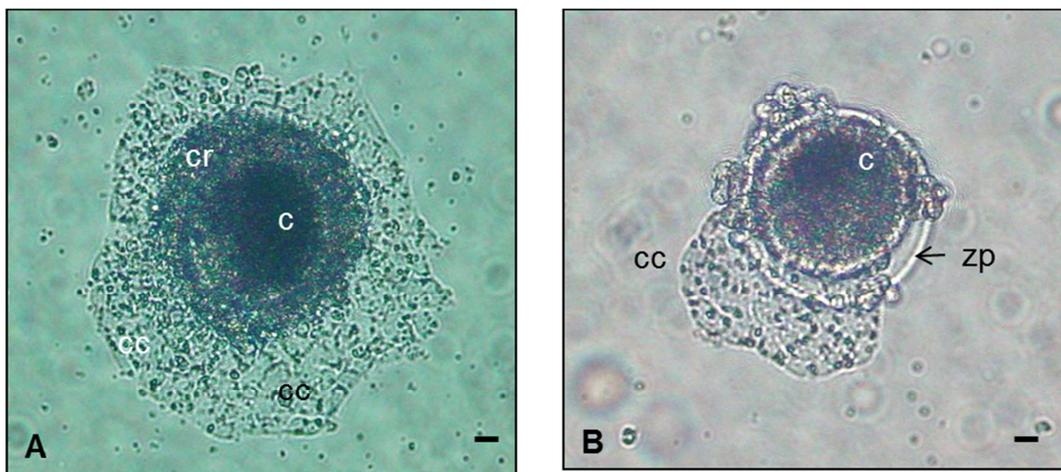


Figura 21: Complejo-ovocito-cúmulo de *A. jamaicensis* madurados *in vitro* 24 Y 44 horas a 38.5°C con hormonas. A) Ovocito calidad 2 (24 Horas). 20 X. B) Ovocito calidad 3 (44 Horas). 20 X. Barra 10 μm . c: citoplasma. cc: células del cúmulo o de la granulosa. cr: corona radiada. zp: zona pelúcida.

Observando los cortes semifinos pudimos corroborar lo que se observó en los ovocitos en fresco. Las células de la granulosa o del cúmulo estaban rotas, sin una forma definida. La zona pelúcida estaba intacta, el núcleo del ovocito presentó una forma redonda y estaba situado en el centro del citoplasma del ovocito (Vesícula germinal: Figura 22B y 22C); el citoplasma presentó un color homogéneo, sin embargo la forma del ovocito no era redondeada (Figura 22B y 22C).

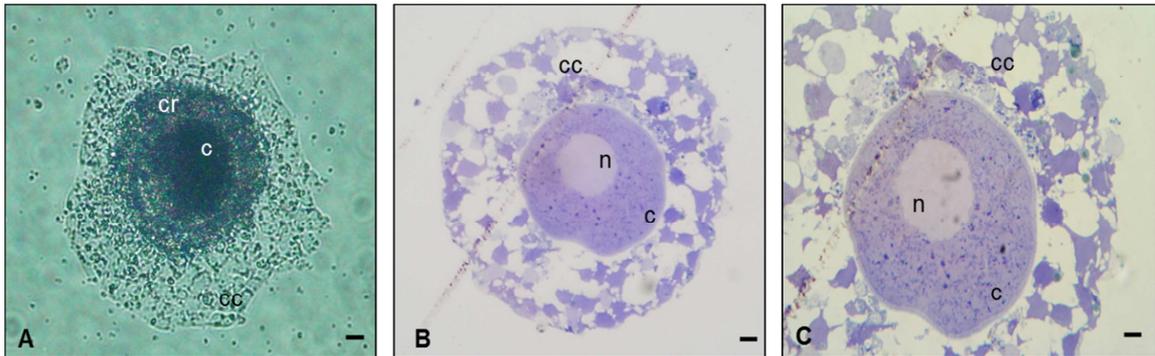


Figura 22: Complejos-ovocito-cúmulo en fresco y cortes semifinos de ovocitos de *A. jamaicensis* teñidos con azul de toluidina. Madurados *in vitro* durante 24 horas a 38.5°C con hormonas. A) Ovocito calidad 2. B) 40 X. B) 100 X. Barra 10 µm. c: citoplasma. cc: células del cúmulo o de la granulosa. cr: corona radiada. n: núcleo.

También se maduraron *in vitro* ovocitos de calidad 4 a 24 y 44 horas a 37°C con hormonas. Estos ovocitos fueron aquellos que estaban desnudos de células de la granulosa o que no presentaron capas de células de la granulosa. No hubo ningún cambio en la morfología de los ovocitos de calidad 4. La zona pelúcida permaneció intacta y el citoplasma presentó una coloración uniforme y homogénea (Figura 23A y 23B). Algunos ovocitos tenían un gran espacio perivitelino pero no presentó el mismo tamaño en todo el ovocito (Figura 23 C).

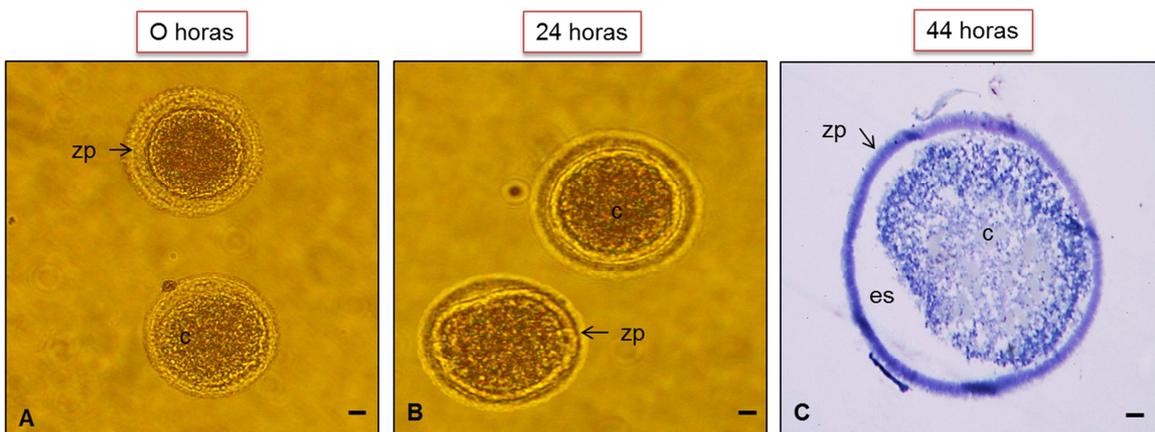


Figura 23: Ovocitos de calidad 4 de *A. jamaicensis* madurados *in vitro* 24 y 44 horas a 37°C con hormonas. A y B) Ovocitos en fresco. A) 20 X y B) 40 X. C) Ovocito teñido con azul de toluidina. 100 X. Barra 10 µm. c: citoplasma. zp: zona pelúcida. es: espacio perivitelino.

Tabla 3: Porcentaje de Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos del murciélago *A. jamaicensis*. A diferentes temperaturas, tiempo de incubación y la adición de hormonas al medio de maduración.

	No. Ovocitos de ambos ovarios	(No. ovocitos/ ovocitos con expansión de las células del cúmulo)	Porcentaje de Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	
24 Horas				
37 °C, Sin hormonas	10	(10 / 0)	0 %	b
37 °C, E ₂ , FSH y LH	12	(11 / 12)	91.6 %	a
38.5 °C, Sin hormonas	12	(12 / 0)	0 %	b
38.5 °C, E ₂ , FSH y LH	11	(11 / 3)	27.30 %	b
44 Horas				
37 °C, Sin hormonas	10	(10 / 0)	0 %	b
37 °C, E ₂ , FSH y LH	10	(10 / 3)	30.0 %	b
38.5°C, Sin hormonas	10	(10 / 0)	0%	b
38.5°C, E, FSH, LH	10	(10 / 2)	20%	b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

8.5. FERTILIZACIÓN *IN VITRO* EN EL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO *A. jamaicensis*

Ya que no existe información al respecto en murciélagos y en particular del murciélago *A. jamaicensis*, decidimos hacer pruebas de fertilización *in vitro* para esta especie. Para lo cual se emplearon dos medios de fertilización para establecer cuál era el más indicado y el que proporcionara los factores necesarios durante la incubación de los espermatozoide y de los complejos-ovocitos-cúmulo (COC).

Para los dos medios de fertilización estudiados se observó que los espermatozoides comenzaron a cambiar de movimiento, el bateo del flagelo fue más pronunciado y la cabeza del espermatozoide se desplazó en línea casi recta, quizás debido a que se estaban hiperactivando.

Después de 22 horas de la fertilización *in vitro* se observó que ambos medios de fertilización había una gran cantidad de espermatozoides vivos, que éstos aún

presentaban un ligero movimiento en el flagelo, aunque no se desplazaban. También se observaron grupos de espermatozoides aglutinados y unidos por la cabeza, mientras que otros se encontraban unidos a las células del cúmulo o de la granulosa (Figura 24B).

En ambos medios de fertilización, a las 0 horas se observó que los COC estaban intactos, esto es, se mantuvieron con las células de la granulosa (Figura 24A). Al transcurrir el tiempo de la fertilización *in vitro* se observó que los espermatozoides comenzaron a dirigirse hacia las células del cúmulo y a las 22 horas se observó la dispersión de las células del cúmulo o de la granulosa. Lo anterior indicó que los espermatozoides tuvieron una actividad normal (Figura 24B).

En las pruebas realizadas con el medio HTF se observó que durante el tiempo de incubación de los COC y de los espermatozoides, las cabezas de los espermatozoides se encontraron unidas a la zona pelúcida de los ovocitos (Figura 25A y 25B). Sin embargo no se observó la presencia de dos cuerpos polares o pronúcleos.

En lo que se refiere al ovocito, después de 22 horas de la inseminación, presentó un citoplasma homogéneo y un color uniforme, la zona pelúcida estaba intacta y con poco espacio perivitelino (Figura 25A). Algunos ovocitos se observaron con un gran espacio perivitelino que no presentaba la misma longitud entre el ovocito y la zona pelúcida (Figura 24B).

Cabe señalar que durante el procedimiento para cambiarlos de medio de maduración a medio de fertilización, con el pipeteo a algunos ovocitos se les desprendieron fácilmente las células del cúmulo o de la granulosa.

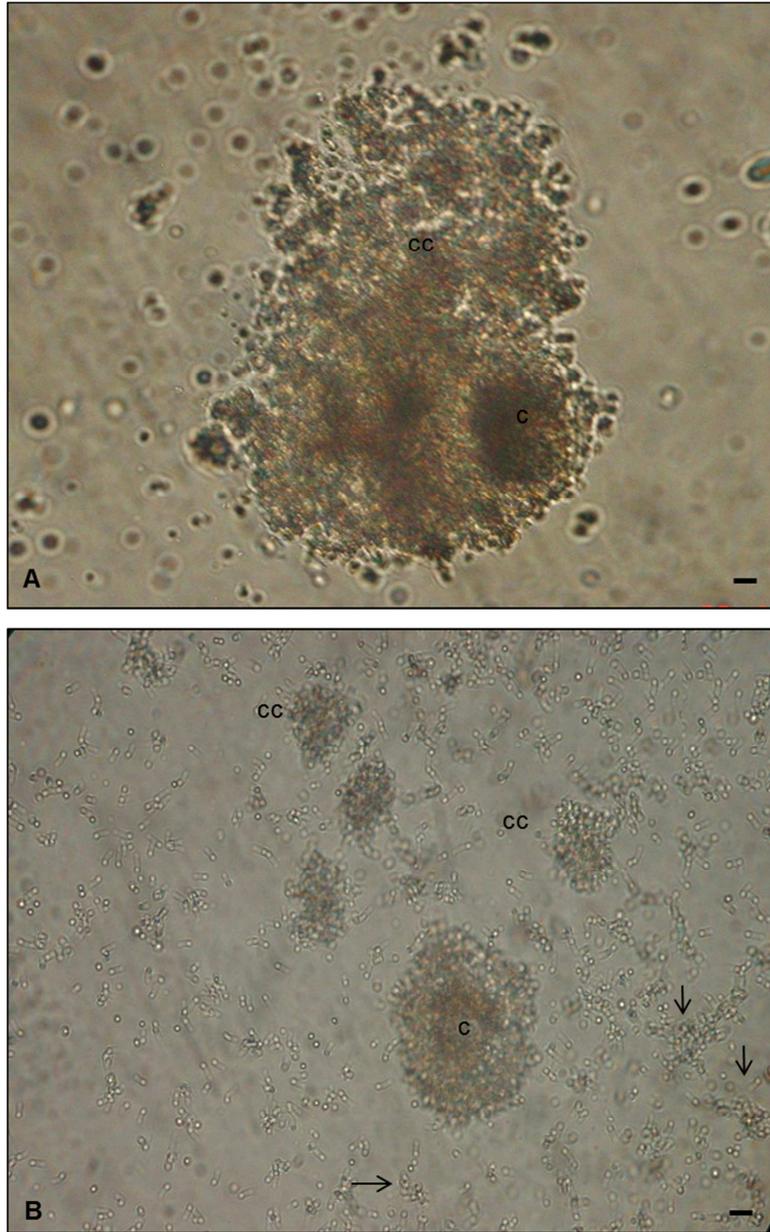


Figura 24: Fertilización *in vitro* de complejos-ovocitos-cúmulo y espermatozoides de *A. jamaicensis* con medio TALP durante 22 horas a 37°C. A) 0 horas. B) 22 horas. A y B) 20 X. c: citoplasma. cc: células del cúmulo o de la granulosa. La flecha los espermatozoides. Barra 10 µm

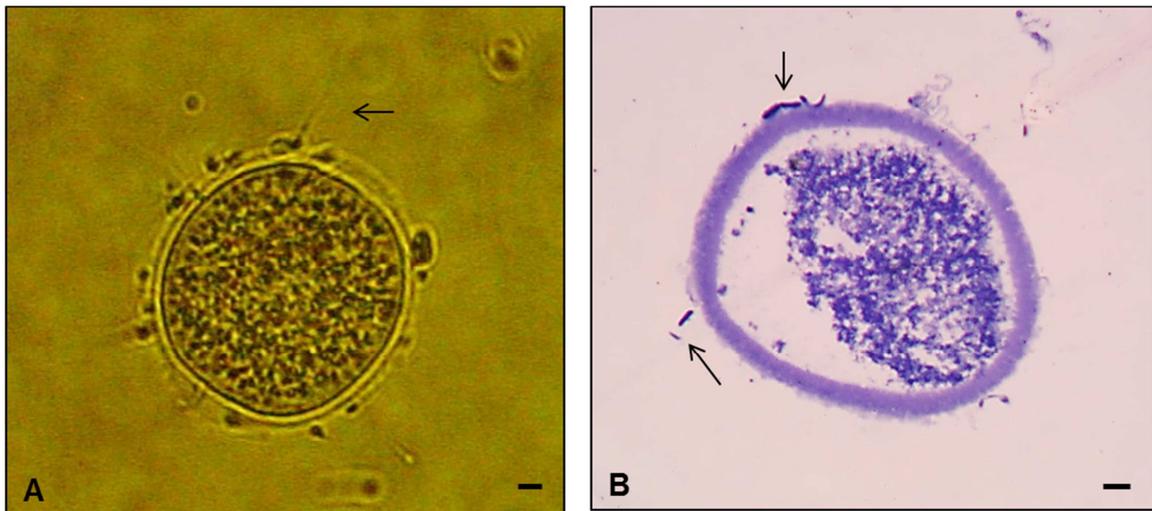


Figura 25: Fertilización *in vitro* de ovocitos y espermatozoides de *A. jamaicensis* con medio HTF durante 22 horas a 37°C. A) Ovocito y espermatozoides en fresco 20 X. B) Ovocito y espermatozoides en corte semifino 100 X. La flecha indica los espermatozoides. Barra 10 µm.

Al utilizar medio TALP como medio de fertilización después de 22 horas de incubación de los espermatozoides y ovocitos se observó una gran cantidad de espermatozoides rodeando al ovocito (Figura 26A). Algunos de ellos se encontraron unidos a la zona pelúcida (Figura 26A, 26B y 26C). Algunos espermatozoides formaron grupos alrededor del ovocito muy cerca de la zona pelúcida (Figura 26B y 26D). Los ovocitos presentaron un citoplasma homogéneo de color uniforme, la zona pelúcida estaba intacta. El espacio perivitelino fue de gran tamaño y su arreglo no fue uniforme.

Al igual que los resultados obtenidos al utilizar medio HTF, con el medio TALP no se observaron la presencia de dos cuerpos polares ni de pronúcleos.

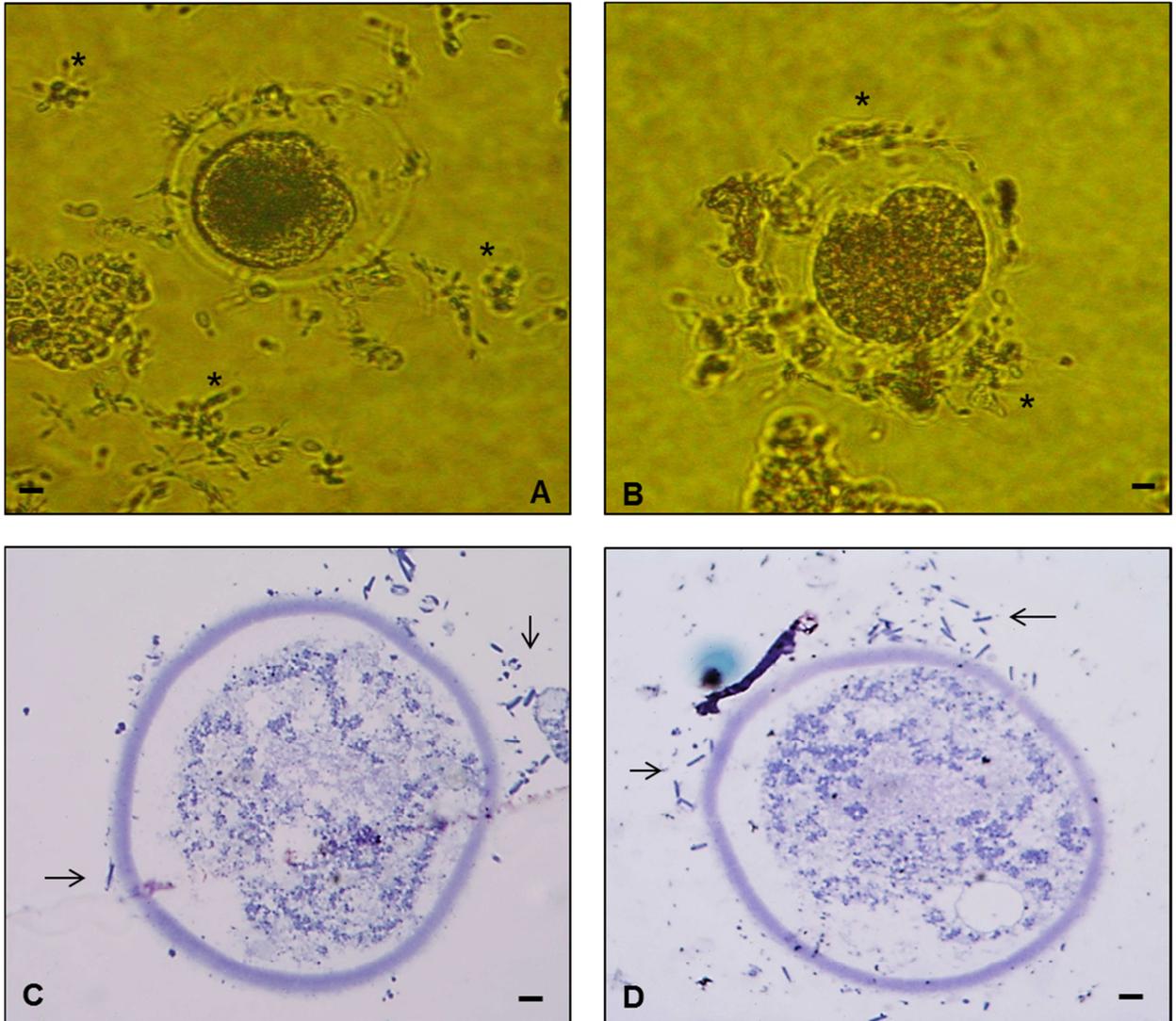


Figura 26: Fertilización *in vitro* de complejos-ovocitos-cúmulo y espermatozoides de *A. jamaicensis* con medio TALP durante 22 horas a 37°C. A y B) Ovocito y espermatozoides en fresco 20 X. B y C) Ovocito y espermatozoides en corte semifino 100 X. La flecha indica los espermatozoides. * indica la presencia de grupos de espermatozoides. Barra 10 µm.

8.6. DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO *IN VITRO* EN EL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO *A. jamaicensis*

Después de 22 horas de llevar a cabo la fertilización *in vitro* en los diferentes medios de fertilización, los posibles cigotos fueron transferidos a medio de desarrollo *in vitro*. Estos se mantuvieron durante 48 horas y posteriormente se revisaron las cajas de cultivo; sin embargo no fue posible obtener embriones *in vitro* del murciélago filostómido *A. jamaicensis*, ya que se observó que ningún COC presentó señales de división de los blastómeros (Figura 27).

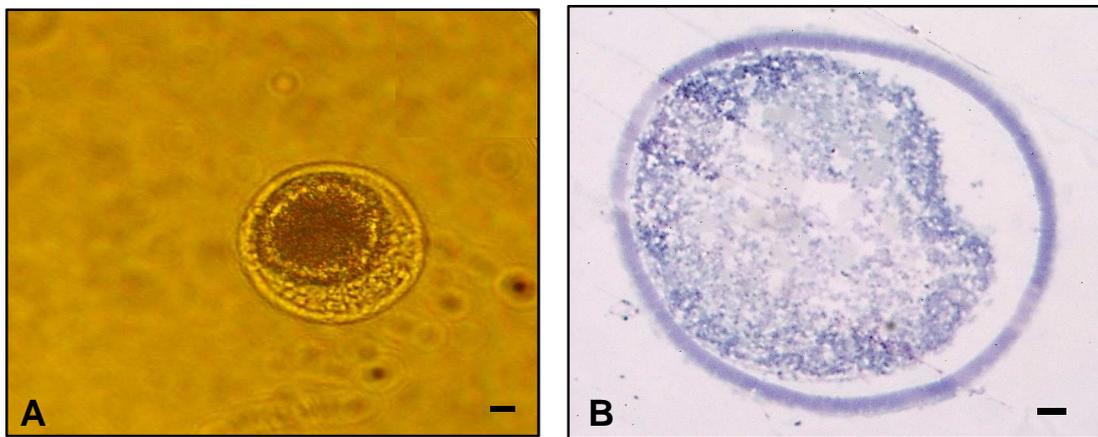


Figura 27: Desarrollo embrionario *in vitro* de *A. jamaicensis* durante un periodo de 48 horas en medio de desarrollo. A) 20 X y B) corte semifino 100 X. No se observó división de los blastómeros.

IX. DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE GAMETOS

En fauna silvestre es complicado obtener espermatozoides eyaculados de manera natural. Los murciélagos *A. jamaicensis* y *S. liliium* por ser organismos pequeños y que aún no se conocen métodos o técnicas para poder lograr que los organismos puedan eyacular de manera natural (como para los animales domésticos) la colección de semen se obtuvo directamente de la cola del epidídimo, ya que una de las funciones principales de este órgano es la de almacenar y madurar de espermatozoides para ser eyaculados (Rodríguez *et al.* 2010).

Silva *et al.* (2004) mencionan que en las tecnologías de reproducción asistida se realiza la colección de semen del epidídimo y que puede ser un método alternativo y viable para obtener muestras de semen de animales incapaces de eyacular o de animales que recientemente han muerto. En nuestro caso fue una técnica en la que pudimos obtener espermatozoides y hacer los análisis correspondientes.

Claramente existen diferencias considerables en la morfología espermática entre *A. jamaicensis* y *S. liliium*, principalmente en la morfología del acrosoma y de la cabeza. Forman y Genoways (1979) mencionan que los murciélagos de la familia Phyllostomidae el acrosoma es la estructura del espermatozoide que presenta mayor variabilidad dentro de esta familia. Además, en el orden Chiroptera se ha encontrado la mayor diversidad en el tamaño de los espermatozoides (Cummins y Woodall, 1985).

A. jamaicensis presenta un acrosoma relativamente pequeño y su segmento apical se extiende poco más de la punta del núcleo, semejante a lo reportado en espermatozoides del mono, el hombre, el cerdo y conejo. (Fawcett, 1970). Por otro lado, *S. liliium* presenta un acrosoma mucho más largo, claramente visible por microscopía de luz. Sin embargo, la forma de la cabeza del espermatozoide de *S. liliium* puede ser comparable con el de humanos y cerdos (Fawcett, 1970).

En un estudio morfológico realizado por Forman y Genoways (1979) observaron que los espermatozoides de *A. jamaicensis* están formados por una cola corta y la cabeza es casi circular. Ellos no consideraron la longitud de la cola como un aspecto morfológico importante para la caracterización de los espermatozoides en las diferentes especies de murciélagos. Nuestros resultados difieren con lo reportado por Forman y Genoways (1979) en cuanto a las dimensiones de cabeza y pieza media quizás debido a que ellos realizaron las mediciones por medio de un micrómetro Unitron Filar de línea de campo amplio unido a un microscopio óptico. Para nuestro estudio utilizamos un analizador de imágenes. Sin embargo en cuanto a morfología de la cabeza y pieza media de los espermatozoides concuerda con lo reportado por dichos investigadores.

Los espermatozoide de *A. jamaicensis* y *S. liliium* fueron de gran longitud y presentaron concentraciones espermáticas menores a los 10 millones de espermatozoides. Esto quizás se deba a que los machos tienen que cruzar grandes distancias para el encuentro con la hembra; o que la morfología del tracto reproductor de la hembra es diferente y podría ser que los espermatozoides sean largos para tener un mayor bateo del flagelo y atravesar las diferentes estructuras. Otra razón puede ser que la baja concentración se deba a que estos organismos prefieran gastar energía en la búsqueda de alimento, y en el apareamiento que en la producción de espermátózoides.

A. jamaicensis y *S. liliium* presentaron altos porcentajes de espermatozoides morfológicamente normales (62% al 70% respectivamente), esto significa que el espermatozoide al presentar una apariencia normal puede realizar sus funciones para realizar la fertilización del ovocito. Menkveld (2010) menciona que solo espermatozoides con una apariencia morfológicamente normal son aquellos que se encuentran unidos a la zona pelúcida.

El semen contiene cierta proporción de espermatozoides morfológicamente anormales; los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo en las especies de estudio presentaron porcentajes del 13% de anormalidades constituidas principalmente por defectos en la cabeza, parte media y flagelo, semejante a humanos (Lim *et al.* 1998; Steele *et al.* 2000), toros (Freneau *et al.* 2010); roedores (Ding *et al.* 2010), cabras (Suwanpugdee *et al.* 2009) musaraña (Parapanov *et al.* 2009) y oso negro (Brito *et al.* 2010). Se encontró la presencia de gotas citoplasmáticas en la pieza media del espermatozoide que van desde un 5 al 19%. Menkveld *et al.* (1991) indicaron que el

porcentaje de espermatozoides de humano con gotas citoplasmáticas debe ser mayor al 30% para considerarse como un factor de riesgo en la fertilidad del varón. En el murciélago *Corynorhinus mexicanus*, también se ha observado la presencia de gotas citoplasmáticas (Cervantes et al. 2008). Sin embargo, no mencionan que porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas se observa en esta especie de murciélago. La presencia de gotas citoplasmáticas se considera como la cuarta mayor anomalía del espermatozoide además de las anomalías de la cabeza, cuello, pieza media y flagelo (Menkeveld, 2010). La presencia de residuos o gotas citoplasmáticas está asociada con la inmadurez del espermatozoide, por lo tanto el epidídimo no está llevando a cabo su función de maduración del espermatozoide, generando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y como consecuencia daño al ADN.

La presencia de anomalías espermáticas en el volumen recuperado del epidídimo puede ser un reflejo de lesiones o cambios degenerativos en los testículos y/o en los epidídimos. Sin embargo, los porcentajes de anomalías son diferentes para cada especie y dependen de la salud del macho, la alimentación, edad entre otros. Holy (1983) menciona que en espermatozoides de bovino cuando se sobrepasa el límite del 50% de anomalías, esto influye en forma negativa sobre la fertilidad, ya que el espermatozoide no puede realizar sus funciones biológicas fundamentales solo cuando esta cualitativamente y morfológicamente bien constituido

S. liliium presentó porcentajes mayores al 50% de motilidad en comparación con la motilidad de los espermatozoides de *A. jamaicensis*, donde el porcentaje de motilidad progresiva fue menor al 50%. Al hacer la suma de espermatozoides con motilidad progresiva y no progresiva el porcentaje es mayor al 50%, considerando a ambas especies con una motilidad aceptable. Eliasson (2010) menciona que si existe un porcentaje inferior al 40% de espermatozoides móviles (Progresivos), se considera como un factor importante en el pronóstico de la fertilidad en humanos. Para evaluar la motilidad utilizamos como medio para observar cómo se desplazaba el espermatozoide solución salina fisiológica a 37°C que es la que comúnmente se utiliza en bovinos, ovinos, cerdos, caballos y en animales de fauna silvestre. Sin embargo el porcentaje de motilidad que presento en *A. jamaicensis* (menor al 50%) nos permite plantearnos algunas preguntas: ¿Cuáles son los componentes de los fluidos en el tracto reproductor de la hembra que podrían permitir al espermatozoide adquirir esa habilidad para desplazarse

progresivamente y que sea en un número mayor?, ¿El epidídimo estará funcionando de manera normal o los espermatozoides de esta especie requieren de otros compuestos o sustancias en el epidídimo para que sean motiles?. ¿El espermatozoide de *A. jamaicensis*, tiene componentes en la membrana plasmática o en el flagelo que no permiten que se desplace al utilizar solución salina?. Habría que hacer más estudios sobre temas relacionados con la motilidad y no solo basarnos en el factor masculino, sino también tomar en cuenta el factor femenino.

Una característica interesante que presentan estas dos especies de murciélagos filostómidos es la presencia de un flagelo insertado de manera lateral a la cabeza, conocido como flagelo abaxial, con porcentajes que van del 9.9 al 12.8 %. Forman y Genoways (1979) al describir morfológicamente a los espermatozoides de estas especies mencionan que otra característica en general es que el cuello del espermatozoide se une a la cabeza un poco fuera del centro. Sin embargo en nuestros resultados se observaron espermatozoides con este tiempo de inserción y con inserciones del cuello y del flagelo en el centro de la cabeza. En murciélagos de la especie *Anoura Geoffroyi* que también pertenece a la familia Phyllostomidae, la unión del cuello del espermatozoide a la cabeza está ligeramente fuera del centro (Forman y Genoways, 1979; Ortega y Alarcón, 2008).

En especies de fauna silvestre como el oso negro (Brito *et al.* 2010) y roedores de la subfamilia *Nesomyinae* (Ding *et al.* 2010), también se presenta esta particularidad. Sin embargo, en especies de roedores caviomorfos, especialmente los de la especie *Tympanoctomys barrerae*, todos los espermatozoides presentan flagelo abaxial. Se ha descrito que esta condición puede deberse a procesos evolutivos adaptativos de los espermatozoides durante su paso por el tracto reproductor de la hembra (Gallardo *et al.* 2002).

Esta desalineación entre la cabeza, la pieza media y el flagelo permite que no haya una total conexión entre la cabeza y el flagelo, por ello, se observó presencia de cabezas y flagelos aislados (Menkveld, 2010). Sin embargo en las especies de murciélagos estudiadas, se observaron porcentajes menores al 10% de cabezas y flagelos aislados, considerando que este tipo de flagelos tiene una fuerte unión hacia la fosa de implantación y al cuello del espermatozoide en *A. jamaicensis* y *S. liliium* esta característica puede deberse a que durante la espermiogénesis, los centriolos no migraron hacia el lugar correcto por una falla en la polimerización de los microtúbulos que

conforman el citoesqueleto en el espermatozoide Este defecto en humanos tienen un pronóstico desalentador, ya que dan lugar a que los pronúcleos no se fusionen y los cigotos no se dividan, y por lo tanto degenerarán (Menkveld, 2010). En algunas especies de animales domésticos (toros y cerdos) este tipo de espermatozoides es considerado como una anomalía (De Alba, 1985; Elmore y Romo, 1988) en contraste con el flagelo abaxial reportado como una característica normal en caballos (Bielanski, 1981) y en borregos (Roberts, 1981).

Barth (1989) realizó estudios en toros para determinar la importancia del flagelo abaxial sobre la fertilidad. Los toros produjeron porcentajes del 0 al 80% de espermatozoides con dicho defecto, posteriormente utilizó vacas, las cuales fueron inseminadas artificialmente. El concluye que los espermatozoides con flagelo abaxial fertilizan óvulos y no están asociados con un aumento en la muerte embrionaria.

Aughey y Renton (1968) atribuyen la esterilidad de toros por presentar un porcentaje del 17.8% de espermatozoides con este tipo de flagelo. Sin embargo, en fauna silvestre no existen trabajos relacionados con este tipo de defecto espermático; por lo que es necesario realizar más estudios sobre motilidad, funcionalidad y la capacidad de fertilizar al ovocito para poderlo catalogar como un espermatozoide normal o anormal.

En análisis espermático realizado en murciélagos *A. jamaicensis* y *S. liliium* en el presente trabajo nos permite hacer un pronóstico de la fertilidad y nos puede indicar el curso del tratamiento o de la técnica de reproducción asistida que podemos emplear para lograr la fertilización y como resultado que la hembra pueda quedar gestante y que el embrión llegue a término.

Con respecto a los gametos femeninos, no existen trabajos relacionados con la morfología y clasificación de los complejos ovocitos cúmulos (COC) de los murciélagos *A. jamaicensis* y *S. liliium*. En este estudio, los ovocitos fueron evaluados de acuerdo a la clasificación de De Loos *et al.* (1989) en base a su morfología, aspecto del citoplasma y células del cúmulo.

En nuestro trabajo nos basamos en la clasificación de De Loos *et al.* (1989) como una herramienta que nos pudiera ayudar en el estudio de los ovocitos de murciélagos. Aunque esta clasificación se basa en bovinos, fue de mucha utilidad para el evaluar la

morfología de los ovocitos de estas especies de murciélagos. Sin embargo, a esta clasificación habría que añadir otros aspectos: Como la morfología, color y grosor de las células de la granulosa y de la zona pelúcida.

La técnica empleada para evaluar a los ovocitos es una técnica no invasiva que puede realizarse sin causar ningún daño a los ovocitos para que posteriormente sean utilizados en procedimientos de ART y mejorar los porcentajes de maduración y fertilización *in vitro* y dar como resultado un embrión de buena calidad y al ser transferido a una hembra este pueda ser capaz de llegar a término. Sin embargo, Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2007) mencionan que la evaluación visual de los ovocitos no es suficiente para que puedan ser competentes y desarrollarse hasta el estadio de blastocito. También existen otros factores que pueden afectar la calidad de los ovocitos como por ejemplo, la edad de la hembra, la alimentación y el nivel hormonal. De Loos *et al.* (1989) menciona que los ovocitos de bovino de categorías 1-3 presentaron buenos porcentajes de maduración *in vitro* y que los ovocitos con morfología de categoría 4 presentaron una disminución en su capacidad de madurar *in Vitro*.

Blondin y Sirard (1995) mencionan que los ovocitos con un cúmulo compacto y completo (categorías 1 y 2) parecen ser originados de folículos saludables o de folículos que comienzan a presentar signos de atresia, pero al cultivar estos ovocitos *in vitro* permiten el desarrollo del embrión hasta blastocisto. Los ovocitos de categoría 3 pudieron desarrollar embriones hasta de 16 células. Sin embargo los ovocitos de categoría 4 que presentaron un cúmulo incompleto no desarrollaron ningún embrión después de 5 días de cultivo. Ellos mencionan que los ovocitos de categoría 3 están sujetos a un largo periodo dentro del folículo y que por lo tanto están más diferenciados en un nivel citoplasmático que los ovocitos de categoría 4.

Madison *et al.* (1992) concluyen que los ovocitos de bovino con un cúmulo compacto y con varias células del cúmulo rodeando al ovocito desarrollaron más embriones que ovocitos con un cúmulo incompleto. Sin embargo Asada *et al.* (2000) reporto que la presencia de las células del cúmulo en ballenas de la especie *Balaenoptera acutorostrata* no tiene efecto sobre la tasa de maduración de los ovocitos.

Los resultados de estos autores muestran que la presencia de varias capas de células del cúmulo en COC antes de ser madurados *in vitro* permite completar la meiosis y la maduración del citoplasma. Mejorar las tasas de fertilización promoviendo la inducción de la capacitación y facilitan la interacción entre el espermatozoide capacitado y la zona pelúcida (Goud *et al.* 1998). Por lo tanto, la clasificación morfológica de los ovocitos inmaduros en especies ovinas, bovinas y porcinas puede ser un criterio de selección adecuada en cuanto a su capacidad de desarrollo del embrión.

Uno de los factores más importantes que afectan la competencia y el desarrollo embrionario temprano es la calidad del citoplasma. Se ha sugerido que la red de uniones ovocito-cúmulo es la responsable de la maduración citoplásmica (Tanghe *et al.* 2002; Dadashpour *et al.* 2012). Las células del cúmulo y el citoplasma del ovocito se encuentran muy relacionados ya que puede transferir cantidades pequeñas de moléculas reguladoras transcripcionales o de señales, que se transmiten desde las células del cúmulo a los ovocitos y por lo tanto la producción de más proteínas que son responsables de la maduración citoplasmática (Wood y Wildt, 1997; Warriach y Chohan, 2004).

Aunque esta clasificación se basa principalmente en la evaluación de ovocitos de bovinos; podría emplearse como una técnica rutinaria para la evaluación de ovocitos de murciélago y de otras especies de animales silvestres que puedan ayudar a predecir la salud de la hembra y el éxito en la fertilización tanto *in vivo* como *in vitro*.

En *A. jamaicensis* y *S. liliium* al puncionar los folículos tanto el ovario derecho como el izquierdo y recuperar los ovocitos, se obtuvieron un mayor número de ovocitos en el ovario derecho que del ovario izquierdo desde calidad 1 hasta calidad 4 propuestas por De Loos *et al.* (1989). Falconer *et al.* (1961) reportó las diferencias en el número de ovocitos almacenados en los dos ovarios de ratón durante un estro natural y después de superovular. Mostrando que el lado derecho tiende a ser reproductivamente superior que el izquierdo.

Podríamos pensar que ambos ovarios en estos murciélagos son funcionales, no importa el número de ovocitos ni la calidad. Ya que al comparar los ovocitos de excelente y buena calidad de ambos ovarios, estos se observan muy semejantes lo que podría indicar que ambos ovarios están produciendo ovocitos que en algún momento en la vida reproductiva de la hembra llegaran a ovular. Sin embargo la diferencia radica en que el

ovario derecho es de mayor tamaño que el izquierdo. Semejante a lo reportado en murciélagos (Antonio-Rubio *et al.* 2012; Rasweiler, 1988), bovinos (Lopez-Gatius, 1997), ratón (Kelly, 1971) y hámster (O y Chow, 1987).

Al realizar la disección de los ovarios se observó que el ovario derecho presentó más vascularidad (está más irrigado) que el ovario izquierdo. Esto es semejante a lo reportado por Rasweiler (1988). El menciona que en murciélagos de la especie *Molossus ater* (murciélagos negros), el ovario derecho fue significativamente más largo que el izquierdo y el ovario izquierdo usualmente tiene mucho menos vascularidad intraovárica, sugiriendo que podría existir un control central que limita la habilidad de los folículos para crecer en el ovario izquierdo.

Esta mayor vascularidad en el ovario derecho puede influenciar que haya una mayor concentración de gonadotropinas y de hormonas esteroideas (estrógenos y/o progesterona) que podrían ser un agente estimulador para la proliferación del folículo permitiendo que haya una mayor superficie para la formación de receptores para estas hormonas y esto podría influir en la maduración tanto citoplasmática como nuclear del ovocito permitiendo que sean de buena calidad o hasta de mala calidad. Krutzch y Crichton (1985) especulan que la función asimétrica puede ser atribuible a las diferencias en el contenido de receptores de gonadotropinas entre los dos ovarios.

Antonio-Rubio *et al.* (2012) mencionan que en *A. jamaicensis* y *S. lillium*, se observó que el cuerpo lúteo fue encontrado tanto en el ovario derecho como en el ovario izquierdo, sugiriendo que ambos ovarios son funcionales y llevan a cabo la ovulación.

Wimsatt (1979) menciona que en murciélagos existe una fuerte asimetría ovárica, ya sea que el ovario derecho sea el dominante o el ovario izquierdo. En la familia Phyllostomidae existe el "patrón filostómido" donde existe una fuerte tendencia a que las ovulaciones sean alternadas entre el ovario derecho y el izquierdo en un ciclo estral o menstrual. Raswieler y Badwaik (2000) indican la probable existencia de un mecanismo local donde el ovario activo directamente influencia la funcionalidad del ovario izquierdo.

En animales domésticos, principalmente en bovinos, mencionan que existe una hormona que es secretada por el folículo dominante, el cual no permite que otros folículos de ese ovario pudieran llegar a ser dominantes y que también está influenciando a los folículos del ovario opuesto y por lo tanto sufrirían atresia, esta hormona es la Inhibina que

es secretada por las células de la granulosa en el folículo ovárico en mamíferos. Se ha visto que altos niveles de esta proteína durante la fase folicular y durante la ovulación inhibe la secreción de la hormona FSH mandando una señal química que permite la disminución en el número y competencia de folículos en crecimiento durante la etapa final de la ovogénesis (Palta *et al.* 1997; Phillips, 2005; Kandiel *et al.* 2008)

Habría que realizar más estudios en estas especies de murciélagos sobre la funcionalidad de los ovocitos (viabilidad, maduración y fertilización *in vitro*) que nos permitan predecir si ambos ovarios son funcionales.

CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL

Considerando que solamente espermatozoides capacitados pueden ser inducidos y llevar a cabo la reacción acrosomal, los resultados del presente estudio indican que, bajo estas condiciones de incubación *in vitro*, la capacitación del espermatozoide del murciélago *A. jamaicensis* puede llevarse a cabo entre 6 y 8 horas. Ya que se observó que hay un incremento entre el 30 y 40% de espermatozoides capacitados y se presenta un porcentaje de entre el 40 y 50% de espermatozoides con reacción acrosomal. El tiempo requerido para la capacitación varía en todas las especies, desde 1 a 2 horas en el ratón (Fraser, 1977), 5 a 7 horas en ratas (Niwa y Chang, 1974), 4 horas en el humano (Patrat *et al.* 2000) de 5 a 6 horas en conejo (Rosado *et al.* 1974) y en el mono ardilla (Gould *et al.* 1973), 24 horas en zarigüeyas y walabi (Mate y Rodger, 1991), 8 a 12 horas en el cuyo (Yanagimachi, 1972) en cerdos, toros, perros y en chinchillas es de 4 a 5 horas (Cheng *et al.* 1986; Parrish *et al.* 1988; Brewis *et al.* 2001; Ponzio *et al.* 2007), 90 minutos en el murciélago *Pteropus poliocephalus* (Cummins *et al.* 1988) y 6 horas en el murciélago *Corynorhinus mexicanus* (Cervantes *et al.* 2008).

En muchas especies se ha documentado que los espermatozoides incubados *in vitro* pueden capacitarse y llevar a cabo la reacción acrosomal. En el presente estudio los porcentajes de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal aumentaron conforme el tiempo de incubación fue progresando. Se obtuvieron valores entre el 40 y 50%, semejantes a lo reportado en roedores como el hámster y en cuyos (Ponzio *et al.* 2007).

Durante la capacitación y reacción acrosomal hay cambios en la organización de la membrana plasmática en cuanto a la proporción y distribución de lípidos, fosfolípidos, proteínas y colesterol, lo cual juega un rol clave durante este mecanismo (Croos, 1988).

Gadella *et al.* (2001) sugieren que la tasa de capacitación depende de la tasa de pérdida del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. Esto es, espermatozoides con alto contenido de colesterol necesitan más tiempo para llevar a cabo la capacitación (por ejemplo: humanos, bovinos y carneros). Se ha observado en humanos, que el contenido elevado de colesterol puede contribuir a la infertilidad (Cross, 1998). En espermatozoides con bajas concentraciones de colesterol (por ejemplo: caballos y cerdos) parece ser que el espermatozoide se capacita mucho más rápido (Gadella *et al.* 2001).

En nuestros resultados al capacitar y llevar a cabo la reacción acrosomal en espermatozoides de *A. jamaicensis* no obtuvimos un porcentaje mayor al 50% de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal, lo que puede deberse a que la membrana plasmática podría presentar altas concentraciones de colesterol.

Crichton *et al.* (1993) mencionan que la membrana plasmática podría ser una posible fuente de diferencias entre el espermatozoide de murciélago y la de otros mamíferos. Ellos mencionan que los espermatozoides de murciélagos que hibernan (*Myotis velifer*) presentan una mayor resistencia a agentes y a cambios de temperatura que pueden desestabilizar la membrana plasmática. Ellos mencionan que la resistencia del espermatozoide a capacitarse y llevar a cabo la reacción acrosomal en temporadas no aptas para la reproducción, se debe a que la morfología y componentes de la membrana plasmática son diferentes.

Mate y Rodger (1991) han notado una similar estabilidad del acrosoma de los espermatozoides de algunas especies de marsupiales que también resisten los esfuerzos para inducir la reacción acrosomal.

En murciélagos no existen trabajos relacionados con estos temas. En *A. jamaicensis* podemos mencionar que la membrana plasmática de la cabeza tiene un

arreglo diferente a la de la mayoría de los mamíferos ya que se encuentra separada de la membrana acrosomal externa (Álvarez-Guerrero *et al.* 2014). Debido, quizás, a que la proporción de proteínas, de colesterol y fosfolípidos es diferente a la de otros mamíferos. Además esta forma de estar separada de la membrana acrosomal externa quizás ayuda a que el espermatozoide tarde más tiempo en capacitarse o que puede ser una cualidad que le ha funcionado al pasar de los años para que los espermatozoides sean más resistentes.

El espermatozoide de esta especie de murciélago, quizás dependa en mayor medida a las fluctuaciones en las concentraciones de factores decapacitantes como la albúmina y el bicarbonato de sodio que están presentes en el tracto reproductor de la hembra durante el estro y también del tiempo en que el espermatozoide se encuentre interactuando con el oviducto, particularmente la porción del istmo ya que son un depósito especializado que alberga la población seleccionada de esperma destinado a proceder al sitio de la fertilización. En este sitio se sintetizan proteínas y lípidos que pueden ayudar en el proceso de capacitación y reacción acrosomal permitiendo que el espermatozoide pueda penetrar al ovocito (Crichton, 2000).

Nuestros resultados demuestran que los espermatozoides de *A. jamaicensis* bajo estas condiciones de incubación *in vitro*, se pudieron capacitar y llevar a cabo la reacción acrosomal. Crichton (1993) menciona que la capacitación, la reacción acrosomal y la penetración del ovocito *in vitro* podrían requerir componentes en el medio que aún no han sido identificados. Sin embargo, en los últimos 10 años se han modificado los medios de cultivo. Ahora se sabe cuáles son las sustancias que pueden provocar que la membrana plasmática se desestabilice y por consiguiente haya un flujo de calcio hacia el interior de la cabeza del espermatozoide, reorganización de las proteínas de membrana y de un flujo de colesterol, permitiendo que se lleve a cabo la reacción acrosomal.

Debido a que no existe información alguna sobre la capacitación y reacción acrosomal en murciélagos que habitan y se reproducen en climas tropicales; en esta investigación se utilizaron dos temperaturas. Una temperatura de 32°C ya que Lambert (1981) menciona que los espermatozoides de murciélagos que hibernan (*Myotis lucifugus lucifugus*) que fueron mantenidos a esta temperatura se activaron resultando en buenas

tasas de fertilización en ovocitos de hamster sin zona pelúcida. Sabemos que el murciélago *A. jamaicensis* presenta una característica que se le conoce como torpor, no hiberna, pero si baja su metabolismo solo poco tiempo (hasta dos semanas) y en lo que llega a su temperatura corporal podría ser que los espermatozoides a esta temperatura presenten cierta motilidad y podrían prepararse para capacitarse.

La otra temperatura de estudio fue a 37°C que es la temperatura corporal de los machos de esta especie. Yudin *et al.* (1988) mencionan que obtuvo espermatozoides de humano capacitados incubados durante toda la noche a esta temperatura y que disminuyo el tiempo de capacitación resultando en altos porcentaje de espermatozoides móviles.

En nuestros cultivos a 37°C y 32°C con y sin proge sterona a las 8 horas los espermatozoides aún se movían, pero se desplazaban muy lento y vibraban de un lado hacia otro. Lo que puede estar sucediendo es que los espermatozoides de *A. jamaicensis* no dependen de la temperatura para poderse capacitar o llevar a cabo la reacción acrosomal pero que someter a los espermatozoides por largos periodos en estas temperaturas puede que se esté afectando la motilidad del espermatozoide. Sin embargo, aunque no existen trabajos sobre el movimiento del espermatozoide en estos murciélagos no sabemos si este tipo de movimiento y forma de desplazamiento sea característico de espermatozoides hiperactivados.

Lambert (1981) menciona que espermatozoides incubados a temperaturas entre 42°C y 55°C presentaron buenas tasas de motilidad al comienzo de la incubación. Sin embargo la motilidad y su desplazamiento hacia delante disminuyeron drásticamente como la incubación continuó y los ovocitos de hámster sin zona pelúcida no fueron penetrados. Esto sugiere que estas temperaturas inactivan a los espermatozoides antes de que la penetración tome lugar. Esto también se observó con los espermatozoides de *A. jamaicensis* a 37°C donde su movimiento fue disminuyendo conforme pasaban las horas de incubación. Sin embargo a 32°C mantuvieron su movimiento durante las primeras 6 horas de incubación y no se observó que presentaran un cambio en la motilidad observada en otros mamíferos donde el movimiento de los espermatozoides es en círculos, con gran amplitud en el bateo del flagelo y avanzan más rápido.

En murciélagos que hibernan, la capacitación, la viabilidad y la motilidad dependen de la temperatura, las hembras conforme van saliendo de la hibernación en primavera van aumentando su temperatura corporal, lo que permite que el espermatozoide empiece a activar ciertos mecanismos y prepararse para que logre capacitarse y llevar a cabo la reacción acrosomal. Esto es muy diferente en murciélagos que no hibernan como en la especie *A. jamicensis* ya que es un organismo que habita climas tropicales y pensamos que no depende de la temperatura para la capacitación de sus espermatozoides.

En cuanto a los porcentajes de viabilidad para todos los tratamientos, estos fueron disminuyendo conforme pasaron las horas de incubación. Sin embargo, a las 8 horas de incubación para todos los tratamientos hubo un porcentaje de 75% de espermatozoides viables.

Esto podría sugerir que la integridad de la membrana puede ser afectada durante el tiempo en el que fueron sometidos a los espermatozoides a incubación y no tanto por la temperatura o la progesterona. Estos porcentajes de viabilidad pueden deberse a que en el epidídimo existen subpoblaciones de espermatozoides que han sido almacenados durante cierto tiempo. Por otra parte también es probable que a las 8 h las células empezaran a agotar los nutrientes del medio de incubación o se produjeron altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que podrían interferir con la capacitación de los espermatozoides y con la reacción acrosomal.

La concentración de progesterona utilizada en nuestros experimentos para estimular la capacitación y la reacción acrosomal en espermatozoides de murciélago de *A. jamaicensis* fue de 4 μM similar a la concentración que se encuentra presente en las células del cúmulo en humanos (Osman *et al.* 1989).

La progesterona a esta concentración estimuló la capacitación y la reacción acrosomal en los espermatozoides de esta especie de murciélago. Sin embargo los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal no fueron mayores al 50%. Quizás sea necesario aumentar la concentración de progesterona como se ha observado en chinchillas en las que utilizaron una concentración de progesterona de 20 μM (Ponzio *et al.* 2007). Sin embargo, en bovinos y en humanos al aumentar la concentración de

progesterona disminuyeron los porcentajes de viabilidad, ya que se ha observado que hay un efecto ligeramente tóxico de la progesterona sobre los espermatozoides (Therién y Manjunath, 2003; Osman *et al.* 1989).

Con los resultados obtenidos en esta investigación en relación al efecto de la progesterona nos surge una pregunta; En la membrana plasmática del espermatozoide de murciélago de *A. jamaicensis* se presentan receptores para este esteroide?.

Los investigadores han demostrado la existencia de sitios de unión para la progesterona en la membrana plasmática del espermatozoide de mamíferos de humanos, cerdos y cabras (Luconi *et al.* 2004, Somanath y Gandhi, 2002; Lösel *et al.* 2004; Wu *et al.* 2006). La progesterona ha demostrado que estimula el flujo de calcio hacia el interior de la membrana plasmática, la transducción de señales a través de proteínas tirosinas y sinasas, incremento del AMP cíclico, resultado en la activación del espermatozoide a través de la inducción de la capacitación, hiperactividad y reacción acrosomal (Travert *et al.* 2009). Será este mismo mecanismo por el cual el espermatozoide de murciélago se capacite y lleve a cabo la reacción acrosomal?.

Conforme pasaron las horas de incubación se observó que cambiaba la morfología de los espermatozoides, esto es que el flagelo se enrollaba presentando dos patrones uno de ellos fue en la pieza final del flagelo y el otro patrón fue el enrollamiento del flagelo procediendo hacia la pieza media. Existen referencias en otras especies que presentan varios tipos de enrollamiento del flagelo en ganado (Correa y Zavos, 1994; Revell y Mrode, 1994), cerdos (Vazquez *et al.* 1997; Zou y Yang, 2000), caballos (Neild *et al.* 1999), humanos (Jeyendran *et al.* 1984) y cabras (Fonseca *et al.* 2005).

Sin embargo estos diferentes arreglos del flagelo que fueron observados en otras especies se debieron a que el medio en el que fueron colocados los espermatozoides era hipoosmótico. Estos autores utilizaron la prueba HOST (Hipoosmotic swelling test) para determinar la integridad de la membrana plasmática del flagelo. El resultado de esta prueba es el enrollamiento del flagelo que puede ser fácilmente observable bajo un microscopio de contraste de fases.

El medio que utilizamos para evaluar la capacitación y reacción acrosomal en los espermatozoides de murciélago de *A. jamaicensis* fue el medio TALP el cual presenta una osmolaridad aproximada de 270 mOsmol. Al igual que en el espermatozoide de *A. jamaicensis*, Jeyendran *et al.* (1984), Mahi y Yanagimachi (1973) mencionan que el espermatozoide de humano presentó enrollamiento en la parte final del flagelo a 300 mOsmol, que es aproximadamente la osmolaridad usada en los medios de fertilización *in vitro*.

Sin embargo, en nuestros resultados y en las microfotografías obtenidas sobre los cambios en la morfología del espermatozoide. Podríamos pensar en dos teorías: Una de ellas es que los espermatozoides de murciélago de *A. jamaicensis* son susceptibles a los cambios en la osmolaridad del medio de cultivo y la otra teoría es que el espermatozoide esté hiperactivado. Ya que esta forma del espermatozoide se ha observado en animales domésticos, lo que nos lleva a sugerir que son espermatozoides hiperactivados. Habría que hacer una prueba HOST y comparar los resultados.

MADURACIÓN *IN VITRO*

La maduración ovocitaria es un fenómeno complejo durante el cual el ovocito progresa desde el estadio de diploteno hasta el de metafase II. El ovocito completa la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de LH (Peng *et al.* 1991), o bien cuando es retirado del folículo. Para llevar a cabo la MIV es necesario un periodo en el que el ovocito completa su maduración nuclear (Sirard *et al.* 2001), es decir, alcanza el estadio de metafase II, en el que permanece hasta el momento en que es fertilizado, que es cuando completa la meiosis y se forman los pronúcleos. Además de la maduración nuclear, también necesita una maduración citoplasmática, que prepara al ovocito para soportar la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (maduración citoplasmática). Aunque el ovocito haya alcanzado el estadio de metafase II, la maduración nuclear no garantiza el consecuente desarrollo embrionario (Sirard, 2001; Yang *et al.* 1998).

Una vez seleccionados los ovocitos, se colocan en el medio de maduración, un medio que tendrá que cumplir con ciertas expectativas para que dicha maduración se lleve a cabo de forma correcta, simulando las condiciones que el ovocito encontraría *in*

vivo (Pawshe *et al.* 1996). Sin embargo al no existir estudios relacionados con técnicas de reproducción asistida como lo es la maduración *in vitro* en murciélagos y particularmente en la especie *A. jamaicensis*, fue necesario utilizar algunos principios de los protocolos realizados en animales domésticos.

En nuestra investigación utilizamos una atmósfera del 5% CO₂ y 95% de aire para la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario *in vitro*, que corresponde a una concentración aproximada del 20% de oxígeno. La concentración de oxígeno en el oviducto y en el útero en monos, hámster y conejos es más baja que en el aire con una concentración que va del 2% al 8% de oxígeno cuando los gametos están presentes (Fischer y Bavister, 1993; Kea *et al.* 2007).

Aunque las condiciones durante el cultivo de ovocitos y embriones *in vitro* son diferentes a los que se realizan en condiciones naturales, uno de los factores críticos es la concentración de oxígeno en que los ovocitos y embriones son cultivados (Karja *et al.* 2004). En reciente investigaciones, se ha observado que bajo condiciones de cultivo *in vitro* con una concentración de oxígeno del 20% soporta exitosamente la maduración *in vitro* en ovocitos de ratón (Umaoka *et al.* 1992), de hámster (McKiernan y Bavister, 1992), de ovino (Thompson *et al.* 1992), de bovino (Van Soom *et al.* 2002) y de cerdos (Park *et al.* 2005). Sin embargo, Karja *et al.* (2004) menciona que los ovocitos cultivados a una concentración de 20% o mayor de oxígeno puede ejercer efectos perjudiciales probablemente por la formación de radicales libres.

Aunque existen datos controversiales sobre qué concentración de oxígeno es la más adecuada para que los ovocitos de diferentes especies puedan soportar y madurar *in vitro*, en nuestro trabajo al utilizar esta atmósfera de gases con una concentración del 20% oxígeno, los ovocitos del murciélago de *A. jamaicensis* soportaron adecuadamente la maduración *in vitro*, ya que se observó expansión de las células de la granulosa. Sin embargo para estar totalmente seguros sería necesario e interesante realizar estudios con diferentes mezclas de gases.

Se utilizaron dos tiempos de incubación (24 y 44 horas) para observar la expansión de las células de la granulosa y la extrusión del primer cuerpo polar, indicando

que el ovocito ha alcanzado la etapa de Metafase II. En ambos tiempos de incubación se observaron ovocitos con células de la granulosa expandidas. Sin embargo el porcentaje de ovocitos con expansión de las células de la granulosa fue mayor en los ovocitos que permanecieron 24 horas en cultivo y presentaron una apariencia considerada como normal, semejante a la de otras especies.

Son *et al.* (2005) demostraron que los ovocitos de humanos que presentaron un cúmulo compacto y un núcleo en vesícula germinal y que aquellos que fueron madurados durante 24 horas fueron más competentes que aquellos en los cuales permanecieron durante más tiempo en cultivo. Sin embargo, Suikkari *et al.* (2007) señalan que una vez que los ovocitos de humano se desprenden de su ambiente folicular, alcanzan la metafase I en aproximadamente 28 a 35 horas y la extrusión del primer cuerpo polar entre 36 y 44 horas en cultivo. En la presente investigación solo se observó extrusión del primer cuerpo polar en ovocitos cultivados a 24 horas a 37°C y el medio suplementado con hormonas.

Schramm y Bavister (1999) mencionan que el porcentaje de ovocitos de humanos y primates que presentaron una maduración nuclear en procedimientos de maduración *in vitro* por 24 horas fue mayor que en ovocitos madurados *in vivo* por 24 horas. Sin embargo Nottola *et al.* (2001) mencionan que el 80% de los ovocitos humanos presentan una asincronía significativa en el tiempo de maduración *in vitro*, ya que cierto número de ovocitos a las 24 horas ya están en Metafase II, pero otros ovocitos necesitan más tiempo para madurar. Si estos ovocitos son inseminados a las 48 horas, algunos ya han estado en Metafase II durante 20 o 30 horas, lo que compromete su potencial de desarrollo después de la fertilización.

Para garantizar que los ovocitos madurados no permanezcan en metafase II por un período prolongado, Smith *et al.* (2000) evaluaron los efectos en la reducción del tiempo de la maduración *in vitro* de los ovocitos de humano de 36 a 24 horas. No hubo diferencias significativas en las tasas de maduración y de fertilización cuando los ovocitos se maduraron durante 24 horas en comparación con 36 h.

Al trabajar con una especie de fauna silvestre como lo es la del murciélago *A. jamaicensis* y en la que no existe reportes relacionados con la maduración *in vitro*, no puede ser posible comparar el tiempo de maduración con otras especies, debido a las variaciones que existen en las condiciones de cultivo, en los criterios de valoración que tiene cada autor y por último a que son especies poco estudiadas. El tiempo de maduración depende de cada especie y no puede ser estrictamente controlado ya que los ovocitos alcanzan la Metafase II en diferentes momentos, ya que se ha observado que para ovinos y bovinos es de 22 a 24 horas (Wynn *et al.* 1998) y en cerdos es de 44 horas (Barnes *et al.* 1996).

Aunque numerosos datos se han recopilado en ensayos con animales, la elección de un medio específico para la maduración *in vitro* de ovocitos parece deberse en gran parte a la adaptación de los métodos desarrollados para el cultivo de otros tipos de células. Medios de cultivo complejos, como el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199), suplementado con diversos sueros, gonadotropinas (FSH y LH) y Estradiol, han sido los más ampliamente utilizados en la investigación o en las aplicaciones clínicas para la maduración *in vitro* de ovocitos (Trounson *et al.* 1998; Mikkelsen, 2005).

El medio de maduración empleado en esta investigación fue el medio TCM-199 ya que en animales domésticos y de fauna silvestre es el medio más utilizado para llevar a cabo la maduración *in vitro* con una tasa de maduración *in vitro* del 68% al 75% (Iwata *et al.* 2004; Liu *et al.* 2008; Li *et al.* 2009). Al cultivar ovocitos de murciélago de *A. jamaicensis* el porcentaje de maduración *in vitro* fue de entre el 30% al 91% cuando el medio de cultivo fue suplementado con hormonas. El medio que no fue suplementado con hormonas hubo un porcentaje de 0% de maduración. Estudios realizados por Barnett y Bavister (1996) y Krisher *et al.* (1999) demostraron que el medio de cultivo puede afectar el metabolismo de los ovocitos de humano y de bovino durante la maduración *in vitro*.

Las gonadotropinas (FSH y LH) juegan un papel importante en el desarrollo y en la función de los folículos pre-antrales, antrales y preovulatorios *in vivo*. Sin embargo, es importante determinar si estas gonadotropinas podrían desempeñar el mismo papel en maduración de ovocitos *in vitro* en la especie *A. jamaicensis*.

Actualmente la mayoría de los protocolos de maduración *in vitro* suplementan con FHS o LH o una combinación en el medio de cultivo. Sin embargo, el efecto de las gonadotropinas y su importancia para la maduración de los ovocitos, la fertilización y el desarrollo temprano es aún controversial.

En nuestra investigación, se obtuvieron ovocitos con expansión de las células de la granulosa solo cuando el medio de cultivo fue suplementado con hormonas. En humanos, bovinos y roedores, al suplementar el medio de cultivo con hormonas aumento el número de ovocitos que alcanzaron la metafase II (Galli y Moor, 1991; Hiller, 1994; Downs et al. 1987; Phillips y Dekel, 1991).

Moor y Trounson (1977) demostraron que la combinación de Estrógenos y FSH fue útil en la maduración de ovocitos ovinos *in vitro*. Los ovocitos de ovejas que alcanzaron la etapa de metafase II resultaron ser más viable que los que no fueron suplementadas con gonadotropina en el medio de cultivo (Galli y Moor, 1991; Ladda *et al.* 1997).

La FHS es importante para el desarrollo de folículos preovulatorios *in vivo* (Macklon y Fauser, 2000) y para la inducción de los receptores de LH (Gougeon, 1996). Los estudios en humanos mencionan que la adición de gonadotropinas al medio de cultivo aumentó los porcentajes de maduración (Alak *et al* 1996; Durenzi *et al* 1997). La LH permite una mayor expresión de ARNm para que la maduración de los ovocitos sea más eficiente y dar lugar a mayores tasas de maduración *in vitro* (Yang *et al.* 2005; Jurema y Nogueira, 2006).

Las gonadotropinas estimulan la generación de una serie de factores positivos que actúan en el ovocito para inducir el rompimiento de la vesícula germinal (Downs, 1993). Por lo tanto, la actividad de proteína quinasa dependiente de AMPc regulada por células del cúmulo puede jugar un papel en el complejo mecanismo de la condensación de la cromatina que conduce a la reanudación meiótica en ovocitos bovinos (Tatemoto y Terada, 1998).

Al igual que en bovinos, humanos y roedores, lo que pudo suceder en murciélagos es que las células de la granulosa tienen suficientes receptores de FSH y LH para transmitir una señal que induce la maduración de los ovocitos, o que al interrumpir o disminuir las uniones que existen entre las células del cúmulo y del ovocito se pueda reanudar la meiosis. Al no añadir hormonas al medio de cultivo no se pudo estimular la reanudación meiótica.

La completa maduración del ovocito implica no sólo la adquisición de competencia meiótica, sino también la maduración citoplasmática (Motlik y Fulka, 1986). La maduración del ovocito depende en gran parte de la presencia de las células del cúmulo que lo rodean, las cuales llevan a cabo funciones nutritivas y reguladoras (Sutovsky *et al.* 1993; Cetica *et al.* 1999).

La calidad de las células del cúmulo es esencial, pues ellas poseen un papel importante en la maduración citoplasmática del ovocito ya que proveen de los aminoácidos, carbohidratos y nucleótidos necesarios (Dode y Graves, 2002; Nagano *et al.* 2006; Rodriguez y Farin, 2004).

La interacción directa del ovocito con las células del cúmulo ocurre a través de las uniones de comunicación que están compuestas de proteínas del tipo de las conexinas, por lo tanto la ruptura de estas uniones afectaría la maduración del ovocito (Eppig, 2001; Nagano *et al.* 2006). En ovocitos mantenidos a 24 horas a 37°C y el medio de cultivo suplementado con hormonas se observó que las uniones que existen entre las células de la granulosa o del cúmulo, atraviesan la zona pelúcida dirigiéndose hacia el citoplasma del ovocito. Específicamente, estas proyecciones celulares se encontraron principalmente en la corona radiada que se comunican con el ovocito atravesando la zona pelúcida, esto también se ha observado en ganado (Hyttel, 1987; de Loos *et al.* 1991), humanos y roedores (Furger *et al.* 1996; Tanghe *et al.* 2002).

Mattioli y Barboni (2000) mencionan que durante la expansión de las células del cúmulo, la cooperación entre las células somáticas y el ovocito se restringe a la corona radiada, mientras que las células del cúmulo que se encuentran más hacia el exterior están desacopladas.

A las 0 horas de incubación se observaron ovocitos con citoplasma uniforme, con vesícula germinal situada hacia un extremo del ovocito. La zona pelúcida estaba intacta, no dañada y las células de la granulosa o del cúmulo presentaron un núcleo grande, redondo y con uno o dos nucléolos. Estas células contenían poco citoplasma. Entre las células de la granulosa no se observaron espacios, se observaron muy unidas entre sí, hubo un espacio perivitelino reducido y uniforme. Mikkelsen y Lindenberg (2001) mencionan que los ovocitos de humano antes de colocarlos en cultivo presentaron un citoplasma claro con textura uniforme y homogénea y un espacio perivitelino de tamaño normal e uniforme. Nottola *et al.* (2001) mencionan que el espacio perivitelino es relativamente pequeño en ovocitos inmaduros, mientras que después de la extrusión del primer cuerpo polar se hace asimétrico y se amplía alrededor del primer cuerpo polar y conserva este aspecto hasta la fertilización. Los ovocitos que fueron expuestos a 24 h a 37°C y el medio fue suplementado con hormonas presentaron una morfología semejante a lo descrito por Mikkelsen y Lindenberg (2001) y Nottola *et al.* (2001).

Después de 24 horas de maduración a 37°C en el medio suplementado con hormonas se observó que las células del cúmulo fueron irregularmente redondeadas y presentaron expansiones citoplasmáticas, las células están separadas por grandes espacios intercelulares, Larsen *et al.* (1991) consideran esto como un signo morfológico de la expansión de las células del cúmulo que usualmente acompaña el proceso final del ovocito.

En ovocitos de murciélago de *A. jamaicensis* se observó que los núcleos de las células del cúmulo presentaron de uno a tres nucléolos, mientras que Familiari *et al.* (2006) mencionan que en ovocitos de humanos esto es una señal de que los ovocitos habían madurado.

Se utilizaron dos temperaturas, a 37°C y 38.5°C. A 37°C se obtuvieron los porcentajes más altos de maduración *in vitro*. Los ovocitos presentaron una apariencia normal, sin embargo los ovocitos expuestos a 38.5°C presentaron las células del cúmulo sin una forma definida y no maduraron debido a la presencia de la vesícula germinal en el centro del citoplasma del ovocito. Los ovocitos de ratón son susceptibles a los daños ocasionados por el estrés térmico durante todo el periodo de maduración *in vivo* e *in vitro*.

Y los daños ocasionados durante este periodo parecen implicar en la generación de Especies Reactivas al Oxígeno (ROS) tanto *in vivo* (Roth *et al.* 2008) como *in vitro* (Lawrance *et al.* 2004).

La apoptosis juega un papel crítico en los efectos ocasionados por el estrés térmico sobre la maduración de los ovocitos bovinos. Una parte importante de los complejos cúmulo–ovocito expuestos a elevadas temperaturas (en ratón, proximadamente un 15-30% desarrollan apoptosis (Roth *et al.* 2008).

Si el estrés es alto y el tiempo de exposición es prolongado, no solamente permitirían que la transducción de señales aumentara, sino que todos los procesos en la célula se verían afectados, tales como la función de las ciclinas, degradación proteosomal y lipoperoxidación. Bajo estas condiciones la célula permanecería en arresto y sufriría apoptosis o necrosis. Karja *et al.* (2006) en cerdos mencionan que la respuesta de las célula contra el estrés puede diferir, dependiendo de la intensidad del estrés y la duración del mismo para que la célula prolifere, quede en arresto o muera por necrosis o apoptosis.

Aunque los ovocitos inmaduros de *A. jamaicensis* se encontraron encerrados dentro de una masa totalmente compactada de células de la granulosa, el grado de expansión de las células del cúmulo pudo verse influenciada por el tamaño del folículo, así como la cantidad de gonadotropinas y la duración de la maduración *in vitro*.

X. CONCLUSIONES

CARACTERIZACION DE GAMETOS

Los espermatozoides recuperados del epidídimo en machos de *Artibeus jamaicensis* y *Sturnira liliium* presentaron altos porcentajes de viabilidad y motilidad y bajos porcentajes de anormalidades. Sin embargo, estos parámetros pueden variar entre los individuos.

Al evaluar la morfología de los ovocitos en hembras de *A. jamaicensis* y *S. liliium*, estos presentaron diferentes categorías. Los ovocitos de categorías 1, 2 y 3 (calidad desde excelente hasta regular) podrían utilizarse en estudios de maduración y fertilización *in vitro*.

Del ovario derecho se obtuvieron un mayor número de ovocitos para la especie *A. jamaicensis*.

La morfología de los espermatozoides y la calidad de los complejos ovocitos cúmulos (COC) en machos y hembras de murciélagos filostómidos *A. jamaicensis* y *S. liliium* puede ser un factor importante que influya en el éxito de la fecundación y en el desarrollo del embrión.

Los gametos de murciélago pueden utilizarse para el estudio sobre la biología reproductiva, en programas de conservación y en tecnología de reproducción asistida (ART) en animales domésticos y de fauna silvestre.

CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL

Los espermatozoides del murciélago filostómico *Artibeus jamaicensis* mantenidos *in vitro* en un periodo de entre 6 y 8 horas se capacitan y llevan a cabo la reacción acrosomal.

El porcentaje de espermatozoides que llevaron a cabo la reacción acrosomal incrementó conforme aumentaron las horas de incubación.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticas en el porcentaje de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal al suplementar el medio de cultivo con progesterona, cuantitativamente si se observó un incremento.

La temperatura de 32°C y 37°C no influye en los porcentajes de viabilidad.

Se pudieron observar diferentes patrones de capacitación en el espermatozoide de *A. jamaicensis* (semejante a lo observado en el espermatozoide de ratón).

La reacción acrosomal en el murciélago *A. jamaicensis* es similar a la de otros mamíferos.

MADURACIÓN *IN VITRO*

Los ovocitos cultivados *in vitro* a 37°C durante 24 horas y el medio de cultivo suplementado con hormonas presentaron expansión de células de la granulosa y morfología normal a diferencia de los otros tratamientos.

La maduración *in vitro* de ovocitos de *A. jamaicensis* puede ser afectada por la temperatura y por el tiempo de incubación.

Es necesario suplementar el medio de maduración con hormonas para que el ovocito de *A. jamaicensis* tenga expansión de células de la granulosa, maduración nuclear y citoplasmática durante un protocolo de maduración *in vitro*.

La maduración *in vitro* en el murciélago de *A. jamaicensis* es similar a la de otros mamíferos.

FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

Después de 22 horas de fertilización *in vitro* los espermatozoides permanecieron vivos, con movimiento y unidos por la cabeza

Hubo dispersión de las células del cúmulo. Señal de la actividad normal espermática

A pesar de que los ovocitos se observaron rodeados de espermatozoides, ninguno de ellos pudo penetrar la zona pelúcida.

XI. REFERENCIAS

- Abbott AL. Fissore RA. Ducibella T. 2001. Identification of a translocation deficiency in cortical granule secretion in preovulatory mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 65:1640-1647.
- Agnarsson I. Zambrana-Torrel CM. Flores-Saldan NP. May-Collado LJ. 2011. A time-calibrated species-level phylogeny of bats (Chiroptera, Mammalia). *PLoS Curr.* <http://dx.doi.org/10.1371/currents.RRN1212>.
- Albertini DF. Combelles CMH. Benecchi E. Carabatsos MJ. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction.* 121: 647-653.
- Álvarez-Guerrero A. Medrano A. Moreno-Mendoza N. 2014. Characterization of gametes in two phyllostomid bat species: *Artibeus jamaicensis* and *Sturnira lilium*. *Anim. Reprod. Sci.* 145:170-181.
- Alak BM. Smith GD. Woodruff TK. Stouffer RL. Wolf DP. 1996. Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization *in vitro* by inhibin A and activin A. *Fertil. Steril.* 66: 646-653.
- Antonio-Rubio NR. Porras-Gomez TJ. Moreno-Mendoza N. 2012. Identification of cortical germ cells in adult ovaries from three phyllostomid bats: *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*. *Reprod. Fertil. Dev.* <http://dx.doi.org/10.1071/RD12126>.
- Anthony E.L.P. 1988. Age determination in bats. In: H.T. Kunz. (Ed.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats.* Smithsonian Institution Press. Washington DC, p. 47-58.
- Arlotto T. Leibfried-Rutledge ML. First NL. 1992. Correlation of oocyte diameter with time of maturation in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 46 (Suppl 1) 63.
- Altringham JD. 1999. *Bats. Biology and Behavior.* Oxford University Press. p. 131-140.
- Ambriz GD. Contreras MJL. Hernándezpo, Mercado PE. Cervantes RF. Rosado GA. 2003. Estudio comparativo de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias y espermatozoides en tres especies de lagomorfos (*Romerolagus diazi*, *Lepus Californicus* y *Oryctolagus cuniculus*). *Acta Zool. Mex.* 88: 257-269.
- Andersen AG. Jensen TK. Carlsen E. Jorgensen N. Andersson AM. Krarup T. Keiding N. Skakkebaek NE. 2000. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reprod.* 15: 366-372.
- Areekijsee, M. Vejaratpimol, R. 2006. *In vivo* and *in vitro* study of porcine oviductal epithelial cells, cumulus oocyte complexes and granulosa cells: A scanning electron microscopy and inverted microscopy study. *Micron.* 37:707-716.
- Aughey E. Renton JP. 1968. Abnormal spermatozoa in an Ayrshire bull. *Vet. Rec.* 82:129-131.
- Asada M. Horii M. Mogoe T. Fukui Y. Ishikawa H. Ohsumi S. 2000. *In Vitro* maturation and ultrastructural observation of cryopreserved minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 62:253-259.
- Bacetti B. 1984. The human spermatozoon. In: Van Blerkom J., Motta PM. (Eds.). *Ultrastructure of Reproduction.* Martinus Nijhoff. The Hague. P. 110-126.
- Balmori A. 1999. La reproducción en los quirópteros. *Rev. Mastozool.* 11(2):17-34.
- Barnes FL. Kausche A. Tiglias J. 1996. Production of embryos from *in vitro*-matured primary human oocytes. *Fertil. Steril.* 65: 1151-1156.
- Barnett DK. Bavister BD. 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol. Reprod. Dev.* 43(1): 105-133.

- Barth AD. 1989. Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility. *J. Can. Vet.* 30:656-662.
- Barth AD, Oko RJ. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. Iowa. United States of America.
- Bavister BD, Boatman DE, Leibfried L, Loose M, Vernon MW. 1983. Fertilization and cleavage of rhesus monkey oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 28: 983-999.
- Bavister B, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matures *in vitro* fertilizes bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology.* 37: 127-146.
- Bavister BD. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reprod. Update.* 1(2): 91:148.
- Bedford JM. 1983. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28:108-120.
- Beguelini MR, Puga CI, Taboga SR, Morielle-Versute E. 2011. Ultrastructure of spermatogenesis in the White-lined broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Micron.* 42:586-599.
- Beguelini MR, Bueno LM, Caun DL, Taboga SR, Morielle-Versute E. 2014. Ultrastructure of spermatogenesis in the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae: Carollinae). *J. Morphol.* 275:111-123.
- Behre HM, Yeung CH, Hostein AF, Weinbauer GF, Gassner P, Nieschlag E. 2000. Diagnosis of male infertility and hypogonadism. In: Nieschlag E, Behre HM. (Eds.). *Andrology male reproductive health and dysfunction*. Springer. Berlin. p. 92.
- Bellvé AR, O'Brien DA. 1983. The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. In Hartmann HF. (Ed.). *Mechanisms and Control of Animal Fertilization*. Academic Press, Orlando, FL. p. 55-137.
- Beker AR, Colenbrander B, Bevers MM. 2002. Effect of 17 B-estradiol on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology.* 58: 1663-1673.
- Berlinguer F, Leoni, GG, Bogliolo L, Bebbere D, Succu S, Rosati I, Ledda S, Naitana S. 2005. *In vivo* and *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) spermatozoa used to restore genetically rare and isolated populations. *Theriogenology.* 63: 902-911.
- Berlinguer F, González R, Succu S, del Olmo A, Garde JJ, Espeso G, Gomendio M, Ledda S, Roldan ERS. 2008. *In vitro* oocyte maturation, fertilization and culture after ovum pick-up in an endangered gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Theriogenology.* 69: 349-359.
- Bernal FA. 2008. Correlación entre la cámara de Neubauer y el espectrofotómetro microreader I. Para evaluar la concentración espermática bovina. Tesis MVZ. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Bernard RTF. 1989. The adaptive significance of reproductive delay phenomena in some South African Microchiroptera. *Mammal. Rev.* 19(1): 27-34
- Bernard RTF, Hodgson AN. 2005. Fine structure of the neck of epididymal spermatozoa of Schreiber's long-fingered bat (Chiroptera: Mammalia). *Gamete Res.* 21:41-50.
- Bertoldo MJ, Holyoake PK, Evans G, Grupen CG. 2011. Seasonal effects on oocyte developmental competence in sows experiencing pregnancy loss. *Anim. Reprod. Sci.* 124:104-111.
- Bevers MM, Dieleman SJ, Van den Hurk R, Izadyar F. 1997. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology.* 47: 13-22

- Bhatnagar KP. 1978. Head presentation in *Artibeus jamaicensis* with some notes on parturition. *Mammalia*. 42(3): 359-363.
- Bielanski W. 1981. Bibliography on spermatozoan morphology in the stallion. *Bibliography Reprod.* 38:501-502.
- Bleil JD. Wassarman PM. 1980. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76:185-202.
- Blondin P. Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41: 54-62.
- Brewer L. Corzett M. Balhorn R. 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 277: 38895-38900.
- Brewis I.A. Morton I.E. Moore H.D.M. England G.C.W. 2001. Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 491-497.
- Brito LFC. Serticha PL. Stull GB. Rives W. Knobbea M. 2010. Sperm ultrastructure, mophometry, and abnormal morphology in American black bears (*Ursus americanus*). *Theriogenology*. 74: 1403-1413
- Björndahl L. Kvist U. 2003. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reprod. Biom. Online*. 7: 440-448.
- Ceballos G. Arroyo-Cabrales J. Medellín RA. Domínguez-Castellanos Y. 2005. Lista actualizada de los mamíferos de México. *Rev. Mex. Mastozool.* 9: 21-71.
- Cervantes M. Arenas-Ríos E. León-Galván M. López-Wilchis R. Ambriz D. Rosado R. 2008. Spermatozoa epididymal maturation in the mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). *Sys. Biol. Reprod. Med.* 54: 196-204.
- Cetica P. Davit G. Beconi M. 1999. Study of evaluation criteria used for *in vitro* bovine oocyte selection and maturation. *Biocell*, 23(1): 125-133.
- Clermont Y. Einberg E. Leblond CP. Wagner S. 1955. The perforatorium-an extension of the nuclear membrane of the rat spermatozoo. *Anat. Rec.* 121: 1-12.
- Coonrod SA. Flores-foxworth G. Moreno JF. Westhusin M. Byrd SR. Kraemer DC. 1994. Birth of Armenian red sheep (*Ovis orientalis*) lambs to domestic sheep (*Ovis aries*) following interspecific transfer of IVM-IVF derived embryos. *Theriogenology* 41: 182.
- Correa JR. Zavos PM. 1994. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*. 42: 351-360.
- Correa-Pérez JR Fernández Pelegrina R. Pavlos A. Panayiotis MZ. 2004. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrospemia. *Fertil. Steril.* 81: 1148-1150.
- Cosson JF. Pons JM. Masson D. 1999. Effects of forest fragmentation on frugivorous and nectarivorous bats in French Guiana. *J. Tropical Ecology*. 15:515-534.
- Courtens JL. Courot M. Fléchon JE. 1976. The perinuclear substance of boar, bull, rams and rabbit spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.* 57:54-64.
- Crichton EG. Krutzsch PH. Yanagimachi R. 1993. Stability of the sperm plasma membrane of hibernating bats (*Myotis velifer*) compared with other mammals. *J. Reprod. Fert.* 97: 1-4.

- Crichton E. 2000. Sperm storage and fertilization: In Crichton E. Krutzsch P (Eds.). Reproductive Biology of Bats. San Diego, California: Academic Press. p. 295-312.
- Croos L. 1998. Role of Cholesterol in sperm capacitation. Biol. Reprod. 59: 7-11.
- Crozet N. Ahmad Ali M. Dubos MP. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 103: 293-298.
- Cuevas CJM. Ruiz DR. 1972. Técnica en la evaluación de semen, comparación de los métodos usados en la determinación de la concentración. Rev. Tec. Pec. Mex. 23: 40-44.
- Cummins JM. Woodall PF. 1985. On mammalian sperm dimensions. J. Reprod. Fert. 75: 153-175.
- Cummins JM. Yanagimachi R. 1986. Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated *in vitro*, in relation to the timing of the acrosome reaction. Gamete Res. 15: 187-212.
- Cummins JM. Robson SK. Rouse GW. 1988. The acrosome reaction in spermatozoa of the Grey-headed flying fox (*Pteropus plocephalus*: Chiroptera) exposes barbed subacrosomal material. Gamete Res. 21: 11-22.
- Chaverri G. Kunz TH. 2006. Reproductive biology and postnatal development in the tent making bat *Artibeus watsoni* (Chiroptera: Phyllostomidae). J. Zool. 270: 650-656.
- Cheng WTK. Polge C. Moore RM. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes. Theriogenology. 25: 146.
- Cheng FP. Fazeli AR. Voorhout WF. Tremoleda JL. Bevers MM. Colenbrander B. 1998. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances *in vitro* binding to the zona pellucida. Int. J. Androl. 21: 57-66.
- Cheng FP. Wu JT. Tsai PS. Chang CLT. Lee SL. Lee WM. Fazeli A. 2005. Effects of cryo-injury on progesterone receptor(s) of canine spermatozoa and its response to progesterone. Theriogenology. 64: 844-854.
- Christensen M. Schmidt M. Hess D. Alak B. 1993. Oocyte nuclear maturation *in vitro* in the African (*Loxodonta Africana*) and Asian elephant (*Elephas maximus*). Biol. Reprod. 48: 88-95.
- Dadashpour DN. Kohram H. Zainoaldini S. 2012. Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. Small Rum. Res. 102: 37-42.
- Dadaune JP. Mayaux MJ. Guihard-Moscato ML. 1988. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. Andrologia. 20: 211-217.
- Dadoune JP. 2003. Expression of mammalian spermatozoa nucleoproteins. Microsc. Res. Tech. 61: 56-75.
- De Jong CE. Jonsson N. Field H. Smith C. Crichton EG. Phillips N. Johnston DS. 2005. Collection, seminal characteristics and chilled storage of spermatozoa from three species of free-range flying fox (*Pteropus* spp.). Theriogenology. 64:1072-1089.
- De Jonge CE. LaFromboise M. Bosmans E. Ombelet W. Cox A. Nijs M. 2004. Influence of the abstinence period on human sperm quality. Fertil. Steril. 82: 57-65.
- De Loos F. Vliet C. Maurik P. Kruip AM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res. 24: 197-209.
- De Loos F. Kastrop P. Van Maurile P. Van Beneden TH. Kruip TAM. 1991. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. Mol. Reprod. Dev. 28: 255-259.
- de Lucas TJ. Arbiza AS. 2004. Sistemas de apareamiento e inseminación artificial en ovinos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. p.118.

- Del Campo MR. Del Campo CH. Donoso MX. Berland M. Mapletoft RJ. 1994. *In vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*. 41: 1219–1229.
- del Río MJ. Godoy A. Toro A. Orellana R. Cortés ME. Moreno RD. Vigil P. 2007. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Rev. Int. Androl*. 5(4): 368-73.
- Devillard F. Metzler-Guillemain C. Pelletier R. DeRobertis C. Bergues U. Hennebicq S. Guichaoua M. Séle B. Rousseaux S. 2002. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum. Reprod*. 17: 1292:1298.
- Dielman SJ. Hendriksen PJM. Viuff D. Thomsen PD. Hyttel P. Knijn HM. Wrenzycki C. Kruip TAM. Niemann H. Gadella BM. Bevers MM. Vos PLAM. 2002. Effect of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*. 57: 5-20.
- Ding X. Leigh CM. Goodman SM. Bedford JM. Carleton MD. Breed WG. 2010. Sperm morphology in the Malagasy rodents (*Muroidea: Nesomyinae*). *J. Morphol*. 71: 1493-1500.
- Dode MA. Graves C. 2002. Involvement of steroid hormones on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Theriogenology*. 57(2): 811-821.
- Donoghue AM. Johnston LA. Seal US. Armstrong DL. Tilson RL. Wolf P. Petrini K. Simmons LG. Gross T. Wildt DE. 1990. *In vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol. Reprod*. 43: 733–744.
- Donoghue AM. Howard JG. Byers AP. Goodrowe KL. Bush M. Blumer E. Lucas J., Stover J. Snodgrass K. Wildt DE. 1992. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization *in vitro* in the cheetah *Acinonyx jubatus*. *Biol. Reprod*. 46: 1047–1056.
- Downs SM. 1993. Factors affecting resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*. 39: 65–79.
- Ducibella T. Duffy P. Buetow J. 1994. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol. Reprod*. 15: 427-430.
- Ducolomb RY. Romo GS. Balcázar SA. Rodarte CF. Casas HE. Fragoso G. Scitutto CE. Betancourt RM. 2005. Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. *Téc. Pecu. Méx.* (43): 425-432.
- Durenzi KL. Wentz AC. Saniga EM. 1997. Follicle stimulating hormone affects immature oocytes: *in-vitro* maturation and hormone production. *J. Assisted Reproduc. Genet*. 14: 199-204.
- Eddy EM. 2006. The Spermatozoon. In: Neill JD. (Ed.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier academic press. UK. p. 3-55.
- Eliasson R. 1975. Analysis of semen In: Behrman SJ. Kistner RW. (Eds.). *Progress in infertility*. 2nd ed. Little Brown. New York. p. 691-713.
- Eliasson R. 2010. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian J. Androl*. 12: 26-32.
- Elmore RG. Romo S. 1988. Examen de la eficiencia reproductiva del toro: (1 de la serie). *Rev. Ganadero*. Vol. XIII (6):34-37.
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122: 829-838.
- Estrada A. Coates-Estrada R. 2001. Species composition and reproductive phenology of bats in a tropical landscape at Los Tuxtlas, México. *J Trop. Ecol*. 17: 26-46.
- Eyestone WH. First NL. 1991. Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*. 35: 612-624.

- Falconer DS. Edwards RG. Fowler RE. Roberts RC. 1961. Analysis of differences in the numbers of eggs shed by the two ovaries of mice during natural oestrus or after superovulation. *J. Reprod. Fertil.* 2: 418-437.
- Familiari G. Heyn R. Relucenti M. Nottola SA. Sathananthan H. 2006. Ultrastructural dynamics of human reproduction, from ovulation to fertilization and early embryo development. *Internat. Rev.Cytol.* 249: 53-141.
- Fawcett DW. Ito S. 1965. The fine structure of bat spermatozoa. *Am. J. Anat.* 116 (3): 567-609.
- Fawcett DW. 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod. Suppl.* 2: 90-127.
- Farstad W. Krogenaes A. Nagyová E. Hafne AL. Hyttel P. 1993. *In vitro* techniques in fox reproduction. *Livestock Prod. Sci.* 36: 23-27.
- Fair T. Hyttel P. Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 437-442.
- Fenton MB. Acharya LD. Audet D. Hickey MB, Merriman C. Obrist MK. 1992. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. *Biotropica.* 24(3): 440-446.
- Ferraz MS. de Menezes DJA. Pessa GT. Cabral RM. Illera MJ. Silva AR. Carvalho MAM. 2011. Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dayprocta aguti*). *Theriogenology.* 75: 459-462.
- Fetterolf PM. Jurisicova A. Tyson JE. Casper RF. 1994. Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biol. Reprod.* 51: 184-192.
- Fisher B. Bavister BD. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamster and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 99: 673-679.
- Fleming TH. 1971. *Artibeus jamaicensis*: Delayed embryonic development in a neotropical bat. *Science.* 171: 402-404.
- Fleming TH. Hooper ,ET. Wilson DE. 1972. Three Central American bat communities: structure, reproductive cycles, and movement patterns. *Ecology.* 53: 555-569.
- Fraser LR. Umer G. Sayeed S. 1993. Na⁺ requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 97: 539-549.
- Fraser LR. 1977. Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *J. Exp. Zool.* 202:439.
- Freneau GE. Chenoweth PJ. Ellis R. Rupp G. 2010. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Anim. Reprod. Sci.* 118:176-181.
- Florman HM. Ducibella T. 2006. Fertilization in Mammals. In: Neill JD. (Ed.). *Knobill and Neill's Physiology of Reproduction.* Elsevier academic press. UK. p. 55-112.
- Fonseca J.F. Torres C.A.A. Maffili V.V. Borges A.M. Santos A.D.F. Rodrigues M.T. Oliveira R.F.M. 2005. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim. Reprod.* 2(2):139-144.
- Forman GL. Genoways HH. 1979. Sperm morphology. In: Baker RJ. Knox JJ. Carter DC. (Eds.). *Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III.* The Museum, Texas Tech University Press. Texas. p. 177-204.
- Fukui Y. Mogoe T. Ishikawa H. Ohsumi S. 1997. *In vitro* fertilization of mink whale (*Balaenoptera acutorostrata*) follicular oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology.* 47: 399.
- Furger C. Cronier L. Poirot C. Pouchelet M. 1996. Human granulosa cells in culture exhibit functional cyclic AMP-regulated gap junctions. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 541-548.

- Gadella. BM. Rathi R. Brouwers JFHM. Stout TAE. Colenbrander B. 2001. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 249-265.
- Gallardo MH. Mondaca FC. Ojeda RA. Kohler N. Garrido O. 2002. Morphological diversity in the sperms of cabiormorph rodents. *J. Neotrop. Mammal.* 9(2): 159-170.
- Galli C. Moor RM. 1991. Gondadotrophin requirement for the *in vitro* maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology.* 35: 1083-1093.
- Gandini L. Lombardo F. Paoli D. Canponecchia L. Familiari G. Verlengia C. Dondero F. Lenzi A. 2000. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15: 830-839.
- Gañán N. González R. Sestelo A. Garde JJ. Sánchez I. Aguilar JM. Gomendio M. Roldan ERS. 2009. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous *in vitro* fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology.* 72: 341-352.
- García M.A. Meizel S. 1999. Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: Pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biol. Reprod.* 60:102-109.
- Gannon MR. Willing MR. Knox JJ. 1989. *Sturnira lilium*. *Mammalian Species.* 333: 1-5.
- Gardner DK. Lane M. Sptzer A. Batt P. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50: 390-400.
- Gatti R. 1984. The fine structure of spermatozoa from Chiroptera. *Acta Biomed. Ateneo Permeso.* 55(5-6): 223-33.
- Gilchrist RB. Nayudu PL. Hodges JK. 1997. Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 56: 238-246.
- Gonzales-Santander R. Clavero Nuez JA. 1973. The fine structure of the human oocyte. *Acta Anat.* 84:106-117.
- Gordon I. Lu KH. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology.* 33: 77-87.
- Goud PT. Goud PP. Qian C. Laverge H. Van der Elst J. De Sutter P. Dhont M. 1998. In vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factors in the culture medium. *Hum. Reprod.* 6: 1638-1644.
- Gould K.G. Cline E.M. Williams W.L. 1973. Observations on the induction of ovulation and fertilization *in vitro* in the squirrel monkey (*Saimiri sciurens*). *Fertil. Steril.* 24: 260-268.
- Goto K. Kajihara Y. Kosaka S. Koba M. Nakanishi Y. Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 83: 753-758.
- Goyanes VJ. Ron-Crozo A. Costas E. Maniero E. 1990. Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. *Hum. Reprod.* 13:1638-1644.
- Greenblatt EM. Meriano JS. Casper RF. 1995. Type of stimulation protocol affects oocyte maturity, fertilization rate and cleavage after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 64: 557-563.
- Grzimek B. 1990. Bats. In B. Grzimek, ed. *Grzimek's Encyclopedia of Mammals*, McGraw-Hill Publishing. New York, NY. p. 584-611.
- Haas van Dorsser FJ. Strick JA. 2005. Semen characteristics and sperm morphology in the Arabian leopard (*Panthera pardus nimr*) and how these vary with age and season. *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 675-682.

Hafez ESE. 1980. Transport and survival of gametes. En: Reproduction in farm animals. 4a edicion Lea & Febiger, Philadelphia

Hafez ESE, Hafez B. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Editorial McGraw Hill. Mexico.

Hammitt DG. Syrop CH. Van Voorhis BJ. Walker DL. Miller TM. Barud KM. 1993. Maturational asynchrony between oocyte cumulus-coronal morphology and nuclear maturity in gonadotropin-releasing hormone agonist stimulations. Fertil. Steril. 59: 375-381.

Hanada A. Enya Y. Suzuki T. 1986. Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. Japan J. Anim. Reprod. 32: 208.

Handelsman DJ. Conway AJ. Boylan LM. Turtle JR. 1984. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. Int. J. Androl. 7: 369-382.

Hazeleger NL. Hill DJ. Walton JS. Stubbing RB. 1993. The interrelationship between the development of bovine oocytes *in vitro* and their follicular fluid environment. Theriogenology. 39: 231.

Heithaus ER. Fleming TH. Opler PA. 1975. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in seasonal tropical forest. Ecology. 56: 841-854.

Hermes R. Göritz F. Portas TJ. Bryant BR. Kelly JM. Maclellan LJ. Keely T. Schwarzenberger F. Walzer C. Schnorrenberg A. Spindler RE. Saragusty J. Kaandorp S. Hildebrandt TB. 2009. Ovarian superstimulation, transrectal ultrasound-guided oocyte recovery, and IVF in rhinoceros. Theriogenology. 72: 959-968.

Herrick JR. Bartels P. Krisher RL. 2004. Post thaw evaluation of *in vitro* function of epididymal spermatozoa from four species of free-ranging African bovinds. Biol. Reprod. 71: 948-958.

Hinrichs K. Williams KA. 1997. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. Biol. Reprod. 57: 377-384.

Hyttel P. 1987. Bovine cumulus-oocyte disconnection *in vitro*. Anat. Embryol. 176: 41-44.

Holy L. 1983. Bases biológicas de la reproducción bovina. 1ra. Ed. Editorial Diana México. p. 368-433.

Ho Y. Wigglesworth K. Eppig JJ. Schultz RM. 1995. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: Augmentation by amino acids and analysis of gene expression. Mol. Reprod. Dev. 42: 232-238.

Hood CS. Smith JD. 1983. Histomorphology of the female reproductive tract in phyllostomid bats. Occasional Papers. The Museum Texas Tech University. 86: 1-38.

Hoodbhoy T. Talbot P. 1994. Mammalian cortical granules: Contents, fate and function. Mol. Reprod. Dev. 39: 439-448.

Hoodbhoy T. Joshi S. Boja ES. Williams SA. Stanley P. Dean J. 2005. Human sperm do not bind to rat zona pellucida despite the presence of four homologous glycoproteins. J. Biol. Chem. 280: 12721-12731.

Hoshi H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. Theriogenology. 59: 675-685.

Holstein AF. Schulze W. Davidoff M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reprod. Biol. Endocrinol. 1: 107.

Iwata H. Hashimoto S. Ohta M. Kimura K. Shibano K. Miyake M. 2004. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. Reproduction, 127: 159-164.

Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática, Anuario Estadístico del Estado de Morelos, Edición 2010.

IUCN. International Union for Conservation of Nature. Red list of threatened species. Version 2013.2. Available at www.iucnredlist.org. Accessed 10 January 2014.

Jayaprakash D. Patil BS. Kuman MN. Majumdar KC. Shivaji S. 2001. Semen Characteristics of the captive Indian leopard, *Panthera pardus*. J. Androl. 22(1): 25-33.

Jeyendran RS. Van der Ven HH. Perez-Pelaez M. Crabo BG. Zaneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertil. 70: 219-228.

Jones J. Carter J. 1976. Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. In Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae. Special Publications. The Museum Texas Tech University Press. 10: 1-218.

Jones JK. 1978. A new bat of the genus *Artibeus* from the Lesser Antillean Island of St. Vincent. Occasional Papers. The Museum Texas Tech University. 51: 1-6.

Johnston LA. Parrish JJ. Monson R. Leibfried-Rutledge L. Susko-Parrish JL. Northey DL. Rutledge JJ. Simmons LG. 1994. Oocyte maturation, fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the gaur (*Bos gaurus*). J. Reprod. Fertil. 100: 131-136.

Johnston SD. McGowan MR. Carrick FN. Cameron RDA. 1994. Tribe A. Seminal characteristics and spermatozoa morphology of captive Queensland koalas (*Phascolarctos cinereus adustus*). Theriogenology. 42: 501-511.

Johnston SD. Ward D. Lemon J. Gunn I. MacCallum CA. Keeley T. Blyde D. 2007. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). Anim. Reprod. Sci. 120: 338-355.

Jouannet P. Ducot B. Feneux D. Spira A. 1988. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples I. Study of sperm characteristics. Int. J. Androl. 11: 379-394.

Jui-Te W. Kai-Chieh C. Feng-Pang C. 2006. Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 93: 34-45.

Jurema MV. Nogueira D. 2006. *In vitro* maturation of human oocytes for assisted reproduction. Fertil. Steril. 86(5): 1277-1289.

Kaneko T. Fukumoto K. Haruguchi Y. Kondo T. Machida H. Koga M. Nakagawa Y. Tsuchiyama S. Saiki K. Noshida S. Nakagata N. 2009. Fertilization of C57BL/6 mouse sperm collected from cauda epididymis after preservation of transportation at 4°C using laser-microdissected oocytes. Cryobiology. 59: 59-62.

Kandiel M. Watanabe G. Jun Y. Manabe N. El Salam A. Azab E. Taya K. 2008. Physiological roles of inhibin in regulation of FSH secretin and follicular development during early pregnancy in goats. Dom. Anim. Endocrinol. 35: 157-163.

Karja NW. Wongsrikeao P. Murakami M. Agung B. Fahrudin M. Nagai T. Otoi T. 2004. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. Theriogenology. 62: 1585-1595.

Katska-Ksiazkiewicz L. Opiela J. Ryńska B. 2007. Effect of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocysts production in goats. Theriogenology. 68: 736-744.

Kea B. Gebhardt J. Watt J. Westphal ML. Lathi BR. Milki AA. Behr B. 2007. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of *in vitro* fertilization. Fertil. Steril. 87: 213-216.

Keast L. Handley CO. 1991. Reproduction on a captive colony. In Demography & Natural History of the Common Fruit Bat, *Artibeus jamaicensis* in Barro Colorado Island, Panama. Smithsonian Institution Press. Washington D.C. p. 19-42.

Kelly EP. 1971. An examination of ovulation ratio in naturally ovulating and induced inbred and outbred mice. J. Reprod. Fertil. 26:271-273.

- Kidson A. Loskutoff NM. Raath C. Wood CA. Williams KR. van Schalkwyk JO. Dyché WK. Barry DM. Bartels P. 1995. Age- and parity-dependent differences in ovarian activity and oocyte maturity in the African elephant (*Loxodonta Africana*). *Theriogenology* 43: 246.
- Kirsher RL. Lane M. Bavister BD. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultures in semi-defined and defined culture media. *Biol. Reprod.* 60: 1345-1352.
- Kubish HM. Gagliardi C. Williams VM. Ribka EP. Ratterree MS. 2006. *In vitro* fertilization in the pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). *Theriogenology*. 66: 749-754.
- Kunz TH. 1992. *Ecology of bats*. Plenum Publishing Corporation. New York. 425.
- Kuran M. Robinson JJ. Staines ME. McEvoy TG. 2001. Developmental and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced in vitro in different culture systems. *Theriogenology*. 55: 593-606.
- Krutzsch PH. Crichton EG. 1985. Observations on the reproductive cycle of female *Molossus fortis* (Chiroptera: Molossidae) in Puerto Rico. *J. Zoology*. 207: 137-150.
- Ladda S. Bogliolo L. Calvia P. Leoni G. Naitana S. 1997. Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J. Reprod. Fertil.* 109: 73-78.
- Lalli M. Clermont Y. 1981. Structural changes in the head component of the rat spermatid during late spermatogenesis. *Am. J. Anat.* 160: 419-434.
- Lambert H. 1981. Temperature dependence on capacitation in bat sperm monitored by zona-free bat ova. *Gamete Res.* 4(6): 523-533.
- Larsen WJ. Wert SE. Chen L. Russell P. Hendrix EM. 1991. Expansion of the cumulus-oocyte complex during the preovulatory period: Possible roles in oocyte maturation, ovulation and fertilization. In: Familiari G. Makabe S. Motta PM. (Eds.). *Ultrastructure of the Ovary*. Kluwer Academic Publishers, Boston. p. 45-61.
- Larsen L. Scheike T. Jensen TK. Bonde JP. Ernst E. Hjollund NK. Zhou Y. Shakkebaek N. Giwercman A. 2000. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish first pregnancy planner study team. *Hum. Reprod.* 15: 1562-1567.
- Laufer N. Tarlatzis BC. DeChernev AH. Masters JT. Haseltine FFP. MacLusky N. Naftolin F. 1984. Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 42: 366-372.
- Lawrence JL. Payton RR. Godkin JD. Saxton AM. Schrick FN. Edwards JL. 2004. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. *J. Dairy Sci.* 87: 2449-2454.
- Leach W.E. 1821. The characters of seven genera of bats with foliaceous appendages to the nose, vol. 13. *The Transactions of the Linnean Society of London*. p. 73-82.
- Lee JD. Kamiguchi Y. Yanagimachi R. 1996. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum. Reprod.* 11: 1942-1946.
- Lefievre 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.
- Leibfried L, First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 47: 76-86.
- Leibfried-Rutledge ML. Critser ES. First NL. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocytes complexes. *Biol. Reprod.* 35: 850-857.

- León MP. 2004. Estudio preliminar de los patrones reproductivos de *Dermanura phaeotis* y *Artibeus intermedius* (Chiroptera: Phyllostomidae) en petenes del noroeste de la Península de Yucatán, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Lim CC, Lewis SEM, Kennedy M, Donnelly ET, Thompson W. 1998. Human sperm morphology and *in vitro* fertilization: sperm tail defects are prognostic for fertilization failure. *Andrología*. 30:43-47.
- Li H.J., D.J. Liu, M. Cang, L.M. Wang, M.Z. Jin, Y.Z. Ma y B. Shorgan. 2009. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 114(1-3): 89-98.
- Liu Y, Li GP, Rickords LF, White KL, Sessions BR, Aston KI, Bunch TD. 2008. Effect of nicotine on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 103(1-2): 13-24.
- Llanos M.N, Anabalón M.C. 1996. Studies related to progesterone-induced hamster sperm acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 313-319.
- Locatelli Y, Cognié Y, Vallet JC, Baril G, Verdier M, Poulin N, Legendre X, Mermillod P. 2005. Successful use of oviduct epithelial cell coculture for *in vitro* production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos. *Theriogenology*. 64: 1729–1739
- Lopez-Gatius F. 1997. Transuterine sperm transport is not affected by bilateral asymmetry of the reproductive system in dairy cows. *Theriogenology*. 47:1319-1325.
- Lonergan T, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 37: 48-53.
- Longo FJ, Krohne G, Franke WW. 1987. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell. Biol.* 105: 1105-1120.
- Lösel R, Dorn-Beineke A, Falkenstein E, Wehling M, Feuring M. 2004. Porcine spermatozoa contain more than one membrane progesterone receptor. *Int. J. Biochemistry & Cell Biology*. 36:1532-1541.
- Loskutoff NM. 2003. Role of embryo technologies in genetic management and conservation of wildlife. In: Holt WV, Pickard AR, Rodger J, Wildt DE. (Eds.). *Reproductive Science and Integrated Conservation*. Cambridge University Press. New York. p. 183-195.
- Luconi M, Francavilla F, Porazii I, Macerola B, Forti G, Baldi E. 2004. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects progesterone and estrogens. *Steroids*. 69(8-9): 553-559.
- Luvoni GC, Keskintepe L, Brackett BG. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 43: 437-443.
- Madison V, Avery B, Greve T. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 27: 1-11.
- Macklon NS, Fauser B. 2000. Regulation of follicle development and novel approaches to ovarian stimulation for IVF. *Hum. Reprod Update*. 6: 307-312.
- Mahadevan, M. M. and Fleetham, J. 1990. Relationship of a human oocyte scoring system to oocyte maturity and fertilizing capacity, *Int. J. Fertil.* 35: 240–244.
- Mattioli M, Racci ML, Galeati G, Seren E. 1989. Development competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* . 31: 1201-1207.
- Mattioli M, Barboni B, Lucidi P, Seren E. 1995. Identification of capacitation in boar spermatozoa by Chlortetracycline staining. *Theriogenology*. 45: 373-381.

- Mattioli M. Barboni B. 2000. Signal transduction mechanisms for LH in the cumulus-oocyte complex. *Mol. Cell. Endocrinol.* 161: 19-23.
- Mares MA. Ojeda RA. Kosco MP. 1981. Observations on the distribution and ecology of the mammals of salta province, Argentina. *Annals of Camegie Museum.* 50: 151-206.
- Martin RH. Rademaker AW. Greene C. Ko E. Hoang T. Barclay L. Chernos J. 2003. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate and severe oligozoospermia. *Biol. Reprod.* 69: 535-539.
- Martínez AF. Martínez-Pastor F. Álvarez M. Fernández-Santos MR. Estes MC. de Paz P. Garde JJ. Anel L. 2008. Sperm parameters on Iberian red deer: Electroejaculation and post-mortem collection. *Theriogenology.* 70: 216-226
- McKiernan SH. Bavister BD. 1992. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2 cell embryos to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* 43: 404-413.
- McLeod J. Wang Y. 1979. Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertil. Steril.* 31: 103-116.
- McPartlin L.A. Littell J. Mark E. Nelson J.L. Travis A.J. Bedford S.J. 2006. Successful *in vitro* capacitation of stallion sperm in a defined medium. *Anim. Reprod. Sci.* 94: 168-169.
- Medellín RA. Arita HT. Sanchez O. 2008. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. 2da. Edición. Instituto de Ecología. UNAM. Pp. 79.
- Meintjes M. Bezuidenhout C. Bartels P. Visser DS. Meintjes J. Loskutoff NM. Fourie FL. Barry DM. Godke RA. 1997. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes recovered from free-ranging Burchell's zebra (*Equus burchelli*) and Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*). *J. Zoo Wildl. Med.* 28: 251-259.
- Melendrez C.S. Meizel S. Berger T. 1994. Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 39: 433-438.
- Menkveld R. 2010. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J. Androl.* 12:47-58.
- Menkveld R. Franken DR. Kruger TF. Ochninger S. 1991. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 30:346-352.
- Meyers SA. Overstreet JW. Liu IKM. Drobni EZ. 1995. Capacitation *in vitro* of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J. Androl.* 16(1): 47-54.
- Mikkelsen AL. Lindenberg S. 2001. Morphology of *in-vitro* matured oocytes: Impact on fertility potential and embryo quality. *Hum. Reprod.* 16: 1714-1718.
- Mikkelsen AL. 2005. Strategies in human *in-vitro* maturation and their clinical outcome. *Reprod. BioMedicine Online.* 10(5): 593-599.
- Motlik J. Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology.* 25(1): 87-96.
- Montes I. 1984. Incidencia de la espermeostasis y la calificación testicular en toros sementales. *Rev. Cubana Reprod. Anim.* 3(10): 69-73.
- Moor RM. Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes matured *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fertil.* 49: 101-109.
- Morato RG. Barnabe RC. 2002. Potencial de técnicas reproductivas para la conservación del jaguar. El jaguar en el Nuevo Milenio (Eds. Medellín RA. Equihua C. Chetkiewicz CL. Crawshaw PG. Rabinowitz A. Redford KH. Robinson JG. Sanderson EW. Taber AB). 43-53.

- Nagano M. Katagiri S. Takahashi Y. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zigote*. 14: 53:61.
- National Research Council. 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) of the National Academy of Science: Bethesda, MD).
- Neild D. Chaves G. Flores M. Mora N. Beconi M. Agüero A. 1999. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 51:721-727.
- Neild D.N. Gadella B.M. Agüero A. Stout T.A.E. Colenbrander B. 2005. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 89:47-56.
- Niemann H. Wrenzycki C. 2002. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology*. 53: 21-34.
- Niwa K, Chang MC. 1974. Optimal sperm concentration and minimum number of spermatozoa for fertilization *in vitro* of rat egg. *J. Reprod. Fertil.* 40:471-474.
- Niwa K. Oghoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*. 30: 733-741.
- Nottola SA. Makabe S. Stallone T. Familiari G. Macchiarelli G. Motta PM. 2001. *In vitro* fertilized human eggs. An electron microscopic study. *Ital. J. Anat. Embryol.* 106(Suppl 2): 75-83.
- Nowak R. 1991. Yellow-shouldered Bats, or Americanf Epauleted Bats. In Walker's Mammals of the World. Johns Hopkins University Press. Baltimore, MD. p. 299-300.
- O WS. Chow H. 1987. Asymmetry in the ovary and uterus of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Reprod. Fertil.* 80: 21-23.
- Oh SA. Park YJ. You YA. Mohamed EA. Pang MG. 2010. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. *Anim. Reprod. Sci.* 121: 133-138.
- Oliveira SF. Rasweiler IV JJ. Badwaik NK. 2000. Advanced oviductal development, transport to the preferred implantation site, and attachment of the blastocyst in captive-bred, short-tailed fruit bats. *Carollia perspicillata*. *Anat Embryol.* 201: 357-381.
- Ortega J. Castro-Arellano I. 2001. *Artibeus jamaicensis*. *Am. Soc. Mammal.* 662:1-9.
- Ortega J. Alarcón DI. 2008. *Anoura Geoffroy* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Am. Soc. Mammal.* 818: 1-7.
- Osman RA. Andria ML. Jones D. Meizel S. 1989. Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Bioche. Biophysical research communications.* 160(2):828-833.
- Oura C. 1971. The ultrastructure and development of the neck region of the golden hamster spermatozoon. *Monitore Zool. Ital.* 5: 253-264.
- Palta P. Monda S. Prakash BS. Madan ML. 997. Peripheral Inhibin levels in relation to climatic variations and stage of estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 47:989-995.
- Parapanov RN. Nusslé S. Crausaz M. Senn A. Hausser J. Vogel P. 2009. Testis size, sperm characteristics and testosterone concentrations in four species of shrews (Mamalia, Soricidae). *Anim. Reprod. Sci.* 114: 269-278.
- Parrish JJ. Susko-Parrish J. Winer MA. First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180.

- Park JL. Hong JY. Yong HY. Hwang WS. Lim JM. Lee ES. 2005. High oxygen tension during *in vitro* oocyte maturation improves *in vitro* development of porcine oocytes after fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 87: 133-141.
- Ptak G. Clinton M. Barboni B. Muzzeddu M. Cappai P. Tischner M. Loi P. 2002. Preservation of the wild European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biol.Reprod.* 66: 796–801.
- Patrat C. Serres C. Jouannet P. 2000. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Cell.* 92: 255-266.
- Pavlok A. Lucas-Hanh A. Niemann N. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31(1): 63-67.
- Pawshe CH. Palanisamy A. Taneja M. Jain SK. Totey SM. 1996. Comparison of various maturation treatments on *in vitro* maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell Lumber. *Theriogenology.* 46: 971-982.
- Peng XR. Hsueh AJ. Lapolt PS. Bjersing L. Ny T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinol.* 129:320-327.
- Phillips DM. 1972. Comparative analysis of mammalian sperm motility. *J. Cell. Biol.* 53: 561-573.
- Phillips DM. 1977. Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.* 58: 144-154.
- Phillips DJ. 2005. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Dom. Anim. Endocrinol.* 28:1-16.
- Pope CE. Lim J. Mikota S. Cochran R. Carter J. Godke R. Dresser B. 1998. Transvaginal oocyte retrieval and *in vitro* maturation, fertilization and culture in bongo antelope (*Tragelaphus euryceros*). *Biol. Reprod.* 58: 102.
- Pope CE. Loskutoff NM. 1999. Embryo transfer and semen technology from cattle applied to nondomestic artiodactylids. In: Fowler ME. Miller RE. (Eds.), *Zoo and Wildlife Medicine*. W.B. Saunders, Philadelphia, USA. p. 597–604.
- Pope CE. 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology.* 53: 163–174.
- Pound N. Javed MH. Ruberto C. Shaikh MA. Del Valle AP. 2002. Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Phys. Behav.* 76:685-689.
- Ponzio MF. Busso JM. Ruiz RD. de Cuneo MF. 2007. Time-related changes in functional activity and capacitation of chinchilla (*Chinchilla lanigera*) spermatozoa during *in vitro* incubation. *Anim. Reprod. Sci.* 102:343-349.
- Pugh PA. Fukui Y. Tervit HR. Thompson JG. 1991. Developmental ability of *in vitro* matured sheep oocytes collected during the non-breeding season and fertilized *in vitro* with frozen ram semen. *Theriogenology.* 36: 771-778.
- Pukazhenti BS. Wildt DE. 2004. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 33–46.
- Rasweiler JJ. 1988. Ovarian function in the captive black mastiff bat, *Molossus ater*. *J. Reprod. Fertil.* 82: 97-111.
- Rasweiler JJ. Badwaik NK. 2000. Anatomy and physiology of the female tranct. In: Crichton EG. Krutzsh PH. (Eds.). *Reproductive Biology of Bats*. Academic Press, London. p. 157-219.
- Rathi R. Colenbrander B. Bevers M.M. Gadella B.M. 2001. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.* 65: 462-470.
- Redford KH. Eisenberg JF. 1992. *Mammals of the Neotropics. The southern cone*. The University of Chicago Press. Illinois 2: 1-430.
- Revell SG. Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 77-86.

- Rinaudo P. Schultz R. 2004. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction*. 128: 301-311.
- Roberts SJ. 1971. *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases*. 2nd ed. Ann Arbor, Michigan: Edwards Brothers Inc. p. 717.
- Robson KS. Rouse GW. Pettigrew JD. 1997. Sperm ultrastructure of *Tarsius bancanus* (Tarsiidae, Primates): implications for primate phylogeny and the use of sperm in systematics. *Acta Zoologica*. 78(4): 269-278.
- Rodríguez AT. Arenas-Ríos E. León-Galván MA. 2010. El almacenamiento prolongado de espermatozoides en el epidídimo, adaptación que permite sincronizar el periodo de apareamientos en murciélagos. *ContactoS*. 78: 58-64.
- Rodríguez KF. Farin CE. 2004: Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 55-67.
- Rodríguez-Martínez H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68S: S138-S146.
- Rosado A. Hicks JJ. Reues A. Blanco I. 1974. Capacitation *in vitro* of rabbit spermatozoa with cyclic adenoside monophosphate and human follicular fluid. *Fertil. Steril.* 25: 821-824.
- Roth Z. Aroyo A. Yavin S. Arav A. 2008. The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle enclosed oocytes in mice. *Theriogenology*. 70: 887-897.
- Russell JB. Knezevich KM. Fabian K. Dickson JA. 1997. Unstimulated immature oocyte retrieval: early vesicular midfollicular endometrial priming. *Fertil. Steril.* 67: 616:620.
- Sabeur K. Edwards D.P. Meizel S. 1996. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 54:993-1001.
- Saeki K. Hoshi M. Liebfried-Rutledge ML. First NL. 1991. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* 44: 256-260.
- Sánchez C. Romero M. 1995. Murciélagos de Tabasco y Campeche: Una propuesta para su conservación. Cuadernos del Instituto de Biología 24. UNAM. p. 215.
- Sánchez-Hernández C. Chávez-Tapia CB. Rojas-Martínez A. 1990. Patrón reproductivo de *Artibeus jamicensis triomylus* (Chiroptera: Phyllostomidae) en la costa sur occidental de México. *Rev. Zool. ENEPI UNAM*. 2: 14-24.
- Sathananthan AH. 1985. Maturation of the human oocyte *in vitro*: Nuclear events during meiosis (an ultrastructural study). *Gamete Res.* 12: 237-254.
- Sathananthan AH. Bongso A. Ng SC. Ho J. Mok H. Ratman SS. 1990. Ultrastructure of preimplantation human embryos co-cultures with human ampullary cells. *Human Reprod.* 5: 309-318.
- Senger PL. 2003. Endocrinology of the male and spermatogenesis. In: Senger PL. (Ed.). *Pathways to pregnancy and parturition*. Current Conceptions. Washington. p. 214-240.
- Sharpe-Timss KL. Zimmer RL. 2000. Oocyte and pre-embryo classification. In: Brooks A. Jeffrey V. De Jonge. (Eds.). *Handbook of the assisted reproduction laboratory*. CRC Press Boca Raton, Florida.
- Shioya Y. Masuda H. Hanada A. Nakahara T. 1989. Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. *Gamete Res.* 83-91.
- Schramm RD. Bavister BD. 1995. A macaque model for studying mechanisms controlling oocyte development and maturation in human and non-human primates. *Hum. Reprod.* 14: 2544-2555.
- Silva MC. 1989. Evaluación de la capacidad reproductiva del macho bovino. FMVZ de Yucatán, Mérida. México.

- Silva A. Morato GR. Silva L. 2004. The potential for gamete recovery from no-domestic canids and felids. *Anim. Reprod. Sci.* 81:159-175.
- Simmons NB. 2005. An Eocene big bang for bats. *Science.* 307: 527-528.
- Sirard MA. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology.* 55: 1241-1254.
- Siriaronrat B. Comizzoli P. Songsasen N. Monfort , SL. Wildt, DE. Pukazhenth, BS. 2010. Oocyte quality and estradiol supplementation affect *in vitro* maturation success in the with-tailed deer (*Odoncoileus virginianus*). *Theriogenology.* 73:112-119.
- Slavik T. Fulka J. Goll I. 1992. Pregnancy rate after the transfer of sheep embryos originated from randomly chosen oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology.* 38: 749-756.
- Smith SD. Mikkelsen AL. Lindenberg S. 2000. Development of human oocytes matured *in vitro* for 28 or 36 h. *Fertil. Steril.* 73: 541-544.
- Somanath PR. Suraj K. Gandhi KK. 2000. Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *Small Rumin. Res.* 37: 279-286.
- Somanath PR. Gandhi KK. 2002. Expression of membrane associated non-genomic progesterone receptor(s) in caprine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 74:195-205.
- Son WY. Lee SY. Lim JH. 2005. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in *in vitro* maturation cycles. *Hum. Reprod.* 20: 3204-3207.
- Songsasen N. Yu IJ. Ratterree Ms. Van de Voort CA. Leibo SP. 2002. Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in Rhesus monkey oocytes. *Fertil. Steril.* 77: 818-825.
- Staigmiller RB. 1998. *In vitro* methods for production of viable embryos. *J. Anim. Sci.* 66 (Supp 2): 54-64.
- StatPoint Technologies, Inc. 2006. Statgraphics plus (statistical analysis program. Version 5.1. Warrenton, VA. EE.UU
- Steele KE. McClure N. Lewis S. 2000. A comparison of the morphology of testicular, epididymal, and ejaculated sperm from fertile men and men with obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.* 73(6):1099-1103.
- Stojkovic M. Machado SA. Stojkovic P. Zakhartchenko V. Hutzler P. Goncalves PB. Wolf E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol. Reprod.* 64: 904-909.
- Stoner K. 2001. Differential habitat use and reproductive patterns of frugivorous bats in tropical dry forest of northwestern Costa Rica. *Canadian J. Zool.* 79: 1626.
- Suikkari AM. Söderström-Anttila V. 2007. *In vitro* maturation of eggs: is it really useful?. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 21(1): 145-155.
- Summers MC. Bhatnagar RP. Lawitts JA. Biggers JD. 1995. Fertilization *in vitro* of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biol. Reprod.* 53: 431-437.
- Sun F. Bahat A. Gakamsky A. Girsh E. Katz N. Giojalas LC. Tur-Kaspa I. Eisenbach M. 2005. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum. Reprod.* 20: 761-767.
- Sutton-McDowall ML. Gilchrist RB. Thompson JG. 2004. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction.* 128: 313-319.

- Sutovsky P. Fléchon J. Fléchon B. Motlik J. Peynot N. Chesné P. Heyman Y. 1993. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol. Reprod.* 49: 1277-1287.
- Sutovsky P. Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: De Jonge CJ. Barratt CLR. (Eds.). *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration.* Cambridge University Press. UK. p. 1-31.
- Suwanpugdee A. Kornkeawrat K. Saikhun K. Siriaroonrat B. Tipkantha W. Doungsa-ard K. Sa-ardrit M. Suthunmapinatha P. Pinyopummin A. 2009. Semen characteristics and sperm morphology of serow (*Capricornis sumatraensis*). *Theriogenology.* 71: 576-585.
- Swanson WF. Paz RCR. Morais RN. Gomes MLF. Moraes W. Adania CH. 2002. Influence of species and diet on efficiency of *in vitro* fertilization in two endangered Brazilian felid the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology* 57:593.
- Taberner E. Morató R. Mogas T. Miró J. 2010. Ability of Catalanian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 118: 354-361.
- Tanghe S. Van Soom A. Nauwynck H. Coryn M. de Kruif A. 2002. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 414-424.
- Tatemoto, H., Terada, T., 1998. Involvement of cumulus cells stimulated by FSH in chromatin condensation and activation of maturation promoting factor in bovine oocytes. *Theriogenology.* 49:1007-1020.
- Thérien I. Manjunath P. 2003. Effect of Progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 69:1408-1415.
- Thompson JG. Simpson AC. Pugh PA. Donnelly PE. Tervit HR. 1992. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* 89: 573-578.
- Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA. 1991. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J. Reprod. Fertil.* 93:125-32.
- Travert C. Carreau S. Galeraud-Denis I. 2009. La capacitation *in vitro*. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37: 523-528.
- Trounson A. Wood C. Kausche A. 1994. *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocyte recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil. Steril.* 62: 353-362.
- Trounson AO. Anderiesz C. Jones G. 2001. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction.* 121: 51-75.
- Umaoka Y. Noda Y. Narimoto K. Mori T. 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 28-33.
- Van Soom A. Yuan YQ. Peelman LJ. de Matos DG. Dewulf J. Laevens H. de Kruif A. 2002. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology.* 57: 1453-1465.
- 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.
- Vasquez J.M. Martinez E.A. Martinez P. Garcia-Artiga C. Roca J. 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology.* 47: 913-922.
- Veck LL. 1988. Oocyte assessment and biological performance. *Ann. NY. Acad. Sci.* 541: 259-274.

- Veck LL. 1990. The morphological assessment of human oocytes and early conception. In: Keel BA. Webster BW. (Eds.). Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 353-359.
- Veck LL. 1991. Preembryo grading. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Vol. 2. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. p. 121-150.
- Villa RB. 1976. Los murciélagos de México. Su importancia en la economía y la salubridad, su clasificación, sistemática. Instituto de Biología. UNAM. México, D.F. p. 491.
- Wani NA. 2002. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization. Small Rum. Res. 44: 89-95.
- Wani NA. Wani GM. Khan MZ. Salahudin S. 2000. Effect of oocyte harvesting technique on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. Small Rum. Res. 36: 63-67.
- Warriach HM. Chohan KR. 2004. Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. J. Vet. Sci. 5: 247-251.
- Ward C.R. Storey B.T. 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. Dev. Biol. 104:287-296.
- Ward F. Enright B. Rizos D. Boland M. Longergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. Theriogenology. 57: 2105-2117.
- Watson AJ. Watson PH. Warmes D. Walker SK. Armstrong DT. Seamark RF. 1994. Pre implantation development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized ovine zygotes: comparison between co-cultured on oviductal epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. Biol. Reprod. 50: 715-724.
- Wassarman PM. Jovie J. Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. Nat. Cell. Biol. 3: E59-E64.
- Westphal LM. el DI. Shimizu S. Tadir Y. Berns MW. 1993. Exposure of human spermatozoa to the cumulus oophorus result in increased relative force as measured by a 760 nm laser optical trap. Hum. Reprod. 8:1083-1086.
- WHO. 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. p. 286.
- Wynn P. Picton HM. Krapez JA. 1998. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the number of human oocytes reaching metaphase II by *in-vitro* maturation. Human. Reprod. 3132-3138.
- Wild DE. Pukazhenthil B. Brown J. Monfort S. Howard JG, Roth T. 1995. Spermatology for understanding, managing, and conserving rare species. Reprod. Fertil Dev. 7: 811-824.
- Wirtu G. Pope CE. Paccamonti DL. Godke RA. Dresser BL. 2009. Ultrasonographic-guided retrieval and *in vitro* maturation of eland (*Taurotragus oryx*) and bongo (*Tragelaphus eurycerus isaaci*) antelope oocytes. Anim. Reprod. Sci. 111: 160-172.
- Wimsatt WA. 1979. Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. J. Reprod. Fertil. 56: 345-357.
- Witte T.S. Somi-Schäfer S. 2007. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 102:181-193.
- Wislochi GB. Fawcett DW. 1941. The placentation of the Jamaican bat (*Artibeus jamaicensis parvipes*). Anat. Record. 81: 307-317.
- Wolf DF. 1988. Analysis of embryonic development. In *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. Plenum Press, New York. p. 137-145.
- Wolf DP. Van de Voort CA. Meyer-Haas GR. Zelinski-Wooten MB. Hess DL. Baughman W. 1989. *In vitro* fertilization and embryo transfer in the rhesus monkey. Biol. Reprod. 41: 335-346.

- Wood TC, Wildt DD. 1997. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 110: 355-360.
- Wu JT, Chiang KC, Cheng FP. 2006. Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 93: 34-45.
- Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. 2005. Correlation between *in vitro* maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. Hum. Reprod. 20: 2097-2103.
- Yanagimachi R, Noda YD. 1970. Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. J. Ultrastruct. Res. 31: 465-485.
- Yanagimachi R. 1972. Fertilization of guinea pig eggs *in vitro*. Anatom. Rec. 174: 9-20.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neills J. (Eds.). The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York. p. 135-185.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Aneja MT, Bols PEJ, Presicce GA. 1998. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. Theriogenology. 49: 471-482.
- Yang YJ, Yan-jun Z, Yuan L. 2009. Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during *in vitro* maturation. Fertil. Steril. 92(1): 396.e1-396.e6.
- Yin H, Duffy DM, Gosden RG. Comparative maturation of cynomolgus monkey oocytes *in vivo* and *in vitro*. Reprod. Biol. Endocrinol. 4: 14.
- Yokoo M, Sato E. 2004. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. Int. Rev. Cytol. 235:251-291.
- Yudin AI, Gottlieb W, Meizel S. 1988. Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. Gamete Res. 20:11-24.
- Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Gamete Res. 23: 189-201.
- Xu KP, Greve T, Smith S, Hyttel P. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. Acta Vet. Scand. 27: 505-519.
- Xu KP, Heier R, Greve T. 1987. Dynamic changes of estradiol concentration in two culture systems for bovine oocyte maturation *in vitro*. Theriogenology. 27:245-255.
- Zamboni L, Stefanini M. 1971. The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. Anat. Rec. 169: 155-172.
- Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. 2000. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. J. Androl. 21: 145-153.
- Zou C.X, Yang Z.M. 2000. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. Theriogenology. 53:1477-1488.