



UNIVERSIDAD DE CHILE

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

**EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE CAPACITACIÓN
ESPERMÁTICA EN LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN
CANINOS**

ROSEMARIE ANDREA OBERLI GRAF

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

PROFESOR GUIA: MONICA DE LOS REYES S.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1060602

**SANTIAGO - CHILE
2006**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN CANINOS

ROSEMARIE ANDREA OBERLI GRAF

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

NOTA FINAL:

NOTA FIRMA

PROFESOR GUIA : MONICA DE LOS REYES S.

PROFESOR CONSEJERO : WALTER VON FREY

PROFESOR CONSEJERO : BESSIE URQUIETA M.

SANTIAGO, CHILE
2006

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

*DEDICADO A MIS PADRES,
DORI Y RODOLFO,
YA MIS SERES QUERIDOS
QUE YA NO ESTÁN AQUÍ...*

AGRADECIMIENTOS

- A mi Profesora Guía, Dra. Mónica De Los Reyes S. por darme la oportunidad de trabajar con ella en esta apasionante área científica, por ser mi guía y consejera, por su disposición y ayuda.
- Al Sr. Jaime Palominos por toda su ayuda, consejo, inagotable paciencia, disposición y dedicación, sin las cuales seguro no habría logrado este trabajo.
- A la Ilustre Municipalidad de La Pintana, por su colaboración y permitirme trabajar en sus dependencias facilitando la realización de este proyecto.
- A todos los profesionales, en especial al Dr. Claudio Barros y Dr. Ricardo Moreno, que desempeñan su labor científica en los Laboratorios de Embriología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Gracias por acogerme y permitirme trabajar en sus dependencias, además de ofrecerme su ayuda y la mejor disposición.
- A la Dra. Valeria Rojas por su asistencia y paciencia al ayudarme con el Análisis estadístico de esta Memoria.
- A la Srta. Carolina Aretio, Srta. Jennifer Hetz y Srta. Gisela Becker por su amistad, compañía, disposición, enorme ayuda y apoyo constante en la realización de esta Memoria.
- A la Dra. Karen Montecinos, Dr. Ignacio Miranda, Dr. Fabián Espínola, Dr. Raúl Vizcarra, Dr. Giorgio Stingo, Dra. Claudia Lubi y a la Srta. Tamara Cáceres, por su colaboración, buena disposición y ayuda con las muestras que permitieron llevar a cabo este estudio.
- A mis padres, Rodolfo Oberli y Dori Graf de Oberli, por todo su cariño, apoyo, consejo y preocupación.
- A mi marido, Sr. Juan Pablo Urrutia, por su consejo, preocupación y apoyo constante, por su comprensión, compañía y amor.
- A mis hermanos, a toda mi familia y amigos les agradezco su preocupación, consejo y apoyo.

ÍNDICE	página:
Resumen	6
Abstract	8
Introducción	10
Revisión Bibliográfica	13
I. Maduración de Ovocitos <i>in vivo</i>	13
II. Maduración de Ovocitos <i>in vitro</i>	15
III. Capacitación Espermática y Reacción del Acrosoma	16
IV. Capacitación Espermática <i>in vitro</i>	18
V. Interacción Gamética y Fecundación	19
Hipótesis	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	23
Materiales y Método	24
I. Obtención de Ovocitos	24
II. Selección y Maduración de Ovocitos	24
III. Obtención de Semen	25
IV. Fijación y Evaluación de Ovocitos Inseminados	27
Resultados	29
Discusión	37
Conclusiones	46
Bibliografía	47

RESUMEN

El avance de las biotecnologías reproductivas en caninos ha sido más lento que en otras especies animales. El estudio del proceso de capacitación espermática es un factor determinante para el desarrollo exitoso de estas técnicas, siendo aún poco estudiado en caninos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar en caninos, el efecto del tiempo de capacitación espermática *in vitro* a través de la fecundación *in vitro*, evaluando la penetración espermática obtenida en ovocitos de perra previamente madurados en el laboratorio.

De ovarios de perras sanas sometidas a ovariectomía se obtuvieron los ovocitos por corte fino a través de réplicas experimentales, los que se seleccionaron de acuerdo: mayor tamaño, citoplasma oscuro y homogéneo y con más de 3 capas compactas de células del cúmulo. Los ovocitos seleccionados se incubaron para maduración en medio TCM 199 suplementado, a 38,5°C, 5 % CO₂ y 98% de humedad, durante 72 y 96 horas.

Se obtuvieron 6 eyaculados de 3 perros adultos utilizando la segunda fracción espermática de cada eyaculado, los que fueron centrifugados y el pellet resuspendido en medio de capacitación canino (CCM), dejándolos en incubación a temperatura ambiente (20° - 22°C) durante 1, 2 y 3 horas en forma separada para capacitarlos. Al término de cada período de capacitación se extrajo el CCM mediante centrifugación y los espermatozoides se resuspendieron en medio Fert-Talp, con el cual se prepararon gotas de 100 µL (10 x 10⁶ espermatozoides/mL) para ser coincubados con los ovocitos (10 – 15 ovocitos por gota) previamente madurados *in vitro* por los diferentes tiempos en forma separada. La coincubación gamética se realizó en la estufa de cultivo por 3 horas a 38,5°C y 5% de CO₂ en 98% de humedad.

Luego de la coincubación los ovocitos inseminados se lavaron y se fijaron en ácido acético, metanol y cloroformo 3:6:2, respectivamente, por tres minutos y luego en ácido acético y metanol 1:3 por 72 horas a 4 °C. Finalmente, los ovocitos se tiñeron con ioduro de propidio (1µg/mL) y fueron evaluados mediante microscopia de epifluorecencia.

Se evaluó un total de 425 ovocitos, determinando el porcentaje de ovocitos penetrados por espermatozoides a nivel de la zona pelúcida (ZP), espacio perivitelino (EP) o en el citoplasma ovular (C). Los resultados se evaluaron por ANDEVA y la prueba de Tukey para determinar la significancia de las diferencias $P \leq 0,05$. Se logró penetración con espermatozoides incubados en los tres tiempos de capacitación empleados, sin encontrar diferencias significativas ($P > 0,05$) respecto a los tiempos de capacitación espermática empleados. Hubo mayores porcentajes de penetración ($P < 0,05$) en los ovocitos madurados durante 72 horas (promedio 60,6%) que en aquéllos madurados durante 96 horas (promedio 45,1%).

Se obtuvieron porcentajes de penetración similares al comparar los diferentes niveles evaluados (ZP, EP y C) entre ambos tiempos de maduración ovocitaria, con los 3 tiempos de capacitación empleados. Tanto en ovocitos de 72 horas, como de 96 horas de maduración, se encontró mayor porcentaje de penetración a nivel de C ($P > 0,05$), promedio 55,0% y 50,0% respectivamente, en comparación con los otros niveles de penetración evaluados. Estos porcentajes son superiores a los obtenidos en otros estudios en los cuales se ha medido la penetración al citoplasma ovular.

Se puede concluir que los espermatozoides caninos pueden ser capacitados por períodos de 1 a 3 horas, logrando porcentajes de penetración importantes en ovocitos de perras, en orden de obtener fecundación *in vitro* exitosa en esta especie.

ABSTRACT

The progress of assisted reproduction techniques in canines has not been as fast as in other animal species. Research about the sperm capacitation process, has not been intensely studied in canids, although it is a determinant factor for successful progress of these techniques. The aim of this study was to evaluate the effect of *in vitro* sperm capacitation time measuring sperm penetration rates in previously matured bitch oocytes.

Oocytes were collected from healthy bitches' ovaries following ovary hysterectomy. Oocytes were selected under stereoscopic microscope choosing only the biggest ones, with homogeneous dark cytoplasm and with more than three compact layers of cumulus cells. The selected oocytes were incubated for maturation in supplemented TCM 199 medium at 38,5 °C (101.3°F), 5 % CO₂ and 98% humidity during 72 and 96 hours.

Six ejaculates were obtained from three donor dogs, using the second sperm fraction of each ejaculate for the study. The ejaculates were centrifuged and the remaining pellet was restored with canine capacitation medium (CCM). Spermatozoa were incubated at room temperature (20° - 22°C) for 1, 2 and 3 hours in three separate tubes to promote capacitation. At the end of each capacitation period, CCM was extracted through centrifugation and the remaining pellet restored with Fert-Talp medium to prepare 100 µL drops (10 x 10⁶ spermatozoa/mL) for coincubation with previously *in vitro* matured oocytes (10 – 15 oocytes per drop) for 3 hours in 98% humidity at 38,5°C and 5% CO₂.

After coincubation, inseminated oocytes were rinsed and fixed with acetic acid, methanol and chloroform 3:6:2, respectively, for three minutes and then in acetic acid and methanol 1:3 for 72 hours at 4°C.

Finally, oocytes were stained with propidium iodide (1 μ g/mL) for nuclear assessment with epifluorescence microscopy.

A total of 425 oocytes were evaluated to determine the sperm penetration rates considering spermatozoa in the ZP, the Perivitelline space (EP) or in the oocyte's cytoplasm (C). Results were analyzed with ANOVA and Tukey test to determine significant differences ($P \leq 0,05$).

Sperm capacitation and penetration was accomplished with the three capacitation periods used, although no statistic differences ($P > 0,05$) were found in the penetration rates between the capacitation periods used. Higher penetration rates ($P < 0,05$) were observed in the group of oocytes matured during 72 hours (average 60,6%) than in those matured during 96 hours (average 45,1%). Similar penetration rates were obtained in the different penetration levels observed (ZP, EP and C) comparing both oocyte maturation periods used considering the 3 capacitation periods used.

In both groups of oocytes matured during 72 and 96 hours, the highest percentage of penetration was found in the oocytes cytoplasm (C) ($P > 0,05$), 55,0% and 50,0%, respectively, comparing with the other penetration levels evaluated. These percentages are higher than those obtained in other studies in which penetration into the ooplasm has been measured.

It can be concluded that canine spermatozoa can be capacitated for 1 to 3 hours, achieving important penetration rates in bitch oocytes, in order to obtain successful *in vitro* fecundation in this species.

INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías reproductivas permiten mejorar el rendimiento reproductivo de las especies y preservar la biodiversidad, entre otros atributos. En caninos, sin embargo, el avance de estas técnicas no ha alcanzado aún un desarrollo equivalente a lo logrado en otros animales

Los estudios de las características reproductivas en perros, permiten obtener conocimientos aplicables a esta misma especie como a otras especies de cánidos silvestres, lo cual adquiere especial importancia en aquéllos que se encuentran en peligro de extinción (Farstad, 2000; Luvoni, 2000; Gobello y Corrada, 2004). Actualmente, las biotecnologías reproductivas que han implicado un mayor interés en caninos son: la criopreservación de semen y la inseminación artificial, siendo aún la maduración *in vitro* de ovocitos, la capacitación espermática y la fecundación *in vitro*, áreas menos estudiadas pero que abren la posibilidad de lograr un posterior desarrollo embrionario y transferencia de embriones, lo que aún no se ha concretado en estos animales (Luvoni, 2000; Bavister, 2002; Gobello y Corrada, 2004).

La interacción gamética y fecundación normal dependen de una maduración adecuada del ovocito, como también del proceso de capacitación de los espermatozoides (De los Reyes y Barros, 2000; Farstad, 2000).

El ovocito canino, a diferencia de otras especies animales, es ovulado en estado inmaduro, con sus cromosomas en dictiateno de la primera profase meiótica (Concannon, 1989; Yamada *et al.*, 1992; Luvoni, 2000), por lo que el estado de segunda metafase, que implica un gameto fecundable, lo adquiere a nivel oviductal (Farstad, 2000).

Aunque el proceso de fecundación se logra en su cabalidad sólo en ovocitos que han completado su maduración, el espermatozoide canino puede penetrar ovocitos independiente de su estado de maduración (Yamada *et al.*, 1992), sin embargo, no está claro si los espermatozoides capacitados penetrarían en la misma medida ovocitos con diferentes estados de maduración.

La capacitación de los espermatozoides *in vivo* ocurre en el tracto reproductivo de la hembra a nivel del oviducto, e involucra la hiperactivación flagelar y la reacción del acrosoma (RA), con la liberación del contenido acrosomal (Barros *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002), siendo un fenómeno dependiente del tiempo, e *in vitro* este tiempo varía entre las especies (Yanagimachi, 1994).

Los primeros estudios en la capacitación de semen canino en estado fresco, han mostrado que espermatozoides incubados en medio inductor de la capacitación por 7 horas podían comenzar a penetrar la ZP (Mahi y Yanagimachi, 1978). Posteriormente, se ha demostrado que tiempos de incubación espermática de 4 a 5 horas permiten penetrar la ZP en caninos (Yamada *et al.*, 1992). Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que los espermatozoides de perro se unirían a la ZP luego de 2 horas de incubación en medio capacitante (Guérin *et al.*, 1999); además, tanto la viabilidad como la motilidad espermática disminuirían significativamente luego de 4 a 7 horas de incubación, con un descenso significativo del número de espermatozoides unidos a la ZP (Kawakami *et al.*, 1993).

Por otra parte, la inducción de la RA *in vitro* se ha podido realizar en una hora de incubación en diferentes medios (Brewis *et al.*, 2001). Estudios preliminares en acrosina canina, enzima acrosomal involucrada en la unión y penetración a la ZP en mamíferos (Moreno *et al.*, 2002), demostrarían que esta enzima comenzaría a liberarse antes de una hora de incubación en medio inductor de la capacitación¹. Es posible, por tanto, que espermatozoides caninos puedan comenzar en este período a penetrar la ZP de ovocitos de perra, lo que hasta ahora no ha sido demostrado.

1. **DE LOS REYES, M.** 2006 [comunicación personal] U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. Maduración de Ovocitos *in vivo*

La maduración de los ovocitos en la especie canina es única comparada con otras especies mamíferas (Yamada *et al.*, 1992; Farstad, 2000; Luvoni, 2000; Brewis *et al.*, 2001; Gobello y Corrada, 2004; De los Reyes *et al.*, 2005). En la mayoría de los mamíferos, a nivel de folículo preovulatorio existe un marcado predominio de estrógenos en el ambiente folicular, lo que gatilla el alza preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) que tiene como consecuencia el reinicio de la división meiótica previo a la ovulación (Luvoni, 2000). De esta forma, el gameto es ovulado como ovocito secundario.

En los cánidos, sin embargo, ocurre un fenómeno particular que corresponde a la luteinización de los folículos ováricos previo a la ovulación, con lo cual los ovocitos caninos están expuestos a mayores concentraciones de progesterona, hormona que bajo estas circunstancias también aumenta a nivel plasmático (Luvoni, 2000; Brewis *et al.*, 2001). La ovulación en la perra es espontánea y se produce generalmente 24 a 72 horas después del alza preovulatoria de LH o inicio del estro (Yamada *et al.*, 1992; Luvoni, 2000). De esta forma, los ovocitos son ovulados en estado inmaduro, con su núcleo como vesícula germinal, en la profase de la primera división meiótica y no como ovocitos secundarios en segunda metafase (MII), como ocurre en las otras hembras mamíferas. Debido a esto, en la especie canina el reinicio meiótico y la maduración ovocitaria ocurre a nivel del oviducto (Yamada *et al.*, 1992; De los Reyes *et al.*, 2005) y tarda aproximadamente 48 a 72 horas en completarse (Luvoni, 2000; Brewis *et al.*, 2001).

El hecho de que se ovulen ovocitos inmaduros, permite aumentar las probabilidades de encuentro con gametos masculinos a nivel de oviducto durante el proceso de maduración ovocitaria (Luvoni, 2000).

La maduración ovocitaria del punto de vista nuclear, implica que el gameto finalice la primera división meiótica e inicie la segunda, quedando detenido en MII (Yamada *et al.*, 1992; Farstad, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005).

Al momento de la ovulación las células del cúmulo que envuelven al ovocito están fuertemente unidas entre sí y en numerosas capas (Yanagimachi, 1994; Farstad, 2000; Luvoni, 2000). A medida que el ovocito madura estas células se van expandiendo; sin embargo, en caninos, la capa más interna de células del cúmulo permanece adherida al ovocito hasta el estado embrionario (Farstad, 2000; Luvoni, 2000). La maduración completa del ovocito es un prerrequisito para la fecundación normal y el futuro desarrollo embrionario (Yamada *et al.*, 1992; Hewitt y England, 1999^b; Farstad, 2000). Se ha observado que el espermatozoide canino puede penetrar ovocitos en estados inmaduros, pero no se produciría una adecuada activación ovocitaria que permita un desarrollo normal del cigoto (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yamada *et al.*, 1992; Yanagimachi, 1994).

II. Maduración de Ovocitos *in vitro*

La maduración de ovocitos *in vitro* es un proceso complejo en el cual se intenta imitar los cambios dinámicos que ocurren a nivel folicular y oviductal y a los cuales están expuestos los ovocitos *in vivo* (Luvoni, 2000). Un sistema de maduración exitoso es aquél que provee los componentes necesarios para suplir los requerimientos del ovocito (Luvoni, 2000; Farstad 2000).

A pesar de las características particulares de la fisiología reproductiva de la perra, se han desarrollado procedimientos y medios de cultivo para madurar específicamente ovocitos caninos *in vitro*, no obstante el éxito de éstos aún es bajo comparado con otras especies domésticas como bovinos y porcinos (Hewitt y England, 1999^b; Farstad, 2000; Luvoni, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005).

Para lograr porcentajes mejores de maduración *in vitro*, se han considerado algunos aspectos que serían importantes para este propósito (Downs, 1993; Yamada *et al.*, 1993; Fujii *et al.*, 2000), tales como la morfología y diámetro del ovocito, (Farstad, 2000), características de suplementación de los medios (Luvoni, 2000; Bogliolo *et al.*, 2002) y tiempos de cultivo empleados (Yamada *et al.*, 1992; Otoi *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2005).

La suplementación de los medios de cultivo para cubrir los requerimientos de los ovocitos *in vitro* y lograr mayores tasas de maduración ha sido importante (Downs, 1993; Hewitt y England, 1999^b; Fastard, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005). Con este propósito se han utilizado diferentes fuentes y concentraciones de hormonas esteroidales, gonadotrofinas, proteínas y sustratos energéticos (Hewitt y England, 1999^b; Farstad, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005).

Muchos de estos elementos han demostrado tener un efecto benéfico sobre la maduración *in vitro* de ovocitos caninos, como por ejemplo, la gonadotropina coriónica humana (hCG) (De los Reyes *et al.*, 2005), células oviductales epiteliales (Hewitt y England, 1999^b; Bogliolo *et al.*, 2002), glicosaminoglicanos y el piruvato como fuente energética (De los Reyes *et al.*, 2006).

III. Capacitación Espermática y Reacción del Acrosoma

En la mayoría de los mamíferos, cuando los espermatozoides llegan a los oviductos, éstos son almacenados temporalmente, manteniendo su viabilidad por cierto período de tiempo, permitiendo el inicio de la capacitación espermática, con lo cual los espermatozoides finalmente adquirirán la capacidad fecundante (Barros *et al.*, 1996; Breitbart y Naor, 1999; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002). Sólo los espermatozoides que han experimentado el proceso de capacitación espermática son capaces de reconocer al ovocito y responder adecuadamente ante las señales que éste emite (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001). Por lo tanto, se considera a la capacitación como una serie de eventos desestabilizantes positivos para el gameto masculino (Barros *et al.*, 1996; Breitbart y Naor, 1999; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

La capacitación espermática corresponde a un proceso en el cual el espermatozoide experimenta una serie de cambios (Brewis *et al.*, 2001), dentro de los cuales al menos dos han sido más estudiados: la hiperactivación o movimiento hiperactivado del flagelo y la RA. Estos eventos le permitirán al espermatozoide interactuar con el ovocito y sus cubiertas, llevando a cabo la fecundación (Barros *et al.*, 1996).

Durante la capacitación del espermatozoide, se produce un incremento en la fluidez y reordenamiento de la superficie de la membrana plasmática dado por un eflujo de colesterol, fosforilación de proteínas y actividad de enzimas, incremento del calcio (Ca^{2+}) y pH intracelular, provocando así la hiperpolarización de la membrana plasmática (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

La hiperactivación, que consiste en un cambio en el patrón de movimiento flagelar del espermatozoide, se evidencia por un aumento en la amplitud y vigor del movimiento flagelar (Yanagimachi, 1994). Dicho fenómeno le otorga a éste la capacidad de desprenderse de las células oviductales y atravesar las cubiertas ovocitarias para lograr interactuar con la ZP (Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

En la mayoría de las especies estudiadas los espermatozoides capacitados, al ponerse en contacto con la ZP, son inducidos a la RA; este proceso involucra la fusión y fenestración de la membrana acrosómica externa y la membrana citoplasmática, permitiendo la exposición de las enzimas acrosomales, como el sistema proacrosina/acrosina (Kawakami *et al.*, 1993; Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Brewis *et al.*, 2001) y, de ese modo, pueden unirse y atravesar la ZP (Barros *et al.*, 1996; Yanagimachi, 1994; Moreno *et al.*, 2002).

IV. Capacitación Espermática *in vitro*

La capacitación espermática es posible inducirla *in vitro* mediante el uso de medios especiales. Este fenómeno es dependiente del tiempo (Yanagimachi, 1994) y en espermatozoides caninos *in vitro*, no existen tiempos estandarizados que permitan determinar mayores porcentajes de penetración por las cubiertas ovocitarias.

En caninos se han descrito algunos medios inductores de la capacitación como el Tyrode modificado (Yamada *et al.*, 1992), el medio de capacitación Canino (CCM) (Mahi y Yanagimachi, 1978; Hewitt y England., 1999^a), los cuales contienen componentes utilizados y descritos en diferentes especies que serían importantes en el proceso de capacitación. Entre estos componentes están: la albúmina, la glucosa, el calcio y el bicarbonato (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yamada *et al.*, 1992; Hewitt y England, 1999^a).

Se ha podido determinar que los espermatozoides no sobreviven adecuadamente sin albúmina. Esta proteína, presente también en los medios de capacitación de diversas especies, ayudaría a inducir la RA favoreciendo el eflujo de colesterol (Sirivaidyapong *et al.*, 2000). La ausencia de esta macromolécula tiene un efecto detrimental sobre la motilidad de los gametos y, además, hace que los espermatozoides se adhieran a las superficies de los recipientes plásticos, lo cual dificultaría el manejo del semen. Un efecto similar a la albúmina presenta la glucosa (Mahi y Yanagimachi, 1978; Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

El Ca^{2+} en el medio de capacitación es fundamental, ya que la presencia de este ión permite su influjo a la célula, lo que induciría la capacitación y, por consiguiente, la hiperactivación y la RA del espermatozoide (Mahi y Yanagimachi, 1978; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). La ausencia de Ca^{2+} disminuye drásticamente la supervivencia de los espermatozoides e impide que se produzca la exocitosis acrosomal (Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001).

El pH del medio de capacitación es un factor muy importante para la RA y la penetración de la ZP. Al aumentar el pH, aumentando la cantidad de bicarbonato en el medio, se facilita la RA, sin embargo, aproximadamente a pH 8 la motilidad disminuye, lo cual se traduce en una menor capacidad de penetración de la ZP por parte de los espermatozoides (Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

V. Interacción Gamética y Fecundación

Al momento de la ovulación los espermatozoides capacitados son liberados del epitelio oviductal para migrar al lugar de la fecundación, ubicado en el ámpula (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). De esta forma, aparentemente el oviducto y el mismo ovocito coordinan la función espermática y la interacción gamética (Hewitt y England, 1999^b).

Los ovocitos, por su parte, están rodeados por 2 cubiertas ovocitarias que juegan un rol fundamental en la interacción gamética: el cúmulo ooforo, que corresponde a una cubierta celular y matriz extracelular, y, la ZP que es una cubierta acelular, compuesta de glicoproteínas sulfatadas (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Brewis *et al.*, 2001), que posee numerosas funciones de importancia para la reproducción de los mamíferos (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

Las células del cúmulo que rodean al ovocito de perra permanecen unidas a éste posterior a la ovulación, a diferencia de lo que se ha descrito en otras especies animales, como algunos ungulados (por ejemplo en la oveja y la vaca) y marsupiales (Yanagimachi, 1994; Van Soom *et al.*, 2002), por lo tanto, al momento de la fecundación el espermatozoide canino debe atravesar esta cubierta celular y luego la ZP para alcanzar la membrana plasmática del ovocito (Barros *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Brewis *et al.*, 2001). Se ha descrito que las células del cúmulo que rodean al ovocito tienen varias propiedades, las cuales facilitarían el encuentro y la fusión entre el espermatozoide y el ovocito, siendo también responsables en gran medida del estado y condiciones de desarrollo ovocitario y del cigoto, posterior a la fecundación (Van Soom *et al.*, 2002).

En la fecundación *in vitro* muchos espermatozoides rodean al ovocito al momento de la interacción de los gametos, permitiendo dispersar y soltar las células del cúmulo en forma mecánica, facilitando así el contacto entre los espermatozoides y la ZP (Yanagimachi, 1994).

Sin embargo, en condiciones naturales *in vivo*, se ha observado que muy pocos espermatozoides están presentes cerca del ovocito al momento de la fecundación, pudiendo ser en algunas especies 1 : 1 (Cummins y Yanagimachi, 1982), lo que evidencia que además de la dispersión mecánica de las células del cúmulo, también existe una acción enzimática, dada por enzimas como la hialuronidasa y betagalactosidasa, entre otras, que se encuentran en la superficie espermática, por la cual el espermatozoide puede abrirse paso más fácilmente (Yanagimachi, 1994).

La unión primaria entre la ZP y el espermatozoide ocurre entre la glicoproteína ZP3 y diferentes receptores localizados en la membrana plasmática del espermatozoide, también conocidos como ligandos primarios (Barros *et al.*, 1996). Esta interacción induce la reacción acrosómica, lo que también se ha determinado en perros (Brewis *et al.*, 2001). La RA permite la exposición de enzimas acrosomales, como el sistema proacrosina/acrosina (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002).

La penetración de la ZP por parte del espermatozoide es un paso crucial durante la fecundación. Los espermatozoides que no tienen la capacidad de reconocer ni unirse a las glicoproteínas de la ZP o responder ante la presencia de ésta mediante la RA, son incapaces de llevar a cabo una fecundación exitosa (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001). Se ha demostrado en otras especies, que la enzima acrosina (que corresponde a la forma activa de la proacrosina) está involucrada en la unión secundaria (ligando secundario) entre el espermatozoide y la ZP que permite la penetración espermática a través de esta cubierta ovocitaria (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002).

Atravesada la ZP, el espermatozoide alcanza el EP interactuando así con la membrana plasmática del ovocito, fusionándose ambas membranas y, de ese modo, el espermatozoide ingresa al citoplasma ovular (Barros *et al.*, 1993; Barros *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

La membrana plasmática del ovocito al ponerse en contacto con el espermatozoide, se activa y experimenta una depolarización, la cual se conoce como bloqueo rápido o primario de la poliespermia, que previene la fusión de otros espermatozoides a la membrana del ovocito, hasta que se produce el llamado bloqueo lento o secundario de la poliespermia dado por la exocitosis de los gránulos corticales del ovocito (Yanagimachi, 1994). Los gránulos corticales son estructuras formadas durante la ovogénesis por secreciones del aparato de Golgi, los cuales migran durante la maduración del ovocito, ubicándose en la zona subcortical. En su interior contienen enzimas que son liberadas por exocitosis, cuya función es modificar las envolturas ovocitarias y remover los receptores para los espermatozoides de la ZP, impidiendo la poliespermia (Yanagimachi, 1994; Sun, 2003).

En este trabajo se estudió tiempos de capacitación espermática en relación a la penetración a la ZP, EP y C de ovocitos caninos madurados *in vitro*, lo que permitirá el desarrollo de protocolos más eficientes en el manejo de los gametos y fecundación *in vitro* en la especie canina.

HIPÓTESIS

El grado de interacción gamética en caninos, variará de acuerdo al tiempo de capacitación *in vitro* a que fueron sometidos los espermatozoides, y al tiempo de maduración de los ovocitos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tiempo de capacitación en relación a la interacción del espermatozoide de perro con el ovocito.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar diferentes tiempos de capacitación espermática en cultivo, a través de la unión y penetración del espermatozoide canino a la zona pelúcida de ovocitos de perra.
- Evaluar en espermatozoides de perro capacitados en cultivo por diferentes tiempos, su fusión y penetración al citoplasma ovular.
- Comparar el grado de interacción gamética entre espermatozoides capacitados *in vitro* y ovocitos de perra madurados en dos períodos de cultivo.

MATERIALES 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.

I. Obtención de Ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de perras sanas (entre 2 y 7 años de edad) sometidas a ovariectomía en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la Ilustre Municipalidad de La Pintana. Los ovarios fueron transportados al laboratorio de reproducción en solución salina (NaCl 0,9%) suplementada con antibióticos (75 mg/L de Penicilina y 50 mg/L de Estreptomina), a 39°C. En el laboratorio los ovocitos se obtuvieron mediante corte fino de los ovarios, para lo cual se utilizaron hojas de bisturí, pinzas y tijeras. Los ovarios, durante su manipulación, se mantuvieron en solución buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,4 y a 37,5°C (De los Reyes *et al.*, 2005).

II. Selección y Maduración de Ovocitos

Los ovocitos se seleccionaron bajo lupa estereoscópica eligiendo aquéllos de mayor tamaño, con citoplasma oscuro y homogéneo y con más de 3 capas compactas de células del cúmulo rodeando al ovocito (Farstad, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005).

Los ovocitos seleccionados se lavaron en solución PBS (buffer fosfato salino) suplementado con suero fetal bovino (SFB), piruvato y antibióticos, para posteriormente ser colocados en gotas de 100 μ L de medio de maduración, preparado previamente en base a: TCM 199 (Tissue Culture Médium 199, In vitrogen), de acuerdo a lo descrito por De los Reyes *et al.* (2006).

En cada réplica experimental, o repeticiones del experimento, se incubaron aproximadamente 15 a 20 ovocitos por gota de medio de cultivo, con un promedio aproximado de 70 ovocitos por réplica, los que fueron cubiertos con aceite mineral estéril (Sigma), a 38,5 °C, 5 % CO₂ y 98% de humedad, en estufa de cultivo (Forma Scientific) por períodos de 72 y 96 horas.

III. Obtención de Semen

La obtención de semen se realizó mediante estimulación digital en el pene de 3 perros adultos sanos, pertenecientes a privados. Se utilizó la segunda fracción espermática de cada eyaculado, con un total de 6 eyaculados (2 eyaculados de cada perro donante). Se evaluó en forma subjetiva la motilidad progresiva (MP) mediante microscopía de contraste de fases. La concentración espermática se evaluó mediante recuento en la cámara de Neubauer, utilizando una dilución previa 1:100, de acuerdo a las técnicas establecidas en el Laboratorio (De los Reyes, 2000).

El semen se diluyó en buffer trishidroxiaminometano (TRIS), en proporción 2:1 (TRIS : semen, respectivamente) y se centrifugó a 700 g por 5 minutos para la extracción del plasma seminal.

Luego, el pellet de espermatozoides fue resuspendido a temperatura ambiente (20° - 22°C) en CCM (en cantidad suficiente para obtener una concentración de 10×10^6 espermatozoides/mL). La composición de CCM (Mahi y Yanagimachi, 1978; Brewis *et al.*, 2001) es: 83,49 mM NaCl, 4,78 mM KCl, 1,71 mM CaCl₂, 1,19 mM KH₂PO₄, 37,61 mM NaHCO₃, 0,25 mM Piruvato de Na, 21,55 mM Lactato de Na solución 60%, 2,78 mM Glucosa, 2 g/l BSA, 0,05 g/l Estreptomina Sulfato, 100.000 UI Penicilina G). Los espermatozoides se dejaron en este medio para ser capacitados por períodos de 1, 2 y 3 horas, en cantidades iguales, en tubos separados.

Posterior a cada período en medio capacitante, los espermatozoides fueron centrifugados nuevamente a 300 g durante 5 minutos y resuspendidos en medio de fecundación (Fert-Talp) (Parrish *et al.*, 1988). Con esta suspensión de espermatozoides, se prepararon gotas de 100 µL para la coincubación con los ovocitos (10 – 15 ovocitos por gota) previamente madurados *in vitro* por 72 y 96 horas. La coincubación gamética se realizó a 38,5°C, 5% CO₂ y 98% de humedad en estufa de cultivo por 3 horas.

Los ovocitos de ambos tiempos de maduración se distribuyeron en 3 grupos. De los 184 ovocitos madurados durante 72 horas, un grupo de 67 ovocitos fue coincubado con semen capacitado durante 1 hora, el segundo grupo de 55 ovocitos con semen capacitado durante 2 horas y el tercer grupo de 62 ovocitos con semen capacitado durante 3 horas. Asimismo, de los 241 ovocitos madurados durante 96 horas, el primer grupo de 79 ovocitos fue coincubado con semen capacitado durante 1 hora, el segundo grupo de 79 ovocitos se coincubó con espermatozoides capacitados *in vitro* durante 2 horas y el tercer grupo de 83 ovocitos se coincubó con espermatozoides capacitados durante 3 horas.

Cada uno de estos grupos se coincubó separadamente durante 3 horas con los espermatozoides capacitados *in vitro* durante los tiempos correspondientes. Toda la manipulación de los gametos se realizó bajo una cámara de flujo laminar, en sala de cultivo con máxima esterilidad.

IV. Fijación y Evaluación de los Ovocitos Inseminados

Luego de la coincubación, los ovocitos se extrajeron de las gotas y se colocaron en una solución de citrato de sodio (5mg/mL) por 5 minutos, con el fin de retirar las células del cúmulo y espermatozoides adheridos superficialmente. Posteriormente, los ovocitos se lavaron en PBS y se fijaron en una solución de ácido acético, metanol y cloroformo en proporción 3:6:2, respectivamente, por tres minutos y posteriormente en ácido acético y metanol en proporción 1:3, por 72 horas a 4 °C (De los Reyes *et al.*, 2005). Los ovocitos se tiñeron con ioduro de propidio (PI; Molecular Probes, Eugene, Oregon USA) 1µg/mL, seguido por 3 lavados sucesivos en PBS, para ser evaluados posteriormente mediante microscopia de epifluorescencia (Microscopio Nikon Optiphot 2), lo que se realizó en el Laboratorio de Embriología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se determinó el porcentaje de ovocitos penetrados considerando un ovocito penetrado cuando se encontraron espermatozoides en la ZP (atravesando la ZP), EP o en el C.

Los resultados fueron analizados en forma de porcentajes con el fin de poder comparar las diferentes réplicas entre sí, ya que el número de ovocitos por réplica es variable y depende de diversos factores, como por ejemplo, la edad, el estado reproductivo y el momento del ciclo estral en el que se encuentra la perra donante al momento de la extracción de los ovarios.

Los porcentajes de ovocitos penetrados en los diferentes grupos de tratamiento (tiempos de maduración 72 y 96 horas, por espermatozoides capacitados durante 1, 2 y 3 horas) fueron evaluados mediante análisis de varianza utilizando para ello el programa Infostat (2004) Infostat versión 2004. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Las diferencias fueron determinadas mediante la prueba de Tukey, considerando significativa una diferencia de $p \leq 0,05$.

El diseño experimental es un modelo factorial 2 x 3:

$$Y_{ijk} = \mu + H_j + T_k + HT_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable a Estudiar (Penetración)

μ = Media poblacional

H_j = Tiempo de Maduración Ovocitos (72, 96 horas)

T_k = Tiempo de Capacitación (1, 2 y 3 horas)

HT_{jk} = Interacción ovocitos - tiempo

ϵ_{ijk} = Error

RESULTADOS

Se analizó una cantidad total de 425 ovocitos ($n = 425$), a través de 6 réplicas experimentales, con aproximadamente 70 ovocitos por réplica. Del total de ovocitos estudiados, 184 fueron madurados durante 72 horas y los otros 241 durante 96.

En la tabla N° 1 se muestran los porcentajes de penetración espermática obtenidos en ambos grupos de maduración ovocitaria. Se determinó, adicionalmente, el porcentaje de ovocitos que presentaban espermatozoides unidos a su superficie, pero sin evidencias de penetración (UNIDOS) (figura N° 1, a y b; figura N° 2, a y b).

TABLA N° 1: Penetración Espermática en Ovocitos Caninos Madurados *in vitro* durante 72 y 96 horas de acuerdo al tiempo de capacitación.

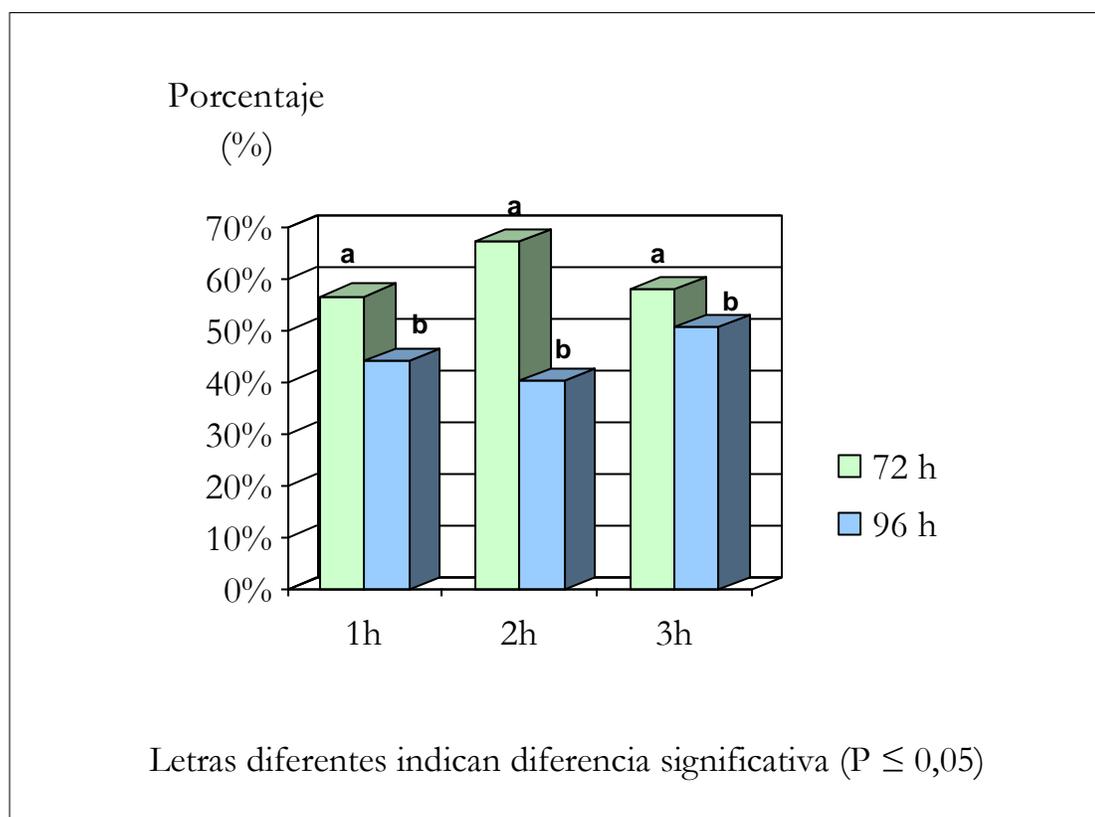
Horas de Capacitación	Ovocitos Madurados (horas)					
	72 horas			96 horas		
	N° DE OVOCITOS EVALUADOS	UNIDOS	PENETRADOS TOTALES	N° DE OVOCITOS EVALUADOS	UNIDOS	PENETRADOS TOTALES
1	67	18/67 (26,87%)	38/67 (56,72%)	79	25/79 (31,65%)	35/79 (44,30%)
2	55	14/55 (25,45%)	37/55 (67,27%)	79	29/79 (36,71%)	32/79 (40,51%)
3	62	17/62 (27,42%)	36/62 (58,06%)	83	27/83 (32,53%)	42/83 (50,60%)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en los porcentajes de penetración entre los diferentes tiempos de capacitación espermática.

El gráfico N° 1 muestra los porcentajes de ovocitos penetrados, obtenidos del total de ovocitos estudiados, considerando ambos tiempos de maduración. Hubo mayores porcentajes de penetración en el grupo de ovocitos madurados durante 72 horas que en aquéllos madurados durante 96 horas ($P < 0,05$).

En ovocitos de 72 horas de maduración, el promedio de penetración alcanzó un 60,6%, mientras que en los ovocitos madurados por 96 horas el promedio alcanzó un 45,1%.

GRÁFICO N° 1: Porcentajes de Ovocitos Penetrados del Total de Ovocitos Estudiados



Un 57,2% (n = 126) de los ovocitos del estudio que estuvieron penetrados (PENETRADOS TOTALES), los que se analizaron respecto del nivel de penetración alcanzado por los espermatozoides capacitados (tabla N° 2), considerando la ZP (figura N° 3, a y b; figura N° 4, a y b), el EP (figura N° 5, a y b), o el C (figura N° 6, a y b; figura N° 7, a y b) tanto con ovocitos madurados por 72 horas (tabla N° 3) como por 96 horas (tabla N° 4).

TABLA N° 2: Estados de Penetración espermática en Ovocitos Caninos Madurados *in vitro* durante 72 y 96 horas

Horas de Capacitación	Ovocitos Madurados (horas)							
	72 horas				96 horas			
	N° Ovocitos Evaluados	ZP	EP	C	N° Ovocitos Evaluados	ZP	EP	C
1	19	6/19 (31,58%) ^a	2/19 (10,53%) ^a	11/19 (57,89%) ^a	26	7/26 (26,92%) ^a	5/26 (19,23%) ^a	14/26 (53,85%) ^a
2	13	3/13 (23,08%) ^a	3/13 (23,08%) ^b	7/13 (53,85%) ^a	21	6/21 (28,57%) ^a	4/21 (19,05%) ^a	11/21 (52,38%) ^a
3	15	4/15 (26,67%) ^a	3/15 (20,00%) ^b	8/15 (53,33%) ^a	32	6/32 (18,75%) ^a	12/32 (37,50%) ^b	14/32 (43,75%) ^a

Letras diferentes entre columnas indica (P < 0,05).

TABLA N° 3: Porcentajes de Ovocitos Madurados 72 Horas Penetrados en la Zona Pelúcida (ZP), Espacio Perivitelino (EP) y Citoplasma (C)

NIVEL DE PENETRACIÓN	1 Hora (%)	2 Horas (%)	3 Horas (%)
ZP	31,6 ^a	23,1 ^a	26,7 ^a
EP	10,5 ^b	23,1 ^a	20,0 ^a
C	57,9 ^c	53,9 ^c	53,3 ^c

Letras diferentes entre columnas indican diferencia $P < 0,05$.

TABLA N° 4: Porcentajes de Ovocitos Madurados 96 Horas Penetrados en la Zona Pelúcida (ZP), Espacio Perivitelino (EP) y Citoplasma (C)

NIVEL DE PENETRACIÓN	1 Hora (%)	2 Horas (%)	3 Horas (%)
ZP	26,9 ^a	28,6 ^a	18,8 ^a
EP	19,2 ^b	19,1 ^a	37,5 ^b
C	53,9 ^c	52,4 ^c	43,8 ^b

Letras diferentes entre columnas indican diferencia $P < 0,05$.

En ambos tiempos de maduración ovocitaria (tablas N° 3 y N° 4), se obtuvieron resultados similares al comparar los 3 tiempos de capacitación en cuanto a los porcentajes de penetración en los diferentes niveles evaluados.

Al comparar los diferentes niveles de penetración en los ovocitos madurados por 72 y 96 horas, se encontró mayor porcentaje a mayor profundidad, especialmente a nivel de C.

No se encontraron significancias estadísticas en la interacción de las variables tiempo de capacitación espermática y tiempo de maduración de los ovocitos.

Las figuras N° 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, muestran ovocitos de perra madurados *in vitro*, penetrados a diferentes niveles por espermatozoides caninos capacitados *in vitro*.

FIGURA N° 1 (x100); **1a** contraste de fases, y **1b** epifluorescencia: Ovocito con Espermatozoides Unidos.

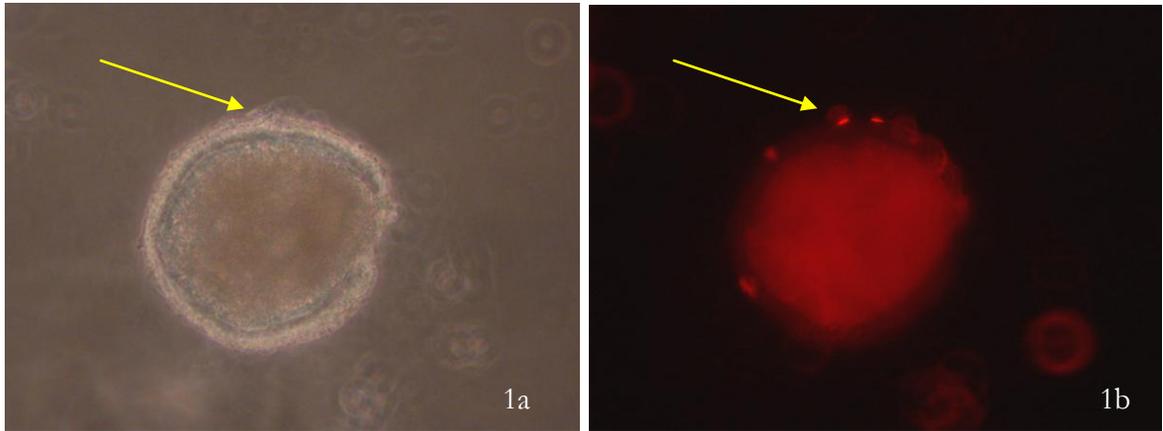


FIGURA N° 2 (x100); **2a** contraste de fases, y **2b** epifluorescencia: Ovocito con Espermatozoide Unido.

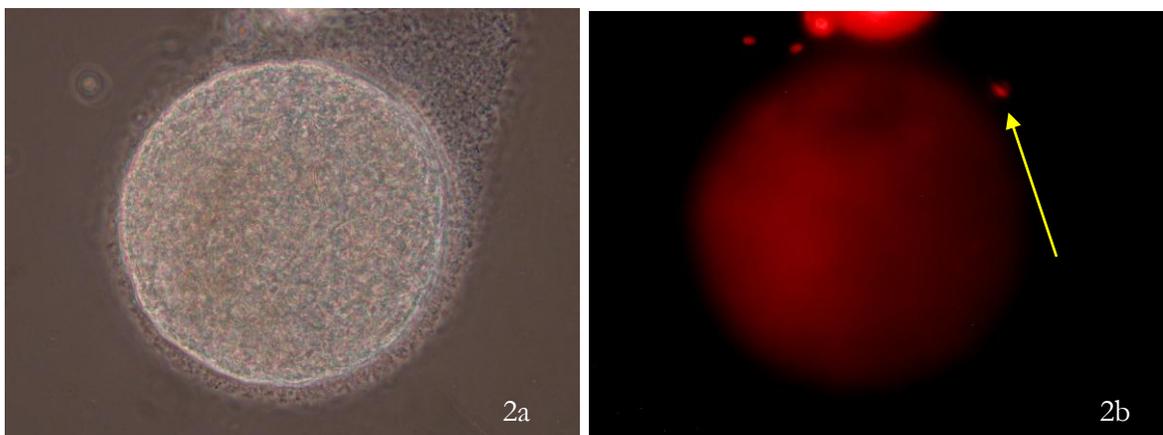


FIGURA N° 3 (x100); **3a** contraste de fases, y **3b** epifluorescencia: Ovocito con espermatozoide atravesando la ZP.

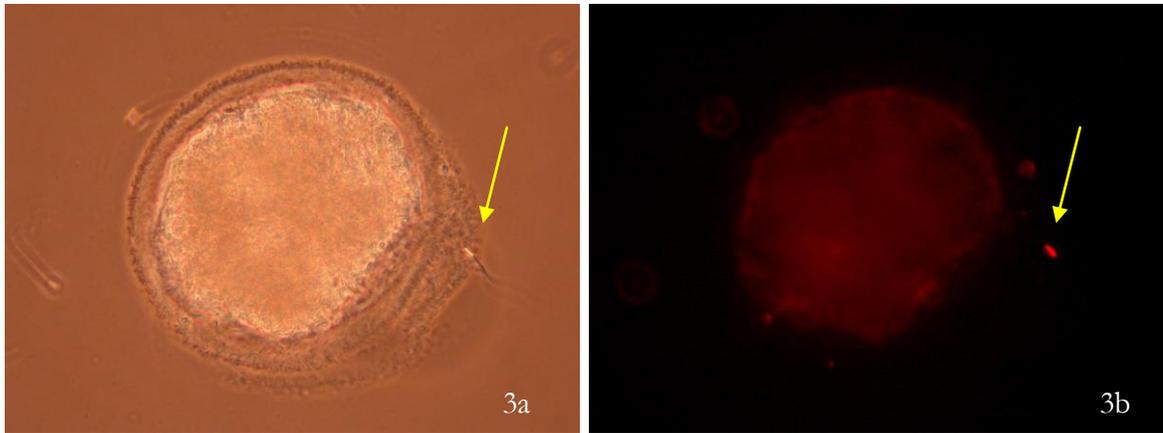


FIGURA N° 4 (x400); **4a** contraste de fases, y **4b** epifluorescencia: Ovocito con espermatozoide atravesando la ZP.

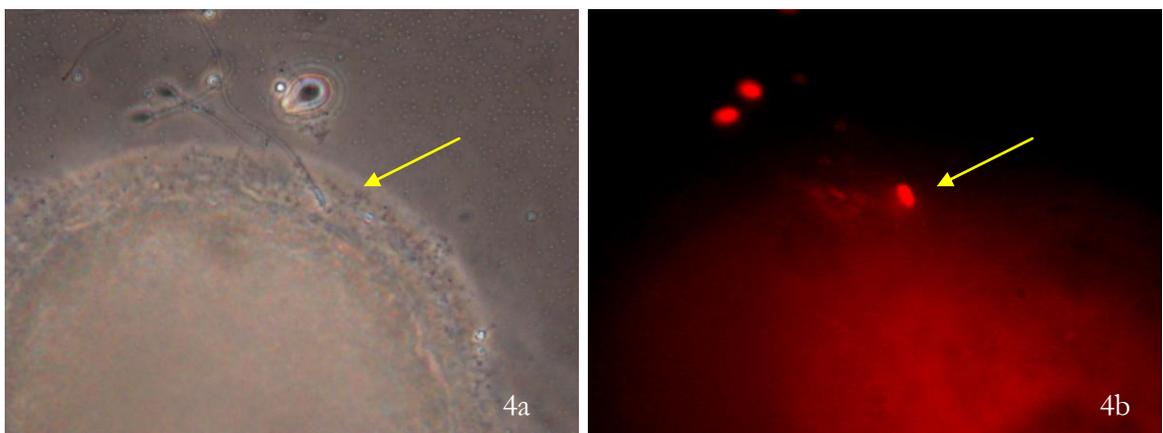


FIGURA N° 5 (x100); **5a** contraste de fases, y **5b** epifluorescencia: Ovocito con Espermatozoide en EP y C.

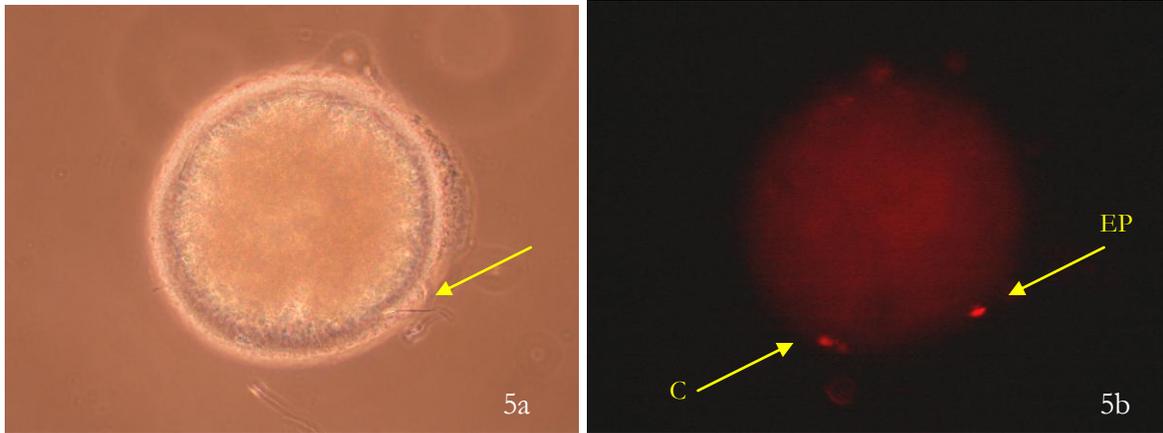


FIGURA N° 6 (x100); **6a** contraste de fases, y **6b** epifluorescencia: Ovocito con Espermatozoides en C y Poliespermia.

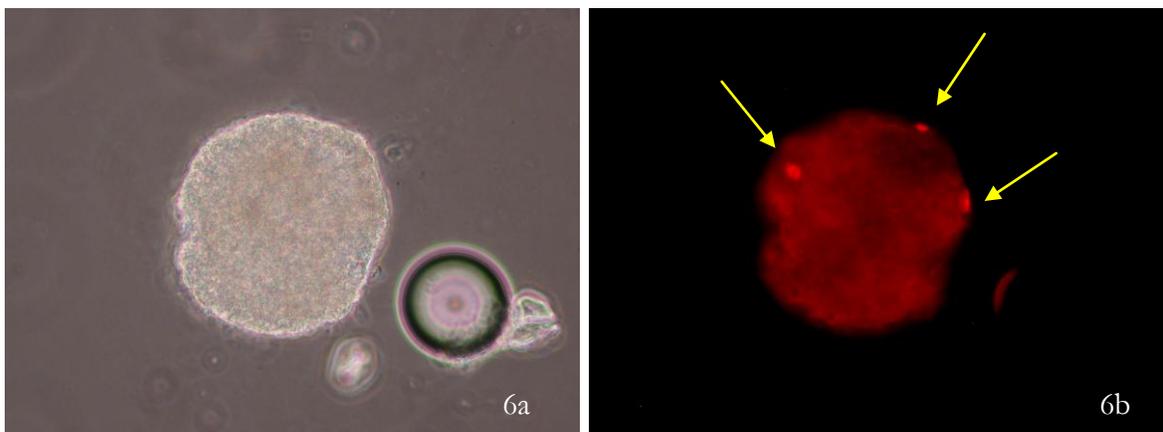
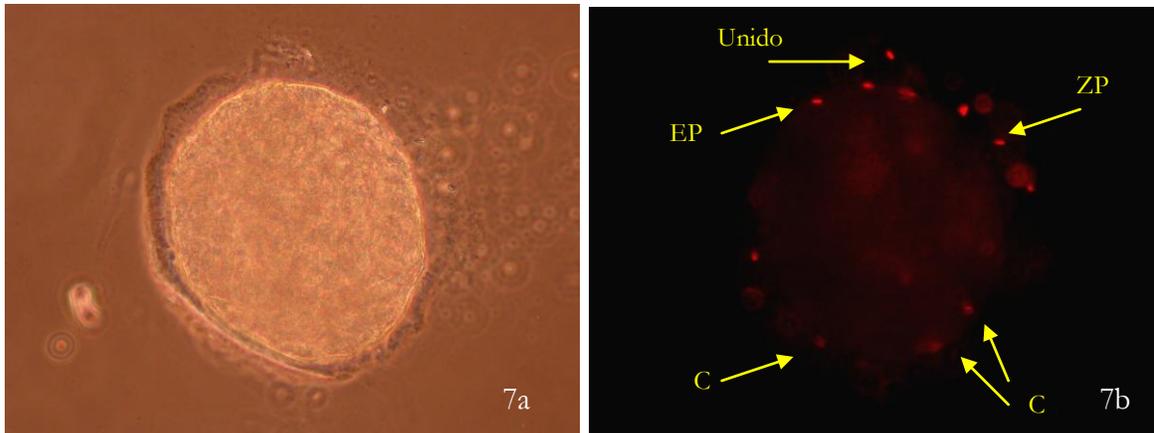


FIGURA N° 7 (x100); **7a** contraste de fases, y **7b** epifluorescencia: Ovocito con Espermatozoides Unidos, en ZP, EP y C. Poliespermia.



DISCUSIÓN

Este trabajo indicó que existe una diferencia importante en los porcentajes de penetración espermática entre los dos tiempos de maduración ovocitaria *in vitro* empleados. No se observó, por el contrario, que los tiempos de capacitación a que estuvieron sometidos los espermatozoides, previo a la interacción de los gametos *in vitro*, influyera en forma significativa en la penetración espermática total.

La capacitación espermática involucra cambios biológicos y estructurales (Barros *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001), que permiten que el espermatozoide pueda interactuar con las cubiertas ovocitarias, penetrar la zona pelúcida y finalmente fusionarse e ingresar al citoplasma ovular (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; De los Reyes y Barros, 2000; Brewis *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2002). El tiempo de capacitación espermática depende de la especie (Yanagimachi, 1994). Trabajos en caninos han mostrado que este fenómeno puede ser inducido *in vitro* similarmente a otros mamíferos como los humanos (DasGupta *et al.*, 1993), ratones (Fraser y Herod, 1990), cabras (Kaul *et al.*, 1997) y toros (Fraser *et al.*, 1995), lo que concuerda a lo logrado en este trabajo, donde los tiempos de capacitación espermática empleados *in vitro* permitieron que un porcentaje importante de espermatozoides alcanzaran este estado, lo que les permitió interactuar con el ovocito y sus cubiertas.

Los primeros estudios en capacitación de espermatozoides caninos emplearon tiempos de incubación de 7 horas logrando inducción de la RA y penetración de ovocitos (Mahi y Yanagimachi, 1976). Estudios posteriores ponen en evidencia que la capacitación espermática y en consecuencia la habilidad de los espermatozoides de unirse y penetrar la ZP de ovocitos caninos, se logra en períodos de tiempo más reducidos (Kawakami *et al.*, 1993). Yamada *et al.* (1992) utilizan 4 – 5 horas de incubación, observando a las 3 horas hiperactivación del flagelo. Otros estudios han utilizado 3 (Guérin *et al.*, 1999) y 2 horas (Brewis *et al.*, 2001) de incubación en medio capacitante, evidenciando cambios en relación a la capacitación a través del movimiento hiperactivado del flagelo. En el presente estudio se pudo comprobar que la fecundación *in vitro* de ovocitos caninos madurados *in vitro* efectivamente se puede llevar a cabo utilizando tiempos de capacitación espermática reducidos, como 1 hora, lo cual no se había comprobado hasta ahora. Esto concuerda con estudios preliminares en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que han observado en espermatozoides de perro la presencia de acrosina, enzima involucrada en la unión y penetración espermática a la ZP (Barros *et al.*, 1993; Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002), utilizando tiempos de capacitación de 1 hora (no publicados) y otros trabajos que han demostrado la RA *in vitro* en tiempos tempranos como el descrito (Brewis *et al.*, 2001).

En este trabajo se pudo observar que en los 3 tiempos de capacitación espermática empleados (1, 2 y 3 horas) se obtuvieron porcentajes de penetración importantes en ovocitos previamente madurados *in vitro*. Sin embargo, el tiempo entre los tres períodos de capacitación empleados no alcanzó a producir diferencias marcadas y significativas en los porcentajes de penetración.

Es probable que durante el tiempo de coincubación de los gametos, de 3 horas, algunos espermatozoides hayan continuado con el proceso de capacitación, ya que el medio utilizado para la fecundación empleado durante la coincubación puede sustentar la capacitación espermática (Hewitt y England, 1999^a).

La penetración espermática fue comprobada efectivamente en los ovocitos bajo el microscopio de epifluorescencia, lo cual permitió determinar los diferentes niveles de penetración alcanzados por los espermatozoides. No existen estudios hasta el momento que hayan evaluado la penetración espermática tan detalladamente en relación al tiempo de capacitación. En los resultados de este trabajo se puede apreciar que en ambos tiempos de maduración ovocitaria utilizando espermatozoides capacitados durante 3 períodos de tiempo diferentes, se presentaron mayores porcentajes de penetración a nivel de citoplasma ovular, sin encontrar diferencias significativas entre las horas de capacitación.

Estudios iniciales en capacitación y penetración espermática de ovocitos caninos, observaron RA y penetración de la ZP a las 7 horas de capacitación con ovocitos madurados *in vitro* por 24 – 72 horas, logrando un 74% de penetración a la ZP y/o EP luego de 11 a 24 horas de coincubación (Mahi y Yanagimachi, 1976). Posteriormente, los mismos autores utilizaron 7 horas de capacitación espermática *in vitro* logrando 71% de penetración a la ZP (Mahi y Yanagimachi, 1978). En comparación con los porcentajes de penetración obtenidos en el presente estudio (promedio 60,6% y 45,1% para ovocitos madurados durante 72 y 96 horas respectivamente), en el cual se utilizaron menores tiempos de capacitación, los resultados de penetración total fueron inferiores a lo logrado por Mahi y Yanagimachi (1976).

Sin embargo, al comparar los porcentajes de penetración al citoplasma ovular con lo obtenido por los mismos autores, éstos fueron superiores (19,7% versus 55,0% y 50,0% en promedio para ovocitos madurados durante 72 y 96 horas, respectivamente).

Los resultados de penetración espermática a nivel de citoplasma ovular obtenidos en este trabajo fueron también superiores a lo logrado en otros estudios: 42,9% (Yamada *et al.*, 1992); 37,5% y 20% (Nickson *et al.*, 1993); 13% - 14% (Otoi *et al.*, 2000^a) y 30,6% (Rodrigues *et al.*, 2004^a), independiente del tiempo de capacitación espermática previa y/o de coincubación utilizado en cada uno de ellos. Sin embargo, se hace difícil la comparación al tratarse de procedimientos no estandarizados y efectuados bajo diferentes protocolos.

La penetración al citoplasma ovular en el estudio de Yamada *et al.* (1992), se observó a las 2 horas de coincubación. Sin embargo, este autor describe que ya a la hora de coincubación se encontraron espermatozoides a nivel de la ZP y EP. El menor tiempo de capacitación espermática al que fueron sometidos los espermatozoides en el presente estudio, en comparación con las 4 – 5 horas de capacitación utilizadas por Yamada *et al.* (1992), pudo haber influido en los diferentes porcentajes alcanzados, ya que, según antecedentes, al aumentar el período de capacitación los parámetros de fertilidad de los espermatozoides caninos pueden disminuir (Kawakami *et al.*, 1993).

No obstante, los menores resultados de penetración también podrían ser atribuibles a la falta de un protocolo previo de capacitación espermática, como lo observado en otros estudios que no han utilizado un protocolo de capacitación previo, como los trabajos de Otoi *et al.* (2000^a) que utilizaron ovocitos madurados *in vitro* durante 72 horas, coincubados con espermatozoides por 6 horas, obteniendo porcentajes de penetración a nivel de citoplasma de 13% - 14%.

Asimismo, en estudios posteriores de los mismos autores, empleando períodos de coincubación de 20 horas de espermatozoides caninos con ovocitos previamente madurados durante 72 horas, se obtuvo un porcentaje de penetración al citoplasma ovular de 40,3% (Otoi *et al.*, 2000^b), lo cual se acerca más a los resultados del presente trabajo. Si bien los porcentajes de penetración del presente estudio son superiores a lo observado por Otoi *et al.* (2000^b), la diferencia es menor a lo observado previamente por dichos autores (Otoi *et al.*, 2000^a), probablemente por el mayor tiempo de coincubación empleado posteriormente, que pudo haber implicado un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados y, por tanto, una mayor penetración. Estas evidencias podrían sugerir que para aumentar los porcentajes de éxito de la fecundación *in vitro* en caninos sería preferible un período de capacitación espermática previa. Sin embargo, este período no debiera ser demasiado largo, ya que, como se ha mencionado anteriormente, los parámetros de fertilidad de los espermatozoides pueden disminuir (Kawakami *et al.*, 1993).

Cuando se ha evaluado la relación entre el tiempo de coincubación gamética y la penetración espermática en semen fresco, refrigerado y congelado-descongelado de perro, utilizando el mismo protocolo, los porcentajes de penetración al citoplasma ovular a las 3 horas de coincubación aumentan significativamente a partir de las 2 horas de coincubación en espermatozoides frescos y ovocitos madurados *in vitro* (De los Reyes *et al.*, no publicado), lo cual sería coincidente con el presente estudio, lo que permitiría explicar en parte, el mayor porcentaje de penetración alcanzado a nivel de citoplasma. Existen evidencias de que la penetración espermática a la ZP se produce 1 hora después de iniciada la coincubación (Nickson *et al.*, 1993). La penetración espermática al citoplasma ovular, en cambio, se ha observado a partir de las 2 horas de coincubación (Yamada *et al.*, 1992). En este estudio se utilizaron 3 horas de coincubación, logrando porcentajes mayores de penetración al citoplasma, lo cual coincide con los antecedentes mencionados. Los menores porcentajes de penetración se observaron a nivel de EP, probablemente porque el tiempo en que los espermatozoides tardan en atravesarlo es más reducido dado su menor grosor en comparación con la ZP (Yanagimachi, 1994).

La penetración espermática con los espermatozoides capacitados por los tres períodos diferentes, se obtuvo en ovocitos madurados por 72 y 96 horas; estos tiempos de maduración ovocitaria empleados tuvieron como referencia la maduración de ovocitos caninos *in vivo* (Yanagimachi, 1994; Farstad, 2000; Luvoni, 2000; Rodrigues y Rodrigues, 2003) y como base estudios previos de maduración ovocitaria *in vitro* (Mahi Yanagimachi, 1976; Yamada *et al.*, 1992; Hewitt *et al.*, 1998; Farstad, 2000; Brewis *et al.*, 2001; Luvoni *et al.*, 2003; Rodrigues y Rodrigues, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004^a, Rodrigues *et al.*, 2004^b; De los Reyes *et al.*, 2005).

Sin embargo, los resultados de penetración mostraron diferencias notorias entre los ovocitos madurados durante 72 y 96 horas. Los mayores porcentajes de penetración se registraron en los ovocitos madurados durante 72 horas, lo cual se repitió con espermatozoides capacitados durante los diferentes tiempos. En todos los casos los porcentajes de penetración en ovocitos madurados durante 72 horas superaron el 50%, a diferencia de lo que ocurrió con los ovocitos madurados durante 96 horas, los cuales, si bien presentaron porcentajes altos de penetración (sobre 40%), fueron inferiores a los que se obtuvieron con ovocitos madurados durante 72 horas. A pesar que se han obtenido mayores porcentajes de maduración *in vitro* a las 96 horas (De los Reyes *et al.*, 2005), es posible que haya existido una sobremaduración y consecuente degeneración progresiva de los ovocitos, las cuales se han evidenciado previamente por picnosis, estructuras intracitoplasmáticas no identificables y/o pérdida de la membrana citoplasmática (Saint-Dizier *et al.*, 2001), lo que podría disminuir el porcentaje de penetración alcanzado en estos gametos en comparación a aquéllos madurados durante 72 horas.

Además, si bien se ha demostrado que largos tiempos de incubación para maduración *in vitro* de ovocitos caninos, como 96 horas, pueden mantener su viabilidad en un porcentaje importante (De los Reyes *et al.*, 2005) es posible que algunos presenten modificaciones ultraestructurales de la ZP (De los Reyes, no publicado) que puedan afectar la penetración espermática, como asimismo pudiesen haber experimentado la reacción de zona con la liberación del contenido de los gránulos corticales (De los Reyes *et al.*, 2006), haciendo a los ovocitos refractarios a la penetración de los espermatozoides (Yanagimachi, 1994).

Luvoni *et al.* (2003), en un estudio de maduración de ovocitos caninos *in vitro* en oviductos aislados obtuvo un marcado aumento de ovocitos en proceso degenerativo a las 48 horas de maduración, en comparación con 24 y 30 horas bajo las mismas condiciones. En otros trabajos con maduración de ovocitos caninos también se han obtenido altos porcentajes de degeneración durante el proceso de maduración, como 17% – 19% (Hewitt *et al.*, 1998) y 28,9% en promedio, durante 72 horas de cultivo (Saint-Dizier *et al.*, 2001). No obstante, la técnica de maduración, en cuanto a condiciones de cultivo, difiere de la utilizada en el presente estudio.

Al evaluar los ovocitos en el microscopio de epifluorescencia para determinar la penetración espermática en cada uno de ellos, se pudo observar que una cantidad considerable de éstos presentaba poliespermia. *In vivo* existen mecanismos fisiológicos que evitan que este fenómeno ocurra (Yanagimachi, 1994; Sun, 2003), ya que un ovocito fecundado por más de un espermatozoide no es compatible con el desarrollo embrionario posterior (Yanagimachi, 1994). Los eventos que evitan la poliespermia y por ende la inviabilidad del cigoto, se conocen como bloqueo de la poliespermia y están orientados a permitir que el ovocito sea fecundado por un único espermatozoide (monoespermia) (Yanagimachi, 1994; Sun, 2003). Es probable que la concentración de espermatozoides con la que se trabajó *in vitro* sea comparativamente mayor que la concentración de espermatozoides que rodean al ovocito al momento de la fecundación en el oviducto de la perra, ya que *in vivo* los espermatozoides van disminuyendo en cantidad por sistemas de selección a través del tracto reproductivo de la hembra (Cummins y Yanagimachi, 1982; Yanagimachi, 1994).

Además, es importante considerar que los sistemas de maduración *in vitro* probablemente no logren la maduración completa a nivel citoplasmático en todos los ovocitos, que incluye la migración de los gránulos corticales (De los Reyes *et al.*, 2006). La madurez incompleta del ovocito, si bien no impide la penetración del espermatozoide (Yamada *et al.*, 1992, Saint-Dizier *et al.*, 2001), permite explicar falencias del mecanismo de bloqueo de la poliespermia (Yanagimachi, 1994; De los Reyes *et al.*, 2006). En este estudio no se midieron parámetros de maduración nuclear y/o citoplasmática de los ovocitos evaluados; sin embargo, en trabajos previos utilizando el mismo protocolo de maduración empleado en esta memoria, se ha podido comprobar que los porcentajes de maduración nuclear han alcanzado 43% (De los Reyes *et al.*, 2005) y a nivel citoplasmático, la migración de los gránulos corticales, luego de 96 horas de cultivo, alcanzaron el 100% (De los Reyes *et al.*, 2006), lo cual implicaría que probablemente la concentración espermática empleada influyó más significativamente en la poliespermia observada utilizando espermatozoides capacitados por 1, 2 o 3 horas.

CONCLUSIONES

La penetración espermática y fecundación *in vitro* de ovocitos de perra pueden obtenerse con espermatozoides capacitados previamente por 1, 2 o 3 horas.

Los espermatozoides caninos podrían ser sometidos a menores tiempos de capacitación *in vitro* que los utilizados hasta ahora, como 1 hora, logrando porcentajes importantes de penetración y fecundación *in vitro* en esta especie.

Los mayores porcentajes de penetración y fecundación *in vitro* se obtendrían con ovocitos de perra madurados en cultivo por 72 horas.

Se obtendrían mayores porcentajes de penetración a nivel de citoplasma ovular (C) en comparación a los otros niveles de penetración evaluados (ZP y EP), independientemente del tiempo de capacitación espermática y maduración ovocitaria *in vitro* utilizada.

BIBLIOGRAFÍA

- **BARROS, C.; MELENDEZ, J.; VALDIVIA, M.; RÍOS, M.; YUNES, R.** 1993. Sperm passage through the egg coats. *Biological Research* 26: 417 – 427.
- **BARROS, C.; CROSBY, J. A.; MORENO, R. D.** 1996. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biology International*. 20: 33 – 39.
- **BAVISTER, B. D.;** 2002. Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction* 124: 181 – 196.
- **BOGLIOLO, L.; ZEDDA, M. T.; LEDDA, S.; LEONI, G.; NAITANA, S.; PAU, S.** 2002. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction Nutrition and Development* 42: 265 – 273.
- **BREITBART, H.; NAOR, Z.** 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of Reproduction* 4: 151 – 159.
- **BREWIS, I. A.; MORTON, I. E.; MOORE, H. D.; ENGLAND, G. C.** 2001. Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 60: 49 – 497.
- **CONCANNON, P. W.** 1989. Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal Reproduction and Fertility* 39: 3 – 25.
- **CUMMINS, J. M.; YANAGIMACHI, R.** 1982. Sperm – egg rations and the site of the acrosome reaction during *in vivo* fertilization. *Gamete Research* 5: 239 – 256.

- **DASGUPTA, S.; MILLS, C. L.; FRASER, L. R.** 1993. Ca²⁺ related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *Journal Reproduction and Fertility* 99: 135 – 143.
- **DE LOS REYES, M.** 2000. Fisiología Reproductiva de la Perra. En: *Tópicos en Reproducción de Pequeños Animales*. De los Reyes, M., Sánchez, A. (ed). Ediciones Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 1° Ed. 2000. Chile. pp. 13 – 28.
- **DE LOS REYES, M.; BARROS, C.** 2000. Immunolocalization of proacrosin / acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. *Animal Reproduction Science* 58: 215 – 228.
- **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. *Theriogenology* 64: 1 – 11.
- **DE LOS REYES, M.; PALOMINOS, J.; MIRANDA, P.; SEPÚLVEDA, S.; PARRAGUEZ, V.; BARROS, C.** 2006. Evaluation of cortical granules and viability evaluation during in vitro maturation of bitch oocytes subjected a long-term culture periods. *The Veterinary Record* (EN PRENSA).
- **DOWNS, S. M.** 1993. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 39: 65 – 79.
- **FARSTAD, W.** 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175 – 186.

- **FRASER, L. R.; HEROD, J. E.** 1990. Expression of capacitation – dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycosable substrate. *Journal Reproduction and Fertility* 88: 611 – 621.
- **FRASER, L. R.; ABEYDEERA, L. R.; NIWA, K.** 1995. Ca²⁺ regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular Reproduction and Development* 40: 233 – 241.
- **FUJII, M.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; UNE, S.; SUZUKI, T.** 2000. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *Journal of Veterinary Medicine Science* 62: 305 – 307.
- **GOBELLO, C.; CORRADA, Y.** 2004. Actualización en la Biotecnología Reproductiva Canina. En: Gobello C. “Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latinoamericanos”. Editorial Gráfica Latina. Buenos Aires. Argentina. Capítulo 11:107-116.
- **GUÉRIN, P.; FERRER, M.; FONTBONNE, A.; BÉNIGNI, L. ; JACQUET, M. ; MÉNÉZO, Y.** 1999. In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 52: 617 – 628.
- **HEWITT, D. A.; WATSON, P. F.; ENGLAND, G. C.** 1998. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology* 49: 1083 – 1101.
- **HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C.** 1999^a. Culture conditions required to induce capacitation and the acrosome reaction of canine sperm in vitro. *The Veterinary Record* 144: 22 – 23.

- **HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C.** 1999^b. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Animal Reproduction Science* 55: 63 – 75.
- **KAUL, G.; SINGH, S.; GANDHI, K. K.; ANAND, S. R.** 1997. Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa assessed by chlortetracycline assay. *Andrologia* 29: 243 – 251.
- **KAWAKAMI, E.; VANDERVOORT, C.; MAHI-BROWN, C.; OVERSTREET, J.** 1993. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biology of Reproduction* 48: 841 – 845.
- **LUVONI, G.** 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reproduction Nutrition and Development* 40: 505 – 512.
- **LUVONI, G.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D.** 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reproduction Domestic Animals* 38: 410 – 414.
- **MAHI, C. A.; YANAGIMACHI, R.** 1976. Maturation and Sperm Penetration of Canine Ovarian Oocytes *In Vitro*. *Journal of Experimental Zoology* 196: 189 – 196.
- **MAHI, C. A.; YANAGIMACHI, R.** 1978. Capacitation, acrosome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Research* 1: 101 – 109.
- **MORENO, R. D.; BUSTAMANTE, E.; SCHATTEN, G.; BARROS, C.** 2002. Inhibition of mouse in vitro fertilization by an antibody against a unique 18–amino acid domain in the polysulfate-binding domain of proacrosin / acrosin. *Fertility and Sterility* 77: 812 – 817.

- **NICKSON, D. A.; BOYD, J. S.; ECKERSHALL, P. D.; FERGUSON, J. M.; HARVEY, M. J.; RENTON, J. P.** 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 44: 231 – 240.
- **OTOI, T.; MURAKAMI, M.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; UNE, S.; SUZUKI, T.** 2000^a. Development of canine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *The Veterinary Record* 146: 52 – 53.
- **OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T.** 2000^b. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 54 (4): 535 – 542.
- **OTOI, T.; SHIN, T.; KRAEMER, D. C.; WESTHUSIN, M. E.** 2004. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after *in vitro* maturation and fertilization. *Reproduction Nutrition Development* 44: 631 – 637.
- **PARRISH, J. J.; SUSKO – PARRISH, J. L.; WINER, A.; FIRST, N.** 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 38: 1171 – 1180.
- **RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L.** 2003. Influence of Reproductive Status on In Vitro Oocyte Maturation in Dogs. *Theriogenology* 60: 59 – 66.
- **RODRIGUES, B. A.; DOS SANTOS, L. C.; RODRIGUES, J. L.** 2004^a. Embryonic Development of In Vitro Matured and In Vitro Fertilized Dog Oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 67: 215 – 223.

- **RODRIGUES, B. A.; DOS SANTOS, L. C.; RODRIGUES, J. L.** 2004^b. The effect of hyaluronan concentrations in HTS supplemented TCM 199 on in vitro nuclear maturation of bitch cumulus-oocyte complexes. 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brazil. 4 to 6th August 2004; 256 – 257.
- **SAINT - DIZIER, M.; RENARD, J-P.; CHASTANT – MAILLARD, S.** 2001. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* 121: 97 – 105.
- **SIRIVAIYAPONG, S.; CHENG, F. P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W. F.; BEVERS, M.; COLENBRANDER, B.** 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology* 53: 789 – 802.
- **SUN, Q. Y.** (2003) Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy Research Technology* 61: 342 – 348.
- **TÖPFER - PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A. M.; EKHLASI - HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte – sperm interactions. *Animal Reproduction Science* 60 – 61: 653 – 662.
- **VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; DE PAUW, I.; MAES, D.; DE KRUIF, A.** 2002. Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. *Reproduction Domestic Animals* 37 (3): 144 – 151.
- **YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y.** 1992. Maturation, Fertilization and Development of Dog Oocytes *In Vitro*. *Biology of Reproduction* 46: 853 – 858.

- **YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y.** 1993. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 47: 227 – 229.
- **YANAGIMACHI, R.** 1994. Mammalian fertilization. En: Knobil, E. y Neill, J. D. (eds). *The Physiology of Reproduction* 2^a ed. Editorial Raven Press. Nueva York. USA. pp. 189 – 317 .