



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ACROSINA EN
ESPERMATOZOIDES FRESCOS DE PERRO SOMETIDOS A
CAPACITACIÓN *IN VITRO*

MICHEL GUTIÉRREZ DÍAZ

Memoria Para Optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la Producción Animal

PROFESORA GUÍA: DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.

FINANCIAMIENTO: FONDECYT 1060602

SANTIAGO DE CHILE

2007



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ACROSINA EN ESPERMATOZOIDES FRESCOS DE PERRO SOMETIDOS A CAPACITACIÓN *IN VITRO*

MICHEL GUTIÉRREZ DÍAZ

Memoria Para Optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la Producción Animal

		NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA:	DRA MÓNICA DE LOS REYES S.
PROFESOR CONSEJERO:	DR. MARIO DUCHENS A.
PROFESORA CONSEJERA:	DRA. BESSIE URQUIETA M.

SANTIAGO DE CHILE

2007

ÍNDICE

Introducción.....	1
Revisión Bibliográfica.....	3
1. Capacitación Espermática.....	4
Capacitación Espermática en Perros.....	6
2. Hiperactivación.....	10
3. Reacción del Acrosoma.....	11
4. Acrosina.....	13
Hipótesis.....	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos.....	16
Materiales y Métodos.....	17
1. Obtención de Espermatozoides.....	17
2. Inmunofluorescencia Indirecta Para Determinar Acrosina.....	18
3. Análisis Estadístico.....	19
Resultados.....	21
1. Inmunofluorescencia.....	21
2. Motilidad Espermática.....	24
Discusión.....	26
Conclusiones.....	32
Bibliografía.....	33

RESUMEN

Existe poca información en espermatozoides caninos sobre la dinámica y factores que influyen sobre la capacitación espermática y la reacción del acrosoma (RA), procesos fundamentales para una exitosa fecundación. Con el fin de implementar biotecnologías reproductivas más avanzadas, se hace imperativo profundizar los conocimientos sobre estos procesos espermáticos. El objetivo de este estudio fue inmunolocalizar, por inmunofluorescencia indirecta, la enzima acrosina en espermatozoides caninos eyaculados capacitados *in vitro*, con el propósito de determinar el efecto del tiempo y temperatura de incubación sobre la cinética de liberación de esta enzima durante la reacción del acrosoma.

Se recolectó la fracción espermática de un total de 5 eyaculados, a partir de 3 perros adultos. Cada muestra fue una réplica experimental, evaluándose en cada una la concentración espermática y motilidad progresiva (MP). Los espermatozoides eyaculados fueron capacitados en medio de capacitación canino (CCM) en diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2 y 3 horas) y temperaturas de incubación (20°C y 37°C). Cada muestra espermática fue evaluada en las diferentes condiciones de tiempo y temperatura de incubación en su motilidad progresiva y procesada para inmunofluorescencia indirecta, utilizando el anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10 y, luego, un anticuerpo secundario antiratón fluorescente, mediante un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot 2). La presencia de acrosina se determinó en base a la marca fluorescente a nivel acrosomal, clasificándose en dos patrones de inmunomarcaje: **a.** sin marca fluorescente o nulos y **b.** con marca fluorescente o marcados, indicativo de la liberación de acrosina o la permanencia de ésta dentro del acrosoma, respectivamente.

Los patrones de inmunomarcaje fueron analizados mediante regresión logística y la motilidad progresiva a través de análisis de varianza, en ambos casos, diferencias de $p \leq 0,05$ se consideraron significativas.

El porcentaje de espermatozoides sin marca fluorescente o nulos fue aumentando ($p < 0,0001$) a través del tiempo de incubación desde 13,9 % a la hora 0, a 35,7 % y 32,1 % a las 3 horas de incubación, a 20°C y 37°C, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas de incubación ($p > 0,05$).

La MP, evaluada subjetivamente mediante microscopía de contraste de fases, indicativa de la viabilidad espermática, fue disminuyendo ($p \leq 0,05$) a medida que transcurrió el tiempo de incubación, desde un 81% en la hora 0, a un 50% a 20°C y a un 53% a 37°C, a las hora 3 de incubación, sin existir diferencias significativas entre ambas temperaturas de incubación.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la liberación de acrosina en los espermatozoides caninos eyaculados sometidos a capacitación *in vitro* es afectada por el tiempo de incubación e independiente de la temperatura de capacitación. Del mismo modo, la motilidad espermática se vio influenciada sólo por el tiempo de capacitación, sin mostrar efecto significativo la temperatura de incubación.

Por primera vez, fue posible determinar el curso del tiempo de capacitación en el espermatozoide fresco de perro, mediante la inmunolocalización de la acrosina, pudiendo ser los cambios en los patrones de inmunomarcaje el reflejo de cambios en la reacción acrosomal de los espermatozoides.

ABSTRACT

There is scarce information on factors that influence dog spermatozoa capacitation and acrosome reaction (AR), which are essential processes influencing a successful fertilization. The knowledge of these sperm processes is important in order to develop reproductive biotechnologies. The aim of this study was to immunolocalize the enzyme acrosin in canine spermatozoa capacitated *in vitro*, in order to determine the effect of time and of temperature incubation on the release of this enzyme during the acrosome reaction.

Sperm-rich fraction from five ejaculates of 3 dogs were collected by digital manipulation. The sperm concentration and progressive motility (PM) were assessed in each sample. The ejaculated spermatozoa were incubated in canine capacitation medium (CCM) using different culture times: 0, 1, 2 and 3 hours, and different incubation culture temperature: 20°C and 37°C. After each time in both temperatures, the samples were processed for indirect immunofluorescence using human antiacrosin monoclonal antibody C5F10 and antimouse fluorescent as a second antibody. The samples were evaluated with epifluorescence microscopy (Nikon Optihot 2), looking for the presence of acrosin determined by means of the fluorescent stain on acrosomal region. Two patterns of immunolabel were classified: **a.** without fluorescent immunolabel or unlabeled and **b.** with fluorescent immunolabel or labeled, indicative of the release or presence of acrosin from the acrosome, respectively.

Immunolabel patterns were analyzed by means of logistic regression and PM through analysis of variance; in both cases, differences of $p \leq 0.05$ were considered significant.

As the incubation time increased, the percentage of unlabeled spermatozoa also increased ($p < 0.0001$) from 13.9 % on time 0, to 35.7 % and 32.1 % at the third

hour of incubation, at 20°C y 37°C, respectively. There was no significant difference between the incubation temperatures ($p>0.05$).

The progressive motility was evaluated subjectively by phase contrast microscopy in order to determine sperm viability. The PM decreased ($p\leq 0.05$) from 81 % at the beginning of culture (time 0) to 50 % at 20°C and 53 % at 37°C at the third hour of incubation. There was no significant difference between the incubation temperature ($p>0.05$).

Based on the results obtained, it can be concluded that the release of acrosin on *in vitro* capacitated ejaculated canine spermatozoa is affected by the time culture but it is not affected by incubation temperature. In the same way, the sperm motility was influenced by time of incubation, but not by culture temperature.

For the first time, was possible to determine the time course of capacitation in fresh dog spermatozoa, through acrosin immunolocalization, it is possible that the changes in the immunolabel patterns reflect of changes in acrosome reaction of spermatozoa.

INTRODUCCIÓN

Para que ocurra la fecundación del ovocito, los espermatozoides deben atravesar las células del cúmulo, penetrar a través de la zona pelúcida (ZP) y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito, provocándole cambios a nivel nuclear y citoplasmático, para posteriormente dar inicio al desarrollo del cigoto (Barros *et al.*, 1996). Dos procesos espermáticos serían esenciales para la fecundación: la hiperactivación y la RA, las cuales se enmarcan en el proceso de "capacitación espermática" (Austin, 1951; Barros y Austin, 1967; Yanagimachi, 1994).

La hiperactivación o motilidad hiperactivada sería necesaria primariamente para que los espermatozoides puedan liberarse de las células oviductales y, además, los ayudaría a abrirse camino entre las células del cúmulo (Flemming y Yanagimachi, 1982; Tesarik *et al.*, 1990; Yanagimachi, 1994). La RA involucra un evento de exocitosis donde hay fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide, activándose y liberándose una de las proteasas más abundantes en el acrosoma: la acrosina (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes, 2000; Moreno *et al.*, 2002). Esta enzima ha sido involucrada en la unión a la ZP (Yanagimachi, 1994; Moreno y Barros, 2000) y en la degradación de los componentes de esta matriz acelular, permitiendo así su penetración (Moreno y Barros, 2000).

La acrosina es sintetizada y transportada dentro del acrosoma de los espermatozoides mamíferos como proacrosina (preproteína), una forma enzimáticamente inactiva (Polakoski *et al.*, 1973; Baba *et al.*, 1989; Barros *et al.*, 1996). La acrosina ha sido inmunolocalizada en espermatozoides de especies como cobayo, humano, hámster (Barros *et al.*, 1992), conejo (Valdivia *et al.*, 1994) y bovino (De los Reyes y Barros, 2000). Recientemente, se ha podido detectar en espermatozoides de perro, previamente permeabilizados, a través del uso de un anticuerpo monoclonal antiacrosina humana que tiene reacción cruzada con la acrosina canina (Cortés *et al.*, 2006). La presencia de esta enzima durante el

proceso de capacitación no ha sido descrita aún en perros.

En esta memoria, se evaluó la presencia de esta enzima en espermatozoides eyaculados de perro durante la capacitación *in vitro*, a través del uso de anticuerpos monoclonales, con el fin de aportar al conocimiento de aspectos claves en la reproducción en los caninos, tendientes a llevar a cabo la fecundación *in vitro* en esta especie.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En los últimos años, la investigación en el área de reproducción canina ha experimentado un enorme crecimiento, debido fundamentalmente al gran interés que se ha desarrollado por esta especie como animal de compañía (De los Reyes, 2004). No obstante, el desarrollo de biotecnologías reproductivas ha sido menor en esta especie si se lo compara con el avance alcanzado en otros animales domésticos (Farstad, 2000), siendo las principales causas de esto, el bajo interés comercial de esta especie y los bajos niveles de fertilidad obtenidos, derivados de la particular fisiología del gameto de la hembra canina (Farstad, 2000; De los Reyes, 2004; Gobello y Corrada, 2004). Estas biotecnologías reproductivas incluyen un conjunto muy diverso de técnicas, entre las que se encuentran: la inseminación artificial (IA) y la criopreservación de semen, siendo las mayoritariamente utilizadas; fecundación *in vitro* (FIV), producción *in vitro* de embriones (PIV), maduración de ovocitos *in vitro* (MIV), transferencia de embriones (TE), citometría de flujo para el sexaje de espermatozoides, transferencia nuclear y microinyección de construcciones de ADN; son técnicas que se encuentran sólo en el área de la investigación (Farstad, 2000; De los Reyes, 2004; Gobello y Corrada, 2004).

La relevancia de profundizar y aumentar la investigación reproductiva en esta especie doméstica es primordial, ya que pueden ser adecuados modelos en la investigación de la reproducción de cánidos silvestres en peligro de extinción, permitiendo obtener conocimientos aplicables en estas especies. Además pueden repercutir en el desarrollo de innovadoras vías de investigación aplicables en el campo de la medicina humana (England, 1993; Farstad, 2000).

1. Capacitación Espermática

El descubrimiento de la capacitación fue realizado por Austin (1951) y Chang (1951) quienes trabajando independientemente en la rata y el conejo, respectivamente, fueron los primeros en documentar evidencias experimentales de la capacitación espermática. Ambos autores postularon que los espermatozoides de algunas especies mamíferas necesitaban permanecer por algún tiempo dentro del tracto reproductivo femenino antes de adquirir la capacidad para penetrar y fecundar el ovocito. Por tanto, el término "capacitación" ha sido empleado para referirse a los procesos que los espermatozoides experimentan durante este tiempo (Barros y Austin, 1967; Kawakami *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Brewis *et al.*, 2001; Petrunkina *et al.*, 2004).

Los cambios que experimentan los espermatozoides durante su tránsito por el tracto reproductivo femenino son múltiples, siendo los más relevantes los que involucran alteraciones a nivel estructural y funcional de la membrana plasmática (Harrison *et al.*, 1996; Brewis *et al.*, 2001; Petrunkina *et al.*, 2004). Dentro de estos cambios están: disminución en la rigidez de la membrana plasmática asociada a un flujo de colesterol, redistribución de los fosfolípidos en la membrana, hiperpolarización de la membrana plasmática, reordenamiento y modificación de los antígenos de membrana y cambios en los iones y metabolitos intracelulares, entre otros (Yanagimachi, 1994; Patrat, 2002; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001). Sin embargo, las bases moleculares de estos cambios aún no están totalmente aclaradas (Yanagimachi, 1994; Harrison, 1996).

Los cambios en las características de la membrana plasmática, actividad enzimática y motilidad de los espermatozoides, permiten a estas células responder a los estímulos que inducen la RA, los cuales son prioritarios para la fecundación. Además, la capacitación es necesaria para que los espermatozoides sean

receptivos a las cubiertas ovocitarias, se unan a la ZP y experimenten la RA (Yanagimachi, 1994; Moreno y Barros, 2000).

El principal sitio de capacitación espermática *in vivo* es el oviducto. Se ha observado que la región caudal del istmo es particularmente importante en el inicio y posterior modulación de la capacitación (Yanagimachi, 1994). Sin embargo, los cambios a nivel molecular inducidos por el oviducto son poco conocidos (Hunter *et al.*, 1998).

La capacitación *in vitro* puede realizarse a través del uso de medios de capacitación químicos especialmente formulados, los cuales deben recrear las condiciones fisiológicas del ambiente del tracto reproductivo femenino (Yanagimachi, 1994).

Los métodos utilizados para medir y estudiar la capacitación *in vitro* han sido variados: la capacidad de los espermatozoides para penetrar la ZP y fecundar a los ovocitos es un método inequívoco de que la capacitación ha ocurrido (Mahi y Yanagimachi, 1978; Kawakami *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1999; De los Reyes y Barros, 2000); la ocurrencia de la RA ha sido utilizada como un indicador de la culminación del proceso de capacitación (Barros y Garavagno, 1970; Yanagimachi, 1994). Sin embargo, bajo condiciones inusuales o agentes especiales se puede inducir la RA sin que los espermatozoides hayan experimentado todos los procesos involucrados en la capacitación. El movimiento de hiperactividad también ha sido usado para determinar el estado de capacitación inicial en los espermatozoides (Shimazu *et al.*, 1992; De los Reyes y Barros, 2000).

La capacitación es un fenómeno dependiente del tiempo, y estos tiempos en estudios *in vitro* varían entre especies, individuos e incluso entre subpoblaciones de espermatozoides dentro de un eyaculado (Harrison, 1996). También, entre espermatozoides epididímales y eyaculados. Además, depende de la composición

del medio de capacitación utilizado (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994; Guérin *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999).

Capacitación Espermática *in vitro* en Perros

El proceso de capacitación de espermatozoides caninos *in vitro* está menos estudiado en comparación a otras especies. El primer reporte fue hecho por Mahi y Yanagimachi (1976), quienes evidenciaron que los espermatozoides de perro podían ser capacitados *in vitro* y posteriormente fecundar ovocitos de perra. Estos mismos autores, en un estudio posterior, desarrollaron un medio de capacitación (CCM), el cual permitía la capacitación y la RA en espermatozoides de perro sin la presencia de ovocitos ni de células de la cubierta ovocitaria (Mahi y Yanagimachi, 1978). El CCM o medio de capacitación canino es el medio más utilizado en los estudios *in vitro*, obteniéndose altos porcentajes de motilidad hiperactivada y RA (Mahi y Yanagimachi, 1978; Kawakami *et al.*, 1999; Brewis *et al.*, 2001), sin embargo, la capacitación puede ser efectuada también en otros medios, tales como el medio de capacitación mínimo (MCM) (Mahi y Yanagimachi, 1978), el BWW (Mahi y Yanagimachi, 1978), el modificado (mCCM) (Guérin *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000). A pesar de existir algunas diferencias en los constituyentes de estos medios de capacitación, todos ellos deben poseer algunos compuestos que son fundamentales para que el espermatozoide de perro experimente la capacitación, como la albúmina, el bicarbonato, el calcio y la glucosa (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994; Harrison *et al.*, 1996; Bavister, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003).

La albúmina es necesaria para que los espermatozoides caninos experimenten la capacitación y la RA. Esta proteína actuaría a través de la remoción de colesterol desde la membrana plasmática del espermatozoide, generando una mayor inestabilidad y posterior fusión de membranas (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994; Rota *et al.*, 1999; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Bavister,

2002). Adicionalmente, se ha observado que la albúmina removería al Zinc desde la membrana plasmática por quelación; este ión ayuda a mantener la estabilidad de las membranas, por ende, su disminución favorecería la fusión de las membranas espermáticas (Bavister, 2002). La ausencia de albúmina, además, provocaría una menor sobrevivencia de los espermatozoides, un efecto negativo sobre la motilidad espermática y una mayor adhesión de los espermatozoides a las superficies de los recipientes, dificultando su manejo *in vitro* (Mahi y Yanagimachi, 1978; Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

El bicarbonato participa en el proceso de capacitación a través de la estimulación de la motilidad y por desestabilización de las membranas plasmáticas que conducirá a la RA (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994; Harrison *et al.*, 1996; Petrunkina *et al.*, 2003). Su mecanismo de acción sería mediante la estimulación de la adenilato ciclasa, la cual provoca un aumento en los niveles de AMPc, traducándose en una alteración en la estructura lipídica de la membrana plasmática (Harrison *et al.*, 1996; Hewitt y England, 1998; Petrunkina *et al.*, 2003) y, además, estimularía el inicio de la motilidad hiperactivada (Yanagimachi, 1994; Petrunkina *et al.*, 2003). También mantendría un pH intracelular adecuado, siendo éste necesario para un óptimo metabolismo energético celular (Harrison *et al.*, 1996).

El calcio juega un rol clave en la función de la membrana espermática durante la capacitación (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). Participa en la activación de sistemas enzimáticos que estimulan la vía de transducción de señales transmembrana (Barros *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000), tendientes a generar factores fusogénicos, facilitando la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa (Yanagimachi, 1994). Otra función de este ión es el iniciar y mantener la motilidad hiperactivada mediante la estimulación de la adenilato ciclasa (Yanagimachi, 1994). En consecuencia, la ausencia de calcio en el medio de capacitación impide que los espermatozoides experimenten la RA, la hiperactivación y, además, disminuiría la sobrevivencia de

éstos (Mahi y Yanagimachi, 1978).

La importancia de la glucosa en el medio de capacitación estaría dada por ser una fuente de reserva energética intracelular, siendo fundamental para que los espermatozoides sean motiles (De los Reyes *et al.*, 2006). Así mismo, se describe que la glucosa favorece la RA en el espermatozoide canino (Mahi y Yanagimachi, 1978; Sirivaidyapong *et al.*, 2000), demostrándose que la fosforilación de tirosina es dependiente de la glucosa, la cual induce un incremento rápido e intenso de todas las fosforilaciones de este aminoácido presente en las proteínas de membrana del espermatozoide (Petrunkina *et al.*, 2003).

Los tiempos de capacitación en espermatozoides de perro parecen ser similares a los observados en otras especies mamíferas (Guérin *et al.*, 1999). Los primeros reportes daban cuenta de períodos de 7 horas de incubación para que los espermatozoides caninos se capacitaran (Mahi y Yanagimachi, 1978). Estudios posteriores han determinado menores tiempos de capacitación para el semen fresco de esta especie, fluctuando entre las 2 y 3 horas (Kawakami *et al.*, 1993; Guérin *et al.*, 1999; Brewis *et al.*, 2001; Petrunkina *et al.*, 2004).

Se han desarrollado diversos métodos para investigar la capacitación y RA en los espermatozoides de perro. Aparte de la hiperactivación y penetración de la ZP, se ha utilizado la microscopía de contraste de fases, la cual permitió visualizar la RA en espermatozoides motiles (Mahi y Yanagimachi, 1976, 1978). La microscopía de transmisión electrónica, a pesar de ser laboriosa y demandante de tiempo, es la única técnica que permite examinar en detalle el estado acrosomal incluyendo la RA (Yanagimachi, 1994; Guérin *et al.*, 1999). Otras técnicas incluyen el uso de marcadores fluorescentes, tales como el antibiótico fluorescente clortetraciclina (CTC), demostrando ser una herramienta útil en la medición del progreso de la capacitación espermática en perros (Guérin *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999); se cree que este antibiótico se une al calcio iónico intracelular formando un complejo CTC-Ca, el que resulta en diferentes patrones de fluorescencia dependiendo del estado

de capacitación y de la RA (Yanagimachi, 1994; Guérin *et al.*, 1999; Peña, 2004). La clortetraciclina ha sido utilizada en conjunto con el Hoechst 33258 (Hewitt y England, 1998), el cual permite evaluar la viabilidad celular. Otros métodos de marcaje incluyen el uso de lectinas fluorescentes (Kawakami *et al.*, 1993), sondas fluorescentes (De los Reyes *et al.*, 2003) e inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos contra contenidos acrosomales o contra la membrana acrosomal (Brewis *et al.*, 2001). Otras formas de estudiar los procesos de capacitación y exocitosis acrosomal es a través de la medición de las enzimas, y preferentemente su actividad, presentes en el acrosoma del espermatozoide canino (Froman *et al.*, 1984; Kawakami *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2006) y mediante el estudio de los cambios en la fosforilación de tirosina presente en las proteínas de membrana del espermatozoide durante la capacitación (Petrunkina *et al.*, 2003).

2. Hiperactivación

Una vez completada la capacitación, los espermatozoides cambian su patrón de motilidad, desde un movimiento lineal y progresivo a uno vigoroso, con un enérgico batir flagelar, y, a menudo, con la cabeza espermática trazando una figura en forma de ocho (Tesarik *et al.*, 1990; Yanagimachi, 1994; Harrison, 1996). El término “hiperactivación” ha sido utilizado para describir este tipo de motilidad (Suarez *et al.*, 1991; Yanagimachi, 1994; Rota *et al.*, 1999).

Aunque no se ha determinado si es un fenómeno común en todos los mamíferos, el número de especies en las cuales ha sido reconocida la hiperactivación se ha incrementado (Yanagimachi, 1988). Estas incluyen a hámsters, ratones, cobayos, conejos, perros, cerdos, bovinos y humanos, entre otros (Yanagimachi, 1994, Guérin *et al.*, 1999).

Las funciones atribuidas a este tipo de motilidad son ayudar a los espermatozoides a separarse del epitelio de los pliegues interiores y de las criptas oviductales, donde éstos suelen adherirse durante la capacitación *in vivo* (Demott y Suarez, 1992) y facilitar al espermatozoide desplazarse a través del viscoso fluido oviductal (Demott y Suarez, 1992) y de las cubiertas ovocitarias, particularmente la ZP (Kawakami *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994; De los Reyes y Barros, 2000). Debido a esto, se ha concluido que existe una estrecha correlación entre la habilidad de los espermatozoides para experimentar la motilidad hiperactivada y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Flemming y Yanagimachi, 1982; Shimazu *et al.*, 1992; Rota *et al.*, 1999; Petrunkina *et al.*, 2003).

3. Reacción del Acrosoma

La RA es un evento clave durante la fecundación de los mamíferos. Este fenómeno ha demostrado ser un prerrequisito para la penetración de la ZP y para la fusión de los espermatozoides con la membrana plasmática del ovocito (Barros y Austin, 1967; Yanagimachi, 1994). La RA involucra la fusión y posterior fenestración de la membrana acrosomal externa y la membrana citoplasmática del espermatozoide, lo cual ocurre en la cercanía o en contacto con las cubiertas ovocitarias (Mahi y Yanagimachi, 1978; Barros *et al.*, 1996; Sillerico *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

La importancia de la RA estaría dada principalmente por permitir la unión fuerte o secundaria del espermatozoide a la ZP, posibilitando la penetración espermática a través de la liberación de enzimas proteolíticas que degradan la ZP, logrando así que el espermatozoide llegue al espacio perivitelino y se fusione con la membrana plasmática del ovocito para una exitosa fecundación, debido a la remodelación de la superficie espermática (Yanagimachi, 1994; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003).

En el ratón, se ha establecido que la ZP, específicamente la glicoproteína ZP3, puede unirse a la superficie del espermatozoide y ser capaz de inducir la RA (Florman y Wassarman, 1985 citado por Wassarman, 1999). Esta propiedad de la ZP de inducir la RA ha sido confirmada en diversas especies mamíferas (Yanagimachi, 1994), incluidos los caninos (Kawakami *et al.*, 1993; Brewis *et al.*, 2001).

El inicio de la RA es usualmente desencadenado por la unión de un ligando específico en la ZP a un receptor de transmembrana específico en la superficie del espermatozoide; esto provoca una señal de transducción a través de la membrana del espermatozoide produciéndose segundos mensajeros intracelulares y cambios iónicos, los cuales provocan un aumento del pH intracelular. Esta alcalinización

intracitoplasmática provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} y la consiguiente entrada masiva de este catión (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000), lo cual será crucial para que ocurra la RA. Barros *et al.* (1996) han propuesto el siguiente mecanismo para la RA: (a) unión del receptor espermático a la ZP; (b) inducción de la actividad de la tirosina kinasa; (c) activación de la proteína G; (d) aumento en los niveles intracelulares de diacilglicerol (DAG); (e) activación de la proteína kinasa C; (f) incremento en los niveles de calcio ; y (g) fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática. Sin embargo, el mecanismo específico por el cual la ZP y otros compuestos inducen la RA aún se encuentra bajo debate.

Diversos productos biológicos y farmacológicos han logrado inducir la RA (Yanagimachi, 1994). A pesar de ésto, sólo la ZP (ZP3) y la progesterona han recibido mayor atención debido a su relevancia fisiológica (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Wassarman, 1999). En este sentido, existen varios estudios enfocados a inducir la RA *in vitro* en espermatozoides caninos a través del uso de diferentes componentes o elementos "inductores". Estos incluyen la ZP canina o sus componentes (proteínas de ZP solubilizadas) (Kawakami *et al.*, 1993; Brewis *et al.*, 2001) y la progesterona (Brewis *et al.*, 2001), encontrándose en ambos casos que un mayor tiempo de capacitación puede verse reflejado en un mayor número de espermatozoides con el acrosoma reaccionado. El ionóforo A23187 ha sido utilizado y ha demostrado ser un promotor de la capacitación espermática *in vitro* (Hewitt y England, 1998).

4. Acrosina

El acrosoma es una vesícula que contiene enzimas hidrolíticas y proteolíticas, las cuales se liberan durante el proceso de exocitosis acrosomal o RA (Fléchon *et al.*, 1977; Barros *et al.*, 1992; Yanagimachi, 1994; Tulsiani *et al.*, 1998; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Estas enzimas están involucradas en el avance del espermatozoide a través de la ZP, siendo una de las más abundantes la acrosina (Urch, 1986; Moreno *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2006).

La acrosina es una glicoproteína básica, hidrosoluble, con propiedades serino-proteinasas que se encuentra como un zimógeno inactivo (proacrosina) en el acrosoma de los espermatozoides mamíferos, en el cual por auto activación, se transforma en la forma proteolíticamente activa durante la RA (Baba *et al.*, 1989; Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002).

Se ha demostrado la presencia de acrosina mediante el uso de técnicas de inmunocitoquímica, en el acrosoma intacto de varias especies mamíferas, tales como: cobayo, hámster, humano (Barros *et al.*, 1992), bovino (De los Reyes y Barros, 2000), conejo (Valdivia *et al.*, 1994), porcino y ovino (Fléchon *et al.*, 1977).

La relevancia fisiológica de la acrosina durante el proceso de fecundación en los mamíferos ha sido inferida a partir de estudios que han mostrado que los inhibidores de esta enzima impiden la fecundación *in vitro* (De Ioannes *et al.*, 1990) e *in vivo* (Dudkiewicz, 1983). En base a éstos y a muchos otros estudios, se han sugerido las principales funciones para la acrosina durante la fecundación en mamíferos: servir como una proteína de unión espermática secundaria a la ZP y ayudar en la penetración del espermatozoide a través de la ZP (De los Reyes y Barros, 2000; Moreno y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002).

Una vez ocurrida la RA, los espermatozoides mamíferos permanecen unidos,

preferentemente por la membrana acrosomal interna, a la ZP del ovocito a través de un sistema de unión secundario (Barros *et al.*, 1992; Barros *et al.*, 1996). Estudios en el ratón, han determinado que la estructura del ovocito participante en esta “unión secundaria” es una glicoproteína de la ZP, más específicamente, la ZP2 (Wassarman, 1992; Wassarman, 1999). En el espermatozoide, el ligando espermático involucrado en esta “unión” es el sistema proacrosina/acrosina (Jones *et al.*, 1988; De Ioannes *et al.*, 1990). Se ha propuesto, a través del bloqueo de esta “unión” con ciertos tipos de polisacáridos sulfatados, que este proceso es esencialmente una interacción entre una proteína (proacrosina) y un carbohidrato (ZP2) (Jones *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1999). Esta “unión” no sólo permitiría al espermatozoide mantenerse fuertemente unido a la ZP del ovocito, sino que además estaría involucrada en los primeros pasos de la conversión de la proacrosina en acrosina (Barros *et al.*, 1996).

La participación de la acrosina en la penetración del espermatozoide a través de la ZP ha sido evidenciada experimentalmente, demostrándose así, que la ZP del ovocito es el sustrato natural para esta enzima (Urch, 1986; Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000). Es así como al acrosina digiere la ZP, permitiendo que los espermatozoides, que han sufrido la RA, penetren a la ZP (Urch *et al.*, 1985). Además, mediante la microscopía electrónica de barrido se ha evidenciado que la erosión de la superficie de la ZP, en la cual se forma un agujero o surco, se restringe alrededor de la cabeza del espermatozoide (Jedlicki y Barros, 1985; Wassarman, 1999; De los Reyes y Barros, 2000).

Los estudios referentes a la acrosina realizados en animales de laboratorio, principalmente, y en algunos animales con fines productivos, ya sea en su determinación, caracterización, medición de actividad y/o localización son abundantes (Fléchon *et al.*, 1977; Barros *et al.*, 1992; Valdivia *et al.*, 1994; De los Reyes y Barros, 2000). Sin embargo, en la literatura revisada se encontraron tan sólo tres estudios con relación a la acrosina del espermatozoide del perro (Froman *et al.*, 1984; Kawakami *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2006).

El primer estudio referente a la acrosina canina da cuenta de la medición de la actividad de esta enzima como indicador de daño celular, determinándose que los espermatozoides congelados/descongelados experimentarían una disminución en la actividad de la acrosina en comparación a los espermatozoides frescos eyaculados (Froman *et al.*, 1984).

Se ha descrito que en caninos la actividad enzimática de la acrosina y de otras enzimas acrosomales (hialuronidasa y N- acetilhexosaminidasa), aumentaría en relación al tiempo de incubación de los espermatozoides, el cual estaría relacionado directamente con la capacitación espermática (Kawakami *et al.*, 1999).

Recientemente se ha podido determinar, mediante el uso del anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10, la presencia de acrosina en espermatozoides frescos y congelados de perro, no sometidos a capacitación (Cortés *et al.*, 2006). Este anticuerpo reconocería la acrosina canina (sistema proacrosina-acrosina), dada las marcas fluorescentes encontradas en la región acrosomal de ambas poblaciones espermáticas (De los Reyes *et al.*, 2006).

Debido a que esta enzima está fuertemente relacionada al proceso de fecundación, su localización mediante el uso de anticuerpos, durante el tiempo de capacitación de los espermatozoides, sería importante en la evaluación de la RA en esta especie, evento clave en la capacidad fecundante.

HIPÓTESIS

El proceso de capacitación de los espermatozoides de perro lleva a la reacción del acrosoma con la consiguiente liberación de acrosina. La presencia de esta enzima en la superficie acrosomal se verá modificada de acuerdo a las diferentes condiciones de inducción de la capacitación *in vitro* a que sean sometidos los espermatozoides.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la presencia de acrosina en el espermatozoide eyaculado de perro sometido a capacitación *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Evaluar el efecto del tiempo de capacitación en la liberación de acrosina en espermatozoides eyaculados caninos.
- 2 Comparar la influencia de dos temperaturas de incubación durante la capacitación espermática *in vitro*, en la liberación de acrosina en espermatozoides eyaculados de perro.
- 3 Relacionar la presencia de acrosina en las diferentes condiciones de cultivo, con la viabilidad espermática, a través de la motilidad espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y en el Laboratorio de Embriología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

1. Obtención de Espermatozoides

El semen se obtuvo a través de estimulación manual a partir de 3 perros adultos fértiles, de diferentes razas, sanos y pertenecientes a privados. Se utilizó la segunda fracción del eyaculado correspondiente a la fracción espermática, la cual fue recolectada en copas graduadas previamente entibiadas.

Se evaluó en cada eyaculado la motilidad progresiva (MP) en forma subjetiva mediante microscopía de contraste de fases, utilizándose aquellas muestras seminales con un 70% o más de MP. También se determinó la concentración espermática a través del recuento espermático en la cámara de Neubauer, utilizando una dilución previa de 1:100 de acuerdo a las técnicas implementadas en el laboratorio (De los Reyes, 2000). Posteriormente las muestras fueron diluidas en buffer TRIS (Trishidroxiaminometano; pH 7.2; Merck) en una relación de 1:2 (semen: TRIS) (Rota *et al.*, 1999), para ser centrifugadas durante 5 minutos a 700 G con el fin de extraer el sobrenadante (plasma seminal). El "pellet" final de espermatozoides obtenido fue resuspendido en CCM, medio de capacitación canino (Mahi y Yanagimachi, 1978), lográndose una concentración final de 50 millones de esp/mL. El pellet resuspendido en CCM fue alicuotado en 7 partes iguales, siendo evaluadas a tiempos de 1, 2 y 3 horas a temperatura ambiente (20° C) y de 1, 2 y 3 horas a temperatura de incubación (37° C) y a la hora 0 (control). En cada una de estas muestras se evaluó la MP mediante el microscopio de contraste de fases y a continuación fueron procesadas para la técnica de inmunofluorescencia.

2. Inmunofluorescencia Indirecta Para Determinar Acrosina

La presencia de acrosina fue determinada a través del uso del anticuerpo monoclonal antiacrosina C5F10 (Cortés *et al.*, 2006).

Una vez evaluada la MP, los espermatozoides alicuotados fueron colocados sobre cubreobjetos impregnados con poli-L-lisina y posteriormente fijados en paraformaldehído al 4% (Merck) por 30 minutos. Luego, las muestras fueron permeabilizadas con Triton X-100 (Sigma) al 1% en PBS (Buffer Fosfato Salino; pH 7,4) durante 1 hora. Los sitios de unión no-específicos fueron bloqueados con PBS-BSA 1% (Buffer Fosfato Salino con Albúmina Sérica Bovina; Sigma)+ Glicina (Sigma) 100 mM por al menos 1 hora.

Posteriormente las muestras se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-acrosina humana C5F10 (Cortés *et al.*, 2006), previamente diluido 1:100 en PBS-BSA 1%, por 2 horas a 37° C o a temperatura ambiente durante toda la noche y bajo humedad controlada. Las muestras fueron lavadas, para descartar el anticuerpo primario, en una solución de PBS-Tween (Sigma) 0.2 % dos veces durante 5 minutos cada una. Después los espermatozoides fueron incubados durante 1 hora (protegidos de la luz) con un segundo anticuerpo, anticuerpo antimouse fluorescente (Pierce Biotechnology), diluido 1:100 en PBS-BSA 1%, luego fueron sometidos a un segundo lavado, para descartar el segundo anticuerpo, en una solución de PBS-Tween 0.2 % dos veces durante 5 minutos cada una. Finalmente las muestras fueron montadas en un portaobjeto utilizando Vectashield (Vector, Burlingame, CA).

Las muestras fueron observadas mediante un microscopio de epifluorescencia (Optiphot 2, Nikon, Japón). Se evaluó la presencia de acrosina en los espermatozoides frescos de perro capacitados *in vitro*, a través de las marcas fluorescentes presentes en la región acrosomal.

3. Análisis Estadístico

Se realizaron cinco réplicas experimentales (repeticiones del experimento), en cada una de las muestras, correspondientes a los diferentes tiempos y temperaturas de incubación, se contabilizaron 200 espermatozoides, siendo evaluados mediante inmunofluorescencia.

Los resultados de marca de acrosina en los espermatozoides procesados para inmunofluorescencia, se clasificaron en: Marcados (marca fluorescente a nivel acrosomal) y Nulos (sin marca fluorescente a nivel acrosomal). Los porcentajes de espermatozoides en cada una de estas categorías y en cada protocolo de capacitación, fueron comparados mediante un modelo de regresión logística, el cual permitió visualizar la existencia de diferencias entre los distintos protocolos de capacitación espermática (Quintero, 2003). Las diferencias de $p \leq 0,05$ se consideraron significativas.

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = \beta_{0i} + \beta_{1i} T_{1j} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Inmunomarcaje de Acrosina (Variable Binomial (1=nulo; 0=marcado)).

β_{0i} = Intercepto.

β_{1i} = Coeficiente de regresión de Y_{ij} sobre el tiempo T_{1j} (para cada tratamiento).

T_{1j} = Tiempo de incubación.

E_{ij} = Error.

Los resultados de MP obtenidos fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANDEVA), con un diseño factorial, el cual incluyó como fuentes de variación el tiempo de capacitación (0, 1, 2 y 3 horas) y la temperatura de incubación (20° C y 37° C). Las variables que mostraron diferencias al ANDEVA ($p \leq 0,05$), fueron analizados por la prueba de Tukey.

Para llevar a cabo el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, Institute, Cary, NC, USA) y previo a realizar los análisis, los porcentajes fueron transformados mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje para lograr homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS

1. Inmunofluorescencia

Sobre la base de cinco réplicas experimentales se evaluó la presencia de acrosina, mediante la observación de inmunomarca fluorescente, a nivel acrosomal en 7000 espermatozoides eyaculados sometidos a diferentes condiciones de capacitación *in vitro*. En la Figura 1.1 se muestra la fotografía control con microscopía de contraste de fases. El inmunomarcaje fue clasificado como **Marcado** cuando el acrosoma espermático emitió fluorescencia verde (Figura 1.2 a) y **Nulo** cuando el acrosoma espermático no emitió fluorescencia (Figura 1.2 b).



Fig. 1.1 Microscopía de contraste de fases (400x) .

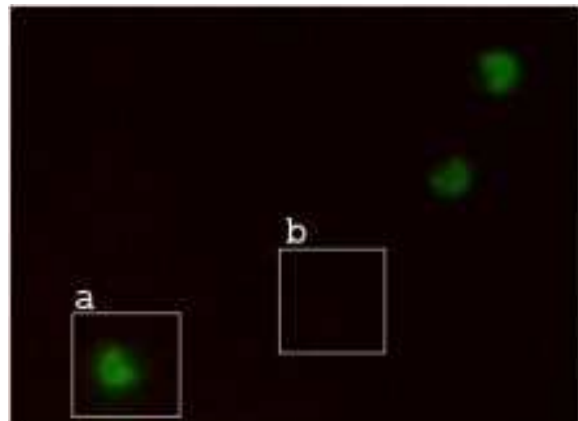
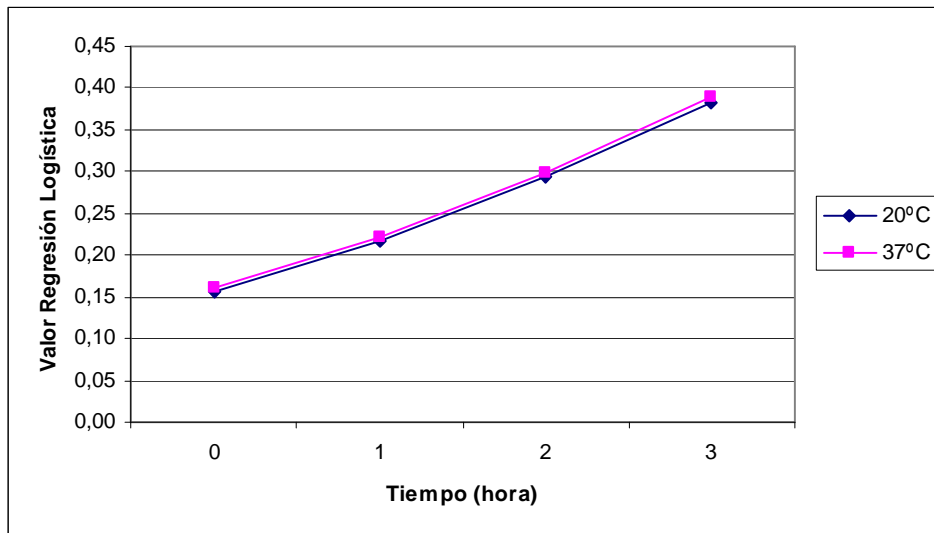


Fig. 1.2 Microscopía de epifluorescencia (400x).

En la figura 2 se observa un incremento en la probabilidad de encontrar espermatozoides sin marca fluorescente (Nulos) a medida que aumenta el tiempo de capacitación, tanto para los espermatozoides capacitados a 20° C como a 37° C ($p < 0,0001$). Además, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre

ambas temperaturas de incubación (20° C VS 37° C) en ninguna de las tres horas de incubación analizadas ($p < 0,05$).

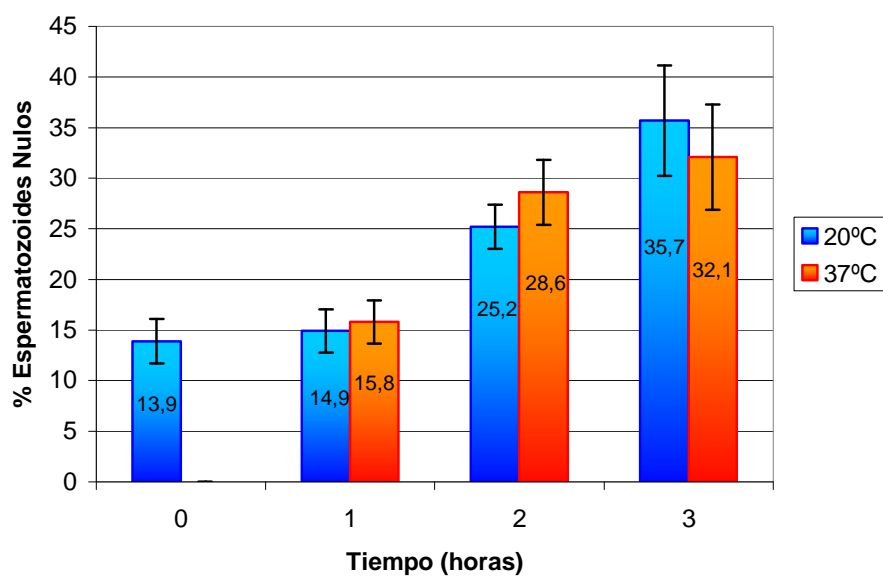
Figura 2. Diagrama de la Regresión Logística que muestra las probabilidades de existencia de espermatozoides SIN MARCA FLUORESCENTE (Nulos) en los diferentes tiempos y temperaturas de capacitación.



El valor en el tiempo cero a los 37°C fue obtenido mediante extrapolación de los datos obtenidos.

Posteriormente se evaluó el efecto de cada temperatura de incubación (20° y 37° C) a través del tiempo de capacitación, obteniéndose que tanto a 20° C como a 37° C existieron variaciones significativas en los porcentajes de espermatozoides categorizados como Nulos en el tiempo ($p < 0,0001$). Estas diferencias significativas se observaron a partir de las 2 horas de incubación (Figura 3).

Figura 3. Valores porcentuales de espermatozoides SIN MARCA FLUORESCENTE (Nulos) en los diferentes tiempos y temperaturas de capacitación (Promedios \pm DS).



2. Motilidad Espermática

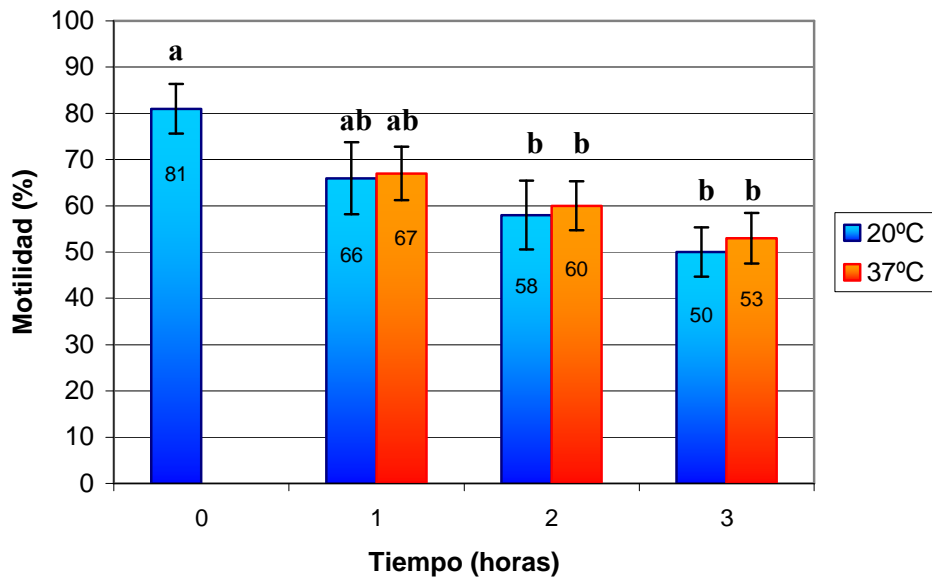
La viabilidad de los espermatozoides frescos caninos sometidos a diferentes condiciones de capacitación *in vitro* fue evaluada a través de la MP, la cual fue determinada por observación subjetiva en el microscopio de contraste de fases.

Como se observa en la Figura 4, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en los porcentajes de MP entre los espermatozoides capacitados a 20° C y a 37° C en cada una de las horas de incubación.

Además, los porcentajes de MP disminuyeron progresivamente en el tiempo de capacitación, traduciéndose en diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Al evaluar entre los distintos tiempos de capacitación para cada temperatura, se observa que tanto los espermatozoides capacitados a 20° C como los capacitados a 37° C, el tiempo ejerció un efecto significativo ($p \leq 0,05$). Estas diferencias se produjeron entre la hora 0 y 2, y entre la hora 0 y 3, disminuyendo entre las horas 0 y 3 un 31 % a los 20° C y un 28 % a 37° C. Junto con esto, no se encontraron diferencias estadísticas entre las horas 1, 2 y 3 ($p > 0,05$)

Figura 4. Porcentajes de MP en las diferentes condiciones de capacitación *in vitro* (Promedios \pm DS).



Letras distintas en barras del mismo color indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

La capacitación espermática es un proceso biológico que permite al espermatozoide mamífero sufrir la RA, un fenómeno clave para la fecundación (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Brewis *et al.*, 2001). Durante este evento se liberan enzimas acrosomales como la acrosina (Froman *et al.*, 1984; Barros *et al.*, 1992; Yanagimachi, 1994; Sillerico *et al.*, 1996; Wassarman, 1999; De los Reyes y Barros, 2000). La localización de esta enzima en espermatozoides de cobayo, hámster, humano (Barros *et al.*, 1992), bovino (De los Reyes y Barros, 2000), conejo (Valdivia *et al.*, 1994; Sillerico *et al.*, 1996), porcino y ovino (Fléchon *et al.*, 1977) ha permitido determinar la cinética de su liberación durante la RA.

En el presente estudio, utilizando el anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10, fue posible inmunolocalizar la proacrosina/acrosina en espermatozoides caninos eyaculados sometidos a diferentes condiciones de capacitación *in vitro*, determinándose la dinámica de liberación de esta enzima durante la RA, a través de inmunofluorescencia indirecta. Se evidenció que los espermatozoides con marca fluorescente a nivel acrosomal fueron disminuyendo durante el tiempo de incubación, en el medio inductor de la capacitación espermática, así como el porcentaje de espermatozoides sin marca fluorescente (Nulos) fue aumentando, siendo esta pérdida de fluorescencia el resultado de un proceso de exocitosis acrosomal. Por tanto, aquellos espermatozoides con marca fluorescente, indicativo de la presencia de acrosina, corresponderían a los espermatozoides que aún no habían experimentado la RA, a diferencia de los espermatozoides sin marca fluorescente o nulos, en los cuales no fue posible observar la presencia de la enzima debido a que probablemente se capacitaron y sufrieron la RA.

Durante la incubación espermática se evidenció un continuo aumento de espermatozoides nulos a mayor tiempo de capacitación. Sin embargo, durante la primera hora de incubación no se observó un cambio estadísticamente significativo en el número de espermatozoides sin marca fluorescente (nulos), a

diferencia de lo que ocurrió a las 2 y 3 horas de incubación, donde el número de espermatozoides nulos mostró un aumento significativo y sostenido. Estos resultados serían concordantes con el aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados hallados por Guérin *et al.* (1999) y Rota *et al.* (1999), en los cuales, mediante la técnica de clortetraciclina (CTC), los espermatozoides eyaculados categorizados como capacitados mostraban un aumento significativo a partir de las 2 horas de incubación. Este comportamiento se debería a una mayor estabilidad de las membranas espermáticas durante la primera hora de incubación, ya que el espermatozoide comienza más tarde a sufrir cambios en su arquitectura lipídica tendientes a facilitar la fusión de membranas y la posterior exocitosis acrosomal, siendo esto coincidente con lo que ocurre durante el tránsito del espermatozoide a través del tracto reproductivo femenino (Yanagimachi, 1994; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Petrunkina *et al.*, 2003).

El mayor porcentaje de espermatozoides sin marca fluorescente o nulos fue encontrado a las 3 horas de incubación. Estos resultados serían concordantes a otros estudios en semen canino. Guérin *et al.*, (1999), mediante el ensayo CTC con CCM modificado como medio inductor, observaron el mayor porcentaje de espermatozoides caninos con el acrosoma reaccionado a las 3 horas de incubación. También coincidiría con lo encontrado por Mayenco-Aguirre y Pérez-Córtez (1998), quienes determinaron que los espermatozoides caninos se capacitaban y reaccionaban siendo capaces de unirse a la ZP del ovocito, después de 2 horas de incubación en el medio de capacitación Ham's F10 modificado; e igualmente con los resultados obtenidos por Shimazu *et al.* (1992), en los cuales el proceso de capacitación espermático fue medido en base al porcentaje de espermatozoides con movimiento hiperactivado, encontrándose los mayores porcentajes de hiperactivación a las 3 horas de incubación (54%).

Estudios en espermatozoides caninos congelados-descongelados (Aretio, 2006) y refrigerados (Becker, 2007), utilizando la misma metodología de inmunofluorescencia con el anticuerpo C5F10 de este estudio, mostraron el mayor

porcentaje de espermatozoides nulos durante la primera hora de incubación, en cambio durante las siguientes horas de incubación, los espermatozoides sin marca fluorescente registraron sólo un leve aumento, indicativo de una pérdida de acrosina menos drástica que en la primera hora de incubación. Estos resultados difieren a los hallados en el presente estudio, probablemente porque los espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación, ya sea por autoactivación de la proacrosina o por una lisis del acrosoma espermático en el proceso de congelamiento (Froman *et al.*, 1984; Cortés *et al.*, 2006), liberarían la acrosina más temprano que los espermatozoides eyaculados caninos capacitados *in vitro*, lo que se reflejaría por tanto, en una disminución más drástica de la inmunomarca fluorescente.

Se ha descrito que la capacitación espermática es un proceso también dependiente de la temperatura (Mahi y Yanagimachi, 1973; Flemming y Kuehl, 1985; Sirivaidyapong *et al.*, 2000), siendo los 37° C y 38° C las temperaturas utilizadas para llevar a cabo la incubación para una capacitación *in vitro* en la mayoría de los mamíferos, ya que al ser cercanas a la temperatura corporal otorgarían un ambiente similar al fisiológico favoreciendo la capacitación espermática (Yanagimachi, 1994; Sirivaidyapong *et al.*, 2000). Se ha determinado que variaciones en la temperatura de incubación durante la capacitación *in vitro* de los espermatozoides provocaría cambios en la estructura lipídica de la membrana plasmática, que influiría en la motilidad espermática y en la velocidad de liberación y actividad de las enzimas acrosomales, generándose cambios relevantes para el proceso de capacitación (Froman *et al.*, 1984; Yanagimachi, 1994; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2006).

La mayoría de los estudios de capacitación espermática en espermatozoides de perro han utilizado temperaturas cercanas a la corporal, fluctuando entre 37° C y 39° C (Mahi y Yanagimachi, 1978; Kawakami *et al.*, 1993; Hewitt y England, 1998; Guérin *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001; Petrunkina *et al.*, 2003). Sirivaidyapong *et al.* (2000), utilizaron dos temperaturas de

capacitación, obteniendo mayores porcentajes de RA en los espermatozoides incubados a 37° C que los incubados a una temperatura de 20° C. Estos resultados son distintos a los encontrados en este estudio, debido a que el porcentaje de espermatozoides eyaculados sin marca fluorescente o reaccionados incubados a 20° C no mostró diferencias significativas con los incubados a 37° C ($p>0,05$). A pesar de no encontrarse diferencias estadísticas entre las temperaturas de incubación utilizadas en este estudio, fue posible observar una tendencia, en que los espermatozoides nulos incubados a 20° C liberaron la acrosina más lentamente que los incubados a 37° C durante los distintos tiempos de capacitación, lo cual podría deberse a diferencias en la fluidez de la membrana plasmática y en la composición lipídica a 20° C y 37° C, pudiendo enlentecer la cinética de capacitación en los espermatozoides incubados a menor temperatura (Sirivaidyapong *et al.*, 2000). Esto concuerda con los trabajos de Aretio (2006) y Becker (2007), en espermatozoides caninos congelados-descongelados y refrigerados respectivamente, donde se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas de incubación, produciéndose un mayor incremento en los espermatozoides sin marca fluorescente a 37° C que a 20° C.

La motilidad espermática es una manifestación de la competencia estructural y funcional de los espermatozoides, por esto, el porcentaje de MP se relaciona positivamente con la viabilidad de los espermatozoides durante la capacitación (Yanagimachi, 1994; Rota *et al.*, 1999; Peña, 2004). El porcentaje de MP en eyaculados de caninos normales fluctúa entre el 70 y 90 % (Iguer-Ouada y Versteegen, 2001).

En este estudio se procedió a medir el porcentaje de MP, como complemento a la evaluación de los patrones de liberación de la acrosina, con el fin de determinar la viabilidad de los espermatozoides sometidos a las diferentes condiciones de incubación. Se observó que la motilidad espermática disminuyó a medida que transcurrió el tiempo de capacitación, como lo señalan otros estudios de capacitación en caninos con espermatozoides eyaculados (Kawakami *et al.*, 1993;

Kawakami *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Petrunkina *et al.*, 2003). Durante el transcurso de la capacitación se observaron diferencias significativas en los porcentajes de MP entre la hora 0 (81 %) y 2 (58 %); y entre las 0 y 3 horas (51 %). Estos valores son coincidentes con el mayor aumento en el número de espermatozoides nulos, lo cual indicaría que luego de sufrir la RA, los espermatozoides experimentarían un detrimento en su motilidad, lo que podría acompañarse además, de muerte celular (Petrunkina *et al.*, 2003). Se ha observado, tanto en espermatozoides eyaculados como en criopreservados, que la disminución en la motilidad espermática se debería a un agotamiento de las reservas energéticas celulares necesarias para desencadenar el movimiento flagelar (Yanagimachi, 1994). Además, se ha descrito que la actividad de la tirosina de la pieza media del espermatozoide, responsable de la hiperactivación, se reduciría luego del movimiento hiperactivado, lo que conllevaría a una disminución de la motilidad (Petrunkina *et al.*, 2003).

A diferencia de espermatozoides caninos criopreservados, donde la disminución de la MP es más pronunciada durante la primera media hora (Aretio, 2006) o a la hora de incubación (Becker, 2007), no registrándose durante las restantes horas de incubación una disminución significativa en los porcentajes de MP, en el presente trabajo no se evidenció un descenso significativo en la motilidad durante la primera hora de capacitación, lo que sí ocurrió, en cambio, durante las siguientes horas de capacitación. Por tanto, esto indicaría que los espermatozoides eyaculados comenzaron a completar el proceso de capacitación espermática, representado por la exocitosis acrosomal, con la consiguiente disminución en la motilidad espermática y posterior muerte celular, después de la primera hora de incubación en el medio de cultivo.

Se observó que la temperatura de incubación no ejerció un efecto significativo sobre la disminución de la MP. Al evaluar entre los distintos tiempos de incubación en medio inductor de la capacitación para cada temperatura, se visualizó que la disminución en la MP tanto a 20°C como a 37°C fue similar. Estos resultados son

coincidentes con los hallados por Becker (2007), en los cuales, la temperatura de incubación no influyó en forma significativa sobre la disminución de la motilidad de los espermatozoides refrigerados sometidos al mismo protocolo de capacitación *in vitro*. Por el contrario, los espermatozoides congelados-descongelados experimentaron una disminución significativa de la motilidad, siendo más pronunciada a 37° C (Aretio, 2006), posiblemente debido a una baja en la termorresistencia exhibida por los espermatozoides posterior a la descongelación (Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

En el presente estudio, se compararon los porcentajes de espermatozoides nulos, indicativo de la pérdida de acrosina y por tanto reaccionados, con los valores de MP observados en cada tiempo y temperatura de incubación, con el objetivo de determinar si los espermatozoides capacitados en CCM sufrieron una reacción del acrosoma fisiológica o “verdadera”, o sólo el producto de la muerte celular, lo que se conoce como “falsa” reacción del acrosoma (Mahi y Yanagimachi, 1976; Yanagimachi, 1994).

De acuerdo a lo observado, los espermatozoides nulos o reaccionados presentaron un bajo porcentaje a la primera hora de incubación (13%), coincidente con un alto porcentaje de motilidad (81%), de lo cual se podría inferir que la mayor parte de los espermatozoides evaluados estaban vivos y pocos habían sufrido la RA. Durante las siguientes horas de incubación, los porcentajes de espermatozoides nulos aumentaron, alcanzando un 35,7 % a las 3 horas de incubación, además se observaron porcentajes de MP por sobre el 50 % durante todo el período de incubación.

Se concluiría que gran parte de los espermatozoides nulos experimentaron una exocitosis acrosomal fisiológica, debido a los altos porcentajes de espermatozoides motiles durante todo el período de capacitación espermática.

CONCLUSIONES

- La utilización del anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10 permitió la localización de la enzima acrosina en la región acrosomal de los espermatozoides eyaculados de perro capacitados *in vitro*.
- El tiempo de incubación influye en la liberación de la enzima acrosina en espermatozoides eyaculados de perro sometidos a capacitación *in vitro*.
- La temperatura de incubación no ejerció un efecto significativo en la capacitación *in vitro* de los espermatozoides eyaculados caninos.
- La motilidad progresiva, como expresión de viabilidad espermática, disminuyó a través del tiempo de incubación.
- El mayor porcentaje de espermatozoides capacitados se obtuvo a las 3 horas de incubación, independiente de la temperatura de incubación.

BIBLIOGRAFÍA

- ARETIO, C.** 2006. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides caninos congelados-descongelados sometidos a diferentes condiciones de capacitación *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 50 pp.
- AUSTIN, C.R.** 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *J Sci Res (B)* 4: 581-596.
- BABA, T.; WATANABE, K.; KASHIWABARA, S.I.; ARAI, Y.** 1989. Primary structure of human proacrosin deduced from its cDNA sequence. *Febs Lett* 244: 296- 300.
- BARROS, C.; AUSTIN, C.R.** 1967. In vitro fertilization and the sperm acrosome reaction in the hamster. *J Exp Zool* 166: 317-384.
- BARROS, C.; GARAVAGNO, A.** 1970. Capacitation of hamster spermatozoa with blood sera. *J Reprod Fertil* 22: 381-384.
- BARROS, C.; CAPOTE, C.; PEREZ, C.; CROSBY, J.A.; BECKER, M.; DE IOANNES, A.** 1992. Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. *Biol Res (Chile)* 25: 31-40.
- BARROS, C.; CROSBY, J.A.; MORENO, R.D.** 1996. Early steps of sperm-egg interaction during mammalian fertilization. *Cell Biol Int* 20: 33-39.
- BAVISTER, B.** 2002. Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction* 124: 181-196.

- BECKER, G.** 2007. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides caninos refrigerados sometidos a diferentes condiciones de capacitación *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 60 pp.
- 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.
- CHANG, M.C.** 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. *Nature (Londres)* 168: 997-998.
- CORTÉS, C.; CODELIA, V.; MANOSALVA, I.; DE LANGE, J.; MORENO, R.D.; DE LOS REYES, M.** 2006. Proacrosin and acrosin quantification as a tool for the evaluation of acrosome integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 93: 165-175.
- DE IOANNES, A.E.; BECKER, M.I.; PEREZ, C.; BARROS, C.** 1990. Role of acrosin and antibodies to acrosin in gamete interactions. **En:** Alexander, N.; Griffin, D.; Spieler, J.; Waites, G. (eds). *Gamete Interactions. Prospects for Immunocontraception*. Nueva York, EE.UU. 185-195.
- DE LOS REYES, M.** 2000. Andrología Canina. **En:** De los Reyes, M. y Sánchez, A. (eds). *Tópicos en Reproducción de Pequeños Animales*. 1ª ed. Ediciones Facultad Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile. Chile. pp. 82-93.
- DE LOS REYES, M.** 2004. Congelación de semen canino. **En:** Gobello C. "Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latinoamericanos". Editorial Gráfica Latina. Buenos Aires, Argentina. 2: 17-26 pp.

- 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.; TELLO, L.; BARRIONUEVO, B.; PALOMINO, J.** 2003. Acrosomal integrity of chilled dog semen. 28th Congress of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). Bangkok, Thailandia.
- 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.
- DEMOTT, R.; SUAREZ, S.** 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 46: 779-785.
- DUDKIEWICZ, A.B.** 1983. Inhibition of fertilization in the rabbit by anti-acrosin antibodies. *Gamete Res* 8: 183-187.
- ENGLAND, G.C.W.** 1993. Criopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fertil (Supplements)*. 47: 243-255.
- FARSTAD, W.** 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*. 53: 175-186.
- FLÉCHON, J.E.; HUNEAU, D.; BROWN, C.R.; HARRISON, R.A.P.** 1977. Immunocytochemical localization of acrosin in the anterior segment of the acrosomes of ram, boar and bull spermatozoa. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 17: 749-758.
- FLEMMING, A.D.; YANAGIMACHI, R.** 1982. Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 220: 109-115.

- FLEMMING, A.D.; KUEHL, T.J.** 1985. Effects of temperature upon capacitation of guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 233: 405-411.
- FLORMAN, H.M.; WASSARMAN, P.M.** 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41: 313-324 (Citado por WASSARMAN, P.M. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96: 175-183).
- FROMAN, D.P.; AMANN, R.P.; RIEK, P.M.; OLAR, T.T.** 1984. Acrosin activity of canine spermatozoa as index of cellular damage. *J Reprod Fertil*. 70: 301-308.
- GOBELLO, C.; CORRADA, Y.** 2004. Actualización en la biotecnología reproductiva canina. En: Gobello C. "Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latinoamericanos". Editorial Gráfica Latina. Buenos Aires, Argentina. 11: 107-116 pp.
- GUÉRIN, P.; FERRER, M.; FONTBONNE, A.; BÉNIGNI, L.; JACQUET, M.; MÉNÉZO, Y.** 1999. In Vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 52: 617-626.
- HARRISON, R.A.P.** 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8: 581-594.
- HARRISON, R.A.P.; ASHWORTH, P.J.C.; MILLER, N.G.A.** 1996. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 45: 378-391.
- HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W.** 1998. An investigation of capacitation and acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim Reprod Sci* 51: 321-332.

- HUNTER, R.H.F.; HUANG, W.T.; HOLTZ, W.** 1998. Regional influences of the fallopian tubes on the rate of boar sperm capacitation in surgically inseminated gilts. *J Reprod Fertil* 114: 17-23.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P.** 2001. Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology* 55: 1143-1158.
- JEDLICKI, A.; BARROS, C.** 1985. Scanning electron microscope study of *in vitro* prepenetration gamete interactions. *Gamete Res* 11: 121-131.
- JONES, R.; BROWN, C.R.; LANCASTER, R.T.** 1988. Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. *Development* 102: 781-792.
- KAWAKAMI, E.; VANDERVOORT, 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.; ARAI, T.; OISHI, I.** 1999. Changes in hyaluronidase, acrosin, N-acetylhexosaminidase of dog sperm after incubation. *J Vet Med Sci* 61: 183-184.
- MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R.** 1973. The effect of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil* 35: 55-66.
- 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.
- MAYENCO-AGUIRRE, A.M.; PÉREZ-CORTÉS, A.B.** 1998. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology* 50: 195-204.
- MORENO, R.D.; HOSHI, M.; BARROS, C.** 1999. Functional interactions between sulphated polysaccharides and proacrosin: implications in sperm binding and digestion of zona pellucida. *Zygote* 7: 105-111.
- MORENO, R.D.; BARROS, C.** 2000. A basic 18 acids domain is involved in the polysulfate binding domain and activation of boar proacrosin/acrosin system. *Biol Reprod* 62: 1536-1542.
- MORENO, R.D.; RAMALHO-SANTOS, J.; CHAN, E.K.L.; WESSEL, G.M.; SCHATTEEN, G.** 2000. The golgi apparatus segregates from the lysosomal/acrosomal vesicle during rhesus spermiogenesis: structural alterations. *Dev Biol* 219: 334-349.
- MORENO, R.D.; BUSTAMANTE, E.; SCHATTEEN, 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.
- MORENO, R.D.; CORTES, C.J.; CODELIA, V.A.; DE LOS REYES, M.** 2006. Cross-reactivity of monoclonal antibodies against human acrosin to dog spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 41: 317-317.

PATRAT, C.; SERRES, C.; JOUANNET, P. 2002. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* 92: 225-266.

PEÑA, A.I. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 82-83: 209-224.

PETRUNKINA, A.M.; SIMON, K.; GUNZEL-APEL, A.R.; TOPFER-PETERSEN, E. 2003. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *Andrology* 24: 3.

PETRUNKINA, A.M.; SIMON, K.; GUNZEL-APEL, A.R.; TOPFER-PETERSEN, E. 2004. Kinetic 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: 1617-1634.

POLAKOSKI, K. L.; MC RORIE, R. A.; WILLIAMS, W. L. 1973. Boar acrosin. Purification and preliminary characterization of a proteinase from boar sperm acrosomes. *J Biol Chem* 248: 8178-8182.

QUINTERO, A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral. Bellaterra, España. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. 156 pp.

RAMALHO-SANTOS, J.; SCHATTEN, G.; MORENO, R. 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 67: 1043-1051.

- 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.
- SHIMAZU, Y.; YAMADA, S.; KAWANO, Y.; KAWAYI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y.** 1992. In vitro capacitation of canine spermatozoa. *J Reprod Dev* 38: 67-71.
- SILLERICO, T.; VALDIVIA, M.; DE IOANNES, A.; BARROS, C.** 1996. Proacrosin and acrosin determination during capacitation and acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Biocell* 20: 133-142.
- SIRIVAIYAPONG, S.; CHENG, F.P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W.F.; BEVERS, M.; COLENBRANDER, B.** 2000. Effects of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology* 53: 789-802.
- SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OWEN, D.H.; ANDREW, J.B.; POWELL, R.L.** 1991. Evidence for the function of hiperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 44: 375-381.
- TESARIK, J.; OLTRAS, C.M.; TESTART, J.** 1990. Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *J Reprod Fertil* 88: 665-675.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; PETRUNKINA, A.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* 60-61: 653-662.
- TULSIANI, D.; ABOU-HAILA, A.; LOESER, C.; PEREIRA, B.** 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 240: 151-164.

URCH, U.A.; WARDRIP, N.J.; HEDRICK, J.L. 1985. Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: the nature of the hidrolisis products. *J Exp Zool* 236: 239-243.

URCH, U.A. 1986. The action of acrosin on the zona pellucida. **En:** Hendrik, J.L. (ed). *The Molecular and Cellular Biology of Fertilization*. Plenum Press. Nueva York, EE.UU.113-132.

VALDIVIA, M.; YUNES, R.; MELÉNDEZ, J.; DE IOANNES, A.; LEYTON, L.; BECKER, M.I.; BARROS, C. 1994. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in rabbit sperm during acrosome reaction and in spermatozoa recovered from the perivitelline space. *Mol Reprod Dev* 37: 216-222.

WASSARMAN, P. 1992. Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* 46: 186-191.

WASSARMAN, P.M. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96: 175-183.

YANAGIMACHI, R. 1988. Mammalian fertilization. **En:** Knobil, E. y Neill, J.D. (eds). *The Physiology of Reproduction*. Vol 1. Editorial Raven Press. Nueva York, EE.UU. pp. 135-185.

YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian fertilization. **En:** Knobil, E. y Neill, J.D. (eds). *The Physiology of Reproduction*. 2^a ed. Editorial Raven Press. Nueva York, EE.UU. pp. 189-317.