



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



FECUNDACIÓN IN VITRO EN CANINOS: EVALUACIÓN DE
LA PENETRACIÓN ESPERMÁTICA EN EL TIEMPO
UTILIZANDO SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO CON
OVOCITOS EN DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN.

Carla Fernanda Anguita Bohmwald

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal.

PROFESOR GUÍA: DRA. MONICA DE LOS REYES S.

Financiamiento Proyecto FONDECYT 1030380

SANTIAGO – CHILE

2006



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



FECUNDACIÓN IN VITRO EN CANINOS: EVALUACIÓN DE
LA PENETRACIÓN ESPERMÁTICA EN EL TIEMPO
UTILIZANDO SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO CON
OVOCITOS EN DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN.

Carla Fernanda Anguita Bohmwald

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal.

NOTA FINAL: 7.0

	NOTA	FIRMA
PROF. GUÍA: DRA. MONICA DE LOS REYES S.
PROF. CONSEJERO: DR. WALTER VON FREY
PROF. CONSEJERO: DR. VICTOR H. PARRAGUEZ

SANTIAGO – CHILE
2006

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate *in vitro* fertilizing ability of cooled (4°) and fresh spermatozoa to cross the zona pellucida (ZP) and penetrate the cytoplasm (C) of immature and *in vitro* matured bitch oocytes through out different coincubation times.

Ejaculates were obtained by manual stimulation from five adult dogs using the sperm-rich fraction. After semen evaluation, seminal plasma was removed by centrifugation. The remaining pellet of the sperm that was going to be processed as fresh sample (control) was resuspended in Fert TALP media. The one left to be processed as cooled samples was rediluted in TRIS- egg yolk-citric acid extender and then maintained at 4 °C for 24 hours, after that the extender was removed by centrifugation and the pellet was resuspended in Fert TALP media. Fresh and chilled spermatozoa were coincubated with immature and *in vitro* matured bitch oocytes separately.

Ovaries from ovariectomy were macerated to obtain oocytes which were selected under stereoscopic microscope and washed in PBS media. Those oocytes used as immature oocytes were previously adapted in Fert TALP media and then coincubated with fresh or chilled spermatozoa. Oocytes for *in vitro* maturation were incubated in TCM 199 media supplemented with 10% FCS, 10 UI/mL of hCG, 2,5µL/mL of pyruvate solution and 5 µL/mL antibiotic solution for 72 and 96 hours. Finally, they were coincubated with both fresh and chilled sperm separately.

Gametes were coincubated for up to ten hours in Fert TALP media. At each hour oocytes were removed from the co-culture media, fixed with acetic acid-methanol-chloroform solution (3:6:2) for 3 minutes, and with acetic-methanol solution for 72 hours at 4 °C. The oocytes were then stained with 0.1% of propidium iodide and examined with epifluorescence microscope. Penetrated oocytes were defined as those having sperm heads in ZP, PV or C.

A total of 3391 immature (n= 1765) and matured (n=1626) oocytes were evaluated.

The results showed that as the co-culture time increases the penetration rate through the egg coats also increases using fresh and chilled dog sperm. The increase in the penetration rate with fresh sperm was found significant from 3 hours of co-culture for immature oocytes and 2 hours for *in vitro* matured oocytes ($p < 0,05$). Nevertheless, chilled sperm showed a significant increase since 5 hours of co-culture for immature oocytes and 2 hours for *in vitro* matured oocytes. Fresh sperm penetrated more oocytes than chilled sperm in all co-culture time, except in the first hour when chilled sperm could penetrate more *in vitro* matured oocytes ($p < 0,05$). *In vitro* matured oocytes were more penetrated than immature oocytes during all co-culture time ($p < 0,05$).

In conclusion, when co-culture time is increased a major number of sperm are capable of passing through the egg coats. Although fresh sperm penetrate more oocytes the chilled sperms this ones can penetrate earlier *in vitro* matured oocytes. Eventhough immature and *in vitro* matured dog oocytes can be penetrated by fresh or cooled canine sperms, *in vitro* mature oocytes would be more appropriate to evaluate the fertilizing capacity of fresh or chilled dog sperm.

RESUMEN

En este trabajo se investigó mediante fecundación *in vitro*, la capacidad de espermatozoides caninos refrigerados a 4 °C y frescos (controles), de atravesar la ZP, y penetrar el citoplasma ovular, de ovocitos de perra en estado inmaduro y madurados *in vitro*, a través de diferentes tiempos de coincubación gamética.

Se trabajó con eyaculados de 5 perros adultos, el semen se obtuvo por estimulación digital, utilizando la segunda fracción espermática. Luego de la evaluación del semen, se retiró el plasma seminal por centrifugación, los espermatozoides utilizados como controles (frescos) fueron resuspendidos en medio Fert TALP y los espermatozoides que se sometieron a refrigeración se resuspendieron en extensor o diluyente en base a TRIS-yema de huevo-ácido cítrico y fueron posteriormente refrigerados a 4 °C, por 24 horas. Posterior a ese tiempo, se retiró el diluyente por centrifugación y el pellet espermático fue resuspendido en medio Fert TALP. Ambos tipos de espermatozoides -frescos y refrigerados- fueron coincubados con ovocitos de perra tanto inmaduros como madurados *in vitro*, en forma separada.

Los ovocitos utilizados provinieron de ovarios macerados, obtenidos previamente por ovariectomía. Los ovocitos fueron seleccionados bajo la lupa estereoscópica y lavados en PBS. Posteriormente, los utilizados en estado inmaduro se ambientaron en medio de coincubación Fert TALP y luego se coincubaron con espermatozoides frescos o refrigerados. Los ovocitos que se sometieron a maduración *in vitro* fueron incubados en medio TCM 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10 UI/mL de hCG, 2.5 µl/mL de solución piruvato y 5 µl/mL de solución antibiótica por 72 y 96 horas. Posteriormente fueron coincubados separadamente con ambos tipos de espermatozoides.

La coincubación gamética se realizó por períodos de 1 a 10 horas en medio Fert TALP. Cada hora de incubación se retiraron ovocitos, se fijaron en una solución en base a ácido acético, metanol y cloroformo (3:6:2) por tres minutos, y posteriormente en ácido acético y metanol (1:3) por 72 horas a 4 °C y teñidas con 0,1% de Yoduro de Propidio para la

posterior evaluación de la penetración espermática y fecundación en microscopia de epifluorecencia. Un ovocito penetrado se determinó cuando se encontró espermatozoides en zona pelúcida (ZP), en espacio perivitelino (PV) o en el citoplasma ovular (C). Se utilizó análisis de varianza y de regresión para determinar diferencias en los diferentes parámetros estudiados. Se evaluaron un total de 3391 ovocitos inmaduros (n= 1765) y madurados *in vitro* (n= 1626).

La penetración espermática fue directamente proporcional al tiempo de coincubación. El aumento del porcentaje de penetración total con espermatozoides frescos fue significativo a partir de las 3 horas en ovocitos inmaduros y 2 horas en ovocitos madurados *in vitro* ($p < 0,05$). Con espermatozoides refrigerados, los ovocitos inmaduros muestran diferencias en la penetración total a partir de las 5 horas de coincubación, en ovocitos madurados *in vitro* es posible observar diferencias a partir de las 2 horas. Los mayores porcentajes de penetración total se obtuvieron a partir de las 6 y 7 horas de coincubación y hacia finales del cultivo. Los espermatozoides refrigerados tuvieron un menor porcentaje de penetración que los frescos, durante todo el periodo de cultivo, excepto a la primera hora de coincubación con ovocitos madurados *in vitro* y espermatozoides refrigerados ($p < 0,05$). Los ovocitos madurados *in vitro* fueron penetrados en mayor proporción que los inmaduros ($p < 0,05$), considerando todo el periodo de cultivo.

Se concluye que al aumentar el tiempo de cultivo, un mayor número espermatozoides logró atravesar las cubiertas ovocitarias. Los ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* son penetrados en mayor porcentaje por espermatozoides frescos respecto a aquellos refrigerados, sin embargo, los espermatozoides sometidos a refrigeración serían capaces de penetrar antes los ovocitos madurados *in vitro*. No obstante los ovocitos de perra inmaduros y madurados *in vitro* pueden ser penetrados por espermatozoides caninos frescos y refrigerados, la utilización de ovocitos madurados sería más apropiado para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides frescos y criopreservados.

INTRODUCCIÓN

Los estudios de aspectos reproductivos en el perro doméstico permiten su extrapolación a otros cánidos silvestres, lo que cobra importancia especialmente en aquellos que se encuentren en peligro de extinción. Por otra parte, en los caninos domésticos también son importantes estos estudios para superar problemas en poblaciones con dificultades en su capacidad reproductiva, como por ejemplo machos clínicamente discapacitados, hembras que no aceptan la monta o bien que tengan anomalías en su tracto reproductivo que le impidan reproducirse.

Algunas biotecnologías reproductivas importantes de estudiar y profundizar adecuadamente en caninos son: la criopreservación de espermatozoides, inseminación artificial y fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*, pudiendo así desarrollar posteriormente otras más avanzadas como la transferencia nuclear o clonación.

La criopreservación de semen, en comparación al semen fresco, permite tener un mayor margen de tiempo para su utilización. Desde el punto de vista práctico, facilita la difusión del material genético de animales que se encuentren distanciados, sin tener que utilizar transporte del individuo y todo lo que ello implica. A diferencia del semen congelado-descongelado, el semen refrigerado tiene una mayor viabilidad posterior a su preservación, por lo tanto, un mayor porcentaje de preñeces logradas (Bouchard *et al.*, 1990; Pinto *et al.*, 1999). No obstante lo anterior, la refrigeración también causa alteraciones en las estructuras del espermatozoide, asociadas a cambios funcionales, que se traducirían en el detrimento de su capacidad fecundante. En estudios recientes, evaluando la viabilidad de espermatozoides de perro, expresada a través de la actividad mitocondrial y determinada con la sonda fluorescente Mitotracker, así como la integridad acrosomal evaluada según la accesibilidad del Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) -conjugado con AlexaFluor 488 al acrosoma de espermatozoides vivos, se ha determinado que en los espermatozoides refrigerados hay una disminución significativa de la viabilidad (76%) e integridad de membrana (75%), con respecto a los espermatozoides frescos (84 y 82% respectivamente), observándose también un aumento en la ruptura acrosomal de los espermatozoides refrigerados, diferencia que se mantiene al ser incubados hasta 6 horas (Manosalva *et al.*, 2005).

La evaluación de la interacción gamética con semen congelado, ha demostrado que el daño espermático producto del enfriamiento, afecta la funcionalidad del espermatozoide en relación a su capacidad de penetración a la ZP (Ström- Holst *et al.*, 2000). Esta adecuada penetración espermática a través de las cubiertas ovocitarias y la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, dependen de un estado acrosomal funcional, para así poder experimentar la capacitación y reacción acrosómica del espermatozoide que le permitirá interactuar con las cubiertas del ovocito (De los Reyes y Barros, 2000).

En semen refrigerado y congelado de perro, se ha observado además un incremento significativo de espermatozoides reaccionados entre las 0 y 2 horas de incubación en medio capacitante, evaluados mediante el ensayo de clortetraciclina (CTC) (Rota *et al.*, 1999), tiempo significativamente menor que en espermatozoides frescos. En otras especies como el ratón (Fuller y Whittingham, 1997), comparando el semen congelado con el semen fresco, el primero es capaz de penetrar la ZP en corto tiempo, a diferencia de los espermatozoides frescos que requerirían un período de incubación más largo. La evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides caninos que han sido refrigerados, en relación con su unión y tiempo de penetración a la ZP del ovocito no ha sido determinada, por lo que su estudio ayudaría a la correcta interpretación de los cambios experimentados por estos espermatozoides en el proceso de fecundación, optimizando las técnicas de criopreservación espermática y fecundación *in vitro* en los caninos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Inseminación Artificial

La inseminación artificial (IA) implica el depósito de semen, a través de técnicas instrumentales, en el tracto reproductivo de la hembra. El primer informe sobre el uso de en IA con éxito animales domésticos fue del científico Italiano Lázaro Spallanzani en 1780, justamente en caninos, que obtuvo cachorros de una perra inseminada con semen fresco (Farstad, 2000; De Los Reyes, 2004). Actualmente la IA en caninos se realiza usando semen fresco, refrigerado o congelado. El American Kennel Club reconoce crías nacidas mediante cualquiera de estos tipos de semen (Pinto *et al.*, 1999). El número mínimo total de espermatozoides recomendado para una inseminación varía desde 40 a 200 millones; sin embargo, se han obtenido gestaciones con un número más reducido al depositarlos en el útero, ya sea a través de técnicas quirúrgicas o transcervical (De Los Reyes, 2004).

El uso de semen refrigerado para IA en caninos ha cobrado importancia en el último tiempo (Rota *et al.*, 1999). Comparando la IA utilizando semen refrigerado versus semen congelado, este último procesamiento disminuye significativamente la viabilidad espermática, por lo que las tasas de preñeces logradas son menores (Bouchard *et al.*, 1990). Además, requiere de equipos más sofisticados en su procesamiento y técnicas más complejas durante la inseminación (inseminación intrauterina) (Linde-Forsberg *et al.*, 1999). Con el semen refrigerado en cambio, las tasas de gestación son aceptables aún empleando la técnica intravaginal para el depósito del semen. Por otra parte, el semen refrigerado es de fácil manejo, tanto en su procesamiento como en su aplicación (Rota *et al.*, 1995)

Diluyentes para refrigeración del semen

Se han estudiado diferentes tipos de diluyentes por su capacidad de mantener la motilidad del semen canino sometido a refrigeración a través del tiempo (Bouchard *et al.*, 1990; Rota *et al.*, 1995; Pinto *et al.*, 1999; Ström- Holst *et al.*, 2000; Iguer- Ouada y Vergesten 2001; Tsuitsui *et al.*, 2003; Ponglowpan *et al.*, 2004). Estos diluyentes pueden incluir: citrato,

Tris, fosfato y glicina como sustancias buffer, leche, crema esterilizada, azúcares, yema de huevo y antibióticos (Rota *et al.*, 1995).

Se ha demostrado que la yema de huevo tendría un efecto protector contra la reacción acrosómica espontánea, cuyo mecanismo no está aun claro, pero puede ser mediante la mantención de la presión coloidesmótica del medio externo (en el cual se encuentran los espermatozoides) y por la protección de la membrana plasmática y acrosómica (Foulkes, 1977; Watson, 1981). Esto último puede ser debido a que la yema de huevo previene o reduce la pérdida de fosfolípidos de membrana que ocurre durante el shock térmico (Bouchard *et al.*, 1990).

La glucosa (Rota *et al.*, 1997) y fructosa (Silva y Verstegen, 1995) son los azúcares mas utilizados en los diferentes diluyentes. Los espermatozoides pueden obtener energía por la fosforilación oxidativa mitocondrial y glicólisis de estos azúcares. Se ha visto que el principal efecto de estos monosacáridos en los diluyentes es mantener la motilidad y el patrón de movimiento (Ponglowhapan *et al.*, 2004), por lo tanto la utilización de estos azúcares, en diluyentes en base a yema de huevo, han dado un buen resultado cuando se evalúa la motilidad espermática, integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, tiempo de supervivencia (Rota *et al.*, 1995; Iguer-Ouada y Vergesten, 2001; Ponglowhapan *et al.*, 2004) y el número de crías luego de la inseminación artificial (Linde-Forsberg, 1995).

Entre otros componentes de los diluyentes están las sustancias buffer, de las cuales las que más se utilizan en caninos son el citrato y TRIS (England, 1993; Linde Forsberg y Forsberg, 1993; Silva y Vergesten, 1995; Rota *et al.*, 1997). En estudios donde se han probado diversos extensores para semen canino, con aquellos en base a yema de huevo-Tris (EYT), se han obtenido mejores resultados, tanto *in vivo* como *in vitro* (Bouchard *et al.*, 1990; Rota *et al.*, 1995, Ström- Holst *et al.*, 2000; Iguer- Ouada y Vergesten, 2001; Tsuitsui *et al.*, 2003; Ponglowpan *et al.*, 2004), tanto en la integridad acrosomal evaluada con diferentes métodos de tinción, como en la mantención de la motilidad espermática por mayor tiempo, obteniéndose una mayor cantidad de espermatozoides vivos (Rota *et al.*,

1995). Esto puede ser atribuible a que esta composición del diluyentes prevendría la “falsa reacción del acrosoma”, que ocurre junto a la muerte del espermatozoide o junto a un daño irreversible de él (Aalseth y Sacke, 1985).

Criopreservación de espermatozoides

La primera inseminación artificial exitosa con semen refrigerado canino fue realizada en 1954 por Harrop, quien usó como diluyente leche y lo almacenó a 4 °C por 100 horas (Pinto *et al.*, 1999; Tsuitsui *et al.*, 2003). El uso del semen refrigerado ha demostrado un buen resultado en relación a las tasas de fertilidad obtenidas (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001). Sin embargo, se ha descrito que la fertilidad sería menor en comparación al semen fresco (Linde- Forsberg *et al.*, 1999; Watson, 2000).

Los espermatozoides de perro, humano y conejo son más tolerantes al shock térmico (enfriamiento) que los espermatozoides de otros animales domésticos, como los de los verracos (Bouchard *et al.*, 1990). Esto es debido a que los espermatozoides caninos tienen una relación de ácidos grasos saturados y poliinsaturados unidos a los fosfolípidos de membrana menor, por lo tanto serían menos susceptibles al shock térmico que otras especies como la porcina (De los Reyes, 2004).

En el proceso de enfriamiento, la membrana plasmática sufre cambios morfológicos (Sirivaidyapong *et al.*, 2000; De los Reyes, 2004), se producen alteraciones en los lípidos de membrana y por lo tanto cambia el estado funcional de esta (Watson, 2000). Dentro de estos cambios, ocurre la separación lateral de la fase lipídica con la agrupación de las proteínas integrales de membrana (Buhr *et al.*, 1994). Esta agrupación puede afectar la función de las proteínas, especialmente aquellas que juegan un rol estructural y de modulación, como por ejemplo, las que conforman los canales iónicos (Watson, 2000).

Otros cambios morfológicos de membrana son un aumento en su permeabilidad y consecuente entrada de calcio al espermatozoide (Robertson y Watson, 1986; Manosalva *et al.*, 2005). Esto último es más grave durante la congelación que durante la refrigeración y

tendría consecuencias en términos de la función celular, lo cual en casos severos puede ser incompatible con la viabilidad del espermatozoide (Parks y Lynch, 1992).

Se ha visto que la membrana plasmática es más sensible al enfriamiento que la estructura acrosomal del espermatozoide, por lo cual el deterioro de esta membrana ocurre antes que el daño acrosómico (Ponglowhapan *et al.*, 2004).

El ingreso de calcio a la célula durante el enfriamiento contribuye a cambios en la capacitación y en los eventos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. Se han descrito similitudes entre cambios en la membrana durante el enfriamiento y la reacción del acrosoma (Watson, 2000). Un avance significativo ha sido el reconocer que el espermatozoide criopreservado se comportaría como si estuviese capacitado (Watson, 1995), aunque aún no está claro si el espermatozoide manifiesta los mismos cambios de la capacitación o pasa directamente a la exocitosis del contenido acrosomal.

En resumen, no obstante del diluyente empleado, los procesos de criopreservación resultan en una disminución de los porcentajes de fertilidad si se compara con semen fresco. Se ha demostrado que esto surge de la combinación de la pérdida de viabilidad y un deterioro de la función en la población sobreviviente (Watson, 2000).

Capacitación espermática

Una vez que los espermatozoides han sido eyaculados, necesitan llevar a cabo una serie de modificaciones durante su tránsito por el tracto genital de la hembra, antes de que sean capaces de penetrar el ovocito. Estos cambios que preparan al espermatozoide para la futura interacción gamética y fecundación son conocidos como capacitación (Austin, 1951; Chang, 1951). La regulación de la capacitación *in vivo* es una función del oviducto (Petrunkina *et al.*, 2004), mientras que *in vitro* es posible inducirla en medios especiales (Parrish *et al.*, 1988; Barros, 1974; Mahi y Yanagimachi, 1976; 1978; Hewitt y England, 1998a).

Dentro de estos cambios está la hiperactivación, donde el espermatozoide capacitado cambiará el patrón de movimiento flagelar para que su movimiento sea más activo (Barros, 1974; Barros *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994). Este cambio en el patrón de motilidad genera una mayor amplitud y fuerza en el batir del flagelo. Se cree que esto es necesario tanto para que el espermatozoide logre liberarse de las células oviductales como para su paso a través de las células del cúmulo, pudiendo así alcanzar la ZP (Harrison, 1996; Kawakami *et al.*, 2001).

La reacción del acrosoma ocurre en la cercanía o en contacto con las cubiertas ovocitarias (Barros *et al.*, 1993; 1996). Este proceso involucra la fusión y fenestración de la membrana acrosómica externa y la membrana citoplasmática (Brewis y Moore, 1997; Wassarman *et al.*, 2005), excepto en la porción que cubre la región posterior del acrosoma, es decir, el segmento ecuatorial (Barros y Austin, 1967), permitiendo la exposición de enzimas acrosomales, como la acrosina, la cual participaría en la penetración del espermatozoide a través de las cubiertas ovocitarias (De los Reyes y Barros, 2000). El estado acrosomal, por lo tanto, debe conservarse intacto antes de la interacción de los gametos, lo que implica un manejo espermático *in vitro* que impida la reacción prematura de los espermatozoides (Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

Se ha visto que el tiempo de capacitación es menor en los espermatozoides criopreservados que en aquellos frescos (Rota *et al.*, 1999), por lo que se ha especulado que los espermatozoides que han sido sometidos a bajas temperaturas serían funcionalmente diferentes (Fuller y Whittingham, 1997). Esto podría explicar la reducción en el tiempo de vida fértil de los espermatozoides criopreservados.

Mahi y Yanagimachi (1976), observaron que el espermatozoide canino era capaz de penetrar la zona pelúcida solo siete horas o más luego de iniciada la coincubación gamética, lo que sugiere que el espermatozoide debe estar capacitado antes de penetrar la zona pelúcida y que la capacitación espermática demora al menos 7 horas bajo las condiciones *in vitro* utilizadas por dichos autores. En estudios posteriores utilizando diferentes medios de

capacitación espermática, se observó la penetración a la zona pelúcida de ovocitos a las 2 y 4 horas de coincubación gamética (Kawakami *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993).

Se han desarrollado varios métodos para evaluar la capacitación espermática y estado acrosomal en el canino; entre ellos podemos encontrar ensayo con Clortetraciclina (Hewitt y England, 1998a), Tinción Triple (Peña *et al.*, 1999), Lectinas Fluorescentes (Kawakami *et al.*, 1993) y sondas fluorescentes (De Los Reyes *et al.*, 2002; 2004).

Interacción Gamética y Fecundación

En general en los carnívoros el depósito de semen ocurre a nivel del trasfondo vaginal (Linde-Forsberg *et al.*, 1999). Desde este lugar los espermatozoides deben atravesar el cérvix hacia el lumen uterino, pasando por diferentes barreras anatómicas y fisiológicas del tracto genital de la hembra. El mucus cervical constituye una barrera, seleccionando espermatozoides móviles y removiendo el componente seminal que podría inhibir la capacitación (Brewis *et al.*, 2001).

Se ha visto que los espermatozoides son almacenados en el tracto reproductivo de la hembra, con el propósito de esperar la ovulación y la maduración de los ovocitos. En este lugar los espermatozoides conservan la motilidad y fertilidad gracias a la asociación de ellos con las células del epitelio oviductal y el efecto del fluido oviductal (Kawakami *et al.*, 1998). Existen evidencias que los glicosaminoglicanos del fluido oviductal y uterino de perras en estro, favorecerían la capacitación de los espermatozoides de canino (Kawakami *et al.*, 2000).

Los ovocitos de mamíferos están rodeados por dos cubiertas: una más externa celular, aportada por las del cúmulo oóforo y otra, más interna acelular, la ZP (Harrison, 1996; Wassarman, 1999). Esta última se forma durante la ovogénesis y es una matriz extracelular compuesta por glicoproteínas sulfatadas (Dunbar *et al.*, 1994; Barros *et al.*, 1996). Gran parte de la interacción ovocito- espermatozoide ocurre entre el espermatozoide y las capas que rodean el ovocito, siendo la asociación del espermatozoide con la ZP uno de los pasos

más cruciales en la fecundación de mamíferos (Barros *et al.*, 1996; Mayenco- Aguirre y Pérez Cortés, 1998; Peña *et al.*, 2004). Esta cubierta puede ser dispersada mediante enzimas del espermatozoide como la acrosina (Barros *et al.*, 1996; Moreno y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2006). Existen dos tipos de ligandos en el espermatozoides: Los que están presentes en la membrana plasmática del espermatozoide (ligando primarios) y los que se encuentran en el acrosoma y que quedarán expuestos luego de que la reacción del acrosoma haya ocurrido (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000). Luego de la reacción acrosómica, estimulada por la ZP, específicamente la glicoproteína ZP3, el espermatozoide se separa del acrosoma y comienza a atravesar la ZP. Se ha sugerido que la digestión controlada de las glicoproteínas de la ZP, como ZP2 por parte de la acrosina, permitiría la exposición de oligosacáridos presentes en la ZP, cuya función sería mantener la asociación estrecha con la superficie del espermatozoide (Barros *et al.*, 1993; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002).

Una vez que el espermatozoide ha atravesado la zona pelúcida, cruza el espacio perivitelino y por la región ecuatorial de la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática del ovocito, para penetrar posteriormente al citoplasma ovular (Yanagimachi, 1994; Töpfer- Petersen *et al.*, 2000)

En caninos, los ovocitos son ovulados en estado de vesícula germinativa (VG), por lo tanto en estado inmaduro como ovocitos primarios, a diferencia de lo que ocurre en las otras especies mamíferas, donde el ovocito se ovula después de la primera división meiótica, en la segunda metafase (MII) (Mahi y Yanagimachi, 1976; Yamada *et al.*, 1993; Hewitt y England, 1998b; 1999; Farstad, 2000; Saint-Dizier *et al.*, 2001; Otoi *et al.*, 2002; De los Reyes *et al.*, 2005). En algunas especies como el hámster, se ha observado que el espermatozoide puede penetrar ovocitos en estado inmaduro, sin embargo, no habría un posterior desarrollo del espermatozoide hasta la adecuada activación del ovocito (Barros y Muñoz, 1973). En perros se ha determinado, en estudios previos *in vitro*, que el espermatozoide penetraría ovocitos en estado inmaduro (Mahi y Yanagimachi, 1976; Hewitt y England, 1997a; Ström- Holst *et al.*, 2000), no obstante, se desconoce si bajo las

mismas condiciones experimentales habría diferencias en la penetración de la zona pelúcida y subsecuente desarrollo entre ovocitos primarios (inmaduros) o en MII (maduros).

En esta memoria, se estudió la fecundación en caninos a través de la capacidad de unión y tiempo de penetración espermática por las cubiertas de ovocitos, inmaduros y madurados *in vitro*, con espermatozoides frescos y refrigerados, lo que permitirá mejorar los protocolos de criopreservación espermática, promoviendo la inseminación artificial, como también otras biotecnologías reproductivas en esta especie.

HIPÓTESIS

La capacidad de atravesar la zona pelúcida y penetrar al citoplasma ovular no variará de acuerdo al estado de maduración de los ovocitos, pero será diferente entre los espermatozoides frescos y refrigerados, traducándose en distintos tiempos de penetración en aquellos espermatozoides criopreservados respecto a los espermatozoides frescos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar posibles diferencias en la interacción espermatozoide-ovocito en caninos, utilizando semen fresco y refrigerado, con ovocitos inmaduros y madurados *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los porcentajes de penetración espermática a la ZP de ovocitos de perra entre distintos tiempos de coincubación gamética, utilizando espermatozoides eyaculados refrigerados y frescos (controles)

- Comparar el tiempo de penetración espermática a la ZP de ovocitos de perras, entre espermatozoides eyaculados frescos o sometidos a refrigeración.

- Determinar en ovocitos de perra, inmaduros y madurados *in vitro*, posibles diferencias en la capacidad de ser penetrados por espermatozoides caninos, ya sea frescos o criopreservados.

MATERIAL Y MÉTODOS

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 a través de estimulación digital, utilizando copa recolectora de vidrio previamente entibiada, a 5 perros adultos de diferentes razas, sanos, pertenecientes a privados.

Se utilizó la 2^o fracción seminal, es decir, la fracción espermática, evaluando en forma subjetiva la motilidad progresiva (MP), mediante microscopía de contraste de fases. La concentración espermática se midió utilizando cámara de recuento celular de Neubauer, utilizando una dilución previa de 1:100, de acuerdo a las técnicas establecidas en el Laboratorio (De los Reyes *et al.*, 2006). Se utilizaron solo muestras de semen cuya MP fue mayor a 70%.

El plasma seminal se retiró centrifugando las muestras (324 G por 5 minutos), previamente diluidas en buffer TRIS (Tris (hidroximetil)- aminometano) (Rota *et al.*, 1999). Los espermatozoides que fueron utilizados como frescos se resuspendieron en medio Fert TALP (Parrish *et al.*, 1988), para luego ser coincubados con los ovocitos. Los espermatozoides que se sometieron a refrigeración fueron resuspendidos en el diluyente, en concentración de 2×10^8 espermatozoides/mL

La composición del diluyente de refrigeración se describe en la Tabla 1:

Tabla 1: Composición del diluyente de refrigeración para el semen canino.

TRIS	250 mM
Ácido cítrico	88,5 mM
Fructosa	69,4 mM
Yema de huevo	20%
Bencil penicilina	0,28 mM
Sulfato Dihidroestreptomicina	0,068 Mm

Las muestras diluidas, dentro de tubos cónicos (FALCON), se colocaron en un vaso precipitado con agua a temperatura ambiente (20 °C), el que luego se llevó a 4 °C, alcanzando dicha temperatura en aproximadamente 60 minutos. Las muestras se mantuvieron a 4 °C por 24 horas.

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

b) Obtención y maduración de ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de perras sanas ovariectomizadas, provenientes de la Unidad de Salud Ambiental de la Municipalidad de La Pintana. Los ovarios fueron transportados al laboratorio a 37 °C, en un termo con solución salina (NaCl 0,9%), suplementada con 100 UI/ mL de Penicilina y 50 µg/mL de Estreptomicina (Sigma). En el Laboratorio se obtuvieron los ovocitos a través de la maceración de los ovarios con hojas de bisturí. Se seleccionaron los ovocitos de mejor calidad, es decir, aquellos de mayor tamaño, con el citoplasma oscuro y homogéneo y con al menos tres capas de células del cúmulo (Hewitt y England, 1997b). Los ovocitos que se maduraron en cultivo fueron procesados de acuerdo a lo descrito en De los Reyes *et al.* (2005). El medio de cultivo utilizado para la maduración de ovocitos fue TCM 199 (In vitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10 UI/mL de hCG, 2,5 µl/mL de solución piruvato (11,04

mg/mL de ácido Pirúvico) y 5 µl/mL de solución antibiótica (12,2 mg/mL de Penicilina y 20 mg/mL de Estreptomicina; Sigma).

Los ovocitos que se coincubaron con los espermatozoides en estado inmaduro, se ambientaron en medio Fert TALP (Parrish *et al.*, 1988) hasta la coincubación.

c) Coincubación Gamética

Las muestras de semen que se mantuvieron refrigeradas se incubaron a 38,5 °C por 10 minutos. Posteriormente, el diluyente fue extraído mediante centrifugación, a 112 G por 3 minutos a temperatura ambiente y el sedimento espermático fue resuspendido en medio Fert TALP (Parrish *et al.*, 1988).

Los ovocitos, madurados o inmaduros, fueron coincubados separadamente con los espermatozoides frescos o refrigerados, en una concentración de 5×10^6 espermatozoides/mL con 10 – 15 ovocitos en cada gota de 100 µL de medio Fert TALP (Parrish *et al.*, 1988). La coincubación se realizó por diferentes tiempos desde 1 a 10 horas, en la estufa de cultivo Forma Scientific a 38 °C, 5 % CO₂ y 98% de humedad.

d) Evaluación de la fecundación

Las muestras se evaluaron cada una hora hasta las 10 horas de coincubación. Luego de cada periodo de coincubación, los ovocitos fueron removidos desde las gotas y se extrajeron las células del cúmulo a través de pipeteo fino. Los ovocitos desprovistos de células del cúmulo fueron montados en un portaobjeto y fijados mediante una solución en base a ácido acético, metanol y cloroformo (3:6:2) por tres min. y posteriormente en ácido acético y metanol (1:3) por 72 horas (Otoi *et al.*, 2000) a 4 °C. Finalmente, las muestras fueron teñidas con 0,1% de Yoduro de Propidio para su posterior evaluación.

La penetración espermática se evaluó mediante microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot 2). Se consideraron penetrados aquellos ovocitos que tuvieran uno o más espermatozoides, ya sea penetrando la ZP, en PV o en el C.

e) Análisis estadístico

Se realizaron diferentes experimentos en orden de obtener aproximadamente 80 ovocitos para cada evaluación (ovocitos inmaduros y madurados *in vitro*), para cada tiempo de coincubación (1 a 10 horas, cada 1 hora) y para cada tipo de espermatozoides (frescos y refrigerados).

Se utilizó análisis de varianza para la comparación de las diferentes características evaluadas (penetración espermática de los distintos tipos de espermatozoides en los diferentes tiempos evaluados con ovocitos inmaduros y madurados *in vitro*) y la prueba de Tukey para las eventuales diferencias entre las medias. Los resultados expresados en porcentajes, fueron transformados (arcosen $\sqrt{\%}$).

Se utilizó un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \delta_i + H_j + T_k + \delta H_{ij} + \delta T_{ik} + \delta HT_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable a estudiar (Porcentaje de penetración espermática)

μ = Media poblacional

δ_i = Espermatozoide (fresco y refrigerado)

H_j = Ovocito (inmaduro y madurado)

T_k = Tiempo (1 a 10 horas)

δH_{ij} = Interacción semen- ovocito

δT_{ik} = Interacción semen -tiempo

δHT_{ijk} = Interacción semen-ovocito- tiempo

ε_{ijk} = Error

Además, se realizó un modelo de regresión logística, el cual permitió estimar si existían diferencias entre los distintos tratamientos a través del tiempo, utilizando SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA). Las diferencias con $p \leq 0,05$ se consideraron significativas. El modelo utilizado fue:

$$Y_{ij} = \beta_{0i} + \beta_{1i} x_{1j} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Porcentaje de penetración espermática en el tiempo.

β_{0i} = Intercepto para cada tratamiento.

β_{1i} = Coeficiente de regresión para cada tratamiento.

x_{1j} = Tiempo de medición.

ϵ_{ij} = Efecto residual.

RESULTADOS

Se evaluaron un total de 3.391 ovocitos (inmaduros n= 1765 y madurados *in vitro* n= 1626), los que se coincubaron con espermatozoides caninos refrigerados y frescos. La evaluación se realizó considerando la penetración espermática a nivel de la ZP y espacio perivitelino, citoplasma ovular y penetración total (ZP+ PV + citoplasma) (Figuras 1 y 2)

Figura 1 Ovocito inmaduro de perra inseminado *in vitro* con espermatozoides en citoplasma y atravesando la ZP

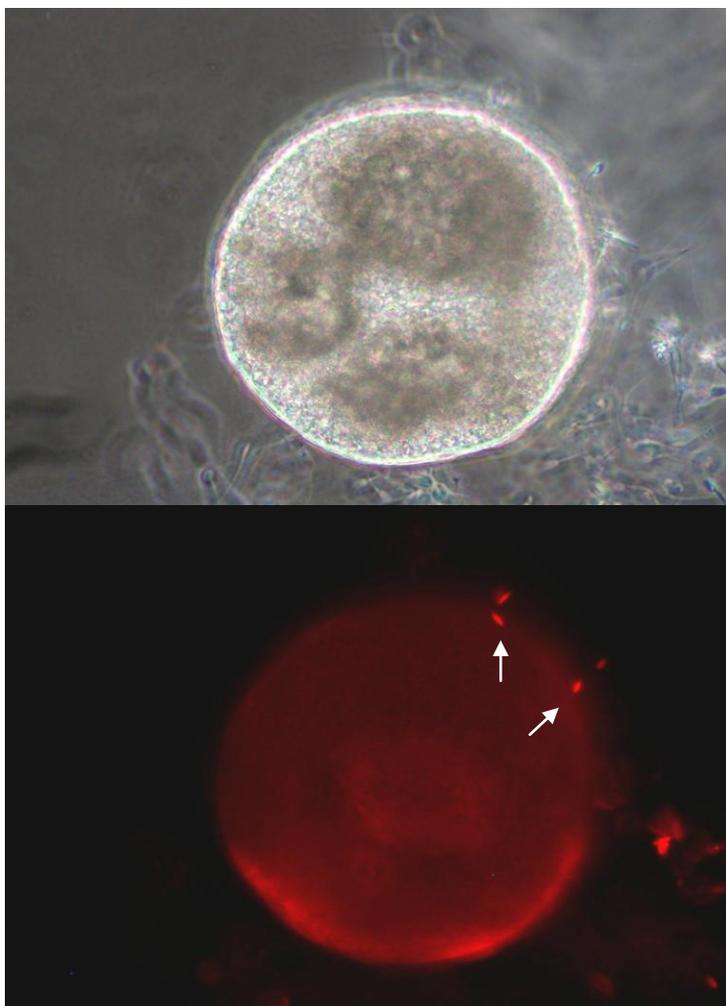
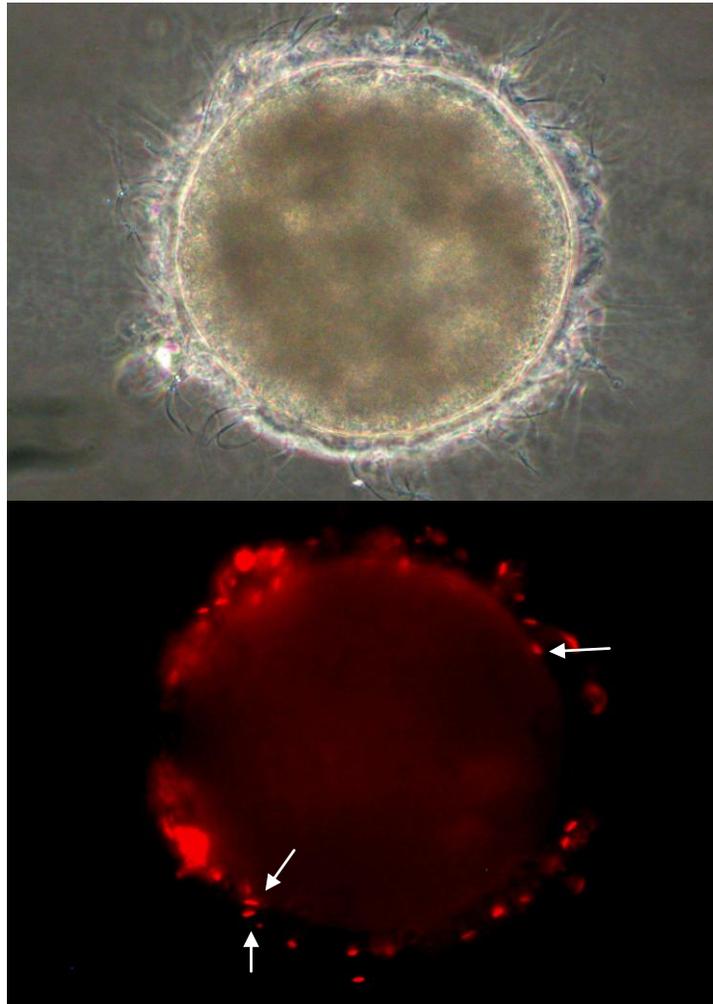


Figura 2 Ovocito madurado *in vitro* de perra inseminado *in vitro* con espermatozoides en citoplasma y atravesando la ZP



Penetración espermática en el tiempo

A) SEMEN FRESCO

En relación a la coincubación utilizando semen fresco y ovocitos inmaduros (tabla 1), la penetración espermática a la ZP y PV, aumentó significativamente a partir de las 4 horas, manteniéndose los mayores porcentajes hasta las 8 horas de coincubación ($p < 0,05$). A nivel del citoplasma ovular, el porcentaje de ovocitos penetrados aumentó significativamente ($p < 0,05$) a partir de las 3 horas de coincubación, encontrándose los mayores porcentajes en los tiempos de cultivo más prolongados. Considerando el porcentaje de penetración total, aumentó a partir de las 3 horas de coincubación, obteniéndose a las 7 horas el máximo porcentaje de penetración espermática ($P < 0,05$).

Tabla 1 Número y porcentaje de ovocitos inmaduros con distintos grados de penetración espermática en diferentes tiempos de coincubación gamética, utilizando semen fresco

Horas Coincubación	Nº ovocitos con esp. en ZP y PV / total (%)	Nº ovocitos con esp. en citop. / total (%)	Nº ovocitos con esp. penetrados totales / total ovocitos (%)
1	20 / 84 (23,81)a	13/84 (15,48)a	33/84 (39,29)a
2	18 /86 (20,93)a	10/86 (11,63)a	28,86 (32,56)a
3	26/93 (27,96)a	23/93 (24,73)b	49/93 (52,69)b
4	34/88 (38,64)b	26/88 (29,55)b	60/88 (68,18)c
5	29/93 (31,18)a	36/93 (38,71)c	65/93 (69,89)c
6	47/120 (39,17)b	32/120 (26,67)b	79/120 (65,83)c
7	27/67 (40,3)b	27/67 (40,3)c	54/67 (80,60)d
8	38/93 (40,86)b	22/93 (23,66)b	60/93 (64,52)c
9	24/80 (30,00)a	23/80 (28,75)b	47/80 (58,75)c
10	19/94 (20,21)a	49/94 (52,13)c	68/94 (72,34)c

Letras distintas indican diferencia significativa dentro de columnas ($p \leq 0,05$)

Al utilizar ovocitos madurados *in vitro*, con semen fresco (tabla 2), la penetración espermática de la ZP y PV no difirió estadísticamente entre las 10 horas de co-incubación. La penetración a citoplasma ovular aumentó significativamente desde las 2 horas de co-incubación ($p < 0,05$). Igual situación se observó con los porcentajes de penetración espermática total.

Tabla 2 Número y porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* con distintos grados de penetración espermática en diferentes tiempos de co-incubación gamética, utilizando semen fresco

Horas Co-incubación	Nº ovocitos con esp. en ZP y PV / total (%)	Nº ovocitos con esp en citop. / total (%)	Nº ovocitos con esp penetrados totales / total ovocitos (%)
1	24/74 (32,43)a	4/74 (5,41)a	28/74 (37,84)a
2	27/77 (35,06)a	12/77 (15,58)b	39/77 (50,65)b
3	30/83 (36,14)a	18/83 (21,69)b	48/83 (57,83)b
4	23/74 (31,08)a	28/74 (37,84)c	51/74 (68,92)c
5	27/80 (33,75)a	34/80 (42,50)c	61/80 (76,25)c
6	31/81 (38,27)a	30/81 (37,04)c	61/81 (75,31)c
7	35/83 (42,17)a	33/83 (39,76)c	68/83 (81,93)c
8	25/81 (30,86)a	29/81 (35,8)c	54/81 (66,67)c
9	22/88 (25,00)a	38/88 (43,18)c	60/88 (68,18)c
10	19/87 (21,84)a	44/87 (50,57)c	63/87 (72,41)c

Letras distintas indican diferencia significativa dentro de columnas ($p \leq 0,05$)

B) SEMEN REFRIGERADO

Los espermatozoides refrigerados y coincubados con ovocitos inmaduros (tabla 3), no mostraron diferencias en la penetración espermática a nivel de la ZP y PV entre las 10 horas de cultivo; sin embargo, en la penetración al citoplasma ovular y en la penetración total, hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) a partir de las 5 horas de coincubación.

Tabla 3 Número y porcentaje de ovocitos inmaduros con distintos grados de penetración espermática en diferentes tiempos de coincubación gamética, utilizando semen refrigerado

Horas Coincubación	Nº ovocitos con esp. en ZP y PV / total (%)	Nº ovocitos con esp. en citop. / total (%)	Nº ovocitos con esp. penetrados totales / total ovocitos (%)
1	20/83 (24,10)a	8/83 (9,64)a	28/83 (33,73)a
2	22/96 (22,92)a	7/96 (7,29)a	29/96 (30,21)a
3	15/77 (19,48)a	6/77 (7,79)a	21/77 (27,27)a
4	27/101 (26,73)a	12/101 (11,88)a	39/101 (38,61)a
5	19/86 (22,09)a	22/86 (25,58)b	41,86 (47,67)b
6	26/82 (31,71)a	20/82 (24,39)b	46/82 (56,1)b
7	23/83 (27,71)a	19/83 (22,89)b	42/83 (50,6)b
8	18/89 (20,22)a	15/89 (16,85)a	33/89 (37,08)a
9	21/83 (25,30)a	17/83 (20,48)b	38/83 (45,78)ab
10	21/87 (24,14)a	21/87 (24,14)b	42/87 (48,28)b

Letras distintas indican diferencia significativa dentro de columnas ($p \leq 0,05$)

La coincubación con ovocitos madurados *in vitro* mostró un aumento significativo ($p < 0,05$) en la penetración a la ZP y PV a partir de las 2 horas, manteniéndose relativamente constante hasta finales del cultivo (tabla 4). Los ovocitos con espermatozoides en su citoplasma, en cambio, aumentaron a partir de las 3 horas, manteniéndose el porcentaje de penetración similar hasta las 10 horas ($p < 0,05$). La penetración espermática total aumentó significativamente a partir de las 2 horas ($p < 0,05$), siendo los porcentajes más altos hacia finales del cultivo ($p < 0,05$).

Tabla 4 Número y porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* con distintos grados de penetración espermática en diferentes tiempos de coincubación gamética, utilizando semen refrigerado

Horas Coincubación	Nº ovocitos con esp. en ZP y PV / total (%)	Nº ovocitos con esp. en citop. / total (%)	Nº ovocitos con esp. penetrados totales / total ovocitos (%)
1	31/103 (30,1)a	14/103 (13,59)a	45/103 (43,59)a
2	8/51 (15,69)b	9/51 (17,65)ab	17/51 (33,33)b
3	16/84 (19,05)b	17/84 (20,24)b	33/84 (39,29)ab
4	22/85 (25,88)b	18/85 (21,18)b	40/85 (47,06)c
5	31/82 (37,8)c	17/82 (20,73)b	48/82 (58,54)c
6	24/81 (29,63)bc	24/81 (29,63)bc	48/81 (59,26)c
7	27/81 (33,33)bc	28/81 (34,57) c	55/81 (67,9)d
8	29/84 (34,52)bc	26/84 (30,95)bc	55/84 (65,48)d
9	30/86 (34,88)bc	23/86 (26,74)bc	54/86 (61,63)cd
10	35/81 (43,21)c	19/81 (23,46)b	54/81 (66,67)d

Letras distintas indican diferencia significativa dentro de columnas ($p \leq 0,05$)

El porcentaje de ovocitos penetrados, tanto inmaduros (Gráfico 1) como madurados *in vitro* (Gráfico 2) a través de los periodos de coincubación (10 horas), utilizando espermatozoides refrigerados fue menor que al utilizar espermatozoides frescos ($p < 0,05$), con excepción de la primera hora en ovocitos madurados *in vitro*, donde se observó mayor porcentaje utilizando espermatozoides refrigerados ($p < 0,05$).

Gráfico 1 Comparación de los porcentajes de penetración espermática total entre espermatozoides frescos y refrigerados utilizando ovocitos inmaduros

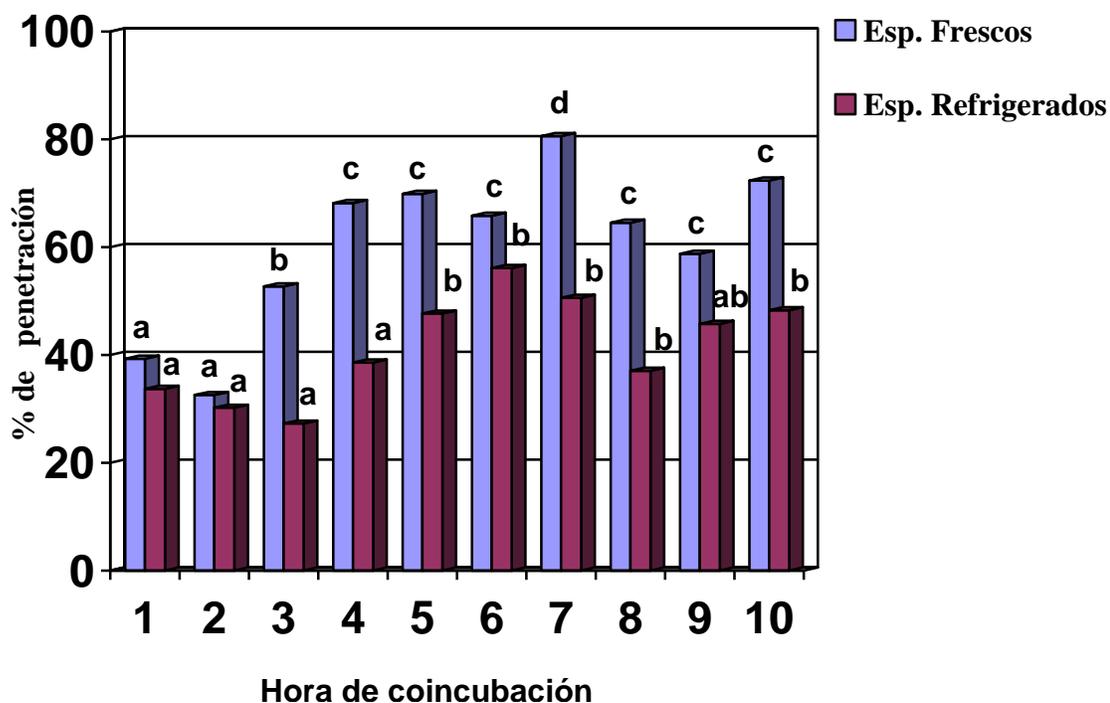
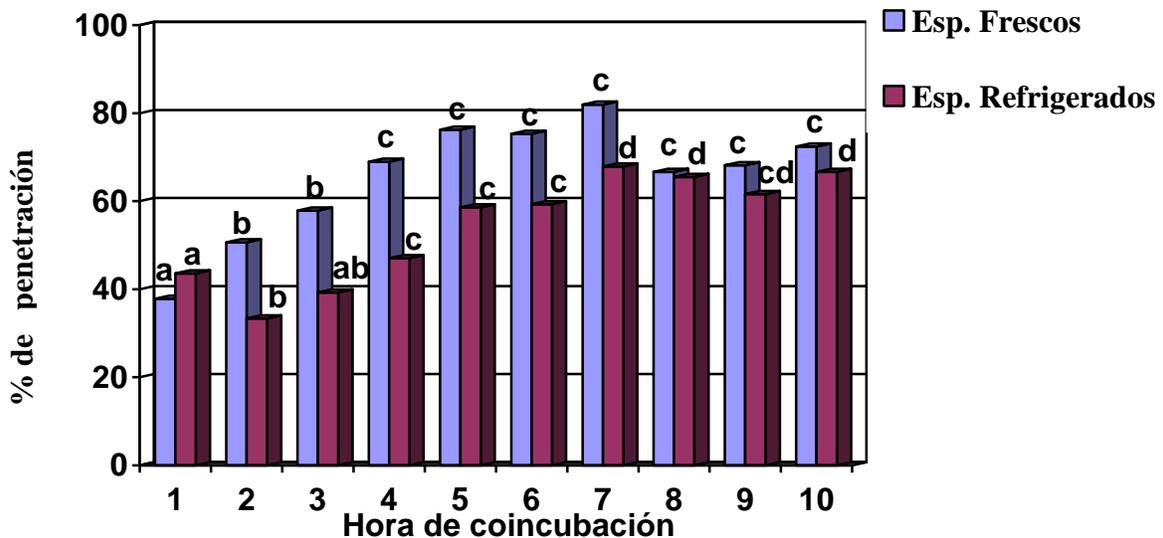


Gráfico 2 Comparación de los porcentajes de penetración espermática entre espermatozoides frescos y refrigerados utilizando ovocitos madurados *in vitro*



El porcentaje de ovocitos penetrados, inmaduros y madurados *in vitro*, tanto con semen fresco (Gráfico 3) como con semen refrigerado (Gráfico 4) a través de los diferentes períodos de coincubación, mostró un mayor porcentaje de penetración con ovocitos madurados vs. inmaduros al utilizar espermatozoides refrigerados ($p \leq 0,05$), y al utilizar espermatozoides frescos, algunas horas de coincubación mostraron diferencias entre ambos tipos de ovocitos. La penetración espermática a ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* mostró diferencias entre ambos tipos de ovocitos a las 2, 3, 5, 6 y 9 horas con espermatozoides frescos (Gráfico 3) y a las 2, 6 y 9 horas con espermatozoides refrigerados (Gráfico 4) ($p \leq 0,05$).

Gráfico 3 Comparación entre los porcentajes de penetración espermática en ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* utilizando espermatozoides frescos

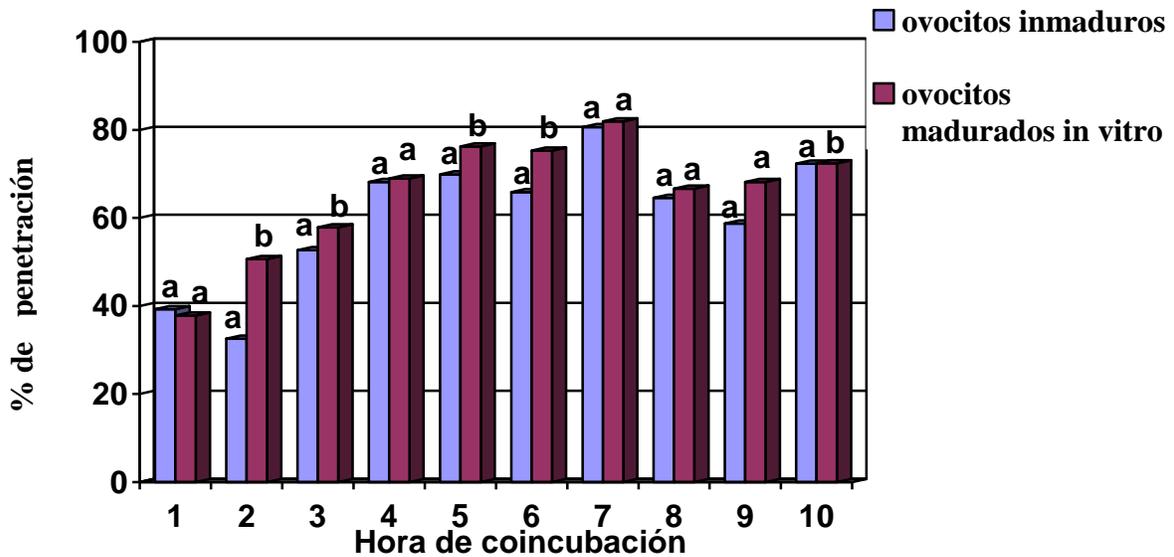
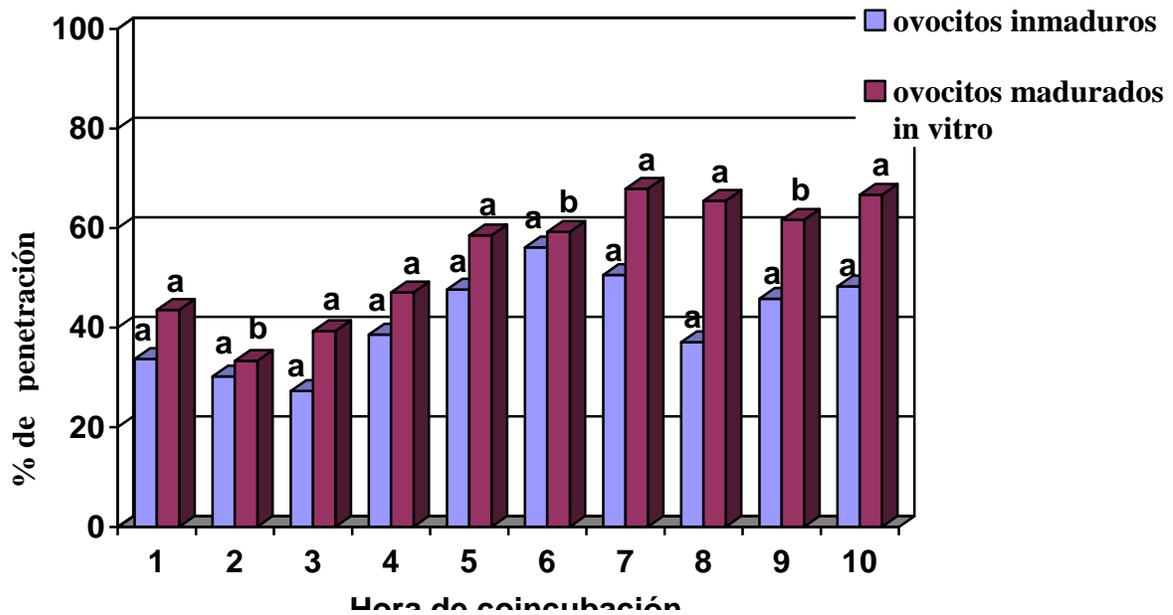


Gráfico 4 Comparación entre los porcentajes de penetración espermática en ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* utilizando espermatozoides refrigerados



El análisis del grado de penetración (ZP, PV, y C) a través del tiempo, se evaluó mediante regresión logística. La penetración espermática a ZP y PV con espermatozoides frescos se mantiene constante durante el periodo de coincubación, sin embargo con espermatozoides refrigerados la penetración aumenta en función del tiempo. Además es posible observar diferencias ($p \leq 0,05$) en la penetración espermática a ZP y PV entre espermatozoides frescos y refrigerados (Gráfico 5).

A nivel citoplasmático el tiempo de coincubación influyó positivamente ($p \leq 0,05$) en ambos tipos de espermatozoides, sin embargo no fue posible encontrar diferencias significativas entre estos (Gráfico 6). En relación a la penetración total (Gráfico 7) solo fue posible observar una influencia ($p \leq 0,05$) del tiempo de coincubación sobre los espermatozoides.

Gráfico 5 Penetración a ZP y PV utilizando espermatozoides frescos y refrigerados

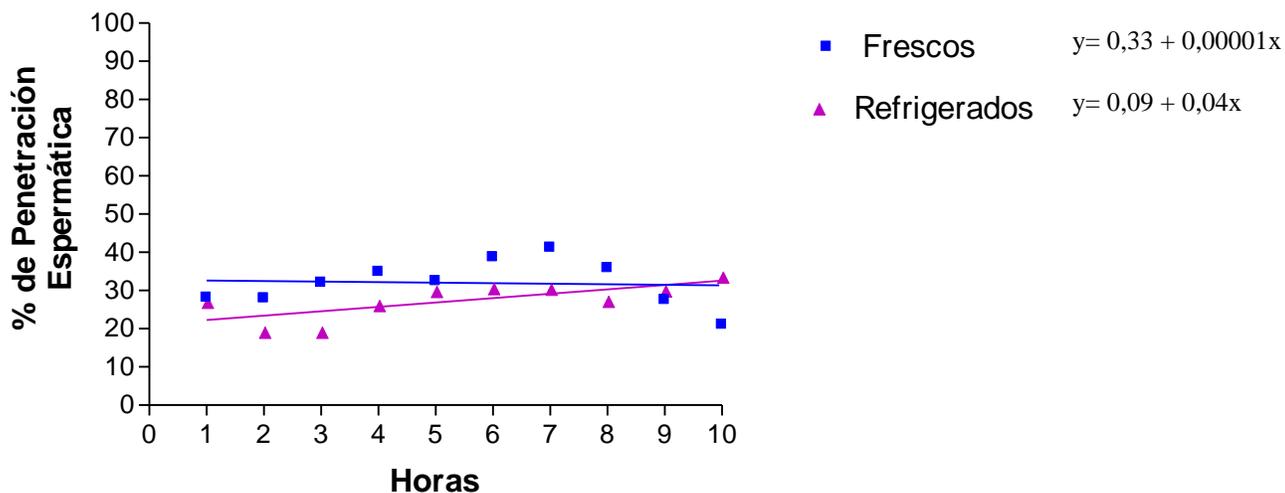


Gráfico 6 Penetración a citoplasma utilizando espermatozoides frescos y refrigerados

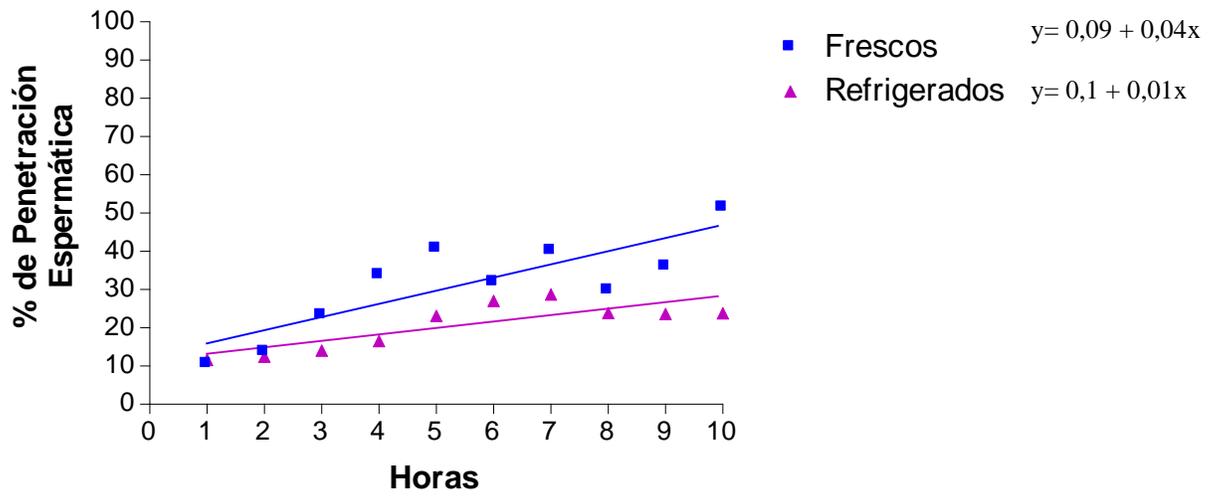
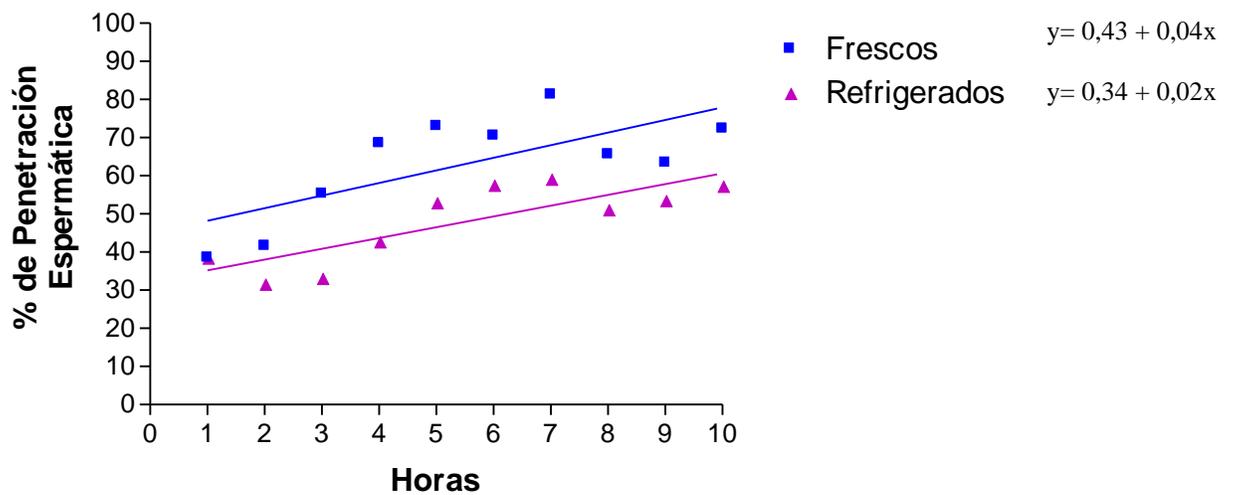


Gráfico 7 Penetración total utilizando espermatozoides frescos y refrigerados



DISCUSIÓN

Esta memoria de título evaluó, mediante ensayos de fecundación *in vitro* con ovocitos de perra inmaduros y madurados *in vitro*, la capacidad fecundante de espermatozoides caninos frescos y refrigerados, demostrando que los tiempos de penetración a través de las cubiertas ovocitarias, varían en ambas poblaciones espermáticas, como también de acuerdo al estado de maduración de los ovocitos.

La capacidad fecundante de los espermatozoides ha sido investigada a través de diferentes estudios. Mediante la inseminación artificial, resulta más costoso y largo, e influyen además otros factores como el ciclo, capacidad fértil de la hembra y la técnica de inseminación empleada (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000). Las características espermáticas como la motilidad, morfología, estatus acrosomal y viabilidad del espermatozoide, han sido frecuentemente utilizados para evaluar indirectamente la fertilidad (Silva y Vergesten, 1995). Considerando que la evaluación del daño de la estructuras moleculares a través de estas características son sólo indirectos, la unión del espermatozoide a la ZP y su paso a través de las cubiertas ovocitarias, los cuales son eventos críticos en la interacción gamética, representan una mejor y más directa evaluación de la capacidad fecundante del espermatozoide (Yanagimachi, 1994).

La capacidad de unión del espermatozoide a la ZP y la penetración espermática han sido estudiadas *in vitro* en caninos por diferentes investigadores (Mahi y Yanagimachi, 1976, 1978; Shimazu *et al.*, 1992; Hewitt y England, 1997a; De los Reyes *et al.*, 2006). Su utilización ha tenido como objetivos: investigar el proceso de fecundación (Mahi y Yanagimachi, 1976, 1978; Hewitt y England, 2001) como indicador de fertilidad de diferentes machos (Mayenco- Aguirre y Pérez Cortés, 1998) y predecir el potencial fecundante de espermatozoides que han sido sometidos a métodos de preservación (Hay *et al.*, 1997ab; De los Reyes *et al.*, 2006).

La interacción gamética es un proceso complejo, que requiere la completa funcionalidad del espermatozoide para el reconocimiento entre los gametos, reacción acrosómica y

penetración a través de la ZP (De los Reyes y Barros, 2000). Entre los ensayos de interacción gamética, el de unión a la ZP mide la capacidad de los espermatozoides de unirse a esta cubierta ovocitaria, lo cual es mediado por receptores en la membrana plasmática del espermatozoide y glicoproteínas de la ZP (Yanagimachi, 1994). La evaluación de la función espermática utilizando este método ha sido demostrada *in vitro* en otras especies como en verraco (Ivanova y Mollova, 1995) y equino (Fazeli *et al.*, 1993), y se ha correlacionado positivamente con la fertilidad *in vivo* en el ganado bovino (Fazeli *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). En caninos, su utilización para evaluar el efecto de la refrigeración y congelación, ha demostrado que estas disminuyen la capacidad de unión a la ZP en comparación a espermatozoides frescos (Ström- Holst *et al.*, 2000). Lo anteriormente expuesto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde la unión a la ZP se vió afectada por la refrigeración. La menor capacidad de unirse a la ZP en espermatozoides que han sido criopreservados en comparación a espermatozoides frescos, ha sido observado previamente en trabajos de congelación (Ivanova *et al.*, 1999), donde al coincubar durante una hora, habría menor número de espermatozoides sometidos a congelación unidos a ZP, en comparación a los frescos. En esta memoria de título se observó algo similar con la penetración espermática a citoplasma ovular, la que también fue menor al utilizar espermatozoides refrigerados en comparación con aquellos frescos.

Se ha demostrado que la mayor disminución en la capacidad de los espermatozoides para penetrar la ZP y citoplasma de los ovocitos, ocurre durante el proceso de congelación-descongelación, más que durante el proceso de dilución inicial y enfriamiento hasta los 4 C°, por lo que la refrigeración, si bien tiene un efecto detrimental en la morfología, viabilidad y capacidad de atravesar las cubiertas ovocitarias (Hay *et al.*, 1997b; Rota *et al.*, 1999) este sería menor que la congelación. La menor capacidad de unión a ZP y penetración a citoplasma del espermatozoide refrigerado respecto a espermatozoides frescos puede deberse, tanto a su menor periodo de sobrevivencia, como a la disminución de su capacidad fecundante luego de la refrigeración (Rota *et al.*, 1999), debido a que el procesamiento puede alterar tanto la membrana plasmática como la acrosomal del espermatozoide, cuya potencial consecuencia es la disminución de la capacidad de unión y penetración del ovocito (Burgess *et al.*, 2001, Nishizono *et al.*, 2004).

En espermatozoides caninos, no existen estudios previos en los cuales se haya evaluado la unión a ZP y penetración espermática a través del tiempo. En este trabajo se obtuvo penetración espermática a ZP y citoplasma a partir de la primera hora de coincubación gamética, lo que es indicativo de espermatozoides capacitados. La penetración a ZP de espermatozoides frescos y refrigerados, el tiempo de incubación incrementó los porcentajes de penetración.

El aumento del periodo de coincubación gamética hasta las 10 horas, mostró una relación directa con los porcentajes de penetración al citoplasma en ambos tipos de espermatozoides (frescos y refrigerados) y ovocitos (inmaduros y madurados *in vitro*), obteniéndose los mayores porcentajes entre la 6 y 7 horas de coincubación. Se ha indicado, en otros trabajos, que este tiempo sería el necesario para que un mayor número de espermatozoides completen la capacitación espermática y lleven a cabo la reacción acrosómica para penetrar las cubiertas ovocitarias y alcanzar el citoplasma ovular (Mahi y Yanagimachi, 1978; Kawakami *et al.*, 1993, 1998; Rota *et al.*, 1999). Posterior a este tiempo de máxima penetración espermática los porcentajes no aumentan, lo que podría estar asociado a la pérdida progresiva de enzimas acrosomales desde el acrosoma, como la acrosina, la cual se ha asociado a la unión secundaria a la ZP (Moreno *et al.*, 2002) y a su posterior penetración (Yanagimachi, 1994; De los Reyes y Barros, 2000), lo cual llevaría a la disminución de la capacidad de penetración a través del tiempo. La disminución en la penetración se ha visto en espermatozoides caninos luego de ser capacitados, estando aún mótil y viable, perdiendo gradualmente su capacidad de unión y penetración del ovocito (Peña *et al.*, 2004).

Tanto el porcentaje de penetración al citoplasma como la penetración total a ovocitos madurados *in vitro*, fue superior en la primera hora de coincubación gamética, utilizando espermatozoides refrigerados, en comparación a aquellos en estado fresco, sugiriendo que los primeros necesitarían menor tiempo para atravesar las cubiertas ovocitarias y penetrar el citoplasma ovular que los espermatozoides frescos.

La penetración espermática más temprana en espermatozoides criopreservados a través de las cubiertas ovocitarias ha sido demostrada en otras especies, como en el humano (Critser *et al.*, 1987), rata (Fuller y Whittingham, 1997), verraco (Wang *et al.*, 1991) y tigre siberiano (Byers *et al.*, 1989). En estos trabajos se ha evidenciado que los espermatozoides sometidos tanto a refrigeración como a congelación, serían capaces de penetrar los ovocitos en un tiempo corto luego del entibiamiento, a diferencia del semen fresco que necesita algunas horas de preincubación para la capacitación. Este hecho podría implicar que los espermatozoides que han sido sometidos a preservación a bajas temperaturas experimentarían un menor tiempo para la capacitación. Se ha visto en caninos, que espermatozoides congelados- descongelaos tienen mayor daño de su estructura acrosomal y consecuente pérdida de acrosina, que espermatozoides frescos (Cortés *et al.*, 2006). En verracos, la integridad acrosomal de espermatozoides sometidos a congelación-descongelación, evaluada con sonda Lyso Tracker®, disminuye en más de 50% (De los Reyes *et al.*, 2002). En espermatozoides sometidos a preservación por frío, el menor tiempo en la capacitación *in vitro* también ha sido estudiada a través del ensayo de Clortetraciclina en diferentes especies como el carnero (Pérez *et al.*, 1996), canino (Rota *et al.*, 1999) y rata (Fuller y Wittingham, 1997), identificándose espermatozoides no capacitados, capacitados, y capacitados / reaccionados. En estos trabajos ha sido posible observar que luego de la criopreservación existiría un mayor número de espermatozoides capacitados en comparación a aquellos frescos, concluyendo que los procesos de capacitación se ven acelerados por la criopreservación.

Aunque no existen estudios que evalúan la penetración espermática en función del tiempo de coincubación gamética, los porcentajes de penetración total de espermatozoides frescos, obtenidos en este trabajo a las 10 horas de coincubación con ambos tipos de ovocitos, serían similares a lo obtenido por Hay *et al.* (1997b) a las 18 horas de coincubación gamética (73%), y superiores a lo reportado por Hewitt y England, (1997a) a las 12 horas (52.2%). Las diferencias en los porcentajes de penetración entre los diferentes estudios puede deberse a las distintas metodologías y tiempos de coincubación utilizados. Los porcentajes de penetración total obtenidos en este trabajo, utilizando espermatozoides refrigerados en ambos tipos de ovocitos a las 6 horas de coincubación, son superiores a los

obtenidos al mismo tiempo bajo protocolos similares, utilizando espermatozoides caninos congelados/descongelados (34%) (De los Reyes *et al.*, 2006), lo que confirmaría que la refrigeración es menos detrimental sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Estudios de interacción gamética han utilizado ovocitos inmaduros, ZP conservadas en sal (Hay *et al.*, 1997a), ZP congeladas (Ström- Holst *et al.*, 2000) y ovocitos madurados *in vitro* (De los Reyes *et al.*, 2006) para evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides caninos frescos y criopreservados. Los estudios con ovocitos en ambos estados de maduración han indicado que los espermatozoides caninos pueden penetrar ovocitos de perra independiente de su estado de maduración, por lo que se ha planteado que el estado de maduración del ovocito, evaluado nuclearmente, no afectaría la penetración espermática (Mahi y Yanagimachi, 1976; Hewitt y England, 1997a). De igual forma se ha demostrado que ovocitos inmaduros pueden ser penetrados por espermatozoides frescos y criopreservados (Ström- Holst *et al.*, 2000). Sin embargo, en estos trabajos la coincubación gamética fue a tiempo fijo, generalmente superior a las 12 horas, sin que existan estudios en los cuales se haya evaluado la capacidad de unión y penetración de ZP en diferentes tiempos de coincubación más tempranos, utilizando ambos tipos de ovocitos paralelamente, como lo realizado en el presente trabajo.

La evaluación de la penetración de los ovocitos ya sea inmaduros o madurados *in vitro* en diferentes tiempos de coincubación gamética, mostró diferencias entre ambos tipos de ovocitos en todo el periodo de coincubación, siendo superiores estos porcentajes al utilizar ovocitos madurados *in vitro* en comparación a los inmaduros. Esto podría explicarse por la inmadurez de la ZP de estos ovocitos, lo cual se ha relacionado a diferencias en la penetración en otras especies (Bezard *et al.*, 1998), por lo que, la utilización de ovocitos madurados *in vitro* parece ser más apropiado para evaluar fecundación *in vitro*.

Los resultados presentados en este estudio proporcionan evidencias sobre la capacidad fecundante de espermatozoides caninos sometidos a refrigeración, en relación a su unión y tiempo de penetración a través de las cubiertas de ovocitos homólogos. Los antecedentes aportados en este estudio sobre criopreservación e interacción gamética, abre la posibilidad

de futuras investigaciones para optimizar técnicas de criopreservación espermática y fecundación *in vitro* en caninos y poder extrapolarlos a cánidos silvestres que se encuentren amenazados, en orden a poder utilizarse en programas de preservación y conservación de especies.

CONCLUSIONES

- A medida que aumenta el tiempo de cultivo, un mayor número espermatozoides logra atravesar las cubiertas ovocitarias, logrando los máximos porcentajes de penetración a las 6 y 7 horas.
- Espermatozoides frescos penetraron un mayor número de ovocitos que los refrigerados, sin embargo, aquellos sometidos a refrigeración son capaces de penetrar antes ovocitos madurados *in vitro* que espermatozoides frescos.
- Los ovocitos inmaduros pueden ser penetrados por espermatozoides frescos y refrigerados, sin embargo, la utilización de ovocitos madurados *in vitro* es más apropiado para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides frescos y criopreservados.

BIBLIOGRAFÍA

- **AALSETH, E.P.; SACKE, R.G.** 1985. Morphological change of the acrosome on motile bovine spermatozoa due to storage at 4 °C. *J. Reprod. Fertil.* 74:473-478.
- **AUSTIN, C.R.** 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B4:* 581-596.
- **BARROS, C.; AUSTIN, C.R.** 1967. *In vitro* fertilization and the sperm acrosome reaction in the hamster. *J. Exp. Zool.* 166: 317-324.
- **BARROS, C.; MUÑOZ, G.** 1973. Sperm- egg interaction in immature hamster oocytes. *J. Exp. Zool.* 186:73-78.
- **BARROS, C.** 1974. Capacitation of mammalian spermatozoa. **In:** Coutinho, E.M.; Fuchs, F. (Eds.). *Physiology and genetics of reproduction, Part B.* Plenum Press; New York. pp 3-24.
- **BARROS, C.; MELÉNDEZ, J.; VALDIVIA, M.; RÍOS, M.; YUNES, R.** 1993. Sperm passage through the egg coats. *Biol. Res.* 26: 417-427.
- **BARROS, C.; CROSBY, J.A.; MORENO, R.D.** 1996. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biol. Int.* 20: 33-39.
- **BÉZARD, J.; DUCHAMP, G.; OKOLSKI, A.; PALMER, E.; MLODAWSKA, W.** 1998. Sperm zona pellucida binding assay according to stage of equine oocyte maturation. (Abstract). *Theriogenology* 49: 255.
- **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 spermatozoa motility. *Theriogenology* 34: 147-157.
- **BREWIS, I.A.; MOORE, H.D.M.** 1997. Molecular mechanism of gamete recognition and fusion at fertilization. *Hum. Reprod.* 12 Natl. (Suppl) 2: 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. Dev.* 60: 491-497.

- **BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S.** 1994. Composition and behavior of head membrana lipid of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31: 224- 238.
- **BURGESS, C.M.; BREDL, J.C.; PLUMMER, J.M.; ENGLAND, G.C.** 2001. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cyopreservation. *J. Reprod. Fertil. (Suppl)* 57: 357–363.
- **BYERS, A.P.; HUNTER, A.G.; SEAL, U.S.; BINCZIK, G.A.; GRAHAM, E.F.; REINDL, N.J.; TILSON, R.L.** 1989. *In vitro* induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the siberian tiger (*Panthera tigris*). *J. Reprod. Fertil.* 86: 599-607.
- **CHANG, M.C.** 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.
- **CORTES, C.J.; CODELIA, V.A.; MANOSALVA, I.; DE LANGE, J.; DE LOS REYES, M.; MORENO, R.** 2006. Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 165-175.
- **CRITSER, J.K.; ARRIESON, B.W.; AAKER, D.V.; HUSE-BENDA, A.R.; BALL, G.D.** 1987. Cryopreservation of human spermatozoa II. Posthaw chronology of motility and zona-free hamster ova penetration. *Fertil. Steril.* 47: 980-984.
- **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.; CARRIÓN, R.; SAENZ, L.; BARROS, C.** 2002. Viability of cryopreserved canine spermatozoa. **In:** 9th International Symposium on Spermatology. Cape Town, South Africa. 6-11 octubre 2002. pp. 1-27.
- **DE LOS REYES, M.** 2004. Congelación de semen canino. **In:** “Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latinoamericanos”. Gobello C. (Ed) Buenos Aires, Argentina. pp. 15-24.
- **DE LOS REYES, M.; DE LANGE, J.; MIRANDA, P.; PALOMINO, 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.; CARRION, R.; BARROS, C.** 2006. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured canine oocytes using frozen- thawed dog semen. *Theriogenology* 66: 1682-1684.

- **DUNBAR, B.S.; AVERY, S.; LEE, V.; PRASAD, S.; SCHAWAHN, D.; SCHWOEBEL, E.; SKINNER, S.; WILKINS, B.** 1994. The mammalian zona pellucida its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 331-347.

- **ENGLAND, G.C.W.** 1993. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. (Suppl)* 47: 243- 255.

- **FARSTAD, W.** 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175- 186.

- **FAZELI, A.R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.M.; BRACHER, V.; PARLEVLIT, J.; COLENBRANDER, B.** 1993. Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallion fertility. *Equine Vet. J. (Suppl)* 15: 57–59.

- **FAZELI, A.R.; ZHANG, B.R.; STEENWEG, W.; LARSSON, B.; BEVERS, M.M.; VAN DEN BROEK, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; COLENBRANDER, B.** 1997. Relationship between sperm–zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen–thawed bull semen. *Theriogenology* 48: 853–863.

- **FOULKES, J.A.** 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 49: 277-284.

- **FULLER, S.J.; WHITTINGHAM, D.G.** 1997. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 314-324.

- **HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; GOODROWE, K.L.** 1997a. Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48: 1329-1342.

- **HAY, M.A., KING, W.A., GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L.** 1997b. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl)* 51: 99–108.

- **HARRISON, R.A.P.** 1996. Capacitation mechanism, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 581-594.
- **HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W.** 1997a. 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.; ENGLAND, G.C.W.** 1997b. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of the domestic bitch. *J. Reprod. Fertil. (Suppl)* 51: 83-91.
- **HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W.** 1998a. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim. Reprod. Sci.* 51: 321- 332.
- **HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W.** 1998b. The effect of oocyte size and bitch age upon nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology* 49: 957–966.
- **HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W.** 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 55: 63–75.
- **HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W.** 2001. Manipulation of canine fertility using *in vitro* culture techniques. *J. Reprod. Fertil. (Suppl)* 57:111–125.
- **IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P.** 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55: 671- 684.
- **IVANOVA, M.; MOLLOVA, M.** 1995. Zona – penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology* 44: 751-760.
- **IVANOVA, M.; MOLLOVA, M.; IVANOVA-KICHEVA, M.G.; PETROV, M.; DJARKOVA, TS.; SOMLEV, B.** 1999. Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa *in vitro*. *Theriogenology* 52: 163-170.
- **KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W.** 1993. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol. Reprod.* 48: 841–845.
- **KAWAKAMI, E.; HORI, T.; TSUITSUI, T.** 1998. Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 197-202.

- **KAWAKAMI, E. ; ARAI, T.; OISHI, I.; HORI, T.; TSUTSUI, T.** 2000. Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminocans amounts of oviductal and uterine fluid in bitches. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 65-68.

- **KAWAKAMI, E. ; KASHIWAGI, C.; HORI, T.; TSUTSUI, T.** 2001. Effect of canine oviduct epithelial cells on movement and capacitation of homologous spermatozoa *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 121-131.

- **LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.** 2000. Can we use *in vitro* fertilization test to predict semen fertility?. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 327-336.

- **LINDE –FORSBERG, C.; FORSBERG, M.** 1993. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. *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. (small animal)* 10: 48-58.

- **LINDE- FORSBERG, C.; STRÖM-HOLST, B.; GOVETTE, G.** 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen – thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* 52: 11-23.

- **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.J.; LEYVA, V.; VALDIVIA, M.; DE LOS REYES, M.; BARROS, C.; MORENO, R.** 2005. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Rev. Inv. Vet. Perú* 16: 114-128.

- **MAYENCO-AGUIRRE, A.R.; PEREZ CORTES, A.B.** 1998. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology* 50: 195-204.

- **MORENO, R.D.; BARROS, C.** 2000. A basic 18-amino acid peptide contains the polysulfate-binding domain responsible for activation of the boar proacrosin/acrosin system. *Biol. Reprod.* 62: 1536–1542.

- **MORENO, R.; 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. *Fertil. Steril.* 77: 812-817.
- **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.
- **OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T.** 2000. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 54: 535-542.
- **OTOI, T.; WILLINGHAM, L.; SHIN, T.; KRAEMER, D.C.; WESTHUSIN, M.** 2002. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 124: 775–781.
- **PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, A.; FIRST, N.** 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180.
- **PARKS, J.E.; LYNCH, D.V.** 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29: 255-266.
- **PETRUNKINA, A.M.; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A.R.; TÖPFER-PETERSEN, E.** 2004. Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct. *Theriogenology* 61: 16-34.
- **PEÑA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C.** 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52: 965–980.
- **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*. *Anim. Reprod. Sci.* 84:193-210.
- **PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H.** 1996. Evidence that frozen/ thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46: 131-140.
- **PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.** 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 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 . *Theriogenology* 62: 1498- 1517.

- **ROBERTSON, L.; WATSON, P.F.** 1986. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J. Reprod. Fertil.* 77: 177- 185.

- **ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE FORSBERG, C.** 1995. Effect of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology* 44: 885-900.

- **ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE FORSBERG, C, RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 1997. Effect of Equex STM paste on viability of frozen- thawed spermatozoa during *in vitro* incubation at 38 °C. *Theriogenology* 47: 1093- 1101.

- **ROTA, A.; PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 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.; RENARD, J.P.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2001. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* 121: 97–105.

- **SHIMAZU, Y.; YAMADA, S.; KAWANO, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y.** 1992. *In vitro* capacitation of canine spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 38: 67-71.

- **SILVA, L.D.; VERSTEGEN, J.P.** 1995. Comparisions between three diferent extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 44: 571-579.

- **SIRIVAIYAPONG, 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. *Theriogenology* 53: 789-802.

- **STRÖM-HOLST, B.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LINDE-FORSBERG, C.** 2000. Evaluation of chilled and frozen- thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 119: 201-206.

- **TÖPFER-PETERSEN, E.; PETRUNKINA, A.M., EKHLASI-HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte–sperm interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 61: 653-662.

- **TSUITSUI, T.; TEZUKA, T.; MIKASA, Y.; SUGISAWA, H. ; KIRIHARA, N. ; HORI, T.; KAWAKAMI, E.** 2003. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 307-312.
- **WANG, W.H.; NIWA, K.; OKUDA, K.** 1991. *In vitro* penetration of pig oocytes matured in culture by frozen thawed ejaculated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 93: 491-496.
- **WASSARMAN, P.M.** 1999. Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96: 175-183.
- **WASSARMAN, P.M.; JOVINE, L.; QI, H.; WILLIAMS, Z.; DARIE, C.; LITSCHER, E.S.** 2005. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol. Cel. Endocrinol.* 234: 95-103.
- **WATSON, P.F.** 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg- yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.* 62: 483- 492.
- **WATSON, P.F.** 1995. Recent developments and the assesement of their pos-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891.
- **WATSON, P.F.** 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
- **YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y.** 1993. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J. Reprod. Fert. (Suppl)* 47: 227-229.
- **YANAGIMACHI, R.** 1994. Mammalian fertilization. **In:** Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds.). *The phisyology of reproduction. Second Edition.* Raven Press; New York. pp. 189-317.
- **ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen–thawed semen from dairy AI bulls International. *J. Androl.* 21: 207–216.