

# EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HEPARINA SOBRE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA *IN VITRO* EN CANINO

## Effect of Different Concentrations of Heparin on Canine Sperm Capacitation *In Vitro*

Jennie Risopatrón<sup>1,2</sup>, Sandra Catalán<sup>5</sup>, Néstor Sepúlveda<sup>1,3</sup> y Raúl Sánchez<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnología en Reproducción, Facultad de Medicina. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina. <sup>3</sup>Departamento de Producción Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. <sup>4</sup>Departamento de Ciencias Preclínicas. Universidad de La Frontera. Casilla 54-D, Temuco, Chile. <sup>5</sup>Tecnólogo Médico. E-mail: jennie@ufro.cl.

### RESUMEN

La capacitación es un prerrequisito del espermatozoide previo a la fecundación y se produce *in vivo* al interactuar los espermatozoides con factores presentes en el tracto reproductivo femenino. La heparina (HE) induce capacitación *in vitro* en espermatozoides de bovino, caprino y equino. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* la actividad de HE a diferentes concentraciones sobre la capacitación espermática en canino. Espermatozoides de eyaculados de 4 caninos adultos (Ovejero Alemán con edades entre 2-4 años), fueron incubados a diferentes concentraciones de HE (5, 10, 25 y 50 µg/mL) hasta 4 horas. La capacitación espermática y reacción acrosómica fueron determinadas por la tinción Clortetraciclina-Hoechst 33258 (CTC-HO). Los resultados no demostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los grupos, en los porcentajes de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto (Patrón C) en las diferentes concentraciones de heparina en los distintos tiempos de incubación. Sin embargo la adición de 50 µg/mL HE al medio capacitante incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) los porcentajes de reacción de acrosoma (Patrón RA) desde las 3 horas de incubación. Las diferentes concentraciones de HE utilizadas, no tuvieron efecto adicional sobre los porcentajes de viabilidad y motilidad espermática. Estos resultados sugieren que la adición de 50 µg/mL de HE al medio capacitante (CCM) incrementa ( $P < 0,05$ ) los porcentajes de RA a partir de las 3 horas de incubación.

**Palabras clave:** Capacitación espermática, reacción de acrosoma, heparina, espermatozoides caninos, reacción de acrosoma espontánea.

### ABSTRACT

Capacitation is an important process in the sperm maturation and it is an obligatory previous step to the fertilization. The heparin (HE) induces *in vitro* sperm capacitation in bovine, goat and equine. The objective of this study was to evaluate *in vitro* the HE activity in different concentrations on the sperm capacitation in canine. Sperm from four adults canines adults (German Shepherd, ages between 2 and 4 years old) were incubated in different HE concentrations (5, 10, 25 and 50 µg/mL) up to 4 hours. Sperm capacitation and acrosome reaction were determined by of Chlortetracycline-Hoechst 33258 (CTC-HO) stain. The results did not show any significant differences ( $P > 0.05$ ) between groups, in the percentage of capacitated-acrosome-intact sperm (C pattern) in the different incubation times. Nevertheless the addition of 50 µg/mL HE to the capacitating medium increased significantly ( $P < 0.05$ ) the percentages of acrosome reaction (RA pattern) from 3 h of incubation. Different HE concentrations used, didn't have any additional effect on the percentage of viability and sperm motility. These results suggest that the addition of 50 µg/mL of HE to the capacitating medium (mCCM) increases ( $P < 0.05$ ) the percentages of RA from 3 h of incubation.

**Key words:** Sperm capacitation, acrosome reaction, heparin, canine spermatozoa, spontaneous acrosoma reaction.

### INTRODUCCIÓN

En mamíferos, los espermatozoides recién eyaculados son móviles y viables, no obstante son incapaces de fecundar al ovocito. Para lograr esta función es necesario que ocurra el proceso de capacitación que se produce al interactuar los espermatozoides con las secreciones presentes en el tracto re-

productivo femenino [2-4]. Ello conlleva a cambios bioquímicos en la membrana celular [43], como modificación del pH intracelular, incremento de la permeabilidad para iones como el  $\text{Ca}^{2+}$ , aumento en la fluidez de la membrana plasmática y su metabolismo, y a la modificación de los patrones de fosforilación de proteínas y composición lipídica [41].

Glicosaminoglicanos (GAGs), similar a la heparina, presentes en el fluido folicular han demostrado ser necesarios en la capacitación de espermatozoides de bovino. Los GAGs pueden promover la capacitación uniéndose y removiendo las proteínas del plasma seminal que se fijan por adsorción a la membrana plasmática del espermatozoide e inhiben la capacitación [28, 40]. La heparina (HE), induce capacitación *in vitro* en espermatozoides de bovino, caprino y equino [6, 7, 21, 30]. La HE se une al espermatozoide de bovino a través de proteínas de unión situadas en la membrana celular [29, 31] produciendo un aumento en la fosforilación de proteínas [10, 21] y en el  $\text{Ca}^{2+}$  libre que conlleva a un incremento del pH intracelular [14, 32, 33]. En espermatozoides de canino *in vitro*, la adición de HE (20 µg/mL) al medio capacitante CCM mantiene la motilidad total, pero no tiene efecto en la reacción de acrosoma [17]. Sin embargo, estudios posteriores señalan que la adición de 5 µg/mL de HE al CCM induce un aumento significativo en la motilidad espermática, hiperactividad y reacción de acrosoma [18]. Estos autores sugieren que la HE-similar y otros GAGs provenientes del fluido oviductal y uterino de perras en estro estarían asociados con la motilidad y la capacitación espermática. En contraste, estudios previos demostraron que la adición de 5 µg/mL de HE al CCM no tiene efectos significativos sobre la motilidad y capacitación espermática en espermatozoides congelados-descongelados [34]. La acción de HE, dosis y periodos de incubación sobre la capacitación espermática *in vitro* en esta especie no han sido determinados, constituyendo la evaluación de estos parámetros el objetivo de este estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención y preparación de los espermatozoides

Semen fresco de eyaculados de 4 caninos adultos de la raza Ovejero Alemán con edades entre 2-4 años, fueron utilizados en este estudio. Los animales permanecieron en el bioferro de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, y fueron controlados periódicamente por un médico veterinario y mantenidos con una dieta balanceada y libre acceso al agua. Cinco eyaculados de cada perro fueron obtenidos por estimulación manual después de un periodo de abstinencia mínimo de tres días. Sólo se utilizó la segunda fracción de los eyaculados, rica en espermatozoides [20]. El semen fue colectado en vasos estériles manteniendo una temperatura de 37°C. Se realizó un análisis seminal para evaluar la concentración, motilidad, viabilidad, morfología espermática y estado acrosómico.

### Evaluación de los eyaculados

La concentración espermática fue determinada por recuento en una cámara de Neubauer en un microscopio de luz. El movimiento progresivo individual de los espermatozoides se determinó por observación de 10 µL suspensión espermática en una lámina portaobjeto, bajo microscopio (Nikon Optiphot-2, Tokio, Japón), con platina temperada (37°C) y condensador de contraste de fase. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se determinó considerando los grados 3 y 4 de una escala 0 a 4 (0: Sin movimiento, 1: Movimiento sin avance, 2: Movimiento en círculo, 3: Movimiento progresivo rectilíneo suave y 4: Movimiento rectilíneo rápido) [37]. La viabilidad, morfología y estado acrosómico se evaluaron por medio de la técnica de doble tinción con azul tripán-Giemsa [8], que permite determinar simultáneamente los porcentajes de viabilidad y de espermatozoides vivos con reacción acrosómica espontánea.

Se utilizaron eyaculados que cumplieran con las siguientes características: volumen de la segunda fracción espermática > 3 mL, concentración >  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL, morfología normal  $\geq 80\%$ , motilidad progresiva  $\geq 80\%$ , y acrosoma intacto  $\geq 90\%$ . Para reducir la variabilidad [44] y obtener el volumen y concentración adecuada para cada ensayo ( $n = 5$ ), se realizó un pool de las fracciones rico en espermatozoides de los eyaculados.

### Procedimiento de capacitación espermática *in vitro*

**Medio capacitante.** El medio de capacitación utilizado fue el medio de capacitación modificado para caninos (mCCM) libre de glucosa [12]. La composición del medio fue la siguiente: NaCl (83,49 mM), KCl (4,78mM),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1,71 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,19 mM), TRIS (66 mM), Na-Piruvato (0,25 mM), Na-Lactato (21,55 mM), albúmina sérica bovina (10 mg/mL-BSA), penicilina G (100 UI/mL), estreptomycin (50 µg/mL) y rojo fenol (20 µg/mL). El pH se ajustó a 7,8 y la osmolaridad a 300 mOsm. El medio mCCM fue suplementado con diferentes concentraciones de HE para inducir la capacitación espermática.

### Incubación de espermatozoides con heparina

Con el propósito de obtener espermatozoides libres de plasma seminal, las muestras de pool de semen fueron lavadas en mCCM sin albúmina (1:1 v/v) y centrifugadas a 1.800 g por 3 min. Posteriormente el pellet fue diluido en mCCM suplementado con 1% BSA y la concentración espermática fue ajustada a  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL. La suspensión espermática se dividió en cinco grupos iguales (alícuotas de 1mL), a los que se les adicionó diferentes concentraciones de heparina (HE): sin HE (Control), 5, 10, 25 y 50 µg/mL e inmediatamente fueron incubados a 38°C, 5% de  $\text{CO}_2$  y 90% de humedad. Se determinó motilidad progresiva, viabilidad, y estado acrosómico a las 0 (Control) y después 1, 2, 3, y 4 horas de incubación en cada muestra con las diferentes concentraciones de HE.

### Evaluación espermática post incubación

**Motilidad.** La motilidad progresiva fue estimada en forma similar a la descrita previamente en los espermatozoides pre incubación.

**Viabilidad, capacitación y reacción de acrosoma.** La evaluación de estos parámetros espermáticos se realizaron simultáneamente con la técnica de tinción Clortetraciclina (CTC; Sigma USA)-Hoechst 33258 (HO; Sigma USA) [15]. Alícuotas de 100  $\mu$ L de la suspensión espermática de los diferentes grupos fueron incubadas con 1  $\mu$ L (70  $\mu$ g/mL) de solución HO 33258 por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente los espermatozoides fueron lavados mediante centrifugación (400 g) por 5 minutos con una solución de polivinilpirrolidona al 2% (PVP-40; Sigma USA) en fosfato buffer salino (PBS). El pellet fue resuspendido (50  $\mu$ L) en mCCM libre de proteína, de esta suspensión se extrajeron 5  $\mu$ L y se mezclaron con 5  $\mu$ L de solución CTC<sup>1</sup> sobre una lámina porta objeto. La muestra fue incubada por 30 seg a temperatura ambiente y se le adicionó 0,2  $\mu$ L de solución fijadora TRIS-G<sup>2</sup>, y 5  $\mu$ L de 1,4-diaza-2,2,2-bicyclo-octane (DABCO). Las láminas fueron cubiertas con cubreobjetos, guardadas en oscuridad a 4°C y evaluadas antes de 48 horas.

Las observaciones de los espermatozoides se realizaron en un microscopio de fluorescencia (Optiphot-2, Nikon, Japón), con iluminación vertical y lámpara de mercurio. La tinción de HO (marcador de viabilidad), se observó utilizando un filtro de barrera (BA-400), un filtro de excitación (EX 330-380), y un espejo dicroico (DM-400), y la CTC (marcador de capacitación y RA), se observó utilizando una longitud de onda de 495 nm, un filtro de barrera (BA-520), de excitación (EX 450-490), y un espejo dicroico (DM-510). Se contabilizaron 100 espermatozoides al azar por grupo. El porcentaje de espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto (Patrón NC), capacitados con acrosoma intacto (Patrón C) y capacitados con reacción de acrosoma (Patrón RA) fue determinado del total de espermatozoides viables evaluados con la CTC-HO. Los distintos patrones de fluorescencia con CTC fueron determinados en base a lo descrito por Guérin y col. [12].

### Análisis estadístico

Los valores porcentuales de motilidad, viabilidad, capacitación espermática y reacción de acrosoma se analizaron utilizando el programa estadístico Prisma® (Graph Pad Software Incorporated, 1996, San Diego, California USA). Se realizó prueba de ANOVA de dos vías, para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de heparina, el efecto del tiempo y la interacción entre ambos factores. En los grupos que la ANOVA demostró diferencias estadísticamente significativas

se analizaron mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y el Test de comparación múltiple de Dunn. El nivel de significancia fijado para la totalidad de las pruebas estadística aplicadas fue  $P < 0,05$  [9, 45].

## RESULTADOS

### Motilidad y viabilidad espermática

Las diferentes concentraciones de HE (5, 10, 25 y 50  $\mu$ g/mL), no tuvieron efecto adicional sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides. Los porcentajes de motilidad espermática fueron similares entre los grupos con las diferentes concentraciones de HE incubados por 4 horas ( $P > 0,05$ ) (TABLA I). Sin embargo la motilidad fue afectada por el tiempo de incubación, esta fue decreciendo ( $P < 0,05$ ) al aumentar el tiempo (h) de incubación, el porcentaje promedio inicial de motilidad de los grupos (tiempo 0) fue de  $92,8\% \pm 1,3$ , declinando este porcentaje a  $68,8\% \pm 1,4$  a las 4 horas de incubación.

La viabilidad de los espermatozoides no fue afectada por las diferentes concentraciones de HE utilizadas en este estudio. Los porcentajes promedios de viabilidad, evaluados por HO, no presentaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los grupos evaluados hasta las 4 horas de incubación (TABLA II). Sin embargo la viabilidad fue afectada por el tiempo de incubación, se observó que al aumentar el tiempo (h) de incubación los porcentajes de viabilidad fueron disminuyendo en todos los grupos. El porcentaje promedio inicial total de viabilidad de los grupos (tiempo 0) fue de  $93,8\% \pm 1,8$ , declinando este porcentaje a  $79,4\% \pm 1,9$  a las 4 horas de incubación.

### Capacitación espermática y reacción de acrosoma

Las diferentes concentraciones de HE no tuvieron efecto adicional sobre el porcentaje de espermatozoides clasificados con el patrón C (capacitados con acrosoma intacto). Los resultados obtenidos con la CTC-HO, no revelaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) al comparar los porcentajes promedios de espermatozoides con patrón C obtenidos entre los distintos tratamientos con HE, en las diferentes horas de incubación evaluadas (FIG. 1). Sin embargo, los espermatozoides con patrón C fueron afectados por el tiempo (h) de incubación. El porcentaje promedio ( $\pm$  SEM) total de los 5 grupos aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) después de una hora de incubación comparado con el inicio ( $41,4\% \pm 3$ ;  $9,9\% \pm 1,1$ , respectivamente), posteriormente fue decreciendo ( $P < 0,05$ ) hasta las 4 horas ( $9,4\% \pm 1,2$ ).

Los porcentajes de espermatozoides con patrón RA (reacción de acrosoma) en todos los tratamientos con HE y el

1 La solución de CTC contiene 750  $\mu$ M CTC (Sigma ref. C 4881) en buffer TRIS (20mM)-NaCl (130mM)-DL cisteína (5mM) a un pH final 7,8.

2 La solución TRIS-G contiene Glutaraldehído (12,5%) en buffer TRIS(1M) a un pH final 7,4.

**TABLA I**  
**MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES INCUBADOS POR 4 HORAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HEPARINA (PORCENTAJES PROMEDIOS ± SEM). MOTILITY OF SPERM INCUBATED FOR 4 HOURS AT DIFFERENT CONCENTRATION OF HEPARIN (AVERAGE PERCENTAGE ± SEM)**

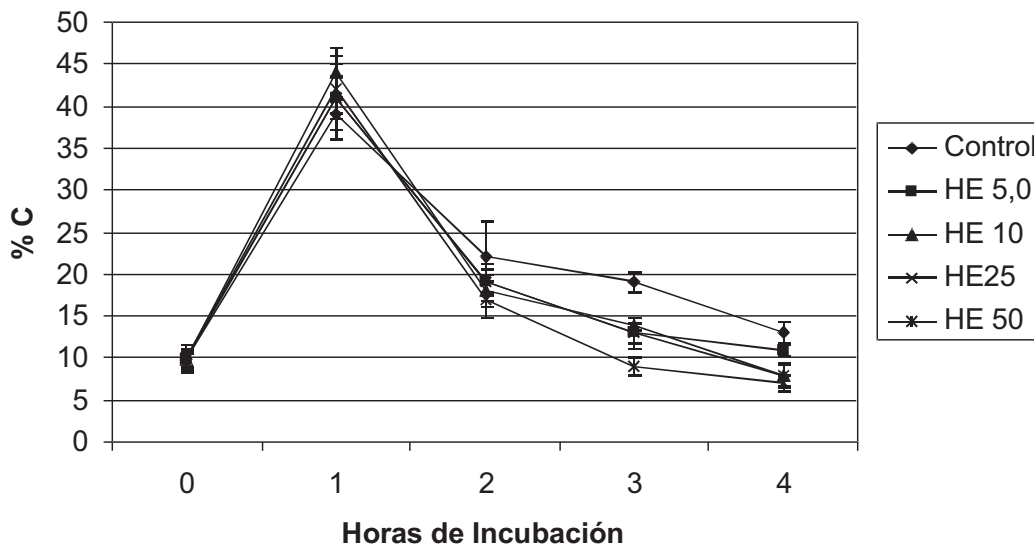
Tiempo (h)	Control	HE-5*	HE-10	HE-25	HE-50
0	93 ± 1,2 <sup>a</sup>	92 ± 1,6 <sup>a</sup>	94 ± 1,3 <sup>a</sup>	93 ± 1,2 <sup>a</sup>	92 ± 1,4 <sup>a</sup>
1	85 ± 1,7 <sup>c</sup>	85 ± 1,4 <sup>c</sup>	84 ± 1,3 <sup>c</sup>	82 ± 1,5 <sup>c</sup>	80 ± 1,6 <sup>c</sup>
2	80 ± 1,3 <sup>d</sup>	80 ± 1,4 <sup>d</sup>	78 ± 1,6 <sup>d</sup>	77 ± 1,4 <sup>d</sup>	75 ± 1,9 <sup>d</sup>
3	75 ± 1,4 <sup>e</sup>	74 ± 1,6 <sup>e</sup>	73 ± 1,7 <sup>e</sup>	73 ± 1,6 <sup>e</sup>	73 ± 1,2 <sup>e</sup>
4	72 ± 1,2 <sup>f</sup>	70 ± 1,7 <sup>f</sup>	68 ± 1,6 <sup>f</sup>	68 ± 1,3 <sup>f</sup>	66 ± 1,3 <sup>f</sup>

Letras minúsculas iguales por filas indican diferencias no significativas (P > 0,05). \*HE: Heparina (µg/mL).

**TABLA II**  
**VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES INCUBADOS POR 4 HORAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HEPARINA. EVALUADOS POR HOECHST 33258 (PORCENTAJES PROMEDIOS ± SEM). VIABILITY OF SPERM INCUBATED FOR 4 HOURS AT DIFFERENT CONCENTRATION OF HEPARIN. EVALUATED BY HOECHST 33258 (AVERAGE PERCENTAGE ± SEM)**

Tiempo (h)	Control	HE-5*	HE-10	HE-25	HE-50
0	95 ± 2,0 <sup>a</sup>	95 ± 1,7 <sup>a</sup>	94 ± 1,9 <sup>a</sup>	94 ± 1,8 <sup>a</sup>	93 ± 1,6 <sup>a</sup>
1	88 ± 2,3 <sup>c</sup>	86 ± 2,5 <sup>c</sup>	85 ± 2,1 <sup>c</sup>	84 ± 2,0 <sup>c</sup>	83 ± 2,0 <sup>c</sup>
2	86 ± 1,6 <sup>d</sup>	83 ± 1,9 <sup>d</sup>	83 ± 2,5 <sup>d</sup>	83 ± 2,1 <sup>d</sup>	81 ± 2,2 <sup>d</sup>
3	82 ± 1,9 <sup>e</sup>	82 ± 1,6 <sup>e</sup>	80 ± 1,8 <sup>e</sup>	80 ± 2,3 <sup>e</sup>	78 ± 2,5 <sup>e</sup>
4	80 ± 1,8 <sup>f</sup>	80 ± 1,7 <sup>f</sup>	80 ± 1,7 <sup>f</sup>	79 ± 2,4 <sup>f</sup>	78 ± 1,7 <sup>f</sup>

Letras minúsculas iguales por filas indican diferencias no significativas (P > 0,05). \*HE: Heparina (µg/mL).



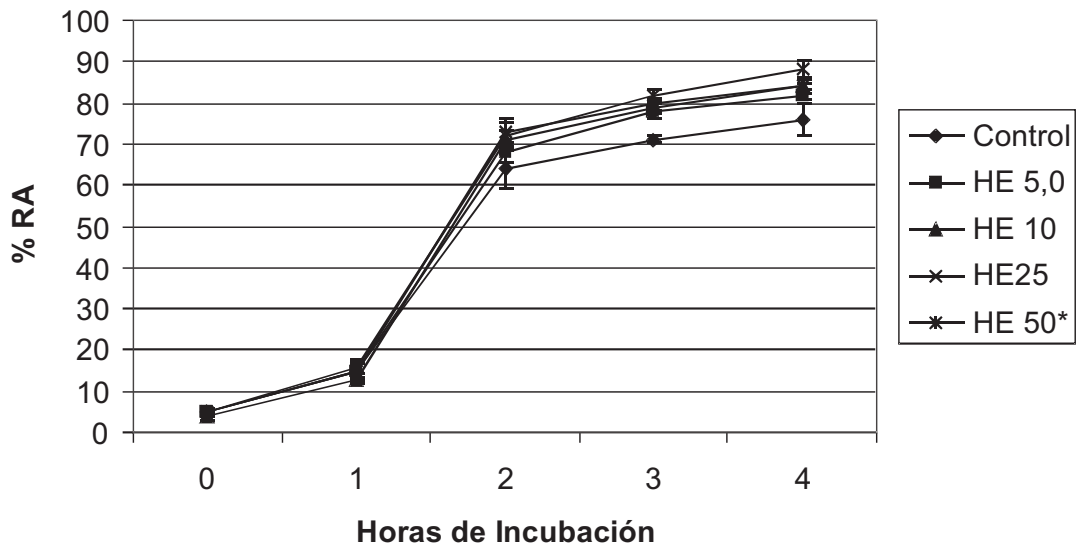
**FIGURA 1. PORCENTAJES (PROMEDIOS ± SEM) DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS CON ACROSOMA INTACTO (PATRÓN C), DESPUÉS DE INCUBACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HEPARINA (HE: µG/ML). ESTADO ACROSOMAL EVALUADO POR CLORTETRACLINA-HOECHST 33258 [N = 5].**

control fueron afectados por el tiempo (h) de incubación, incrementándose (P < 0,05) a medida que aumentaron las horas de incubación (FIG. 2). Al comparar los porcentajes de espermatozoides con RA en las concentraciones de 5,10 y 20 µg/mL de HE y el control no presentaron diferencias significativas (P > 0,05) hasta las 4 horas de incubación. Sin embargo la adición de 50 µg/mL HE aumento significativamente (P < 0,05) el porcentaje de RA desde la 3 horas de incubación comparado

con los otros grupos (3 horas: 84,4% ± 1,3; 76,3% ± 1,7, a las 4 horas: 88% ± 1,9; 81,5% ± 1.8, respectivamente) (FIG. 2).

## DISCUSIÓN

El proceso de capacitación es un prerrequisito que antecede a la fecundación, éste lo adquiere el espermatozoide al interactuar con factores capacitantes presentes en el tracto re-



**FIGURA 2. PORCENTAJES (PROMEDIOS  $\pm$  SEM) DE ESPERMATOZOIDES VIVOS CON ACROSOMA REACCIONADO (PATRÓN RA), DESPUÉS DE INCUBACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HEPARINA (HE:  $\mu$ G/ML). ESTADO ACROSOMAL EVALUADO POR CLORTETRACLINA-HOECHST. 33258 [N = 5].**

productivo de la hembra. Entre estos factores se encuentran los glicosaminoglicanos (GAGs) como condroitín sulfato [22], ácido hialurónico [39] y heparina [24, 31]. Su presencia en las secreciones del tracto reproductor de la hembra, en el fluido folicular, y en la matriz intercelular de las células del cúmulo-zona pelúcida ha sido asociado al aumento de la motilidad y la capacitación espermática.

En canino, GAGs provenientes del fluido oviductal y uterino de hembras en estro han sido asociados con la motilidad y la capacitación de espermatozoides *in vivo*, resultados que enfatizarían la importancia de los GAGs en la función espermática y en la fecundación [16, 18]. Un importante GAGs, la HE se ha relacionado con el incremento de la motilidad o mantención de una motilidad alta por tiempos prolongados en los espermatozoides de canino *in vitro* [17, 18]. Los resultados del presente estudio, contrastan con los obtenidos por Kawacami y col. [17, 18], no observándose un efecto adicional de la HE sobre la motilidad espermática. La motilidad disminuyó a medida que aumentó el tiempo de incubación, efecto que también observaron Sirivaidyapong y col. [38]. En investigaciones previas, esto se ha asociado a la ausencia de glucosa en el medio de cultivo, que fisiológicamente es necesaria como sustrato energético para la motilidad [25]. No obstante los resultados de la presente investigación están en concordancia con los obtenidos por Peña y col. [34], quienes utilizaron CCM suplementado con glucosa y HE (5  $\mu$ g/mL) en espermatozoides congelados-descongelados. En relación a la viabilidad espermática, no fue afectada por las diferentes dosis de HE. Similarmente que la motilidad, la viabilidad fue afectada por el tiempo de incubación. Resultados similares han sido obtenidos en espermatozoides de canino incubados en medio CCM [12, 23] en medio CCM suplementado con HE [17, 34] y en medio CCM libre de HE y glucosa [1]. Los espermatozoides de canino son capaces de conservar niveles relativamente altos de glucosa intracelu-

lar en la forma de metabolitos como glucógeno o glucosa 6-fosfato, y los niveles intracelular de estos metabolitos siguen siendo altos por un tiempo relativamente largo sin la adición de azúcares exógenos [35]. Esto explicaría en parte el mantenimiento de una adecuada motilidad y viabilidad espermática en medios libres de glucosa. No se excluye la importancia de la composición de los medios y la procedencia de los espermatozoides, si son de semen fresco (eyaculados) o congelados-descongelados [1], que podrían tener diferente metabolismo energético.

La capacitación espermática inducida por HE *in vitro* ha sido obtenida en diferentes especies de mamíferos. La HE induce capacitación espermática y mejora las tasas de fecundación *in vitro*, en bovino [11, 27, 31]. Similares resultados se han obtenido en otros mamíferos como: caprino [17], equino [6] y búfalo [5]. Sin embargo, en porcino disminuye las frecuencias de fecundación [19, 42], en hámster promueve la reacción de acrosoma pero no la capacitación [13, 26]. En canino, la adición de HE para inducir capacitación espermática ha sido controversial. Estudios preliminares de Kawacami y col. [17], señalan que la HE (20  $\mu$ g/mL) en el medio CCM no tiene efecto en la reacción de acrosoma. Sin embargo, estudios posteriores [18], señalan que la adición de 5  $\mu$ g/mL de HE al CCM induce un aumento significativo en reacción de acrosoma. Recientes estudios de Peña y col. [34], observaron que la adición de 5  $\mu$ g/mL de HE al CCM no tiene efectos significativos sobre capacitación espermática en espermatozoides congelados-descongelados. Los resultados de la presente investigación concuerdan con Peña y col., en este último estudio, las diferentes concentraciones de HE no tuvieron efecto adicional sobre el porcentaje de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto (Patrón C), determinados por CTC-HO, no se presentaron diferencias significativas al comparar los porcentajes promedios de capacitación espermática (Patrón C) obte-

nidos entre los diferentes grupos con distintas concentraciones de HE y el control hasta las 4 horas de incubación. Sin embargo la RA fue incrementada con la adición de 50 µg/mL de HE al medio capacitante (mCCM). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en espermatozoides de hámster [13, 26], la HE (50 µg/mL) inducirán una reacción de acrosoma pero no la capacitación espermática. Estudios previos han señalado que los porcentajes de inducción de la RA en espermatozoides de canino son incrementados en un medio libre de glucosa (Sp-Talp) en comparación con un medio con glucosa (CCM) [38]. En el presente estudio se utilizó un medio mCCM libre de glucosa y se obtuvieron altos porcentajes de espermatozoides RA desde 3 horas de incubación, lo que sugiere que en el medio mCCM libre de glucosa mas el efecto de la HE, la RA fue inducida en un menor período de tiempo (h de incubación) al comparar los resultados con estudios previos [12, 36, 38]. La capacitación de espermatozoides de canino en medios CCM libre de glucosa (libre de HE) ha sido también demostrada recientemente por Albarracín y col. [1]. Estos resultados contradictorios de la presencia o ausencia de glucosa en los medios sobre la capacitación espermática, se explicarían porque el logro de una capacitación funcional *in vitro* en espermatozoides de canino depende más de sus niveles intracelulares de metabolitos derivados de la glucosa que de la presencia de glucosa extracelular, e incluso existen diferencias en los niveles intracelulares de estos metabolitos en el espermatozoide de canino que podrían ser causados por tasas diferentes de metabolismo en los espermatozoides recién extraídos o por la diferente composición de los medios de capacitación [1]. En resumen, la HE en las concentraciones utilizadas en el presente estudio, no tuvo un efecto adicional en los espermatozoides con patrón C, pero concentraciones de 50 µg/mL de HE inducirían la RA en los espermatozoides de canino incubados en el medio mCCM. No obstante, no se puede descartar el efecto *in vivo* de los GAGs, debido a que el alto porcentaje de capacitación y reacción de acrosoma espontánea que se produce en espermatozoides de canino deprivados de su plasma seminal, eventualmente no permitiría reflejar la acción de la heparina sobre el proceso de capacitación *in vitro*.

## CONCLUSIONES

La heparina en las concentraciones utilizadas en el presente estudio, no tuvo un efecto adicional en los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto (Patrón C). Sin embargo la adición de 50 µg/mL de HE al medio capacitante mCCM, induciría reacción de acrosoma (Patrón RA) en espermatozoides de canino. Los porcentajes de espermatozoides que expusieron patrón C (capcitados, con acrosoma intacto) y patrón RA (reacción de acrosoma) fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) afectados por el tiempo (horas de incubación), evaluados por la técnica de doble tinción Clortetraclina-Hoechst 33258.

Es factible de lograr capacitación en espermatozoides de canino en un medio capacitante libre de glucosa.

Se hace necesario en el futuro, realizar estudios que nos permitan identificar el o los factores que intervienen en la capacitación de espermatozoides canino, para optimizar los métodos de capacitación espermática y así mejorar los procedimientos de fecundación *in vitro*.

## AGRADECIMIENTO

El presente estudio fue financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad de La Frontera de Temuco-Chile. Proyecto N° 120442.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBARRACIN, J.L.; MOGAS, T.; PALOMO, M.J.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. In vitro capacitation and acrosome reaction of dog spermatozoa can be feasibly attained in a defined medium without glucose. **Reprod. Dom. Anim.** 39: 129-135. 2004.
- [2] AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of sperm into mammalian egg. **Aust. J. Sci. Res.** 4:581-596. 1951.
- [3] AUSTIN, C.R. The "capacitation" of the mammalian sperm. **Nature.** 170:326. 1952.
- [4] CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. **Nature.** 168:697-698. 1951.
- [5] CHAUHAN, M.S.; SINGLA, S.K.; MANIK, R.S.; MADAN, M.L. Increased capacitation of buffalo sperm by heparin as confirmed by electron microscopy and in vitro fertilization. **J. Exp. Biol.** 35:1038-1043. 1997
- [6] CHRISTENSEN, P.; WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. **Theriogenol.** 45:1201-1210. 1996.
- [7] COX, J.F.; SARAVIA, F.; BRIONES, M.; SANTA MARIA, A. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. **Theriogenol.** 10: 451-460. 1995.
- [8] DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Res.** 22:51-57. 1989.
- [9] DOMENECH, J.M. **Bioestadística. Métodos Estadísticos para Investigadores.** Editorial Herder, 1<sup>ra</sup> Ed. Barcelona, España. 642 pp. 1977.
- [10] GALANTINO-HOMER, H.L.; VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. **Biol. Reprod.** 56: 707-719. 1997.

- [11] GLIEDT, D.W.; ROSENKRANS, C.F.; RORIE, R.W. Jr.; RAKES J.M. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. **J. Dairy Sci.** 79: 532-535. 1996
- [12] GUÉRIN, P.; FERRER, M.; FONTBONNE, A.; BÉNIGNI, L.; JACQUET, M.; MÉNÉZO, Y. In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. **Theriogenol.** 52: 617-628. 1999.
- [13] HANDROW, R.R.; PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of glycosaminoglycans on capacitation and the acrosoma reaction of bovine and hamster sperm. **Biol. Reprod.** 34: 93 (Suppl). 1986.
- [14] HANDROW, R.R.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. **J. Exp. Zool.** 252:174-182. 1989.
- [15] HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. **Anim. Reprod. Sci.** 51: 321-332. 1998.
- [16] KAWAKAMI, E.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. **J. Vet. Med. Sci.** 60(2):197-202. 1998.
- [17] KAWAKAMI, E.; ARAI, T.; NAKAMURA, U. Effects of medium containing heparin and theophylline on capacitation and metabolic enzyme activities of ejaculated spermatozoa from dogs with asthenozoospermia. **Anim. Reprod. Sci.** 54: 251-259. 1999.
- [18] KAWAKAMI, E.; ARAI, T.; OISHI, I.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in bitches. **J. Vet. Med. Sci.** 62(1):65-68. 2000.
- [19] KIM, N. H.; DAY, B.N.; LIM, J. G.; LEE, H. T.; CHUNG, K.S. Effects of oviductal fluid and heparin on fertility and characteristic of porcine spermatozoa. **Zigote.** 5: 61-65. 1997
- [20] KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenol.** 39: 1279-1289. 1993.
- [21] LANE, M.E.; THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Heparin and High-Density Lipoprotein Mediate Bovine Sperm Capacitation by Different Mechanisms. **Biol. Reprod.** 60: 169-175. 1999.
- [22] LENZ, R.W.; MARTIN, J.L. Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. **J. Dairy Sci.** 71:1073-1077. 1988.
- [23] MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Capacitation, acrosome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. **Gamete Res.** 1978; 1: 101-109. 1978.
- [24] MAHMOUD, A.I.; PARRISH, J.J. Oviductal fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. **Mol. Reprod. Dev.** 43: 554-560. 1996.
- [25] MAHADEVAN, M.M.; MILLER, M.M.; MOUTOS, D.M. Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro. **Hum. Reprod.** 12:119-123. 1997.
- [26] MEIZEL, S.; TURNER, K.O. Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of previously capacitated hamster sperm. **J. Exp. Zool.** 237:137-139. 1986.
- [27] MENDES, J.O. Jr.; BURNS, P.D.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL G.E. Jr. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenol.** 60(2):331-40. 2003.
- [28] MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biol. Reprod.** 42:899-915. 1990.
- [29] McCAULEY, T.C.; BELLIN, M.E.; AX, R.L. Localization of a heparin-binding protein to distinct regions of bovine sperm. **J. Anim. Sci.** 74:429-438. 1996
- [30] PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. **Theriogenol.** 24:537-549. 1985
- [31] PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.** 38:1171-1180. 1988.
- [32] PARRISH, J.J.; VRENDENBURGH, W.L.; LAVIN, CA. Increases in bovine sperm intracellular calcium (Ca) and pH (pH<sub>i</sub>) during capacitation. **Biol. Reprod.** 48(Suppl 1):106. 1993
- [33] PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; GRAHAM, J.K. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: Role of intracellular calcium. **Theriogenol.** 51:461-472. 1999.
- [34] PEÑA, A.I.; LOPEZ-LUGILDE, L.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Studies on the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of frozen-thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. **Reprod. Dom. Anim.** 38: 27-35. 2003.
- [35] RIGAU, T.; RIVERA, M. PALOMO, M.J.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; MOGAS, T.; BALLESTER, J.; PEÑA, A.; OTAEGUI, P.J.; GUINOVART, J.J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. **Reprod.** 123: 579-591. 2002.

- [36] ROTA, A.; PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIQUEZ-MARTINEZ, H. 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. 1999.
- [37] SÁNCHEZ, R. Use of low temperature to induce acrosome reaction in human spermatozoa. Justus-Liebig-University of Giessen, Alemania (Doctoral Thesis). 79 pp. 1991.
- [38] SIRIVAIYAPONG, S.; CHENG, F.P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W.F.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenol.** 53: 789-802. 2000.
- [39] SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B. Fertilizing capacity of bovine spermatozoa selected after swim-up in hyaluronic acid-containing medium. **Reprod. Fertil. Dev.** 5: 307-315. 1993.
- [40] THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biol. Reprod.** 52:1372-1379. 1995.
- [41] VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. **Biol. Reprod.** 59: 1-6.1998.
- [42] WANG, W. H.; NIWA, K.; OKUDA, K. In vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** 93(2): 491-496. 1991.
- [43] YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: **The Physiology of Reproduction**. Knobil, E.; Neill, J. (Eds). 2<sup>nd</sup> Ed. Raven Press, 189-317 pp. 1994.
- [44] YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. **Cryobiol.** 44: 62-78. 2002.
- [45] ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4<sup>th</sup> Ed. Editorial Prentice Hall. New Jersey. 929 pp. 1999.