



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**UNIÓN Y PENETRACIÓN A LA ZONA PELÚCIDA DE  
OVOCITOS DE PERRA CON ESPERMATOZOIDES CANINOS  
CAPACITADOS POR DIFERENTES TIEMPOS DE  
INCUBACIÓN: ESTUDIO CON ESPERMATOZOIDES  
REFRIGERADOS**

**KARLA PAOLA ACEVEDO CLAROS**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento De Fomento De  
La Producción Animal

**PROFESOR GUIA: MÓNICA DE LOS REYES S.**

**Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1060602**

**SANTIAGO - CHILE  
2008**

**Esta Memoria de Título fue financiada por el Proyecto Fondecyt 1060602.**

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Mónica De los Reyes, por su labor como profesora guía. Gracias por su disposición, apoyo y entrega de conocimiento que sin duda influyeron en el camino que seguiré a futuro.
- A Jaime Palomino por su amistad, inagotable paciencia y apoyo. En general, a todo el grupo de trabajo del Laboratorio de Reproducción Animal, quienes facilitaron la realización de esta memoria a través de la amistad, compañía y apoyo.
- A la I. Municipalidad de La Pintana, por su colaboración en la realización de esta tesis y en especial a todo el grupo de trabajo de la Unidad de Salud e Higiene Ambiental por su gran disposición.
- A mi familia por el apoyo incondicional. A mis padres, Elba Claros y Alexis Acevedo, por confiar en mí y por su entrega de amor, comprensión y orientación. Sin ustedes nada de esto hubiese sido posible.
- A todos mis amigos, quienes contribuyeron con su gran apoyo e inagotables consejos.

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
REFRIGERACIÓN DE SEMEN CANINO. ....	11
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y REACCIÓN ACROSÓMICA. ....	13
MADURACIÓN DE OVOCITOS CANINOS.....	16
INTERACCIÓN GAMÉTICA. ....	17
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>22</b>
A) OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES.....	22
B) ESPERMATOZOIDES FRESCOS.....	23
C) REFRIGERACIÓN/DESREFRIGERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES. ....	23
D) RECOLECCIÓN Y MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS CANINOS.....	23
E) CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y CO-INCUBACIÓN CON OVOCITOS MADURADOS <i>IN VITRO</i> .....	24
F) EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN.....	25
G) ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	27
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
ANÁLISIS DE LA FECUNDACIÓN CON ESPERMATOZOIDES FRESCOS Y REFRIGERADOS DE PERRO, MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA. ....	28
ANÁLISIS DE LA FECUNDACIÓN CON ESPERMATOZOIDES FRESCOS Y REFRIGERADOS DE PERRO, MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO. ....	32
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>43</b>

## ABSTRACT

Gamete interaction depends on the ability of sperm to undergo capacitation and acrosomal reaction, which are essential for fertilization. These processes can be affected by sperm cooling. The aim of this work, was to study the effect of capacitation time of chilled/rewarmed sperm on binding and penetration hability in *in vitro* matured oocytes in canines.

Semen was obtained from digital stimulation of five adult dogs, 9 ejaculates from the same dog were processed as a fresh control samples and as a chilled experimental samples. After routine evaluation, seminal plasma was removed by centrifugation and the sperm pellet restored in TRIS - egg yolk - citric acid - fructose extender and then chilled at 4 ° C for 24 hours, after that sperm samples were warmed at 37 ° C for 10 minutes and then centrifuged to remove the extender fresh samples were centrifugated. Fresh control samples were centrifuged and the sperm pellet restored in Fert Talp. Fresh (control) and chilled sperm, were incubated in Fert Talp for *in vitro* capacitation at room temperature (20 ° C) for 0 to 3 hours. At each time point either fresh or chilled/rewarmed sperm were co-incubated with *in vitro* matured oocytes, for 3 hours.

After co-incubation, oocytes were washed and then processed separately for scanning electron microscopy (SEM) and epifluorescencie microscopy evaluation. For SEM, a total of 318 oocytes (174 and 134 oocytes for fresh and chilled sperm, respectively) were assessed, consedering the binding and the penetration to the zona pellucida (ZP). For epifluorescence microscopy analysis a total of 466 oocytes (219 and 247 oocytes for fresh and chilled sperm, respectively) were assessed. Sperm binding at hte ZP

surface were evaluated as well as sperm penetration at different levels: ZP, perivitelline space or within the oocytes cytoplasm.

The results were analysed using a Logistics Binomial regression (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA). Data of *in vitro* fertilization with either fresh and chilled sperm with both SEM and epifluorescence microscopy, showed no significant difference neither the union nor the sperm penetration ( $p < 0.05$ ), through the different times of capacitation. Also, no significant differences were found ( $p < 0.05$ ), when the two types of sperm were compared considering the binding and penetration throughout different capacitation times.

In conclusion, fresh and chilled dogs sperm, capacitated *in vitro* for 0 to 3 hours, do not differ in their ability to bind to and penetrate the ZP of bitch oocytes matured *in vitro*.

## RESUMEN

La adecuada interacción de los gametos depende de la capacidad que tengan los espermatozoides de experimentar la capacitación y reacción acrosómica, procesos esenciales para la fecundación del ovocito y que pueden verse afectados por el proceso de refrigeración espermática. En este trabajo se estudió el efecto del tiempo de capacitación en espermatozoides refrigerados de perro, a través de la capacidad de unión y penetración a la zona pelúcida de ovocitos de perra madurados *in vitro*.

El semen se obtuvo de la estimulación digital a 5 perros adultos. Un total de 9 eyaculados provenientes de los mismos perros, fueron procesados como muestras frescas o refrigeradas. Posterior a la evaluación seminal, el plasma seminal fue retirado por centrifugación. Los espermatozoides frescos se resuspendieron inmediatamente en Fert Talp y los espermatozoides a refrigerar se resuspendieron en diluyente en base a TRIS - yema de huevo - ácido cítrico - fructuosa y se conservaron a 4°C por 24 horas, para luego ser mantenidos a 37°C por 10 minutos y posteriormente centrifugados para retirar el diluyente. Luego, los espermatozoides frescos (control) y refrigerados, fueron incubados en Fert Talp para capacitación *in vitro*, a temperatura ambiente (20°C) durante 0 a 3 horas y, posterior a cada tiempo de incubación, co-incubados con ovocitos madurados *in vitro*.

Posterior a la co-incubación, los ovocitos inseminados fueron lavados y luego procesados separadamente para ser examinados bajo microscopia electrónica de barrido (MEB) y microscopia de epifluorescencia. Para MEB, se evaluaron un total de 318 ovocitos (174 y 134 ovocitos para espermatozoides frescos y refrigerados, respectivamente). El análisis de MEB consideró un ovocito con espermatozoides unidos cuando fueron encontrados uno o más espermatozoides adheridos a la zona

pelúcida ovocitaria (ZP), y un ovocito con espermatozoides penetrados cuando se encontraron uno o más espermatozoides atravesando la ZP. Para la microscopia de epifluorescencia se evaluaron un total de 466 ovocitos (219 y 247 ovocitos para espermatozoides frescos y refrigerados, respectivamente), considerando un ovocito con espermatozoides unidos cuando se encontraron uno o más espermatozoides adheridos a la ZP y ovocito con espermatozoides penetrados cuando fueron encontrados uno o más espermatozoides atravesando la ZP, en el espacio perivitelino o dentro del citoplasma ovular.

Los resultados se analizaron mediante un procedimiento de Regresión Logística Binomial (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA). Tanto en MEB como en microscopia de epifluorescencia, los resultados de fecundación *in vitro* con espermatozoides frescos y refrigerados, no mostraron diferencias significativas en la unión ni en la penetración espermática ( $p \geq 0,05$ ), a través de los diferentes tiempos de capacitación. Asimismo, al comparar entre ambos tipos de espermatozoides, la unión y penetración en los diferentes tiempos de capacitación, no se evidenciaron diferencias significativas entre ellos ( $p \geq 0,05$ ).

En conclusión, los espermatozoides frescos y refrigerados caninos, capacitados *in vitro* durante 0 a 3 horas, no difieren en su capacidad para unirse y penetrar la ZP de ovocitos de perra madurados *in vitro*.



## INTRODUCCIÓN

El canino doméstico ha estado ligado al hombre durante siglos, diversificándose en muchas razas debido a mutaciones naturales, factores ambientales, y selección del hombre sobre características deseables. Esto ha generado diversas investigaciones en esta especie, dentro de ellas las que involucran el ámbito reproductivo. Los estudios reproductivos realizados en perros domésticos, además de ser necesarios en la misma especie, podrían extrapolarse a otros cánidos ayudando a la conservación de especies en peligro de extinción (Luvoni *et al.*, 2006).

La reproducción es esencial para la continuidad de las especie. Es así como la profundización de estos estudios, es necesaria para lograr desarrollar biotecnologías reproductivas como la criopreservación de espermatozoides, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*, inseminación artificial y otras más avanzadas como la transferencia nuclear o clonación (Farstad, 2000).

En el desarrollo de estas técnicas, la evaluación funcional de los gametos cobra importancia. La capacidad fecundante de los espermatozoides puede estudiarse a través de evaluaciones *in vitro* que permitan determinar directamente esta función, como la unión a la zona pelúcida (ZP), penetración a la ZP y fecundación *in vitro*, tanto en caninos (Mahi y Yanagimachi, 1976; Kawakami *et al.*, 1993; Hewitt y England, 1997; Hay *et al.*, 1997a,b; Mayenco-Aguirre y Pérez-Cortés, 1998; Ivanova *et al.*, 1999; Ström Holst *et al.*, 2000a,b; Peña *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Hermansson *et al.*, 2006; Palomino y De los Reyes, 2007; De los Reyes *et al.*, 2007) como en conejos (Parrish y Foote, 1986), ratones (Nishizono *et al.*, 2004), verracos (Marchal *et al.*, 2002), y toros (Fazeli *et al.*, 1993; De los Reyes y Barros, 2000), que pueden explicar diferentes aspectos de la interacción entre el espermatozoide y el

ovocito, lo que da una mejor valoración de la capacidad fértil del espermatozoide (Hermansson *et al.*, 2006).

La adecuada interacción de los gametos como la unión, penetración espermática a través de las cubiertas ovocitarias y la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, dependen de la capacidad que tengan los espermatozoides de experimentar la capacitación y reacción acrosómica (Yanagimachi, 1994; Brewis y Moore, 1997; Wassarman, 1999; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; De los Reyes y Barros, 2000).

La criopreservación (refrigeración y/o congelación) de espermatozoides presenta la ventaja de tener un mayor margen de tiempo para su utilización, a diferencia del semen fresco (Manosalva *et al.*, 2005). Sin embargo, la refrigeración y congelación tienen efectos negativos en la membrana plasmática de los espermatozoides y/o membrana acrosomal, lo que afectaría el normal desarrollo de la capacitación y por consiguiente, de la reacción acrosómica (Hay *et al.*, 1997a,b; Ström Holst *et al.*, 1998; Nishizono *et al.*, 2004; Watson, 2000; Manosalva *et al.*, 2005; Hermansson y Linde Forsberg, 2006; Palomino y De los Reyes, 2007). No obstante, a pesar que el daño acrosomal sería mayor en la congelación/descongelación de espermatozoides que en la refrigeración de ellos (Oettlé, 1986; England y Ponzio, 1996), se ha podido determinar que hay una disminución significativa de la viabilidad, expresada a través de la actividad mitocondrial e integridad de membrana, en los espermatozoides de perro refrigerados con respecto a los espermatozoides frescos, observándose también un aumento en la ruptura acrosomal en los espermatozoides refrigerados (Manosalva *et al.*, 2005).

Por otra parte, se ha descrito que la criopreservación acortaría el tiempo requerido para la capacitación de los espermatozoides (Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000). Ensayos con clortetraciclina (CTC), han mostrado que tanto espermatozoides caninos refrigerados y/o congelados, disminuirían en aproximadamente 2 horas el período de capacitación respecto a aquéllos frescos (Rota *et al.*, 1999). Así mismo, recientemente se ha visto que espermatozoides caninos refrigerados y/o congelados penetran un mayor porcentaje de ovocitos la primera hora de co-incubación gamética en comparación a espermatozoides frescos, lo que podría estar relacionado también, a un menor tiempo de capacitación en estas poblaciones (De los Reyes *et al.*, 2007)

Los tiempos utilizados *in vitro* para capacitar los espermatozoides podrían, por tanto, traducirse en diferencias en la unión y penetración del espermatozoide al ovocito y sus cubiertas. En el presente estudio, se evaluó el efecto del tiempo de capacitación en espermatozoides refrigerados de perro, a través de la capacidad de unión y penetración a la zona pelúcida de ovocitos de perra madurados *in vitro*.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### **Refrigeración de semen canino.**

Desde la primera inseminación artificial (I.A.) exitosa con semen canino refrigerado reportada por Harrop en 1954, se han descrito estudios en semen canino que han evaluado el efecto de la temperatura sobre la conservación del semen (Rota *et al.*, 1999; Ström Holst *et al.*, 2000b; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Ponglowhapan *et al.*, 2004; Verstegen *et al.*, 2005; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Hermansson *et al.*, 2006; De los Reyes *et al.*, 2007), influyendo en la mejora de las tasas de preñez, que varían desde un 45% hasta un 100% al utilizar semen refrigerado (Linde-Forsberg, 1995; Pinto *et al.*, 1999; Verstegen *et al.*, 2005), y que son más altas que con semen congelado/descongelado (Linde-Forsberg, 1991; Linde-Forsberg y Forsberg, 1993).

El objetivo de almacenar el semen utilizando el procedimiento de refrigeración, es preservar gametos a baja temperatura sin alcanzar el punto de congelación que induce cambios intracelulares más deletéreos, que afectan la potencial viabilidad y fertilidad posterior del espermatozoide (Iguer-ouada y Verstegen, 2001).

Si bien, la congelación de los espermatozoides causa un mayor daño que la refrigeración a 4°C (Oettlé, 1986; England y Ponzio, 1996), la disminución de la temperatura produce un deterioro de la calidad espermática, especialmente al prolongar el tiempo de almacenamiento (England y Ponzio, 1996; Hermansson *et al.*, 2006; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006).

Se ha descrito que los espermatozoides sometidos al proceso de refrigeración experimentan una disminución significativa de la motilidad (Rota *et al.*, 1999;

Manosalva *et al.*, 2005; Aurich, 2005; Hermansson *et al.*, 2006), integridad de la membrana plasmática (Ström-Holst *et al.*, 1998; Ponglowhapan *et al.*, 2004; Manosalva *et al.*, 2005; Aurich, 2005; Hermansson *et al.*, 2006), viabilidad e integridad del acrosoma (Oettlé, 1986; Manosalva *et al.*, 2005; Hermansson *et al.*, 2006), si se comparan con los espermatozoides frescos (Manosalva *et al.*, 2005; Hermansson *et al.*, 2006) y, por consiguiente, contribuye significativamente a la pérdida de su capacidad fecundante (Aurich, 2005). Además, como el espermatozoide maduro ha perdido la mayoría de sus organelos y la transcripción de DNA ha cesado, los mecanismos reparadores no son viables y el daño en la membrana plasmática espermática resulta en la pérdida irreversible de su funcionalidad (Eddy y O'Brien, 1994).

El paso más crítico para el espermatozoide es alcanzar la temperatura de almacenamiento, especialmente cuando se usa una tasa de refrigeración mayor a 3°C/min, ya que provocaría un daño específico de la membrana plasmática espermática conocido como “shock térmico o por frío” (Aurich, 2005). Sin embargo, la susceptibilidad a las bajas temperaturas varía de acuerdo a la especie. Una baja relación entre los ácidos grasos saturados e insaturados unidos a los fosfolípidos de membrana, condicionaría el grado de sensibilidad al “shock térmico” (Bouchard *et al.*, 1990); no obstante, en los espermatozoides caninos esta relación es cercana a 1, por lo que serían menos susceptibles en comparación a otras especies como la porcina (De los Reyes, 2004). Cross (1998), adjudica las variaciones individuales al “shock por frío” de diversos eyaculados caninos, a diferencias en el contenido de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides.

No obstante, la técnica de refrigeración es una alternativa prometedora para la convencional criopreservación de semen por congelación y es fácilmente adaptable para el uso clínico. Además, es particularmente útil para el envío de semen, donde los

costos de procedimientos y materiales son menores que al utilizar semen congelado (Iguer-ouada y Verstegen, 2001; Peña *et al.*, 2006).

Por otra parte, el semen refrigerado al ser mantenido en un medio diluyente a una temperatura de 4 a 6 °C (Aurich, 2005), posee una sobrevivencia de los espermatozoides considerablemente mayor comparados que aquéllos mantenidos a 4°C sin diluir (Linde-Forsberg, 1995; Rota *et al.*, 1995). Se ha descrito que la dilución de los espermatozoides antes de cualquier procedimiento *in vitro*, podría prevenir, en cierto grado, las alteraciones en la membrana plasmática del espermatozoide (Rota *et al.*, 1995) incluyendo la membrana acrosomal (Rota *et al.*, 1995; Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

Se han propuesto diferentes extensores para la preservación del semen canino (Pinto *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Iguer-ouada y Verstegen, 2001; Ponglowhapan *et al.*, 2004; Verstegen *et al.*, 2005) y la finalidad de cada uno de ellos es disminuir el daño provocado por el frío, protegiendo a los espermatozoides para preservar la motilidad y fertilidad en un cierto tiempo a través de la estabilización de la membrana y el suministro de sustratos energéticos, además de prevenir el efecto deletéreo del cambio de pH y osmolaridad (Brown, 1992). La yema de huevo o leche descremada que se adiciona a los diluyentes tiene una acción protectora de los espermatozoides disminuyendo el shock térmico, además de un efecto positivo en la integridad acrosómica (Iguer-ouada y Verstegen, 2001).

### **Capacitación espermática y Reacción Acrosómica.**

El espermatozoide que ha madurado en el epidídimo aunque puede moverse progresivamente, no posee la capacidad de fecundar un ovocito. Esta capacidad se

adquiere después de permanecer en el tracto reproductivo de la hembra por un cierto periodo de tiempo, variable entre las especies, donde el espermatozoide experimenta diversos cambios fisiológicos y bioquímicos, denominados colectivamente capacitación espermática (Austin, 1951; Chang, 1951; Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Kawakami *et al.*, 1998).

El cambio total durante la capacitación es un efecto combinado de múltiples modificaciones en las proteínas/glicoproteínas y componentes lipídicos de la membrana plasmática del espermatozoide, que incluyen modificaciones en los canales de iones (Yanagimachi, 1994), resultando en un incremento en la fluidez de membrana y remodelación de la superficie espermática (Storey, 1995; Breitbart, 2002).

Cuando ocurre la capacitación, el espermatozoide muestra una motilidad hiperactivada, caracterizada por ser menos lineal, pero más vigorosa que el espermatozoide recién eyaculado (Yanagimachi, 1994; Petrunkina *et al.*, 2003). Además de este cambio en el patrón de motilidad, los espermatozoides experimentan la reacción acrosómica (RA), considerada un prerrequisito para la penetración en la zona pelúcida y para la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994; Brewis y Moore, 1997; Wassarman, 1999; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; De los Reyes y Barros, 2000).

La RA incluye la fusión en múltiples puntos entre la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa subyacente, con la posterior fenestración, lo que permite que el contenido acrosomal se libere y exponga al medio (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996). Este proceso ocurre en las cercanías o en contacto con las cubiertas del ovocito y en espermatozoides de perros se ha observado que tanto los espermatozoides reaccionados como los no reaccionados, serían capaces

de unirse a la zona pelúcida de ovocitos caninos (Kawakami *et al.*, 1993; Palomino y De los Reyes, 2007). Los medios utilizados para el procesamiento de los espermatozoides deben, por lo tanto, prevenir alteraciones acrosómicas y preservar la capacidad del espermatozoide para efectuar una reacción acrosómica fisiológica cercana a las cubiertas del ovocito (Parrish y Foote, 1986; Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

La capacitación y RA de los espermatozoides mamíferos, puede ocurrir en ausencia de ovocitos, en condiciones *in vitro* adecuadas que imitan el ambiente fisiológico del tracto reproductivo de la hembra (Hewitt y England, 1997), induciendo a través de ciertos constituyentes específicos el proceso de capacitación. Entre estos compuestos están el calcio y albúmina sérica, además de sustancias energéticas como glucosa y piruvato (Sirivaidyapong *et al.*, 2000). La albúmina une al colesterol y así causa un descenso en la relación colesterol:fosfolípido de la membrana plasmática del espermatozoide, lo cual disminuiría la microviscosidad de la membrana, relajaría los fosfolípidos de membrana y permitiría aumentar así el influjo de calcio (Dow y Bavister, 1989; Yanagimachi, 1994; Cross, 1998; Sirivaidyapong *et al.*, 2000), importante, por ser la RA, un proceso calcio dependiente (Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

Se han descrito factores fisiológicos inductores de la RA *in vivo* e *in vitro*, donde se incluyen componentes de la zona pelúcida como la ZP3 (Kawakami *et al.*, 1993; Brewis *et al.*, 2001); glucosa (Mahi y Yanagimachi, 1976; Sirivaidyapong *et al.*, 2000); y la progesterona (Brewis *et al.*, 2001). Estos factores podrían activar al menos dos tipos de canales de calcio, ayudando al influjo de este ión (Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

Se ha descrito que los espermatozoides refrigerados y/o congelados caninos alcanzan el estado capacitado en un menor lapso que los espermatozoides frescos, cuando son incubados en medios capacitantes (Rota *et al.*, 1999; Manosalva *et al.*, 2005). Esto



supone que el espermatozoide después de ser criopreservado, podría ser funcionalmente diferente de la población de espermatozoides frescos, ya que exhibirían una reactividad de membrana equivalente a un espermatozoide capacitado (Ström Holst *et al.*, 2000b; Watson, 2000), en donde la composición de la bicapa lipídica se vería afectada por la tasa de enfriamiento, lo cual causaría que la membrana se encuentre más permeable al calcio y por tanto el mayor influjo de este ion ayudaría al inicio de la capacitación y en consecuencia la RA (Maxwell y Johnson, 1997; Green y Watson, 2001; De los Reyes, 2004). Esto, podría afectar la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados caninos, lo cual aun no ha sido investigado.

### **Maduración de ovocitos caninos.**

En perros, zorros y otros canidos, a diferencia de las otras especies de mamíferos, el ovocito es ovulado como ovocito primario, en el estado de vesícula germinativa (VG), y no como ovocito secundario, en estadio de Metafase II (MII) (Reynauld *et al.*, 2005; Luvoni y Chigioni, 2006; Songsasen y Wildt, 2007). El reinicio meiótico ocurre en el oviducto y es completada 48 a 72 horas después de la ovulación (Tsutsui, 1989; Yamada *et al.*, 1993; Luvoni *et al.*, 2005; De los Reyes *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2005, 2006), en presencia de una alta concentración de progesterona (Concannon *et al.*, 1989; Reynauld *et al.*, 2005).

La maduración de los ovocitos, es un proceso altamente coordinado que incluye cambios morfológicos, ultraestructurales y transcripcionales del compartimiento citoplasmático y nuclear del ovocito (Luvoni *et al.*, 2005), requisitos para una adecuada fecundación y posterior desarrollo embrionario (Wassarman, 1988; Yamada *et al.*, 1992; Hewitt y England, 1999; Farstad, 2000).

Es por esto que, un sistema de maduración *in vitro* debe sustentar los cambios dinámicos requeridos para la maduración de todos los componentes del complejo cúmulo-ovocito (COC), por lo que estos sistemas necesitan estar basado en las condiciones *in vivo* para crear un microambiente similar al que ocurre fisiológicamente (Luvoni *et al.*, 2005; Luvoni y Chigioni, 2006).

### **Interacción Gamética.**

Durante el proceso de fecundación, se requieren tres acontecimientos críticos: a) el paso del espermatozoide a través de las células del cúmulo; b) la unión espermática a la ZP y su penetración y c) la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y la del ovocito, con la consiguiente entrada del espermatozoide al citoplasma ovular (Wassarman, 1999; Barros *et al.*, 1996; Wassarman *et al.*, 2001; Howes y Jones, 2002).

Las interacciones ovocito – espermatozoide en el perro, como en otras especies, tienen más probabilidades de ocurrir cuando las células del cúmulo están presentes (Mastromonaco *et al.*, 2002). Existe evidencia que indica que los espermatozoides de mamíferos podrían ser atraídos al ovocito por péptidos quimioatrayentes emitidos por las células del cúmulo, en vez de simplemente, por un encuentro fortuito (Eisenbach, 1999; Eisenbach y Tur-Kaspa, 1999).

El ovocito, además, está rodeado por una matriz glicoproteica extracelular, la zona pelúcida, que jugaría un importante rol durante la foliculogénesis, ovulación, fecundación y transporte embrionario (Wassarman, 1999). La zona pelúcida esta compuesta por tres glicoproteínas principales, convencionalmente conocidas como ZP1, ZP2 y ZP3, aunque también han sido denominadas como ZPA, ZPB y ZPC en caninos (Harris *et al.*, 1994). En la especie canina, estudios de la expresión de las

proteínas de la zona pelúcida durante la foliculogénesis, han demostrado que el ovocito sería responsable de la síntesis de ZPA y que las células foliculares sintetizarían ZPB y ZPC (Harris *et al.*, 1994).

Una vez unido a la ZP3, el espermatozoide inicia la penetración de la zona pelúcida. Es posible que la glicoproteína ZP2 actúe como un receptor secundario para la fijación del espermatozoide durante su paso a través de esta cubierta (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000). Una vez que el espermatozoide ha atravesado la zona pelúcida, cruza el espacio perivitelino y por la región ecuatorial de su membrana plasmática, se une con la membrana plasmática del ovocito. Posteriormente, ambas membranas se fusionan y el espermatozoide es incorporado al ovocito (Yanagimachi, 1994; Barros, *et al.*, 1996; Flesh y Gadella, 2000).

Debido a que la perra es receptiva a la cruce desde el momento del alza de LH, el que ocurre 36 a 50 horas antes de la ovulación (Concannon *et al.*, 1989), podría ocurrir que los espermatozoides se encuentren con el ovocito canino en estado inmaduro en el oviducto. En estudios previos *in vitro* (Mahi y Yanagimachi, 1976; Hewitt y England, 1997), los espermatozoides podrían penetrar ovocitos en estado inmaduro. No obstante, se ha descrito que a pesar que los ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* pueden ser penetrados por espermatozoides frescos y criopreservados (refrigerados y/o congelados), habría mayores porcentajes de penetración espermática al utilizar ovocitos madurados *in vitro* y, por lo tanto, serían más apropiados para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides frescos y criopreservados. (De los Reyes *et al.*, 2007)

Si bien la criopreservación prolonga la disponibilidad de los espermatozoides para ser utilizados en la inseminación artificial y programas de fecundación *in vitro*, el avance de

estas técnicas en la especie canina no ha alcanzado un desarrollo equivalente a lo logrado en otros animales, por lo que se requieren aun más investigaciones en esta área. El semen canino se ve afectado por el procedimiento de almacenamiento a bajas temperaturas, lo que se refleja entre otras cosas, por el menor tiempo requerido para el proceso de capacitación al compararlo con el semen fresco. Sin embargo, aun no ha sido estudiado cual sería el tiempo requerido por estos espermatozoides para unirse y penetrar la ZP de ovocitos de perra. En este trabajo se investigó, a través de microscopia de epifluorescencia y electrónica de barrido, el tiempo requerido para la capacitación espermática cuando los espermatozoides son criopreservados a 4°C, evaluados según su capacidad de unión y penetración a la ZP de ovocitos madurados *in vitro*.

## HIPÓTESIS

La refrigeración provocaría cambios en el proceso de capacitación, específicamente en el tiempo requerido por este proceso, que se traducirían en diferencias significativas en la unión y penetración espermática al ovocito y sus cubiertas durante la fecundación *in vitro* en caninos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar en espermatozoides caninos refrigerados, preincubados por diferentes tiempos en un medio inductor de la capacitación, la unión y la penetración a la zona pelúcida de ovocitos de perra.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar diferentes tiempos de capacitación en espermatozoides caninos refrigerados de acuerdo a su capacidad de unión y penetración a ovocitos caninos madurados *in vitro*.
- Evaluar a nivel ultraestructural la unión y penetración a la zona pelúcida de ovocitos caninos sometidos a maduración *in vitro* por espermatozoides refrigerados y frescos.

## MATERIAL Y MÉTODO

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **a) Obtención de espermatozoides.**

El semen se obtuvo en copas previamente mantenidas a 37°C, a través de estimulación digital a 5 perros adultos, de diferentes razas, clínicamente sanos, pertenecientes a privados. Se utilizaron un total de 6 eyaculados para el análisis de la interacción gamética con microscopía de epifluorescencia y 3 eyaculados para el análisis con microscopía electrónica de barrido. Cada eyaculado se procesó separadamente como una réplica experimental, utilizándose la segunda fracción espermática.

En cada eyaculado se evaluó volumen seminal, motilidad progresiva en forma subjetiva mediante microscopía de contraste de fases y concentración espermática a través de recuento en la cámara de Neubauer, de acuerdo a las técnicas establecidas en el laboratorio. Se utilizaron sólo muestras de semen cuya motilidad progresiva fue mayor a 70%.

De cada eyaculado, el semen fue dividido y una de las partes utilizada como muestra de espermatozoides refrigerados y la otra como muestra de espermatozoides frescos (control). El plasma seminal se eliminó previa centrifugación a 700 x G por 5 minutos en buffer TRIS en proporción 2:1 (TRIS: Semen).

### **b) Espermatozoides Frescos.**

El pellet, obtenido en la centrifugación, fue resuspendido en Medio Fert Talp (Parrish *et al.*, 1988) para lograr una concentración de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

### **c) Refrigeración/Desrefrigeración de espermatozoides.**

El pellet fue resuspendido en el diluyente de refrigeración (TRIS 249 mM, Ácido cítrico 88.4 mM, Fructosa 69.3 mM, Yema de huevo 20%, Bencil penicilina 2.8 mM y Sulfato Dihidroestreptomicina 0.68 mM), en cantidad suficiente para obtener una concentración de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. El tubo con los espermatozoides diluidos se colocó dentro de un vaso precipitado con agua a temperatura ambiente, el que se llevó al refrigerador a 4°C.

Luego de 24 horas de refrigeración, las muestras fueron entibiadas a 37°C por 10 minutos y centrifugadas a  $300 \times G$  por 5 minutos para extraer el diluyente. El pellet fue resuspendido en medio Fert Talp en cantidad suficiente para obtener una concentración final de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/ mL., de igual forma que en las muestras frescas.

La motilidad espermática se evaluó en forma subjetiva mediante microscopio de contraste de fases en las diferentes etapas del procedimiento.

### **d) Recolección y maduración *in vitro* de ovocitos caninos.**

Se obtuvieron ovarios de perras adultas (1 – 6 años de edad) sanas, de diferentes razas, ovariectomizadas en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la I. Municipalidad de La Pintana, y luego transportados al laboratorio en solución salina (Cloruro de Sodio al 0.9%), suplementada con 100 U.I./mL de Penicilina y 50 µg/mL de Estreptomicina (Sigma), a 38°C.



En el laboratorio, los ovarios se depositaron en medio PBS (buffer fosfato salino) donde se maceraron con hojas de bisturí y tijeras finas, para así liberar del parénquima ovárico los complejos cúmulo-ovocito (COC's). Sólo fueron seleccionados los ovocitos de mayor tamaño, que poseían un citoplasma homogéneo y oscuro, y que estuviesen rodeados completamente por al menos tres capas de células del cúmulo (Hewitt y England, 1997). Los COC's seleccionados se incubaron en medio de cultivo TCM 199, suplementado con 10% suero fetal bovino, 2.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de solución piruvato (11.2 mg/mL de ácido pirúvico), 10 UI/mL gonadotrofina coriónica humana (hCG, Sigma) y 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de solución antibiótica (12.2 mg/mL de penicilina y 20 mg/mL de Estreptomicina, Sigma), de acuerdo a lo descrito en De los Reyes *et al.* (2005).

Los ovocitos fueron incubados por 72 horas en gotas de 100  $\mu\text{L}$  del medio de maduración descrito anteriormente, en una cantidad de 10 a 12 ovocitos por gota, bajo aceite mineral estéril (Sigma) a 38.5°C, 5% de  $\text{CO}_2$  y máxima humedad.

Luego del período de maduración *in vitro*, los COC's se mantuvieron en gotas de 100  $\mu\text{L}$  del medio Fert Talp, previamente adaptado en la estufa de cultivo, hasta la coincubación con los espermatozoides.

#### **e) Capacitación espermática y co-incubación con ovocitos madurados *in vitro*.**

Las muestras espermáticas desrefrigeradas y frescas en el medio Fert-Talp, se mantuvieron a temperatura ambiente (20 – 22°C) por periodos de 0, 1, 2 y 3 horas (T0, T1, T2 y T3, respectivamente) para capacitación espermática.

Posterior a cada período se tomaron gotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra espermática, las que fueron depositadas en cápsula de cultivo (Falcon 3001), adicionándoles por cada gota 10 a 12 ovocitos, previamente madurados *in vitro* y adaptados en la estufa de cultivo en mismo medio Fert-Talp.

Las gotas con los espermatozoides y ovocitos, fueron cubiertas con aceite mineral estéril en cápsulas Falcon y se dejaron en co-incubación por un periodo de 3 horas en la estufa de cultivo a 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y máxima humedad.

#### **f) Evaluación de la fecundación.**

Los ovocitos co-incubados con los espermatozoides capacitados en los diferentes tiempos, se procesaron separadamente para la evaluación de la penetración espermática mediante microscopia electrónica de barrido (MEB) y microscopia de epifluorescencia. Se utilizaron los microscopios LEO 1420 VP y Nikon Optiphot 2 equipado con epifluorescencia, de la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

#### Microscopia Electrónica de Barrido (MEB):

Para la MEB se utilizaron muestras espermáticas de 3 donadores, con un total de 3 replicas para cada tipo de espermatozoide, refrigerado y fresco (control).

Los ovocitos inseminados se prepararon para la MEB, según la técnica descrita por Barros *et al.* (1984). Brevemente, los ovocitos fueron fijados en una solución de glutaraldehído al 2.5% preparado en buffer cacodilato 0.05 M, pH 7.4, por 3 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las muestras se lavaron en buffer cacodilato. Posteriormente, los ovocitos se depositaron en cámaras de bronce, las cuales fueron selladas con grillas de cobre de 400 mesh, para permitir el flujo de los diferentes solventes. Las muestras se deshidrataron en una batería de acetona de concentraciones crecientes (30, 50, 70, 90 y 100%) y luego fueron secadas a punto crítico de CO<sub>2</sub>. Las muestras se cubrieron posteriormente, con una fina película de oro paladio utilizando un equipo Sputter Pelco 91000. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido LEO 1420 VP.

Se consideró un ovocito unido cuando se encontraron espermatozoides adheridos a la zona pelúcida ovocitaria (ZP), y un ovocito penetrado cuando se encontraron espermatozoides en proceso de penetración de la ZP.

#### Microscopia de Epifluorescencia:

Para la microscopia de epifluorescencia se utilizaron muestras espermáticas de 3 donadores, con un total de 6 replicas para cada tipo de espermatozoide, refrigerado y fresco (control).

Los ovocitos inseminados con cada grupo espermático (de acuerdo a los diferentes tiempos: T0, T1, T2 y T3), se limpiaron de las células del cúmulo mediante pipeteo fino y se montaron entre porta y cubre objeto separados por dos hilillos de vaselina sólida. Se fijaron por 5 minutos en una solución de metanol, ácido acético y cloroformo en una proporción de 6:3:1 (De los Reyes *et al.*, 2005). Las placas fueron traspasadas a una mezcla de metanol y ácido acético en proporción 3:1 y se incubaron a 4°C por 48 horas. Pasado este tiempo, las muestras fueron lavadas por 5 minutos en PBS y teñidas con yoduro de propidio (PI; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) en una concentración de 1 µg/mL en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente.

Luego, las muestras se lavaron dos veces, por 5 minutos cada una, en PBS y cubiertas en los bordes del cubre objeto con aceite de inmersión para evitar la desecación de la muestra. Éstas, se mantuvieron a 4°C en ambiente húmedo y oscuridad hasta su observación, las que fueron realizadas en un microscopio Nikon Optiphot 2 equipado con epifluorescencia. La excitación del colorante se realizó interponiendo un filtro de excitación de 540 nm (filtro G).

Se consideró un ovocito unido cuando se encontraron espermatozoides adheridos a la ZP y ovocito penetrado cuando fueron encontrados espermatozoides atravesando la zona pelúcida, en el espacio perivitelino o en el citoplasma ovular.

### **g) Análisis Estadístico.**

Las evaluaciones se analizaron, en forma independiente, a través de MEB y microscopia de epifluorescencia, utilizando espermatozoides frescos y refrigerados, siendo las variables consideradas como ovocitos unido y ovocito penetrado.

La unión y penetración espermática, en cada tiempo de capacitación y tipo espermático, fueron analizadas estadísticamente mediante Regresión Logística Binomial (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA).

El modelo estadístico estimado es igual a:

$$P = 1 / (1 + e^{-(b_0 + b_1 X_t + b_2 X_{tp})})$$

Donde:

P= Probabilidad de unión o penetración espermática

b<sub>0</sub>= Intercepto

b<sub>1</sub>X<sub>t</sub>= Tipo de muestra (refrigerada y fresca)

b<sub>2</sub>X<sub>tp</sub>= Tiempo de capacitación de los espermatozoides (0, 1, 2 y 3 horas)

Las diferencias con  $p \leq 0,05$  se consideraron significativas.

## RESULTADOS

### **Análisis de la fecundación con espermatozoides frescos y refrigerados de perro, mediante microscopia de epifluorescencia.**

Se analizaron un total de 466 ovocitos (n=466), de los cuales 219 fueron co-incubados con espermatozoides frescos y 247 con espermatozoides refrigerados, previa capacitación espermática *in vitro* durante 0, 1, 2 ó 3 horas. La evaluación incluyó espermatozoides unidos (Figura 1) y penetrados del total de ovocitos analizados (Figuras 2).

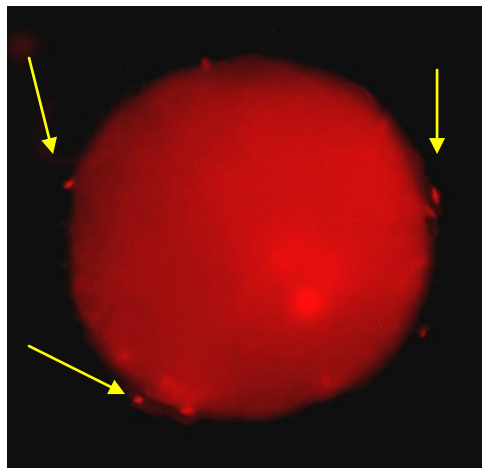


Figura 1: (x200); Ovocito madurado *in vitro* evaluado bajo microscopia de epifluorescencia. Se observan varios espermatozoides unidos a la ZP del ovocito (flechas).

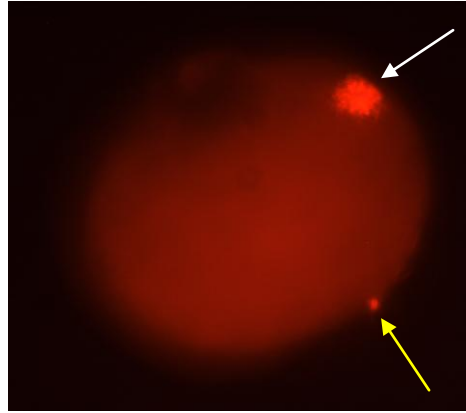


Figura 2: (x200) Ovocito con un espermatozoide penetrado en el citoplasma (flecha amarilla). Además se observa la placa metafásica, lo cual indicaría que el ovocito se encontraba al menos en metafase I (flecha blanca).

En los ensayos de fecundación *in vitro* con ovocitos de perra madurados *in vitro* e inseminados con espermatozoides frescos y refrigerados de perro, evaluados a través de microscopia de epifluorescencia, no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) en la unión ni en la penetración espermática, a través de los diferentes tiempos de capacitación.

Asimismo, al comparar entre ambos tipos de espermatozoides, la unión y penetración en los diferentes tiempos de capacitación no evidenciaron diferencias significativas entre ellos ( $p \geq 0,05$ ) (Tabla 1 y 2).

Capacitación (h)	Unión espermiática N° ovocitos/total (%)	Penetración espermiática N° ovocitos/total (%)
0	12/55 (21,8)	18/55 (32,7)
1	11/50 (22,0)	20/50 (40,0)
2	13/54 (24,1)	23/54 (42,6)
3	15/60 (25,0)	16/60 (26,7)

$p \geq 0,05$

Tabla 1: Número y porcentaje de ovocitos madurados *in vitro*, con espermatozoides frescos unidos y penetrados de acuerdo al tiempo que fueron capacitados, evaluados con microscopia de epifluorescencia.

Capacitación (h)	Unión espermiática N° ovocitos/total (%)	Penetración espermiática N° ovocitos/total (%)
0	17/51 (33,3)	20/51 (39,2)
1	9/58 (15,5)	20/58 (34,5)
2	15/61 (24,6)	22/61 (36,1)
3	21/77 (27,3)	22/77 (28,6)

$p \geq 0,05$

Tabla 2: Número y porcentaje de ovocitos madurados *in vitro*, con espermatozoides refrigerados unidos y penetrados de acuerdo al tiempo de capacitación de 0, 1, 2 y 3 horas.

Respecto a la penetración de los ovocitos, éstos se encontraron penetrados a nivel de la zona pelúcida (ZP), espacio perivitelino (EP) y en citoplasma. Se observó que tanto para espermatozoides frescos (Figura 3) como refrigerados (Figura 4), la mayor cantidad de espermatozoides penetrados se encontró en el citoplasma del ovocito, durante todos los tiempos de capacitación estudiados.

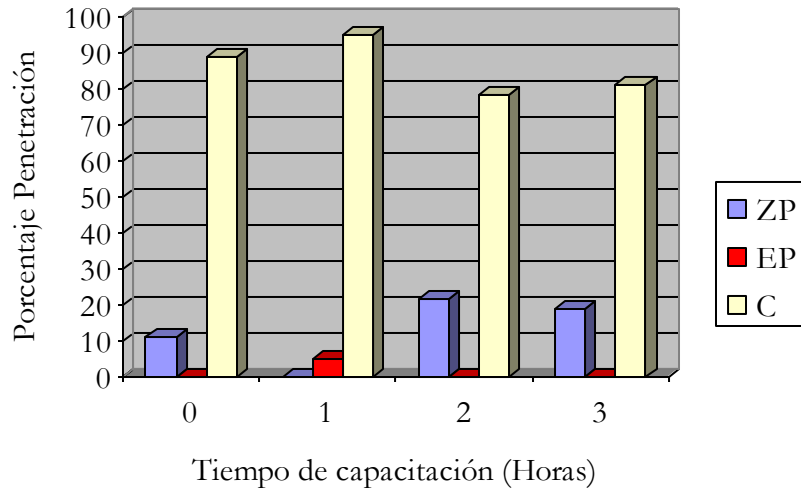


Figura 3: Porcentaje de penetración en los diferentes niveles evaluados, de espermatozoides frescos en ovocitos madurados *in vitro*, previa capacitación *in vitro* por diferentes tiempos.

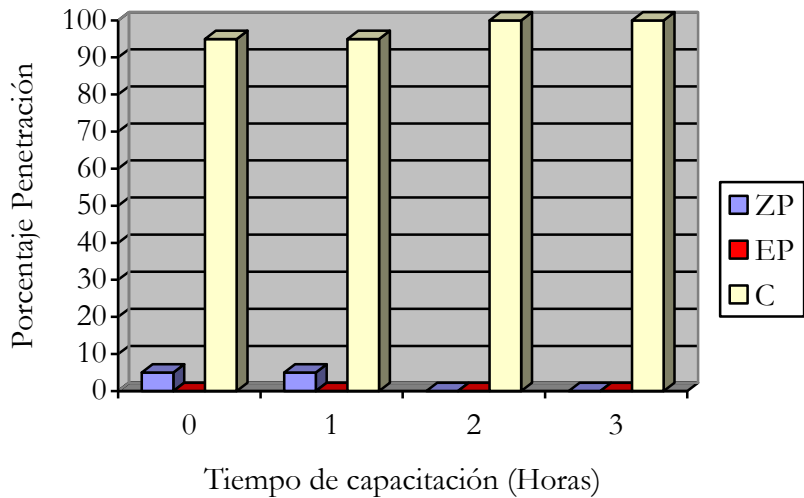


Figura 4: Porcentaje de penetración en los diferentes niveles evaluados, de espermatozoides refrigerados en ovocitos madurados *in vitro*, previa capacitación *in vitro* por diferentes tiempos.



## **Análisis de la fecundación con espermatozoides frescos y refrigerados de perro, mediante microscopía electrónica de barrido.**

Un total de 318 ovocitos madurados *in vitro* fueron evaluados de acuerdo a su unión (Figura 5) y penetración espermática (Figura 6) a través de la zona pelúcida. De éstos, 174 fueron co-incubados con espermatozoides frescos y 134 con espermatozoides refrigerados. Ambos tipos de espermatozoides fueron previamente capacitados durante 0, 1, 2 ó 3 horas.

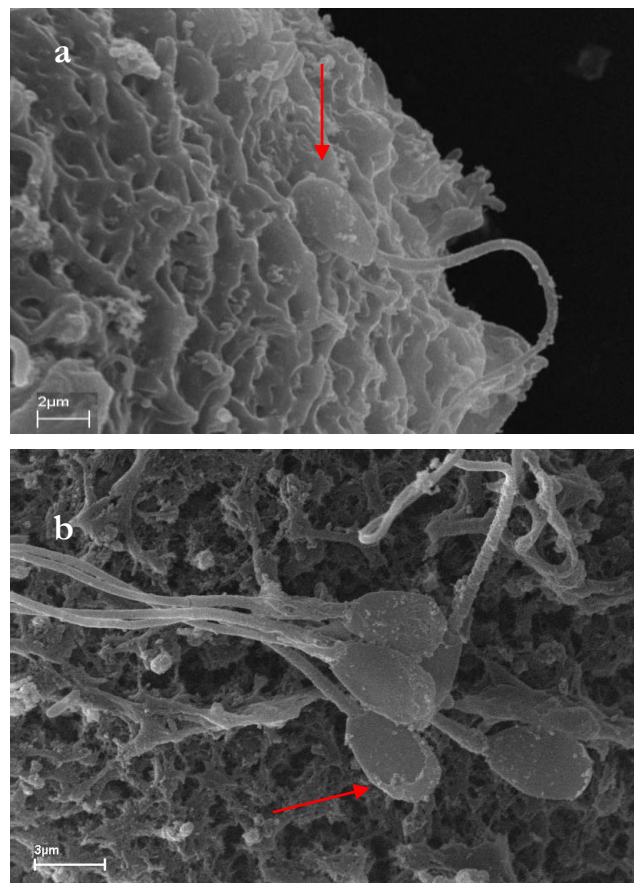


Figura 5: Ovocitos madurados *in vitro* observados bajo MEB con espermatozoides unidos a la ZP (flecha). Además, en la figura b es posible observar un espermatozoide con el borde del acrosoma reaccionado (flecha).

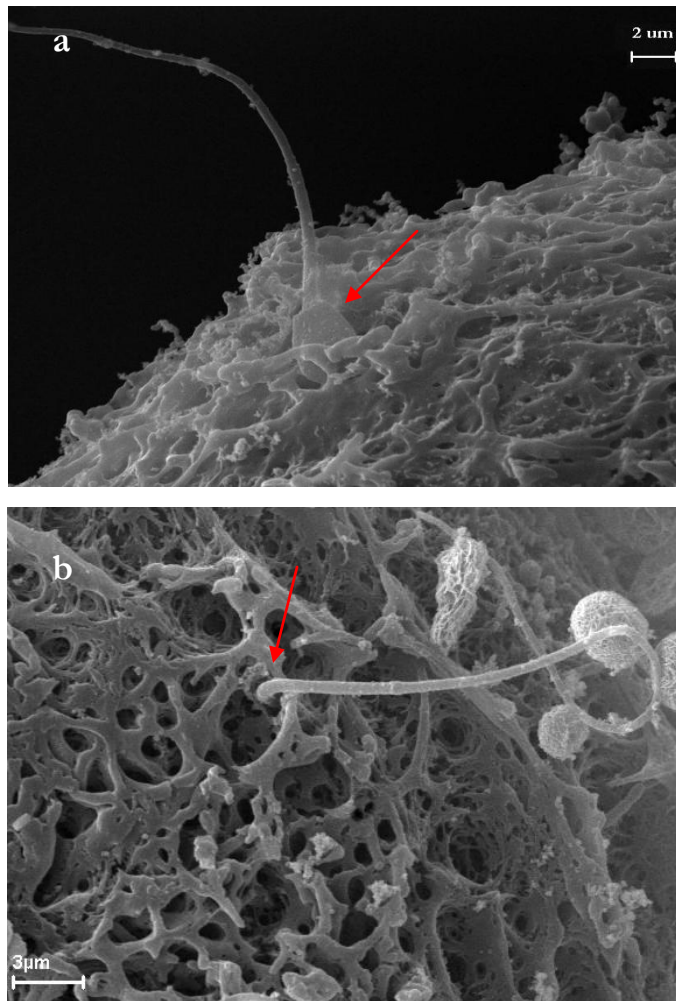


Figura 6: Ovocitos madurados *in vitro* observados bajo MEB con espermatozoides penetrados en la ZP (flecha).

En la interacción gamética de cada tiempo de capacitación evaluado, y utilizando tanto espermatozoides frescos como refrigerados, fue posible observar espermatozoides reaccionados y no reaccionados unidos a la zona pelúcida (Figura 5b).

Durante la co-incubación gamética con espermatozoides frescos y refrigerados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la unión y penetración a través de los diferentes tiempos de capacitación ( $p \geq 0,05$ ).

Además, al comparar ambos tipos de espermatozoides (refrigerados y frescos), los valores obtenidos en la unión y penetración en cada tiempo de capacitación, tampoco difieren significativamente ( $p \geq 0,05$ ) (Tablas 3 y 4).

Tiempo CE (h)	Nº Unidos/Total de ovocitos (%)	Nº Penetrados/Total de ovocitos (%)
0	7/41 (17,1)	6/41 (14,6)
1	8/45 (17,8)	10/45 (22,2)
2	7/42 (16,7)	13/42 (31,0)
3	12/46 (26,1)	13/46 (28,3)

$p \geq 0,05$

Tabla 3: Número y porcentaje de ovocitos madurados *in vitro*, con espermatozoides frescos unidos y penetrados a la zona pelúcida, a través de los diferentes tiempos de capacitación.

Tiempo CE (h)	Unión espermática Nº ovocitos/total (%)	Penetración espermática Nº ovocitos/total (%)
0	4/39 (10,3)	7/39 (17,9)
1	7/54 (13,0)	12/54 (22,2)
2	5/52 (9,6)	9/52 (17,3)
3	13/59 (22,0)	19/59 (32,2)

$p \geq 0,05$

Tabla 4: Número y porcentaje de ovocitos madurados *in vitro*, con espermatozoides refrigerados unidos y penetrados a la zona pelúcida, a través de los diferentes tiempos de capacitación.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se emplearon dos técnicas de microscopia para la evaluación de unión y penetración espermática: microscopia de epifluorescencia, y a nivel ultraestructural, MEB. Utilizando ambas técnicas, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la capacidad de unión y penetración en los diferentes tiempos de capacitación, tanto en espermatozoides frescos como refrigerados. La evaluación microscópica en gametos caninos, se ha visto dificultada por el alto contenido de lípidos que presenta el citoplasma del ovocito (Saint-Dizier *et al.*, 2004), es por ello la necesidad de utilizar técnicas específicas que permitan la adecuada visualización del ovocito y su interacción con el espermatozoide. El yoduro de propidio ha sido utilizada en la evaluación del material nuclear con microscopia de epifluorescencia en ovocitos de perra (Hewitt *et al.*, 1998; Saint-Dizier *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2005; Gutiérrez, 2006) y de los espermatozoides, haciendo más fácil su identificación en las diferentes estructuras ovocitarias durante la fecundación, como la ZP, espacio perivitelino o citoplasma del ovocito (De los Reyes *et al.*, 2006; Oberli, 2006; De los Reyes *et al.*, 2007). Por otro lado, la MEB permite observar las características morfológicas del ovocito, del espermatozoide y de su interacción gamética, determinando si un espermatozoide se encuentra unido a la zona pelúcida por la región de la cabeza o solamente se encuentra adherido por la cola u otra estructura. (Palomino, 2006) Del mismo modo, permite diferenciar a un espermatozoide que se encuentra unido a la zona pelúcida, de otro que la está penetrando (Palomino y De los Reyes, 2007). Por lo tanto, representa una mejor aproximación de la capacidad de unión y penetración a la zona, pudiendo comparar de manera eficiente la funcionalidad espermática.

La capacitación espermática es un evento gradual y esencial, que lleva a la RA del espermatozoide (Bedford, 1994; Yanagimachi, 1994; Jaiswal *et al.*, 1998) y por lo tanto, fundamental para la fecundación del ovocito. Además, es una condición que se ha descrito dependiente del tiempo y que difiere entre las especies (Kawakami *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994; Rota *et al.*, 1999; Petrunkina *et al.*, 2003). En este trabajo se demostró en caninos que la incubación por 0 a 3 horas en medio inductor de la capacitación espermática, previa al co-cultivo con los ovocitos, no afecta en forma significativa la capacidad de unión y penetración a los ovocitos, en ambos tipos de muestras.

En caninos, la capacitación se ha estudiado además, para optimizar las técnicas de fecundación *in vitro*. En los primeros trabajos de fecundación *in vitro* en esta especie utilizando semen fresco, se observó que la capacitación y penetración espermática a través de la ZP, ocurría 7 horas después de inseminados los ovocitos, en el momento en que los espermatozoides mostraban un movimiento hiperactivo (Mahi y Yanagimachi, 1976; 1978). Sin embargo, en estudios posteriores, se pudo establecer que la capacitación en espermatozoides frescos ocurriría más temprano, entre 3 y 4 horas (Shimazu *et al.*, 1992; Rota *et al.*, 1999; Guérin *et al.*, 1999). Yamada *et al.*, 1992 determinó que los espermatozoides frescos de caninos capacitados *in vitro* durante 4 -5 horas previa interacción gamética, comenzaban a penetrar la ZP a las 2 horas después de la co-incubación con ovocitos madurados *in vitro*. En el presente trabajo, fue posible observar espermatozoides unidos y penetrados, en ovocitos co-incubados con espermatozoides frescos y refrigerados al tiempo 0 de capacitación. Esto, concuerda con lo descrito por otros estudios los cuales al utilizar espermatozoides frescos y refrigerados sin previa capacitación, obtuvieron unión y/o penetración a la ZP de ovocitos desde la primera hora de co-incubación (Hermansson *et al.* 2006; De los Reyes *et al.* 2007).

Estudios en espermatozoides frescos (Gutiérrez, 2007) y refrigerados (Becker, 2007) de perro, en relación a la liberación de la enzima acrosomal, acrosina, la cual se ha asociado a la unión y penetración a la ZP en diversas especies (Valdivia *et al.*, 1994; De los Reyes y Barros, 2000), observaron liberación de esta enzima desde la primera hora de capacitación *in vitro*, sin embargo, los espermatozoides refrigerados experimentaron la mayor tasa de liberación de acrosina a la primera hora a diferencia de los espermatozoides frescos. Por otra parte, se ha descrito que los espermatozoides criopreservados (refrigerados y/o congelados) presentarían una mayor tasa de penetración espermática a la primera hora de la co-incubación gamética, al compararlos con espermatozoides frescos, evaluado a través de microscopia de fluorescencia (De los Reyes *et al.* 2007) o MEB (Palomino y De los Reyes, 2007).

La capacitación y penetración más temprana de los espermatozoides criopreservados, se ha asociado a que el proceso induciría cambios similares a los observados en espermatozoides capacitados (Watson, 1995; Rota *et al.*, 1999; Manosalva *et al.*, 2005; Palomino y De los Reyes, 2007; De los Reyes *et al.* 2007). Sin embargo, en este trabajo, al incubar los espermatozoides previo al co-cultivo con los ovocitos, los espermatozoides refrigerados no expresaron diferencias significativas en la unión y penetración espermática al compararlos con los espermatozoides frescos, en ninguno de los tiempos de capacitación estudiados. Este hecho podría atribuirse a que luego de cada período de capacitación *in vitro*, los ovocitos se co-incubaron independientemente con ambos tipos de espermatozoides durante 3 horas, por lo que es probable que durante este período los espermatozoides (especialmente los frescos) hayan continuado con el proceso de capacitación junto a los ovocitos. El medio utilizado en las co-incubaciones, Fert Talp, es capaz de inducir la capacitación de los espermatozoides y sustentar la interacción de los gametos (De los Reyes y Barros, 2000; Palomino y De los Reyes, 2007). Estos resultados concuerdan con lo obtenido al

capacitar *in vitro* espermatozoides caninos frescos por 1 a 3 horas y co-incubados con ovocitos madurados *in vitro* por el mismo tiempo empleado en este estudio, donde no se observó diferencias significativas en los porcentajes de penetración en los tres períodos de capacitación empleados (Oberli, 2006).

A través de diferentes pruebas de interacción gamética *in vitro*, se ha demostrado que el número de espermatozoides frescos unidos a la ZP (Ivanova *et al.*, 1999; Hermansson *et al.*, 2006) y el número de ovocitos penetrados por espermatozoides frescos es más eficiente que en los espermatozoides criopreservados (Hay *et al.*, 1997a; De los Reyes *et al.*, 2007; Palomino y De los Reyes, 2007). En este trabajo, los porcentajes alcanzados tanto en la unión como en la penetración a la ZP de ovocitos madurados *in vitro*, no mostraron diferencias significativas entre los espermatozoides frescos y refrigerados, en ninguno de los tiempos de capacitación estudiados (0, 1, 2 y 3 horas), lo que podría estar relacionado al tiempo de co-incubación, ya que en estudios previos se ha obtenido un incremento en la tasa de penetración espermática en función del tiempo de co-incubación hasta las 4 horas, en espermatozoides refrigerados y hasta las 7 horas en espermatozoides frescos (De los Reyes *et al.*, 2007). Al considerar en este trabajo, el tiempo utilizado en la capacitación (0 a 3 horas) más el tiempo de co-incubación gamética (3 horas), es posible que los espermatozoides frescos podrían haber aumentado la tasa de penetración a través del tiempo de co-cultivo, mientras que para los espermatozoides refrigerados este aumento pudo haber estado presente en la primera hora de co-cultivo. Al respecto, cabe señalar que la glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida es considerada un factor inductor de la reacción acrosómica *in vivo* e *in vitro* y una vez que el espermatozoide se une a este receptor, inicia la penetración de la zona pelúcida (Kawakami *et al.*, 1993; Brewis *et al.*, 2001). Además, es posible que los espermatozoides sometidos a capacitación *in vitro*, previa co-incubación gamética, pudiesen haber alcanzado el estado capacitado, experimentando la reacción

acrosómica antes de la interacción con los ovocitos, perdiendo por tanto, su capacidad fecundante al momento del co-cultivo. Estudios en relación a la liberación de acrosina durante la capacitación *in vitro* en espermatozoides de perro, han demostrado que la mayor liberación de acrosina en los espermatozoides criopreservados ocurre luego de 1 hora de capacitación en cultivo (Aretio, 2006) versus los espermatozoides frescos, donde la mayor liberación de acrosina ocurre a las 3 horas de capacitación (Gutiérrez, 2007).

Los porcentajes de penetración obtenidos con semen refrigerado, evaluados con microscopia de fluorescencia fueron menores que los obtenidos por De los Reyes *et al.* (2007), durante las 6 horas de co-incubación (46,8%). En los espermatozoides frescos estos valores también fueron menores a los obtenidos por Hay *et al.* (1997a), a las 18 horas de co-incubación gamética (73,3%), Oberli (2006) (55%), Hewitt y England (1997) (52,2%) y De los reyes *et al.* (2007) (61,1%). Probablemente los mayores tiempos de co-incubación utilizados en algunos de estos trabajos, provocarían un mayor número de espermatozoides capaces de penetrar la ZP y alcanzar el citoplasma ovular. Con respecto a los resultados de Oberli (2006), quien utilizó tiempos similares a este estudio, las diferencias podrían estar dadas en los medios de capacitación empleados (CCM versus Fert Talp), como también a características propias de los diferentes gametos, tanto en los ovocitos como en los espermatozoides.

Hasta la fecha, no hay estudios publicados que evalúen a través de MEB, la capacidad de espermatozoides caninos refrigerados de unirse y penetrar la ZP de ovocitos, con o sin previa capacitación *in vitro*. En estudios con espermatozoides caninos utilizando 1 hora de capacitación previa co-incubación con ovocitos por períodos de hasta 3 horas, los porcentajes de penetración con espermatozoides frescos aumentaron significativamente durante las 3 horas de co-cultivo, en cambio con espermatozoides



congelados, no se observó diferencias a través del tiempo (Palomino y De los Reyes, 2007). Esto indicaría que, el curso del tiempo de penetración de los espermatozoides congelados es más rápido que los espermatozoides frescos.

En general, los porcentajes de unión y penetración obtenidos por MEB en esta tesis, fueron menores que lo descrito por Palomino y De los Reyes (2007). Sin embargo, en ese trabajo las evaluaciones se realizaron cada una hora de co-cultivo, por lo que es probable que un mayor porcentaje de espermatozoides hayan sido observado en las primeras etapas de penetración, a diferencia del presente estudio donde se evaluó luego de tres horas de co-incubación, donde es posible que un porcentaje importante de espermatozoides haya ya penetrado la ZP.

La observación por MEB a nivel de la cabeza espermática durante la interacción gamética, mostró que tanto los espermatozoides intactos, sin reaccionar, como aquellos reaccionados, eran capaces de unirse a la ZP, lo cual ha sido descrito previamente en esta especie (Kawakami *et al.*, 1993). Es más, en estudios recientes de fecundación *in vitro* en caninos, se encontraron espermatozoides con acrosoma intacto y reaccionado (Palomino y De los Reyes, 2007). Existen evidencias en especies como el hámster y ratón, en los cuales sólo los espermatozoides con acrosoma intacto, son capaces de unirse a la ZP, perdiendo su capacidad fecundante rápidamente luego de experimentar la reacción acrosómica (Yanagimachi, 2003). Sin embargo, espermatozoides de cobayo reaccionados o con acrosoma intacto pueden unirse y penetrar la ZP (Schroer *et al.*, 2000). Este hecho estaría relacionado a que el mecanismo que gatilla la capacitación y reacción acrosómica podría ser diferente. En caninos, se ha demostrado que, el influjo de calcio en respuesta tanto a la progesterona como a proteínas de la zona pelúcida, en espermatozoides de perro, difiere a lo estudiado en otras especies, (Brewis *et al.*, 2001). Esto sugeriría que la

mayoría de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la perra podrían encontrarse con acrosoma reactivo al momento de interactuar con la ZP del ovocito.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan información para protocolos de fecundación *in vitro* más avanzadas utilizando espermatozoides refrigerados, para mejorar las tecnologías reproductivas en caninos, pudiendo utilizarse eventualmente además, en programas de preservación de otros canidos silvestres.

## CONCLUSION

Los espermatozoides frescos y refrigerados caninos, incubados en un medio inductor de la capacitación *in vitro* por un periodo de hasta 3 horas y aquellos sin previa capacitación, no difieren en su capacidad para unirse y penetrar la ZP de ovocitos de perra madurados *in vitro*, luego del periodo de co-incubación gamética utilizado en esta tesis.

Los espermatozoides refrigerados caninos sin previa incubación en un medio inductor de la capacitación *in vitro*, son capaces de fecundar *in vitro* los ovocitos de perra, luego de 3 horas de co-incubación gamética.

Los espermatozoides frescos y refrigerados con acrosoma reaccionado y sin reaccionar, son capaces de unirse a la ZP independiente del tiempo de capacitación utilizado en esta tesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- **ARETIO, C.** 2006. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides caninos congelados/descongelados sometidos a diferentes condiciones de capacitación in vitro. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp. 28-40.
- **AURICH, C.** 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 65-75.
- **AUSTIN, C.R.** 1951. Observation of the penetration of sperm into mammalian eggs. *Aust. J. Sci. Res.* 4: 581-596.
- **BARROS, C., JEDLICKI, A., AGUIRRE, E.** 1984. Relationship between the length of sperm preincubation in the golden hamster. A scanning electron microscope study. *Gamete. Res.* 9: 31-43.
- **BARROS, C., CROSBY, J.A., MORENO R.D.** 1996. Early step of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell. Biol. Int.* 20: 33-39.
- **BEDFORD, J.M.** 1994. The contraceptive potential of fertilization: a physiological perspective. *Hum. Reprod.* 9: 842-858.
- **BECKER, G.** 2007. Presencia de acrosina en espermatozoides caninos refrigerados a diferentes condiciones de capacitación in vitro. Memoria Título

Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp. 41-50.

- **BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S.** 1990. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriog.* 34: 147-157.
- **BREITBART, H.** 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol. Cell. Endocr.* 187: 139-144.
- **BREWIS, I.A., MOORE, H.D.M.** 1997. Molecular mechanisms of gamete recognition and fusion at fertilization. *Hum. Reprod. (Suppl.)* 12: 156-165.
- **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. Develop.* 60: 491-497.
- **BROWN, R.M.** 1992. An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. *Probl. Vet. Med.* 4: 445-452.
- **CHANG, M. C.** 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.
- **CONCANNON, P.W.** 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 39: 3-25.

- **CROSS, N.L.** 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.*59: 7-11.
  
- **DE LOS REYES, M.** 2000. Inseminación artificial en perros. **In:** Tópicos en Reproducción de Pequeños Animales. De los Reyes, M., Sánchez, A. (Eds.). Ediciones Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 1ª Edición. Santiago, Chile. Pp: 94-106.
  
- **DE LOS REYES, M., BARROS, C.** 2000. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 215-228.
  
- **DE LOS REYES, M.** 2004. Congelación de semen. **In:** Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latinoamericanos. Gobello, C. Editorial gráfica latina S.A. Buenos Aires, Argentina. Pp: 15-24.
  
- **DE LOS REYES M., DE LANGE, J., MIRANDA, P., PALOMINOS, J., BARROS, C.** 2005. Effect of human chorionic gonadotropin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriog.* 64: 1-11.
  
- **DE LOS REYES, M., CARRION, R., BARROS, C.** 2006. In vitro fertilization of in vitro matured canine oocytes using frozen-thawed dog semen. *Theriog.* 66: 1682-1684.
  
- **DE LOS REYES, M., DE LANGE, J., ANGUITA, C., PALOMINO, J., BARROS, C.** 2007. In vitro sperm penetration through the zona pellucida of

immature and in vitro mature canine oocytes using fresh, chilled and frozen dog semen. Anim. Reprod. Sci. (In press).

- **DOW, M.P., BAVISTER, B.D.** 1989. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. Gamete Res. 23: 171-180.
- **EDDY, E.M., O'BRIEN, D.A.** 1994. The spermatozoon. **In:** The physiology of reproduction. Ed. E. Knobil and J. Neill. New York, USA.
- **EISENBACH, M.** 1999. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. Dev. Genet. 25: 87-94.
- **EISENBACH, M., TUR-KASPA, I.** 1999. Do human eggs attract spermatozoa?. BioEssays 21: 203-210.
- **ENGLAND, G.C.W., PONZIO, P.** 1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. Theriog. 46: 165-171.
- **FARSTAD, W.** 2000. Assisted reproductive technology in canid species. Theriog. 53: 175-186.
- **FAZELI, A.R., STEENWEG, W., BEVERS, M.M., DE LOOS, F.A., VAN DEN BROEK, J., COLENBRANDER, B.** 1993. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. Vet. Rec. 132: 14-16.

- **FLESH, F., GADELLA, B.** 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrana in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1469: 197-235.
- **GUÉRIN, P., FERRER, M., FONTBONNE, A., BÉNIGNI, L., JACQUET, M., MÉNEZÓ, Y.** 1999. In vitro capacitation of the dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriog.* 52: 617-628.
- **GREEN, C., WATSON, P.** 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reprod.* 122: 889-898.
- **GUTIÉRREZ, M.** 2007. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides frescos de perro sometidos a capacitación in vitro. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp: 33-41.
- **GUTIÉRREZ, C.** 2006. Evaluación de la suplementación del medio de cultivo con piruvato sobre la maduración in vitro de ovocitos caninos. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp. 32-39.
- **HARRIS, J.D., HIBLER, D.W., FONTENOT, G.K., HSU, K.T., YUREWICZ, E.C., SACCO, A.G.** 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* 4: 361-393.
- **HARROP, A.** 1954. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Br. Vet. J.* 110: 424-425.



- **HAY, M.A., KING, W.A., GARTLEY, C.J., LEIBO, S.P., GOODROWE, K.** 1997a. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51:99-108.
- **HAY, M.A., KING, W.A., GARTLEY, C.J., LEIBO, S.P., GOODROWE, K.** 1997b. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriog.* 48: 1329-1342.
- **HERMANSSON, U., PONGLOWHAPAN, S., LINDE FORSBERG, C., STRÖM HOLST, B.** 2006. A short sperm-oocyte incubation time ZBA in the dog. *Theriog.* 66: 717-725.
- **HERMANSSON, U., LINDE FORSBERG, C.** 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriog.* 65: 584-593.
- **HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C.W.** 1997. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 50:123-139.
- **HEWITT, D.A., WATSON, P.F., ENGLAND, G.C.W.** 1998. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriog.* 49: 1083-1101.
- **HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C.** 1999. Culture conditions required to induce capacitation and the acrosome reaction of canine sperm in vitro. *Vet. Rec.* 144: 22 – 23.

- **HOWES, L., JONES, R.** 2002. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 53: 181-192.
  
- **IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J.P.** 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriog.* 55: 671-684.
  
- **IVANOVA M., MOLLOVA, M., IVANOVA-KICHEVA, M.G., PETROV, M., DJARKOVA, T.S., SOMLEV, B.** 1999. Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriog.* 52: 163-170.
  
- **JAISWAL, B.S., COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I., EISENBACH, M.** 1998. Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Lett.* 427: 309-313.
  
- **KAWAKAMI, E., VANDEVOORT, C., MAHI-BROWN, C., OVERSTREET, J.** 1993. Induction of acrosome reaction of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol. Reprod.* 48: 841-845.
  
- **KAWAKAMI, E., HORI, T., TSUTSUI, T.** 1998. Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 197-202.
  
- **LINDE-FORSBERG, C.** 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. No. Am. Sm. Anim. Prac.* 21: 467-485.

- **LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M.** 1993. Results of 527 controlled artificial inseminations in dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 313-323.
- **LINDE-FORSBERG, C.** 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin. Vet. Med. Surg.* 10: 48-58.
- **LUVONI, G., CHIGIONI, S., ALLIEVI, E., MACIS, D.** 2005. Factors involves in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriog.* 63: 41-59.
- **LUVONI, G.C., CHIGIONI, S.** 2006. Culture strategies for maturation of carnivore oocytes. *Theriog.* 66: 1471-1475.
- **LUVONI, G.C., CHIGIONI, S., BECCAGLIA, M.** 2006. Embryo production in dogs: in vitro fertilization to cloning. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 286-290.
- **MAHI, C.A., YANAGIMACHI, R.** 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.* 196:189-196.
- **MAHI, C.A., YANAGIMACHI, R.** 1978. Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Res.* 1: 101-109.
- **MANOSALVA, I., CORTÉS, C., LEYVA, V., VALDIVIA, M., DE LOS REYES, M., BARROS, C., MORENO, R.** 2005. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal en espermatozoides caninos. *Rev. Inv. Vet. Perú* 16: 114-128.

- **MARCHAL, R., PELÁEZ, J., TERQUI, M., MERMILLOD, P.** 2002. Effect of sperm survival and CTC staining pattern on in vitro fertilization of porcine oocytes. *Theriog.* 57: 1917-1927.
  
- **MASTROMONACO, G., MARGERY, H., GOODROWE, K.** 2002. The effects of oocyte storage and cumulus cell presence on canine zona penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriog.* 57: 1123-1134.
  
- **MAXWELL, W., JOHNSON, L.** 1997. Chlortetraciline analisis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 408-418.
  
- **MAYENCO-AGUIRRE, A.M., PÉREZ-CORTÉS, A.B.** 1998. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriog.* 50:195-204.
  
- **NISHIZONO, H.; SHIODA, M.; TAKEO, T.; IRIE, T.; NAKAGATA, N.** 2004. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biol. Reprod.* 71: 973–978.
  
- **OBERLI, R.** 2006. Evaluación del tiempo de capacitación espermática en la fecundación in vitro en caninos. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp. 47-53.
  
- **OETTLÉ, E.E.** 1986. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Ani. Reprod. Sci.* 12: 145-150.

- **PALOMINO, J., DE LOS REYES, M.** 2007. A scanning electron microscopy study of frozen/thawed dog sperm during in vitro gamete interaction. *Reprod. Dom. Anim.* (In press).
  
- **PARRISH, J.J., FOOTE, R.H.** 1986. Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol. Reprod.* 35: 253-257.
  
- **PEÑA, A.I., BARRIO, M., BECERRA, J.J., QUINTELA., L.A., HERRADÓN, P.G.** 2004. Zona pellucida binding ability and responsiveness to ionophore challenge of cryopreserved dog spermatozoa after different periods of capacitation in vitro. *Ani. Reprod. Sci.* 84: 193-210.
  
- **PEÑA, F.J., NUÑEZ-MARTINEZ, I., MORÁN, J.M.** 2006. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 21-29.
  
- **PETRUNKINA, A. M.; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A.; TÖPFER-PETERSEN, E.** 2003. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *J. Androl.* 24: 423-437.
  
- **PINTO, C., PACCAMONTI, D., ELITS, B.** 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriog.*52: 609-616.
  
- **PONGLOWHAPAN, S., ESSÉN-GUSTAVSSON, B., LINDE FORSBERG, C.** 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriog.* 62: 1498- 1517.

- **REYNAUD, K., FONTBONNE, A., MARSELOO, N., THOUMIRE, S., CHEBROUT, M., VIARIS DE LESEGNO, C., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reprod.* 130: 193-201.
  
- **REYNAUD, K., FONTBONNE, A., MARSELOO, N., VIARIS DE LESEGNO, C., SAINT-DIZIER, M., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2006. In vivo canine maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. *Theriog.* 66: 1685- 1693.
  
- **ROTA, A., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C.** 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriog.* 44: 885-900.
  
- **ROTA, A., PEÑA, A.I., LINDE-FORSBERG, C.** 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 57: 199-215.
  
- **SAINT-DIZIER, M., REYNAUD, K., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2004. Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 205-212.
  
- **SCHROER, S.C., YUDIN, A.I., MYLES, D.G., OVERSTREET, J.W.** 2000. Acrosomal status and motility of guinea pig spermatozoa during in vitro penetration of the cumulus oophorus. *Zygote* 8: 107-117.

- **SHIMAZU, Y., YAMADA, S., KAWANO, Y., KAWAJI, H., NAKAZAWA, M., MAITO, K., TOYODA, Y.** 1992. In vitro capacitation of canine spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 38: 67-71.
  
- **SILVA, A., CARDOSO, R., SILVA, L., CHIRINÉA, V., LOPES, M., SOUZA, F.** 2006. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. *Theriog.* 66: 456-462.
  
- **SIRIVAIDYAPONG, S., CHENG, F.P., MARKS, A., VOORHOUT, W.F., BEVERS, M.M., COLENBRANDER, B.** 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriog.* 53: 789-802.
  
- **SONGSASEN, N., WILDT, D.E.** 2007. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Anim. Reprod. Sci.* 98: 2-22.
  
- **STOREY, B.T.** 1995. Interaction between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 927-942.
  
- **STRÖM HOLST, B., ROTA, A., ANDERSEN BERG, K., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ- MARTINEZ, H.** 1998. Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 77-82.
  
- **STRÖM HOLST, B., LARSSON, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ- MARTINEZ, H.** 2000a. Sperm binding capacity and

- ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 119: 77-83.
- **STRÖM HOLST, B., LARSSON, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIGUEZ- MARTINEZ, H.** 2000b. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 119: 201-206.
  - **TÖPFER-PETERSEN, E., PETROUNKINA, A.M., AKHLASI-HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte-sperm interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 653-662.
  - **TSUITSUI, T.** 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39: 269-275.
  - **VERSTEGEN, J.P., ONCLIN, K., IGUER-OUADA, M.** 2005. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro an in vivo studies. *Theriog.* 64: 720-733.
  - **WASSARMAN, P.M.** 1988. Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* 7: 417-522
  - **WASSARMAN, P.** 1999. Mammalian Fertilization: molecular aspect of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell.* 96: 175-183.
  - **WASSARMAN, P., JOVINE, L., LITSCHER, E.** 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell. Biol.* 3: E59-E64.



- **WATSON, P.F.** 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 781-891.
  
- **WATSON, P.F.** 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:481-492.
  
- **YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWAJI, H., NAKAZAWA, M., NAITO, K., TOYODA, Y.** 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biol. Reprod.* 46: 853-858.
  
- **YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWANO, T., NAKAZAWA, M., NAITO, K., TOYODA, Y.** 1993. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 227-229.
  
- **YANAGIMACHI, R.** 1994. Mammalian fertilization. **In:** Knobil, E. y Neill, J. D. (eds). *The Physiology of Reproduction* 2<sup>a</sup> ed. Editorial Raven Press. Nueva York. USA. Pp. 189-317.
  
- **YANAGIMACHI, R.** 2003. Fertilization and development initiation in orthodox and unorthodox ways: from normal fertilization to cloning. *Adv. Biophys* 37: 49-89.