



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUACIÓN DE PROACROSINA/ACROSINA MEDIANTE
WESTERN-BLOT EN ESPERMATOZOIDES CONGELADOS
DE PERRO DURANTE LA CAPACITACIÓN *IN VITRO***

GABRIELA MARÍA MEDINA VELOZ

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

PROFESORA GUÍA: MÓNICA DE LOS REYES S.

Financiamiento: Proyectos FONDECYT 1060602 Y 1080618

**SANTIAGO, CHILE
2010**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUACIÓN DE PROACROSINA/ACROSINA MEDIANTE
WESTERN-BLOT EN ESPERMATOZOIDES CONGELADOS
DE PERRO DURANTE LA CAPACITACIÓN *IN VITRO***

GABRIELA MARÍA MEDINA VELOZ

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : MÓNICA DE LOS REYES
PROFESOR CONSEJERO : VÍCTOR MARTINEZ
PROFESOR CONSEJERO : VICTOR PARRAGUEZ

**SANTIAGO, CHILE
2010**

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco muy sinceramente a mi profesora guía Doctora Mónica De Los Reyes por su apoyo, comprensión y gran ayuda para realizar esta Memoria de Título.
- También agradezco enormemente el apoyo incondicional y amistad de Jaime Palominos en este proceso.
- Agradezco a mi compañera de trabajo en laboratorio y amiga María José Parraguez por su compañía en las largas y agotadoras jornadas experimentales.
- Todo este trabajo no podría haber sido realizado sin el cariño, incentivo y apoyo enorme de mis padres Ana María Veloz y Ramón Medina, como también de mi novio David Polanco.

ÍNDICE

Abstract.....	4
Resumen.....	6
Introducción.....	8
Revisión bibliográfica.....	10
1-Congelación de semen.....	10
1.1-Cambios por criopreservación.....	10
1.2-Diluyentes y crioprotectores de congelación.....	11
1.3-Evaluación post descongelación.....	12
2-Capacitación espermática.....	13
3-Acrosina.....	15
Hipotesis y objetivos.....	17
Material y metodos.....	18
1-Obtención y evaluación de semen.....	18
2-Congelación y descongelación de semen.....	18
3-Capacitación espermática.....	19
4-Extracción de proteínas.....	19
5-Medición de concentración de proteínas.....	20
6-Precipitación de proteínas y electroforesis.....	20
7-Western Blot.....	21
-Método de transferencia.....	21
-Bloqueo de la membrana.....	21
-Anticuerpos.....	21
-Método de detección.....	21
8-Analisis estadístico.....	22
Resultados.....	24
Discusión.....	29
Conclusiones.....	33
Referencias bibliográficas.....	34

ABSTRACT

Among reproductive biotechnologies, sperm cryopreservation has great advantages, however, involves changes in the sperm, both structural and functional, which would alter physiological events associated with fertilization, such as capacitation and acrosome reaction. This may mean changes in activation and release proacrosin/acrosin system, involved in early events of sperm-oocyte interaction, thus the aim of this study was to evaluate the proacrosin/acrosin system by Western Blot in frozen dog sperm, compared with those fresh, during different culture times in vitro.

Six ejaculates were collected from three healthy dogs, through digital stimulation. The spermatic fraction of each ejaculate was used for both controls (fresh) and frozen. Samples proceded as fresh were re-suspended after centrifugation in Fert-Talp medium and spermatozoa that were frozen were re-suspended in extender based on fructose, TRIS, 20% egg yolk, citric acid and 5 % glycerol and later were frozen to -196°C in liquid nitrogen. The thawing was during 8 seconds in water at 60°C . The samples were centrifuged and pellet of spermatozoa was diluted in Fert Talp medium leaving in incubation in the same medium for capacitation for 0, 30, 60 and 90 minutes. After, the samples were subjected to sperm protein extraction to be separated by electroforesis and then detected through western blot using the antibody C5F10 (mouse antibody human antiacrosin). Once obtained proacrosin and acrosin bands (α γ β), the optical density of each one was evaluated by PhotoShop 8.0 Program. The results were analyzed with Variance Analysis and Tukey Test.

Results showed the presence of proacrosin and active forms α and β acrosin at different times of capacitation in fresh and frozen sperm. In each capacitation time was found greater optical density of procrosin ($P < 0,05$) in fresh samples, which indicates a greater amount of zymogen. In the active enzyme α -acrosin in frozen samples, there were different ($P < 0,05$), being higher the optical density at 30 minutes of capacitation in comparison with other times of capacitation. We found a

higher reactivity of α -acrosin in frozen samples at 0 and 30 minutes compared with fresh samples. In β -acrosin, in frozen samples were found a greater optical density at 0 minutes and it was decreased after 90 minutes of capacitation. The analysis of β -acrosin in each times of capacitation, between frozen and fresh sperm showed significant differences ($P < 0,05$) at 0, 30, 60 and 90 minutes of capacitation which was higher in frozen samples.

In conclusion, frozen sperm have greater activation of zymogen compared with fresh, which decreases in more longer capacitation time.

RESUMEN

Dentro de las biotecnologías reproductivas, la criopreservación de espermatozoides presenta grandes ventajas, sin embargo, involucra cambios en el espermatozoide, tanto estructurales como funcionales, que alterarían eventos fisiológicos asociados a la fecundación, como la capacitación y reacción acrosómica. Esto puede significar cambios en la activación y liberación del sistema proacrosina/acrosina, involucrada en los primeros eventos de interacción ovocito-espermatozoide, por tanto, el objetivo de este trabajo, fue evaluar el sistema proacrosina/acrosina mediante western blot en espermatozoides congelados de perro, en comparación con aquellos frescos, durante diferentes tiempos de capacitación *in vitro*.

Se recolectaron 6 eyaculados, de tres perros sanos, a través de estimulación digital. Se utilizó la fracción espermática de cada eyaculado tanto para los controles (frescos) y los congelados. Las muestras procesadas como frescas fueron resuspendidas luego de una centrifugación en medio Fert-Talp y los espermatozoides que se sometieron a congelación se resuspendieron en diluyente en base a fructosa, TRIS, 20% de yema de huevo, ácido cítrico y 5% de glicerol y fueron posteriormente congelados a -196°C en nitrógeno líquido. La descongelación se realizó a 60°C durante 8 segundos en agua. Las muestras se centrifugaron y el pellet de espermatozoides se diluyó en medio Fert-Talp dejándose en incubación en el mismo medio para capacitación durante 0, 30, 60 y 90 minutos. Posteriormente las muestras fueron sometidas a extracción de proteínas espermáticas a las cuales se les adicionó buffer de carga 4X para ser separadas mediante electroforesis y luego detectadas a través de western blot utilizando el anticuerpo C5F10 (anticuerpo de ratón antiacrosina humana). Una vez obtenidas las bandas de proacrosina y acrosina (α y β) se evaluó la densidad óptica de cada una de ellas con el programa PhotoShop 8.0. Los resultados obtenidos fueron analizados a través del análisis de varianza y prueba de Tukey.

Los resultados mostraron la presencia del zimógeno proacrosina y las subunidades de la enzima activa (α y β acrosina) en los diferentes tiempos de capacitación en los espermatozoides frescos y congelados. En cada uno de los tiempos de capacitación se encontró mayor densidad óptica de proacrosina ($P < 0,05$) en las muestras frescas lo cual indica una mayor cantidad del zimógeno. En la enzima activa α -acrosina de las muestras congeladas, hubo diferencias ($P < 0,05$), siendo mayor la densidad óptica a los 30 minutos de capacitación en comparación con los otros tiempos de capacitación. Se encontró mayor reactividad de α -acrosina en las muestras congeladas a los 0 y 30 minutos en comparación con las muestras frescas. En β -acrosina se encontró en las muestras congeladas una mayor densidad óptica a los 0 minutos la que disminuyó hasta los 90 minutos de capacitación. Al analizar β -acrosina en cada uno de los tiempos de capacitación entre congelados y frescos se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) a los 0, 30, 60 y 90 minutos de capacitación siendo mayor en las muestras congeladas.

En conclusión los espermatozoides congelados presentan mayor activación del zimógeno al comparar con los frescos, la cual va disminuyendo en la medida que el tiempo de capacitación es mayor.

INTRODUCCIÓN

La congelación de semen canino es un método de preservación que permite a criadores de perros poder emplear la inseminación artificial con semen proveniente de lugares alejados **(England y Ponzio, 1996)**. Las ventajas de usar semen congelado incluyen mayor difusión de características genéticas deseables, prevención de enfermedades, menor número de sementales en una colonia destinada a investigación, obtención de crías de machos con problemas físicos o de hembras que no aceptan una monta natural. Sin embargo, el semen congelado en caninos no está suficientemente difundido entre criadores y veterinarios. Esto se debe, en parte, al costo de congelar y almacenar semen y al menor índice de preñez al compararlo con el semen fresco y refrigerado **(England, 1993; Linde-Forsberg, 1995; England y Ponzio, 1996)**.

El proceso de congelación y descongelación en los espermatozoides se traduce en una merma de su capacidad fecundante **(Park y Graham, 1992; Watson, 2000)**, lo cual sería provocado por alteraciones funcionales y estructurales que en casos más severos compromete la viabilidad de la célula **(De los Reyes, 2004)**. En la población espermática que logra sobrevivir al proceso, se han descrito cambios en las estructuras espermáticas, principalmente a nivel de las membranas plasmáticas y acrosomal **(Park y Graham, 1992; Watson, 2000)**, receptores **(Cheng et al., 2005)**, como también en su capacidad fecundante **(De los Reyes et al., 2009; Palomino y De los Reyes 2009)**.

En el proceso de capacitación espermática **(Austin, 1951; Chang, 1951; Yanagimachi, 1994; Barros et al., 1996)** ocurren cambios a nivel del flagelo que hacen que los espermatozoides se muevan de forma más activa, lo que es conocido como hiperactivación **(Yanagimachi, 1994; Barros et al., 1996; Töpfer-Petersen et al., 2000; Petrunkina et al., 2003)** y cambios a nivel de las membranas plasmática y acrosomal, con la liberación del contenido del acrosoma, denominado reacción acrosómica (RA) **(Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen et al., 2000)**, donde se activa y libera el sistema proacrosina/ acrosina, que ha sido involucrado en la unión y penetración a la zona pelúcida (ZP) del ovocito durante la fecundación **(Barros et al., 1996; De los Reyes y Barros, 2000)**.

Se ha sugerido que la activación de acrosina se vería inducida por pequeñas fracturas a nivel de las membranas acrosomal y/o plasmática y que sería diferente en espermatozoides congelados, refrigerados y frescos (**Froman et al., 1984; Kawakami et al., 1999**). Esto, podría ser un índice para evaluar el daño celular luego de la congelación en los espermatozoides de esta especie (**Froman et al., 1984; Cortés et al., 2006**). Un estudio previo ha demostrado además, una activación temprana de acrosina, en espermatozoides de perro congelados en comparación a los frescos (**Cortés et al., 2006**).

Considerando que la acrosina es liberada durante la reacción acrosómica y es una de las enzimas más abundantes en el acrosoma, en este estudio se plantea evaluar la activación de esta enzima durante la capacitación *in vitro* de los espermatozoides de perro que han sido sometidos a congelación, versus los espermatozoides frescos, de modo de establecer si existen cambios en la activación del sistema proacrosina/acrosina lo cual sería de gran ayuda para estudios posteriores.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1-Congelación de semen

La criopreservación de espermatozoides, así como la mantención de su capacidad fecundante, ha sido descrita como exitosa en varias especies, pero la susceptibilidad a las bajas temperaturas varía según la especie (**Fastad, 2000; Holt, 2000**). Se ha evidenciado que los espermatozoides de perro son más resistentes al shock térmico que los de verraco (**Bouchard et al., 1990**), esto ocurre debido a que los espermatozoides de perro tienen una relación de ácidos grasos saturados y poliinsaturados unidos a los fosfolípidos de membrana, que los hace menos susceptibles al shock térmico (**De los Reyes, 2004**). Sin embargo, estudios realizados en espermatozoides de perros han demostrado que éstos tienen una limitada viabilidad posterior a la descongelación, lo que se traduce en menor fertilidad en comparación con los espermatozoides frescos y refrigerados (**England, 1993; Pinto et al., 1999; Nizanski, 2006**). La reducción de la fertilidad en el semen congelado y descongelado es atribuida en gran medida a alteraciones en la membrana y su función durante el enfriamiento, congelación y descongelación (**Park y Graham, 1992; Rota et al., 1999; Watson, 2000; De los Reyes, 2004**). Es también por estas causas, que se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides (**Stornelli et al., 2005**). De esta manera, se han obtenido mayores tasas de preñez al utilizar espermatozoides descongelados en inseminación artificial intrauterina y cercano al momento de la ovulación (**England, 1993 ; Fastad, 2000**).

1.1-Cambios por criopreservación

El enfriamiento de los espermatozoides produce cambios morfológicos en la membrana plasmática como el reordenamiento de los lípidos de membrana lo que afecta las asociaciones entre lípidos y proteínas necesarias para una adecuada función (**Bouchard et al., 1990; Park y Graham, 1992**). También ocurre separación lateral de la fase lipídica con las proteínas integrales, lo cual sería sólo parcialmente revertido después de la descongelación (**Buhr et al., 1994; De los Reyes, 2004**).

Las alteraciones estructurales y funcionales de la membrana plasmática del espermatozoide, se producirían a consecuencia del estrés térmico, osmótico y tóxico al que se someten los componentes de dicha membrana durante el proceso de criopreservación **(Watson, 2000; Medeiros et al., 2002)** y que son similares a las modificaciones de membrana en espermatozoides congelados o refrigerados **(Rota et al., 1999; Watson, 2000; Thomas et al., 2005)**. Las bajas temperaturas también afectan al citoesqueleto, en el cual se ha observado una depolimerización prematura de los filamentos de actina, lo que permitiría el acercamiento de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, promoviendo la RA **(Spungin et al., 1995)**.

1.2-Diluyentes y crioprotectores de congelación

En la congelación de espermatozoides caninos se requiere de diluyentes como soluciones buffer, azúcares y sales **(Pinto et al., 1999; Rota et al., 1999)** con el propósito de proteger a la célula espermática del shock térmico, proveer de fuentes de energía y mantener un ambiente adecuado para la sobrevivencia del espermatozoide y su motilidad **(Purdy, 2006)**. Los diluyentes también deben contener crioprotectores ya que protegen a la célula de daños causados por el enfriamiento **(England, 1993; Silva y Verstegen, 1995; De los Reyes, 2004)**. El crioprotector más ampliamente utilizado es el glicerol **(Watson, 2000; De los Reyes, 2004)**, que al ser permeable se uniría directamente a los fosfolípidos de la membrana e interactuaría con las proteínas y glicoproteínas unidas a la membrana. El glicerol regula la deshidratación espermática durante el congelamiento al reemplazar osmóticamente el agua intracelular **(Park y Graham, 1992; De los Reyes, 2004)**, evitando así la formación de cristales de hielo intracelular **(Medeiros et al., 2002; Purdy, 2006)** que es la principal causa de muerte celular en la congelación **(Graham y Mocé, 2005)**. La adición y remoción del crioprotector también genera un estrés osmótico y tóxico sobre la membrana plasmática durante la criopreservación **(England, 1993; Watson, 2000)**. Los diluyentes además deben contener sustancias que protejan las células de los efectos dañinos de las bajas temperaturas a las que son sometidas, como son la yema de huevo o la leche descremada **(Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Tsutsui et al., 2003)**.

1.3-Evaluación post descongelación

La criopreservación genera diversas alteraciones en los espermatozoides, por lo que es importante una evaluación luego del proceso. Los aspectos mayormente analizados son la motilidad y viabilidad espermática, y la evaluación del estado acrosomal.

Estudios en semen canino criopreservado han determinado que cerca del 45% de los espermatozoides presentan diferentes estados de degradación del acrosoma, tales como vesiculación y ruptura acrosomal **(Ström Holst et al., 1997)**. También se ha utilizado el inhibidor de tripsina del poroto de soya (SBTI), conjugado con el fluorocromo alexa fluor, para evaluar la integridad del acrosoma de espermatozoides caninos frescos y criopreservados, donde se encontró una mayor proporción de espermatozoides teñidos en el semen fresco que en el criopreservado, indicativo de daño acrosomal en la muestra de semen congelado **(Cortes et al., 2006)**.

En estudios en espermatozoides caninos se ha encontrado que la disminución de la motilidad progresiva es más pronunciada durante la primera media hora **(Aretio, 2006)** o durante la primera hora de incubación **(Becker, 2007)**, luego de los procedimientos de congelación y refrigeración, respectivamente. Este hecho, no se ha evidenciado en espermatozoides frescos **(Gutiérrez, 2007)**.

La interacción gamética es la evaluación *in vitro* más indicada para estimar la capacidad fecundante de los espermatozoides caninos que han sido congelados. De este modo, se ha demostrado que el daño producto de la congelación y descongelación afecta severamente la funcionalidad espermática en relación a su capacidad de unión y penetración a la ZP **(De los Reyes, 2004; De los Reyes et al., 2009)**. Recientemente se ha visto que espermatozoides caninos refrigerados y/o congelados penetran un mayor porcentaje de ovocitos la primera hora de co-incubación gamética en comparación a espermatozoides frescos, lo que se ha asociado a un menor tiempo de capacitación en estas poblaciones de espermatozoides **(De los Reyes et al., 2009; Palomino y De los Reyes, 2009)**.

2-Capacitación espermática

El espermatozoide de mamífero eyaculado es móvil pero incapaz de fecundar a un ovocito, ya que para lograr su capacidad fecundante, el espermatozoide debe experimentar previamente varias secuencias de cambios, algunos conocidos y otros aún desconocidos. Entre los primeros está el proceso de capacitación espermática donde ocurre la hiperactivación y la RA (**Austin, 1951; Chang, 1951; Yanagimachi, 1994; Barros et al., 1996**).

En forma natural, la capacitación del espermatozoide ocurre en el tracto reproductivo de la hembra (**Austin, 1951; Yanagimachi, 1994; Rodriguez-Martinez, 2007**). En el caso de la especie canina es en el útero, donde los componentes de la superficie espermática son modificados y algunos eliminados por secreciones del aparato reproductor femenino, lo que desestabiliza la bicapa fosfolipídica y permite la activación acrosomal (**Yanagimachi, 1994**). Tales cambios pueden incluir disminución del colesterol en la superficie del espermatozoide (**Visconti et al., 1999**), modificación de glicosaminoglicanos, cambios iónicos a medida que el espermatozoide avanza por el aparato reproductor femenino, entre otros cambios (**Yanagimachi, 1994; Rota et al., 1999; Sirivaidyapong et al., 2000; Töpfer-Petersen et al., 2000; Brewis et al., 2001**). Sólo los espermatozoides que han experimentado el proceso de capacitación espermática son capaces de reconocer al ovocito y responder ante las señales que éste emite para su posterior fecundación (**Töpfer-Petersen, 2000; Brewis et al., 2001**).

Como parte del proceso de capacitación está la hiperactivación, que consiste en un cambio en el patrón de movimiento flagelar, el cual se torna menos progresivo pero más vigoroso, de mayor amplitud, con un menor radio de curvatura y mayor frecuencia que el que presentan los espermatozoides recién eyaculados (**Yanagimachi, 1994; Petrunkina et al., 2003; O'Flaherty et al., 2006; De Lamirande y O'Flaherty, 2007**). Este movimiento le permitiría a los espermatozoides desprenderse de las células oviductales y atravesar las cubiertas que rodean al ovocito, como las células del cúmulo (**Petrunkina et al., 2003**).

La RA, otro evento clave de la capacitación, consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana externa del acrosoma, seguida por una vesiculación extensa sobre el segmento anterior del acrosoma (**Moreno y Barros, 1991; Yanagimachi, 1994; Sirivaidyapong et al., 2000; Watson, 2000**). La fusión y vesiculación del acrosoma da lugar a la liberación de enzimas proteolíticas como la acrosina (**Barros et al., 1996**), la cual ha sido involucrada en la unión y penetración de la ZP (**Yanagimachi, 1994**). Este proceso ocurre en las cercanías o en contacto con las cubiertas ovocitarias.

En espermatozoides caninos se ha podido observar que tanto los que han experimentado la RA como los no reaccionados, son capaces de unirse a la ZP de ovocitos caninos (**Kawakami et al., 1993; Palomino y De los Reyes, 2009**).

Se ha demostrado que la capacitación del espermatozoide de perro podía realizarse *in vitro* mediante el uso de medios de capacitación como el medio de capacitación canino (CCM) (**Mahi y Yanagimachi, 1978**). En la mayoría de las especies de mamífero estudiadas, los medios definidos que permiten la capacitación espermática *in vitro* necesitan de un suplemento de fuente energética apropiada como lactato, piruvato, albúmina sérica, calcio y una cantidad mayor de bicarbonato que de dióxido de carbono (**Mahi y Yanagimachi, 1978; Yamada et al., 1992; Harrison et al., 1996**). El calcio es necesario no solamente para la RA (**Barros, 1974**), sino también para la expresión de la motilidad hiperactivada del espermatozoide (**Yanagimachi, 1994**).

En ensayos con clortetraciclina (CTC) y evaluaciones de los patrones de movimiento espermático, se ha descrito que los cambios observados en la capacitación de espermatozoides de perro podrían ser acelerados y adelantados por los procesos de refrigeración y congelación (**Rota et al., 1999**).

3-Acrosina

La acrosina corresponde a una enzima que ha sido demostrada en espermatozoides de diferentes especies mamíferas (**Barros et al., 1996; De los Reyes y Barros, 2000**). Es una serino proteasa con una especificidad del tipo

tripsina; sin embargo, cuando se le compara con el resto de las serino proteasas, presenta características estructurales diferentes, lo que podría estar relacionado con su función en la fecundación (**Hedrick et al., 1988**). Esta enzima se almacena en el compartimento acrosomal del espermatozoide intacto en su forma zimógena, proacrosina (**De los Reyes y Barros, 2000; Toshimori, 2000**). La proacrosina autocataliza su propia conversión a la forma activa, acrosina, durante la reacción acrosómica (**Baba et al., 1989**). Esta conversión estaría dada específicamente por los carbohidratos presentes en la zona pelúcida (ZP), que es la cubierta ovocitaria que sería el sustrato natural de la acrosina (**Barros et al., 1993**). Se ha demostrado que el sistema proacrosina/acrosina estaría involucrado en la dispersión de la matriz acrosomal y en la unión y penetración a través de la ZP (**Barros et al., 1996**). Este se encontraría presente sobre la membrana interna del acrosoma manteniendo unido al espermatozoide a la ZP (**Howes y Jones, 2002; Gaboriau et al., 2007**).

La activación de proacrosina porcina *in vitro* implica un corte entre Arg23 y Val24 en la región amino terminal, teniendo como resultado una molécula de dos cadenas. La nueva formación del fragmento de 23 aminoácidos (cadena liviana) queda unida por puentes disulfuros al resto de la molécula (cadena pesada). Esta forma de 49 kDa es enzimáticamente activa y representa la α -acrosina. El segundo y tercer corte ocurren en la región carboxilo terminal entre Lys363 y Arg367 y entre Arg322 y Pro323, respectivamente. Estos cortes llevan a una pérdida secuencial de 18 y de 43 fragmentos residuales (**Baba et al., 1989; Moreno y Barros, 2000**). Estos últimos procesamientos tienen como resultado la formación de una forma enzimáticamente activa de 36 kDa denominada β -acrosina (**Schleuning et al., 1976; Topfer-Petersen y Cechova , 1990; Cortés et al., 2006**).

Se ha demostrado que el sistema proacrosina/acrosina presente sobre la membrana interna del acrosoma del espermatozoide mamífero, mantendría unido al espermatozoide reaccionado sobre la ZP, evidencia que apoya que tanto la proacrosina y la α -acrosina como la β -acrosina, tienen una fuerte capacidad de unión a la ZP (**Jones, 1991**). Además, se ha reportado que la acrosina está

implicada en el desarrollo de la fusionabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide (**Barros et al., 1993**).

La acrosina ha sido inmunolocalizada en espermatozoides de diversas especies, como cobayo, humanos, hámster, (**Barros et al., 1996**) conejo (**Valdivia et al., 1999**) bovinos (**De los Reyes y Barros, 2000**), mediante anticuerpos mono y policlonales. En perros, se ha podido detectar esta enzima en espermatozoides no capacitados, mediante inmunofluorescencia indirecta (**Cortés et al., 2006**) y en espermatozoides congelados (**Aretio, 2006**), refrigerados (**Becker, 2007**) y frescos (**Gutierrez, 2007**), incubados para capacitación por diferentes tiempos.

Al producirse un daño en el acrosoma, por un trastorno celular como el provocado por el frío, podría generarse la activación de la acrosina y su dispersión junto a la matriz acrosomal, por lo tanto, la medición de esta enzima podría considerarse una buena medición de este daño (**Harrison y Fléchon, 1980; Kawakami et al., 1999; Cortés et al., 2006**).

El estudio de los cambios ocurridos en los espermatozoides caninos y del sistema proacrosina/acrosina durante la capacitación espermática luego de la congelación y descongelación, aportará valiosa información al mejoramiento de las técnicas de manejo espermático *in vitro* y criopreservación en esta especie.

HIPÓTESIS

La reactividad del sistema proacrosina/ acrosina durante el proceso de reacción acrosómica, se verá adelantado en el tiempo en los espermatozoides caninos que han sido congelados y descongelados versus aquellos espermatozoides frescos (controles) al ser analizados mediante Western Blot.

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar el sistema Proacrosina/Acrosina mediante Western Blot en espermatozoides congelados de perro durante la capacitación *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la presencia del sistema Proacrosina/Acrosina en relación al tiempo de capacitación a que se someterán los espermatozoides caninos.
- Evaluar mediante el patrón de bandeo de Western Blot, el efecto de la congelación y descongelación en la liberación del sistema Proacrosina/Aacrosina.
- Determinar tiempos de capacitación espermática adecuados para espermatozoides congelados y descongelados de perro, que eviten la pérdida prematura de acrosina.

MATERIAL Y MÉTODOS

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

1. Obtención y evaluación de semen

Se utilizaron 6 eyaculados de 3 perros adultos clínicamente sanos, negativos serológicamente a *Brucella canis* y con parámetros seminales normales para la especie. Los eyaculados fueron obtenidos mediante estimulación digital del pene, utilizando la segunda fracción (espermática) que fue recolectada en una copa graduada.

Cada eyaculado se evaluó de acuerdo a: volumen seminal directamente de la copa recolectora, motilidad progresiva en forma subjetiva, mediante un microscopio de contraste de fases, donde se trabajó con eyaculados con motilidad progresiva de 70% o superior. Además se evaluó la concentración espermática, a través de recuento en cámara de Neubauer de acuerdo a las técnicas establecidas en el laboratorio.

2. Congelación y descongelación del semen

La segunda fracción espermática de cada eyaculado fue diluido en buffer TRIS (Trishidroxiaminometano; pH 7,0; Cat. 8382XO11, Merck, Germany), en una relación 1:2 (semen: TRIS) (**Rota et al., 1999**) y luego fue centrifugado a 700 x g durante 5 minutos. El pellet de espermatozoides obtenidos para congelación se resuspendió en el diluyente de congelación, el que se preparó en base a TRIS, ácido cítrico (Cat. C-0759, Sigma, St. Louis, Mo, USA), fructosa (Cat. F-0127, Sigma, St. Louis, Mo, USA), penicilina (Cat. P-3032, Sigma, St. Louis, Mo, USA), estreptomina (Cat. S-9137, Sigma, St. Louis, Mo, USA) y 20 % de yema de huevo (Tabla N° 1) (**De los Reyes et al., 2006**). Esta dilución fue en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 200 millones de

espermatozoides por mililitro. Luego las muestras se enfriaron a 4°C por una hora, posteriormente se adicionó 5% de glicerol, para luego ser envasadas en pajuelas francesas de 0,25 mL, las que se sometieron a vapor de nitrógeno líquido por 9 minutos para luego sumergirlas directamente en nitrógeno líquido a -196°C. Las pajuelas se mantuvieron en el estanque de nitrógeno líquido hasta su descongelación, la que se realizó en agua a 60° C durante 8 segundos.

Tabla 1. Composición del diluyente de congelación para semen de perro.

TRIS	19,811 mM
Ácido Cítrico	6.662 mM
Fructosa	4.44 mM
Penicilina-G sódica	886 UI/mL
Estreptomicina	1 mg/mL
Yema de Huevo	20% v/v
Glicerol	5% v/v

3. Capacitación espermática

Las muestras descongeladas fueron lavadas por centrifugación a 50 x g por 15 minutos y las muestras frescas a 700 x g por 5 minutos en buffer TRIS en relación 1:2. El pellet obtenido fue resuspendido en medio Fert-Talp (pH: 7,2) para obtener una concentración de 200 millones de espermatozoides por mililitro (muestras frescas y congeladas), las que se incubaron separadamente por 0, 30, 60 y 90 minutos a temperatura ambiente (21°C) para capacitación.

4. Extracción de proteínas

Luego de cada período para inducir capacitación, cada muestra se centrifugó a 50 x g por 20 minutos y el pellet se resuspendió en un buffer A, en base a: Triton X-100 1% (Cat. 64K0070, Sigma, St. Louis, Mo, USA), NaCl 1M (Cat. K-36586304, Merck, Darmstadt, Germany), EDTA 1 mM (Cat. ED25C, Sigma, St. Louis, Mo, USA), PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) (Cat. P7626, Sigma, St. Louis, Mo, USA) 10 µg/mL, Tris-HCl 20 Mm pH :7.0, en proporción 1:1 dejándose a 4°C durante

toda la noche (**Cortés et al., 2006**). Al día siguiente se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 7000 x g. El sobrenadante fue rescatado y se mantuvo a -20° C hasta su utilización.

5. Medición de concentración de proteínas

A cada extracto espermático se le realizó la cuantificación de su concentración de proteínas mediante el método de Bradford, donde previamente se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA). De cada extracto se tomaron tres alícuotas, donde en cada tubo se pusieron 10 µL del extracto, 90 µL de agua destilada y 900 µL de reactivo Bradford. Luego se dejó por 10 minutos en oscuridad y posteriormente se vaciaron para medir mediante espectrofotómetro la absorbancia de luz visible a una longitud de onda de 595 nm. Una vez obtenido los valores de absorbancia, se colocaron en la ecuación de la recta obtenida al calibrar la curva lo que permitió conocer la cantidad de proteína presente en los extractos (**Bradford, 1976**).

6. Precipitación de proteínas y electroforesis

Para concentrar las proteínas presentes en los extractos espermáticos de cada muestra se tomó un volumen que tuviera 100 µg de proteína, a este volumen se le agregó TCA (ácido tricloro acético. Cat.T9159, Sigma, St. Louis, Mo, USA) a una concentración del 10%, luego de una hora a 4° C se centrifugó por 15 minutos a 16.000 x g y al pellet obtenido se le agregó 300 µL de acetona, manteniéndolo por 10 minutos, luego se centrifugó nuevamente a 16.000 x g durante 5 minutos más ,para retirar el sobrenadante y el pellet resuspenderlo en 36 µL de buffer de carga 4 % compuesto en base a: Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4% (Cat. L4509, Sigma, St. Louis, Mo, USA), mercaptoetanol 10% (Cat. M7154, Sigma, St. Louis, Mo, USA), glicerol 20% (Cat. 33224, Sigma, St. Louis, Mo, USA), azul de bromofenol 0.05% (Cat. B8026, Sigma, St. Louis, Mo, USA).

La electroforesis se realizó de acuerdo al método de **Laemmli (1970)** en geles de poliacrilamida al 5% (gel concentrador) y 15% (gel separador). Las muestras fueron colocadas en cada uno de los bolsillos presentes en el gel además del

marcador estándar, en un volumen total por bolsillo de 36 μ L. La corrida del gel se realizó a un voltaje de 100 volt, a un amperaje de 60 mA y a temperatura ambiente, todo esto se realizó con una solución de corrida 1% (Trizma base 25 mM (Cat. 25,285-9, Sigma, St. Louis, Mo, USA), glicina 250 mM (Cat. 084K0223, Sigma, St. Louis, Mo, USA), SDS 0,1 % (Cat. L4509, Sigma, St. Louis, Mo, USA) y 900 mL de agua destilada). Una vez terminada la electroforesis el gel se utilizó para realizar el western blot.

7. Western Blot

Método de Transferencia:

La transferencia se realizó según lo descrito por **Towbin et al., (1979)**. Se colocaron hojas de papel filtro y un trozo de membrana de nitrocelulosa en un recipiente con la solución de transferencia (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (Cat. M1770, Sigma, St. Louis, Mo, USA) y SDS 0,04% pH: 8,3). Sobre el papel filtro se colocó la membrana de nitrocelulosa y sobre esta el gel. Sobre el gel se puso otro set de papel filtro y éste “sándwich” fue colocado en la cámara de transferencia. La transferencia de las proteínas desde el gel al papel de nitrocelulosa se realizó a un voltaje de 200 volt y a 350 mA durante una hora.

Bloqueo de la membrana:

Este bloqueo se realizó en solución PBS más 2% de BSA por al menos una hora a temperatura ambiente (21°C) con agitación constante.

Anticuerpos:

Una vez bloqueada la membrana de nitrocelulosa, se adicionó el anticuerpo primario C5F10 (anticuerpo de ratón anti-acrosina humana; Cat. AMC-ACRO-C5F10-AS, Biosonda, Santiago, Chile) preparado a una dilución 1:1000 con PBS con 2% de BSA (Buffer Fosfato Salino con Albúmina Sérica Bovina; Cat. A-2153, Sigma, St. Louis, MO, USA), el que se dejó en incubación durante toda la noche a 4° C y con agitación constante. Luego se realizaron tres lavados de 10 minutos

cada uno con PBS-Tween 0,1 % (Cat. P9416, Sigma, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, se realizó la incubación con un segundo anticuerpo (anticuerpo de conejo anti-ratón) a una dilución de 1:5000 con 1%PBS a pH: 7,3 durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Luego se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween 0,1%.

Método de detección:

Se utilizó como método de detección la fosfatasa alcalina (anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina). Para esto fue preparada una mezcla de reacción en base a: bifosfato bromocloro indolil (BCIP) 150 pg/mL (Cat. B0274, Sigma, St. Louis, Mo, USA), nitrobluetetrazolium (NBT) 300 pg/mL (Cat. N6639, Sigma, St. Louis, Mo, USA) y Tris-NaCl 0,1 M, pH 9,5. Se colocó la membrana con la mezcla de reacción y se dejó con agitación constante hasta que las bandas fueran visibles. La reacción fue detenida con agua corriente para evitar que la membrana se manchara.

Durante la electroforesis se utilizó un marcador estándar (Trichromranger (tm) Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix; Cat. P8748, Sigma, St. Louis, Mo, USA), correspondiente a proteínas de peso molecular conocido junto a las proteínas en estudio (proacrosina, α y β acrosina).

Se realizaron 6 réplicas experimentales de las cuales 3 se utilizaron para semen fresco (control) y 3 para semen congelado provenientes de los mismos perros. La diferente intensidad de las bandas de western blot, indicativas de la reactividad del anticuerpo con proacrosina y las subunidades de la enzima activa (α y β acrosina) fueron evaluados a través de la cuantificación de la densidad óptica de cada banda a través de densitometría, mediante el uso del programa computacional Photoshop 8.0.

8. Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias entre los promedios de los valores de densidad óptica para cada tipo de espermatozoide (fresco y congelado) y entre los

diferentes tiempos de capacitación se utilizó un Análisis de Varianza. Las diferencias se evaluaron a través de la prueba de Tukey. Todos los análisis se desarrollaron con el programa InfoStat (Universidad de Cordova, Argentina), y se utilizó un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

Se utilizó el siguiente modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + T_i \times P_j + e_{ijkl}$$

Donde:

y_{ijkl} = Variable experimental (bandas de pro, α y β acrosina)

μ = Media poblacional.

T_i = Efecto fijo del i -ésimo tratamiento ($i = 1,2$: fresco, congelado).

P_j = Efecto fijo de la j -ésimo período de mantención ($j = 1, \dots, 4$: tiempos de capacitación).

$T_i \times P_j$ = Efecto de la interacción entre el i -ésimo tratamiento y el j -ésimo período.

e_{ijkl} = Error experimental.

RESULTADOS

Detección de proacrosina y acrosina activa (α y β) mediante western blot en espermatozoides de perro frescos y espermatozoides caninos sometidos a congelación.

En la figura N°1 se muestran las bandas de western blots obtenidas de los espermatozoides frescos (Figura N°1- A) y congelados (Figura N°1-B), que fueron sometidos a tiempos de capacitación de 0, 30, 60 y 90 minutos. La densidad óptica de las bandas se muestra en las figuras N° 2 y N° 3. El anticuerpo antiacrosina humana C5F10 reconoció tres bandas, correspondientes a las tres formas de acrosina (pro, α y β acrosina). Se encontró una banda de aproximadamente 40 KDa correspondiente a proacrosina y dos bandas de menor peso molecular correspondiente a α -acrosina de 32 KDa y β -acrosina de 27 KD.

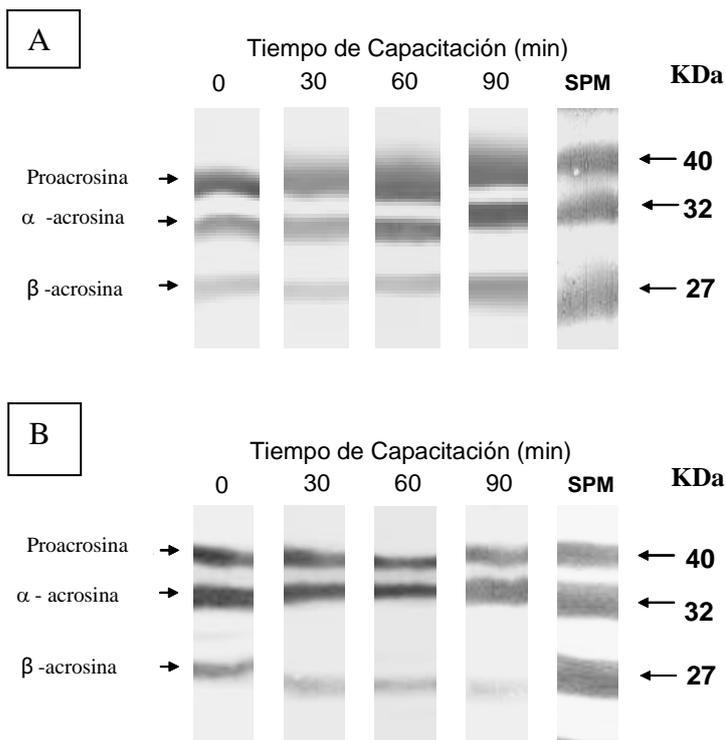


Figura N°1. Western blots de extractos frescos (A) de espermatozoides de perro, y congelados (B). Las bandas de proacrosina (40 kDa), α -acrosina (32 kDa) y β -acrosina (27 kDa), se detectaron a través del anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10. SPM corresponde a los estándares de peso molecular.

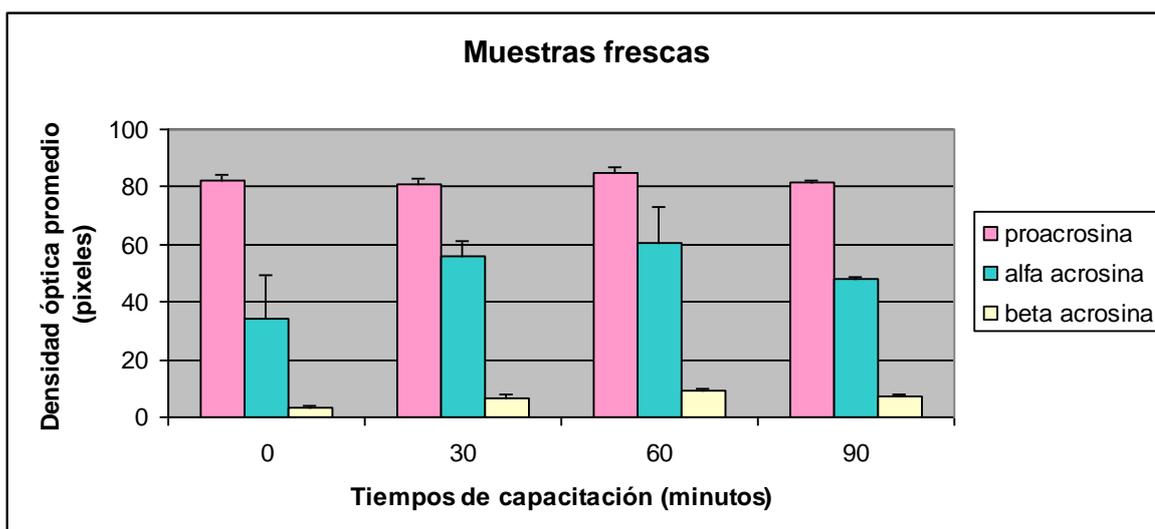


Figura N°2. Densidad óptica (píxeles) promedio obtenida de western blots para proacrosina, α y β acrosina, detectadas en muestras de espermatozoides de perro frescos sometidos a diferentes tiempos de capacitación *in vitro*.

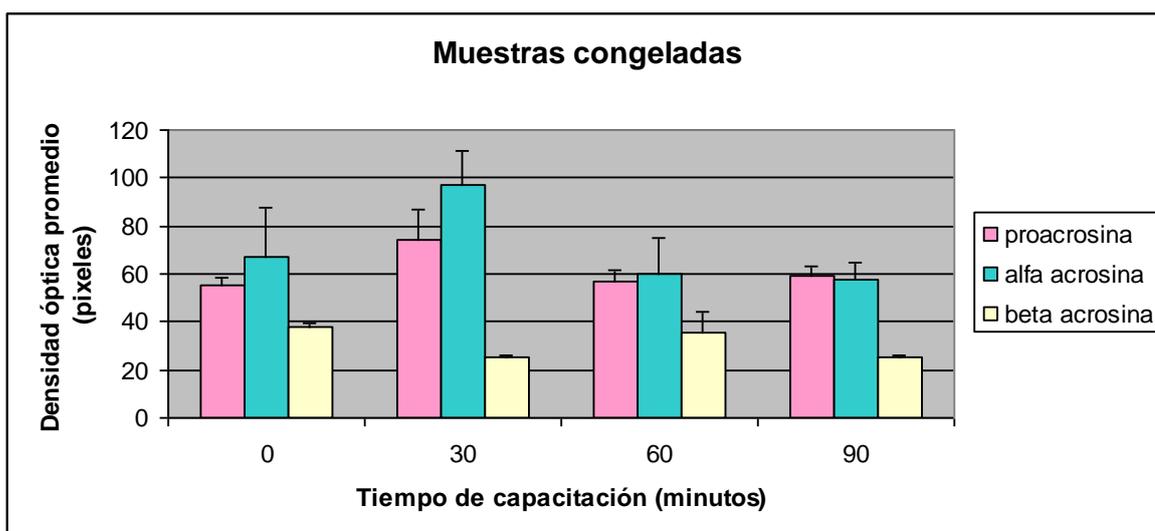


Figura N°3. Densidad óptica (píxeles) promedio obtenida de western blots para proacrosina, α y β acrosina, detectadas en muestras de espermatozoides de perro congelados sometidos a diferentes tiempos de capacitación *in vitro*.

Al analizar los resultados obtenidos en proacrosina, se observó que no existieron diferencias significativas en los niveles de densidad óptica de esta proteína entre los distintos tiempos de capacitación de las muestras frescas (Figura N°4). Sin embargo, en las muestras provenientes de espermatozoides congelados, se

encontró mayor densidad óptica en la detección de proacrosina ($p \leq 0,05$) a los 30 minutos de capacitación.

Al comparar proacrosina entre las muestras frescas y congeladas en cada uno de los tiempos de capacitación, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) a los 0, 60 y 90 minutos, en donde se pudo observar mayores densidades ópticas para esta proteína, en las muestras frescas en relación a las congeladas (Figura N°4).

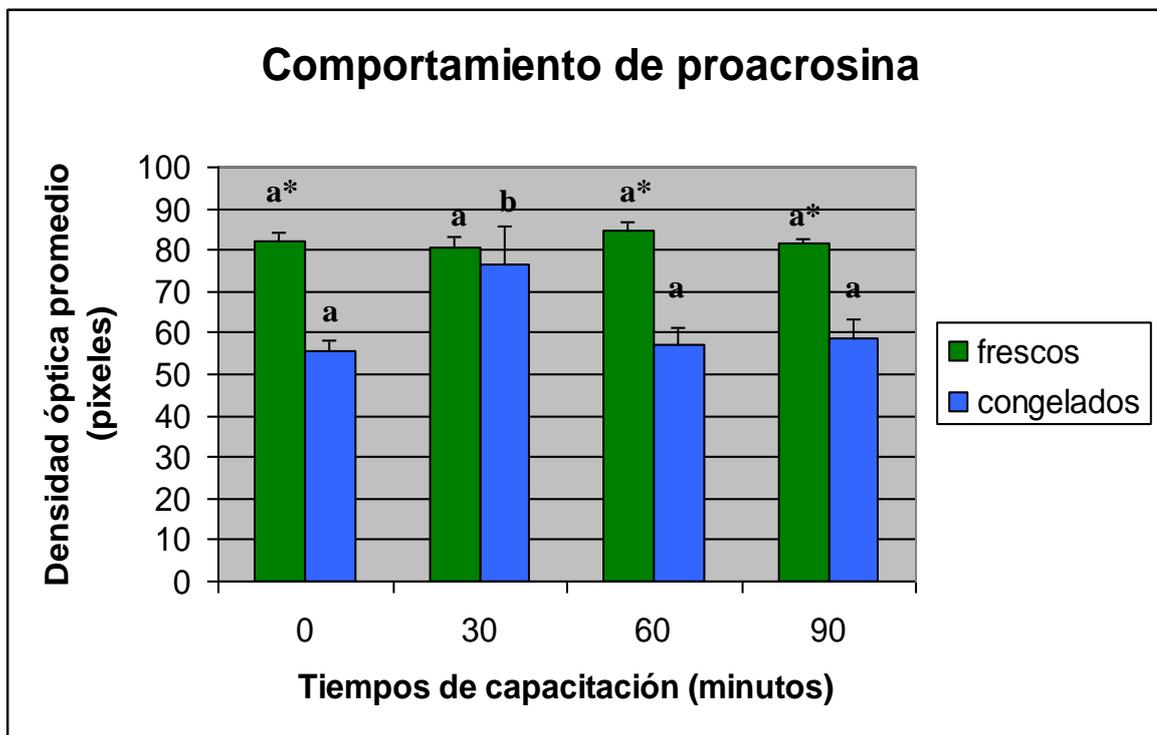


Figura N°4. Densidades ópticas (píxeles) de las bandas de proacrosina obtenidas por western blots de espermatozoides de perro frescos y congelados, durante diferentes tiempos de capacitación *in vitro*. Para cada tipo de espermatozoide, las letras distintas indican diferencias significativa ($p \leq 0,05$) entre tiempos de capacitación y (*) indica diferencias significativas entre tratamientos, para cada tiempo de capacitación *in vitro* ($p < 0,05$).

En relación a α -acrosina, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tiempos de capacitación en las muestras frescas. Sin embargo, en las muestras congeladas hubo una disminución significativa a partir de los 30 minutos de capacitación. Al analizar entre cada tipo de muestra (congelada o fresca) en

cada tiempo de capacitación, se encontraron diferencias ($P < 0,05$) a los 0 y 30 minutos, siendo mayor la presencia de α -acrosina en las muestras congeladas. A los 60 y 90 minutos de capacitación no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$) (Figura N° 5).

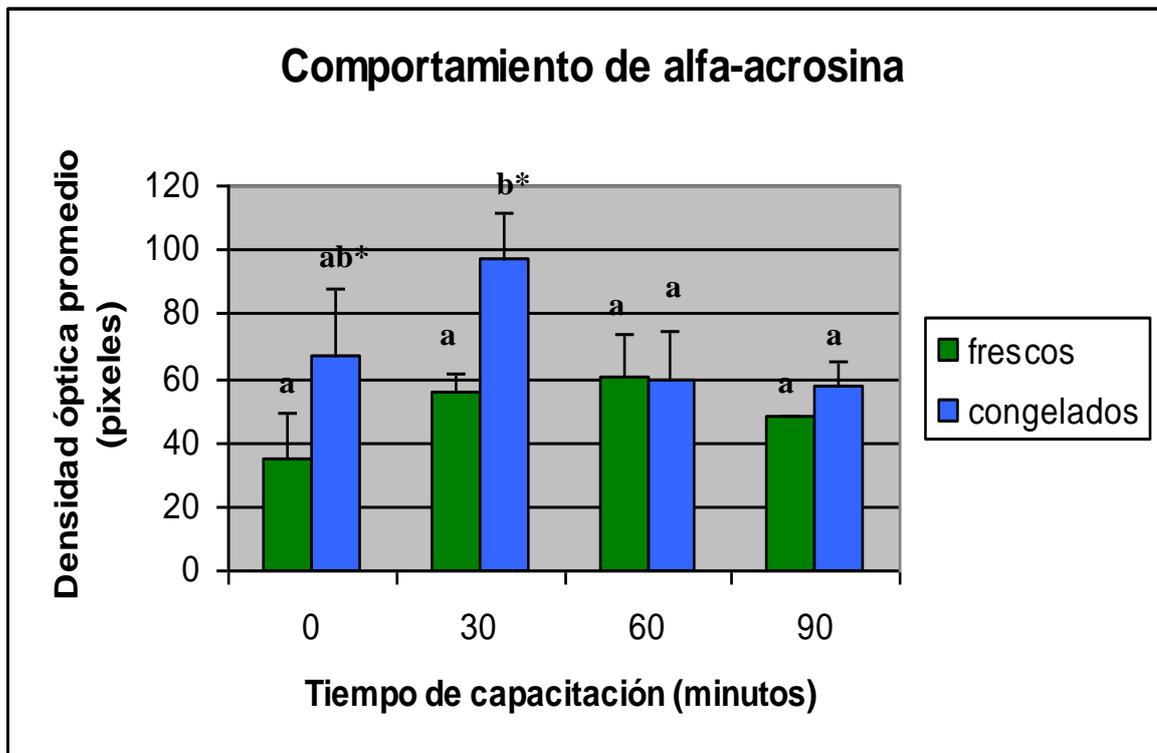


Figura N° 5. Densidades ópticas (píxeles) de las bandas de α -acrosina obtenidas por western blots de espermatozoides de perro frescos y congelados, durante diferentes tiempos de capacitación *in vitro*. Para cada tipo de espermatozoide, las letras distintas indican diferencias significativa ($p \leq 0,05$) entre tiempos de capacitación y (*) indica diferencias significativas entre tratamientos, para cada tiempo de capacitación *in vitro* ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en β -acrosina mostraron que su detección aumentó de manera significativa ($P < 0,05$) en los extractos provenientes de espermatozoides frescos, luego de 30 minutos de capacitación *in vitro*, manteniéndose alto durante los restantes tiempos de capacitación. En el caso de las muestras congeladas por el contrario, se observó una disminución ($P < 0,05$) en los niveles de densidad

óptica a los 90 minutos de capacitación. Al comparar, durante los diferentes tiempos de capacitación, la densidad óptica de β -acrosina, se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en todos los tiempos (Figura N°6) siendo mayor en las muestras congeladas (Figura N° 6).

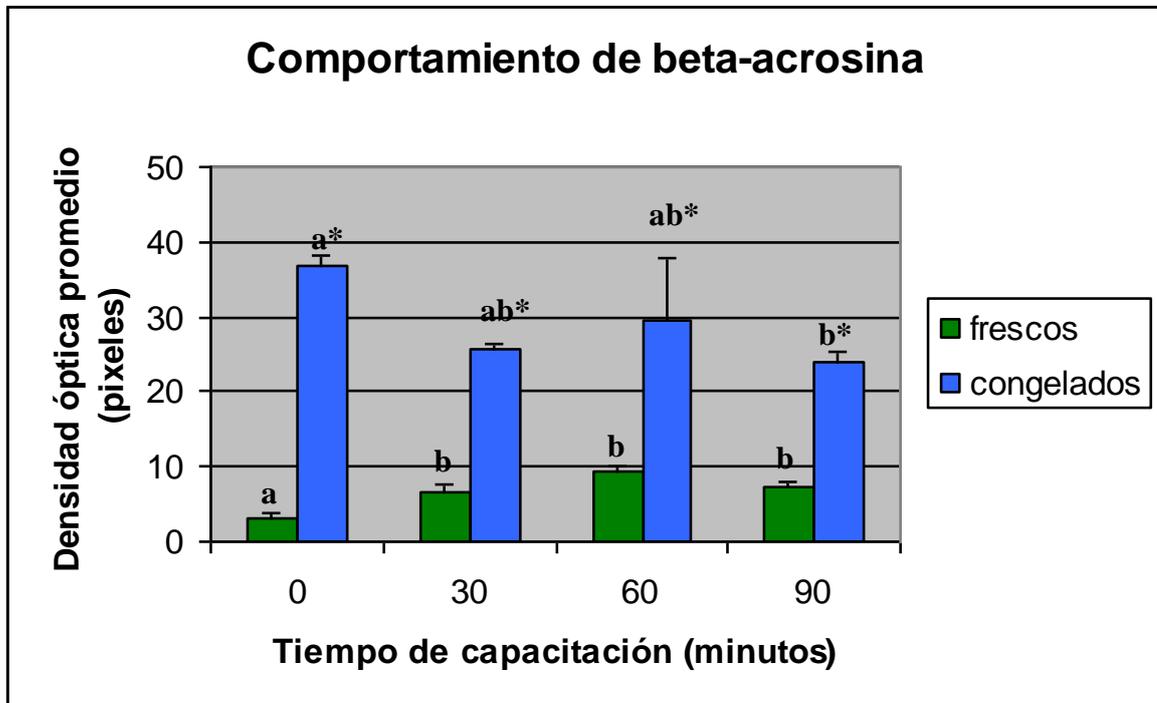


Figura N° 6. Densidades ópticas (píxeles) de las bandas de β -acrosina obtenidas por western blots de espermatozoides de perro frescos y congelados, durante diferentes tiempos de capacitación *in vitro*. Para cada tipo de espermatozoide, las letras distintas indican diferencias significativa ($p \leq 0,05$) entre tiempos de capacitación; (*) indica diferencias significativas entre tratamientos, para cada tiempo de capacitación *in vitro* ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Durante la RA se desencadenan procesos en el cual proacrosina es convertida en sus formas activas (α y β), por lo tanto, la presencia de pro, α y β acrosina fue estudiada en este trabajo a través de western blot.

El sistema proacrosina/acrosina se ha detectado en espermatozoides de perro sin capacitar, tanto en estado fresco como congelados. Sin embargo, β -acrosina sólo se encontró en espermatozoides congelados (**Cortés et al., 2006**). Por el contrario, en el presente trabajo el análisis mediante western blot mostró que el anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10, reconoció bandas de 40, 32 y 27 kDa en muestras frescas y congeladas, correspondientes a proacrosina, α -acrosina y β -acrosina, respectivamente. La detección de estas enzimas en ambos tipos de muestra, podría explicarse por los tiempos de capacitación (30,60 y 90 minutos) a los que se sometió cada muestra (frescas y congeladas) ya que al ser espermatozoides capacitados estos experimentan la RA y por lo tanto proacrosina se autoactivaría a α -acrosina y posteriormente a β -acrosina (**Toepfer-Petersen y Cechoval., 1990; Trater et al., 2000**), en el caso del tiempo 0 de capacitación la presencia de α y β acrosina podría estar explicada por una “falsa” reacción acrosómica producto de la muerte de espermatozoides (**Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994**).

En relación a las bandas de proacrosina, sólo se encontró diferencia a los 30 minutos de capacitación en las muestras congeladas al comparar con los otros tiempos de capacitación, sin embargo, se pudo observar mayor densidad óptica en las muestras frescas al compararlas con las congeladas, lo que podría indicar que proacrosina se pudo haber activado durante el procesamiento de congelación /descongelación. Estudios que han empleado técnicas bioquímicas, han presentado pruebas de que la criopreservación causa alteraciones en los espermatozoides como daños estructurales del acrosoma o alteraciones similares a una prematura capacitación (**Nishizono et al., 2004; Palomino y De los Reyes, 2009**), o al menos exocitosis acrosomal, lo que explica la reducción de la fertilidad (**Watson, 2000; Peña et al., 2004**). La proporción de espermatozoides

con reacción acrosomal o acrosoma anormal son más frecuentes de observar en los espermatozoides congelados y descongelados en comparación a los frescos **(Palomino y De los Reyes, 2009)**, lo que podría implicar activación y liberación prematura del sistema proacrosina/acrosina.

Se ha observado que luego de ocurrida la RA, proacrosina es convertida a α -acrosina que permanece unida al acrosoma y corresponde a una forma intermedia e inestable de la molécula. Luego α -acrosina se convierte en β -acrosina que se libera al medio extracelular **(Baba et al., 1989b)** correspondiendo a una forma más estable.

Al analizar el comportamiento de la reactividad de la β -acrosina entre ambos tipos de espermatozoides se pudo observar en las muestras frescas una menor reactividad con el anticuerpo antes de la capacitación, la que aumentó con el tiempo, lo cual puede estar explicado por el proceso de capacitación donde proacrosina y α -acrosina se han activado a β -acrosina. Sin embargo, en las muestras congeladas se encontró con una mayor proporción de β -acrosina a tiempos tempranos de capacitación y que decreció al final de la capacitación, lo que podría estar relacionado a los cambios que experimentarían los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, que según diversos estudios serían algo similares a los ocurridos durante la capacitación espermática, donde se produciría desestabilización de sus membranas plasmática y acrosomal, generando el mayor influjo de calcio a la célula, lo cual está asociado a la capacitación espermática y RA **(Petrunkina et al., 2003; Sirivaidyapong et al., 2000; Töpfer-Petersen et al., 2000; Brewis et al., 2001; Bavister, 2002; Córtes et al., 2006)**.

En estudios realizados en espermatozoides de perro sometidos a congelación a través de inmunofluorescencia indirecta, se ha demostrado que la mayor cantidad de acrosina se libera en los primeros tiempos de capacitación espermática, lo que podría estar asociado a una prematura activación de esta enzima **(Aretio, 2006)**. Además, a través de western blots y ensayos de actividad enzimática, se encontró que el semen de perro sin capacitación congelado/descongelado

presenta una mayor proporción de acrosina activa que el semen fresco (**Cortés et al., 2006**), lo que coincide con lo encontrado en este estudio, dada la mayor reactividad de la enzima activa, tanto α y β acrosina en los espermatozoides congelados/descongelados respecto a los espermatozoides frescos, al inicio de los períodos de capacitación. Estudios en curso, han demostrado que en espermatozoides refrigerados caninos, las formas activas de la enzima (α y β acrosina), se encuentran en mayor cantidad respecto a los espermatozoides frescos a partir de las 2 horas de capacitación, lo cual, de manera similar a lo encontrado en este trabajo, podría indicar una prematura activación de esta enzima.

De acuerdo a otros trabajos, la congelación y descongelación de espermatozoides no reducirían mucho más el porcentaje de proacrosina por debajo del nivel inducido solo por el enfriamiento, pero el total de la actividad de acrosina si se redujo (**Froman et al., 1984**), lo cual indicaría que la congelación y descongelación afecta la actividad enzimática.

Espermatozoides de perro congelados, presentarían mayores tasas de penetración a la ZP durante la primera hora de coincubación gamética en comparación con los frescos (**De los Reyes et al., 2009; Palomino y De los Reyes, 2009**), lo que podría estar relacionado a la activación más precoz de proacrosina, observada en este trabajo, como asimismo mayor disminución en el tiempo de la capacidad fecundante de estos gametos.

En conclusión, estos resultados indican que proacrosina es activada en α y β acrosina prematuramente en espermatozoides caninos congelados y descongelados, lo que explicaría en parte, la reducción en la capacidad fértil a través del tiempo, que se ha observado en estudios de interacción gamética con espermatozoides criopreservados de perro. Por lo tanto, se podría sugerir que los protocolos in vitro, reduzcan los tiempos de capacitación espermática, de manera que el espermatozoide no pierda su capacidad fecundante antes de que se encuentre con el ovocito.

CONCLUSIONES

- En extractos de espermatozoides frescos y congelados de perro, es posible detectar mediante western blot bandas de 40, 32 y 27 KDa correspondientes a pro, alfa y beta acrosina respectivamente.

-Las formas activas, α y β acrosina, se detectan con mayor intensidad en los espermatozoides congelados al inicio del período de capacitación, lo cual podría indicar una prematura activación del sistema proacrosina/acrosina, en estos espermatozoides.

-En espermatozoides frescos la activación del sistema proacrosina/acrosina ocurre en forma más tardía que la observada en los espermatozoides congelados/descongelados, debido probablemente a una mayor integridad de sus membranas, al no haber sido sometidos a “shock” térmico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ARETIO, C.** 2006. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides caninos congelados/descongelados sometidos a diferentes condiciones de capacitación *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp. 28-40.
2. **AUSTIN, C. R.** 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Australian Journal Science Research 4: 581-596.
3. **BABA, T.; WATANABE, K.; KASHIWABARA, S. I. ; ARAI, Y.** 1989. Primary structure of human proacrosin deduced from its cDNA sequence. Federation of European Biochemical Societies Letters 244: 296-300.
4. **BABA, T., KASHIWABARA, S., WATANABE, K., ITOH, H., MICHIKAWA, Y., KIMURA, K., TAKADA, M., FUKAMIZU, A., ARAI, Y.** 1989b. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. The Journal of Biological Chemistry 264: 11920–11927.
5. **BARROS, C.; MELENDEZ, J.; VALDIVIA, M.; RIOS, M.; YUNES, R.** 1993. Sperm passage through the egg coats. Biological Research 26: 417-427.
6. **BARROS, C.; CROSBY, J.A.; MORENO, R.D.** 1996. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. Cell Biology International 20: 33-39.
7. **BAVISTER, B.** 2002. Early history of in vitro fertilization. Reproduction 124: 181-196.
8. **BECKER, G.** 2007. Presencia de acrosina en espermatozoides caninos refrigerados sometidos a diferentes condiciones de capacitación *in vitro*.

Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp. 28-40.

9. **BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. ; YOUNGQUIST, R.S.** 1990. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders of canine spermatozoa motility. *Theriogenology* 34: 147-157.

10. **BRADFORD, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.

11. **BREWIS, I.A.; MORTON, I.E.; MOORE, H.D.; ENGLAND, G.C.** 2001. Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Molecular reproduction and Development* 60: 491-497.

12. **BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S.** 1994. Composition and behavior of head membrane lipid of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31: 224-238.

13. **CHANG, M.C.** 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.

14. **CHENG, F.P.; WU, J.T.; TSAI, P.T.; CHANG, C.L.T.; LEE, S.L.; LEE, W.M.; FAZELI, A.** 2005. Effects of cryo-injury on progesterone receptor (s) of canine spermatozoa and its response to progesterone. *Theriology* 64(4):844-854.

15. **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. *Animal Reproduction Science* 93: 166-172.

16. **DE LAMIRANDE, E.; O'FLAHERTY, C.** 2007. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784: 106-115.
17. **DE LOS REYES, M.; BARROS, C.** 2000. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. *Animal Reproduction Science* 58: 215 - 228.
18. **DE LOS REYES, M.** 2004. Congelación de semen canino. En: *Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latinoamericanos*. Gobello C. Editorial Gráfica Latina. Buenos Aires. Argentina. Pp. 15-24.
19. **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.
20. **DE LOS REYES, M., DE LANGE, J., ANGUITA, C., PALOMINO, J., BARROS, C.** 2009. In vitro sperm penetration through the zona pellucida of immature and in vitro mature canine oocytes using fresh, chilled and frozen dog semen. *Animal Reproduction Science* 110: 37-45.
21. **ENGLAND, G.W.C.** 1993. Cryopreservation of dog semen: A review. *Journal of Reproduction and Fertility Supplements* 47: 243-255.
22. **ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P.** 1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 46: 165-171.
23. **FASTAD, W.** 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175-186.
24. **FROMAN, D; AMANN, R; RIEK, P; OLAR, T.** 1984. Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. *Journal of Reproduction and Fertility Supplements* 70: 301-308.

25. **GABORIAU, D.; HOWES, E.; CLARK, J.; JONES, J. 2007.** Binding of sperm proacrosin/ β -acrosin to zona pellucida glycoproteins is sulphate and stereodependent. Synthesis of novel fertilization inhibitor. *Development Biology* 306: 459-477.
26. **GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. 2005.** Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64: 492-504.
27. **GUTIERREZ, M. 2007.** Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides frescos de perro sometidos a capacitación *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp. 28-39.
28. **HARRISON, R. A. P. ; FLÉCHON, J. E. 1980.** Immunocytochemical detection of acrosomal damage following cold shock: loss of acrosin from the acrosomal region of ram, bull and boar spermatozoa. *Reproduction Nutrition Development* 20: 1802-1810.
29. **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. *Molecular Reproduction and Development* 45: 378-391.
30. **HEDRICK, J. L.; URCH, U.A. ; HARDY, D.M. 1988.** The structure-function properties of the sperm enzyme acrosin. In : *Enzymes in agricultural biotechnology*. Schoemaker, Sonnet and Whitaker editors. Washington DC. ACS Books. Pp. 55-73.
31. **HOLT, W. 2000.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47-58.

32. **HOWES, L.; JONES, R. 2002.** Interactions between zona pelucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* 53: 181-192.
33. **IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. 2001.** Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55: 671-684.
34. **JONES, R. 1991.** Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin the putative egg-binding proteins from mammalian spermatozoa. *Development* 11: 1155-1163.
35. **KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.; MAHI-BROWN, C.; OVERSTREET, J. 1993.** Induction of acrosome reaction of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biology of Reproduction* 48: 841-845.
36. **KAWAKAMI, E; ARAI, T; OISHI, I. 1999.** Changes in hyaluronidase, acrosin, and n-acetylhexosaminidase activities of dog sperm after incubation. *Journal of Veterinary Medical Science* 61:183-184.
37. **LAEMMLI, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
38. **LINDE-FORSBERG, C. 1995.** Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medical Surgery (Small Animals)* 10: 48-58.
39. **MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. 1978.** Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Research* 1: 101-109.

40. **MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L.** 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57: 327-344.
41. **MORENO, R. D.; BARROS, C.** 1991. Effect of test-yolk upon human sperm acrosome reaction. *Microscopia Electrónica y Biología Celular* 15: 107-118.
42. **MORENO, R.D .; BARROS, C.** 2000. A Basic 18-amino acid peptide contains the polysulfate-binding domain responsible for activation of the boar proacrosin/acrosin system. *Biol.Reprod.* 62: 1536-1542.
43. **NISHIZONO, H.; SHIODA, M.; TADEO, T.; IRIE, T.; NAKAGATA, N.** 2004. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biology of Reproduction* 71: 973-978.
44. **NIZÁNSKI, W.** 2006. Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology* 66: 470-483.
45. **O´FLAHERTY, C.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C.** 2006. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine* 41: 528-540.
46. **PALOMINO, J., DE LOS REYES, M.** 2009. A scanning electron microscopy study of frozen/thawed dog sperm during in vitro gamete interaction. *Reproduction in Domestic Animals* 44: 278–283.
47. **PARKS, J.; GRAHAM, J.** 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209 – 219.
48. **PEÑA, A.; BARRIO, M; BECERRA, J; QUINTELA, L; HERRADON, P.** 2004. Zona pellucida binding ability and responsiveness to ionophore

challenger of cryopreserved dog spermatozoa after different period of capacitation in vitro. *Animal Reproduction Science* 84: 193-283.

49. **PETRUNKINA, A. M.; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A.; TÖPFER-PETERSEN, E.** 2003. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *Journal of Andrology* 24: 423-437.
50. **PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.** 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52: 609-616.
51. **PURDY, P.** 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63: 215-225.
52. **RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.** 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68: 138-146.
53. **ROTA, A.; PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science* 57: 199-215.
54. **SCHLEUNING, W.; HELL, R.; FRITZ, H.** 1976. Multiple forms of human acrosin: isolation and properties. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 357: 855-865.
55. **SILVA, L.; VERSTEGEN, J.** 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 44: 571-579.
56. **SIRIVAIYAPONG, S.; CHENG, F. P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W. F.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B.** 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine. *Theriogenology* 53: 789-802.

57. **SPUNGIN, B; MARGALIT, I; BREITBART, H.** 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of Cell Science* 108: 2525-2535.
58. **STORNELLI, MC; TITTARELLI, CM; SAVIGNONE, CA; STORNELLI, MA.** 2005. Efectos de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria* 25 (2): 28-35.
59. **STROM-HOLST, B.; ROTA, A.; LINDE-FOSBERG, C.** 1997. In vitro characteristic of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48: 247-256.
60. **THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A.; BALL, B. A.** 2005. Capacitation-like in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65: 1531-1550.
61. **TÖPFER-PETERSEN, E; CECHOVA, D.** 1990. Zona pellucida induces conversión of proacrosin to acrosin. *Journal of Andrology*. 13: 190-196.
62. **TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte-sperm interactions. *Animal Reproduction Science*. 60-61:653-662.
63. **TOSHIMORI, K.** 2000. Sperm plasma membrane modifications associated with fertilization in mammals. *The Journal Reproduction and Development* 46: 65-78.
64. **TOWBIN, H.; STAEHELIN T.; GORDON J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Acadademy of Science U.S.A* 76: 4350-4359.

65. **TRATER, R.; READ, JA.; JONES,R.; BRADY,L.** 2000. Effector sites in the three-dimensional structure of mammalian sperm β -acrosin. *Structure* 8:1179-1188.
66. **TSUTSUI, T.; TEZUKA, T.; MIKASA, Y.; SUGISAWA, H.; KIRIHARA, N.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.** 2003. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. *Journal of Veterinary Medical Science* 65: 307-312.
67. **VALDIVIA, M.; YUNES, R.; MELENDEZ, J.; DE IONNES, 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. *Molecular Reproduction Development*. 37: 216-222 .
68. **VISCONTI,P.; NING,X; FORNES,MW; ALVAREZ,J; STEIN,P; CONNORS, S; KOOPF,G.** 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation *Development Biology* 214: 429-436.
69. **WATSON, P.F.** 2000. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 481-492.
70. **YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M; NAITO, K.; TOYODA, Y.** 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction* 46: 853-858.
71. **YANAGIMACHI, R.** 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E; Neil, JD. (Eds). *The Physiology of Reproduction*. 2^a Edición. Editorial Raven Press. Nueva York. EE.UU. Pp.189-317.