



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

**“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ACROSINA EN
ESPERMATOZOIDES CANINOS CONGELADOS-
DESCONGELADOS SOMETIDOS A DIFERENTES
CONDICIONES DE CAPACITACIÓN *IN VITRO*.”**

Carolina Beatriz Aretio León

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: PROYECTOS ENL 05/8 DID; FONDECYT 1060602

SANTIAGO, CHILE
2006



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

**“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ACROSINA EN
ESPERMATOZOIDES CANINOS CONGELADOS-
DESCONGELADOS SOMETIDOS A DIFERENTES
CONDICIONES DE CAPACITACIÓN *IN VITRO*.”**

Carolina Beatriz Aretio León

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.
PROFESOR CONSEJERO : DRA. BESSIE URQUIETA M.
PROFESOR CONSEJERO : DR. VICTOR MARTINEZ M.

SANTIAGO, CHILE
2006

Esta Memoria de Título se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal, Departamento de Fomento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Contó con el financiamiento de los Proyectos ENL 05/8 DID y FONDECYT 1060602.

A mis padres y familia.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a mi profesora guía Dra. Mónica de los Reyes Solovera, por su permanente apoyo, sus consejos y constante estímulo durante la realización de esta memoria de título.

A los profesores colaboradores Dra. Bessie Urquieta Mangiola y el Dr. Victor Martinez Moncada.

A mis compañeras de laboratorio Rose, Gisela y Jennifer, por su constante ayuda y comprensión durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Claudio Barros por facilitarnos el microscopio de Epifluorescencia.

A los miembros del Laboratorio de Embriología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, especialmente a: Jaime Palomino y Pedro Cortés por su desinteresada colaboración.

Al grupo 4A de la Facultad de Cs. Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile por facilitar animales para la toma de muestra.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en la realización de esta memoria de título.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
REVISION BIBLIOGRAFICA	7
• Inseminación Artificial	8
• Criopreservación	9
• Extensores para la congelación de espermatozoides caninos	12
• Capacitación Espermática	13
• Acrosina	20
HIPOTESIS	22
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y METODOS	23
• Obtención y Congelación de Semen	23
• Inmunofluorescencia	25

- Fijación Espermatozoides	25
- Aplicación de Anticuerpos	25
- Observación Muestras	26
• Análisis Estadístico	26
RESULTADOS	28
• Inmunomarcaje	28
• Motilidad Espermática	31
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFIA	41

RESUMEN

En espermatozoides caninos criopreservados, existen pocos antecedentes respecto de la dinámica del proceso de Capacitación Espermática (CE) y de los factores que la influyen. La Reacción Acrosómica (RA), paso final de la CE, permite la liberación de la enzima acrosina, proteasa presente en el acrosoma de los espermatozoides mamíferos, que ha sido involucrada en la unión y penetración de la Zona Pelúcida (ZP). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del tiempo y la temperatura sobre la cinética de la liberación de la enzima acrosina a través de su localización, mediante inmunofluorescencia indirecta.

Los eyaculados fueron obtenidos mediante manipulación digital, siendo evaluados a través de microscopía de contraste de fases, para el análisis subjetivo de Motilidad Progresiva (MP) y el recuento de la concentración espermática, para luego ser congelados con diluyente en base a fructosa, TRIS, ácido cítrico, 20% de yema de huevo y 5% de glicerol y descongelados en agua a 60° C por 8 segundos. Los espermatozoides descongelados fueron capacitados utilizando el Medio de Capacitación Canino (CCM) a diferentes tiempos y temperaturas de incubación. Posteriormente, las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia, mediante la fijación de los espermatozoides y la aplicación de los anticuerpos; como primer anticuerpo se utilizó el anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10. La evaluación de los espermatozoides se realizó observando la presencia de la enzima acrosina, de acuerdo a la marca fluorescente a nivel acrosomal mediante Microscopía de Epifluorescencia (Nikon Optihot 2). Los espermatozoides caninos congelados mostraron la presencia de acrosina sólo a nivel acrosomal. Se pudo identificar 2 patrones según la presencia de la marca: a) sin marca fluorescente o patrón nulo y b) con marca fluorescente o patrón marcado. Al patrón nulo, corresponderían los espermatozoides que han experimentado la RA y por lo tanto, han liberado la enzima acrosina desde el acrosoma, mientras que al patrón marcado pertenecerían aquellos espermatozoides que no han cursado la RA y contienen la enzima en el interior del acrosoma.

Al incubar los espermatozoides en medio capacitante (CCM), por periodos de 0, 30, 60 y 90 minutos y a temperaturas de 20 y 37° C se observó que el porcentaje de espermatozoides reaccionados o sin marca fluorescente aumentó a través del tiempo desde 29,71% a 65,43% a 20° C y desde 50,29% a 73,43% a 37° C de incubación.

La motilidad espermática fue medida subjetivamente, mediante microscopía de contraste de fases en cada protocolo de capacitación (tiempo y temperatura) y se utilizó como medida de la viabilidad espermática. Los resultados de este estudio indicaron que la motilidad disminuyó a medida que aumentó el tiempo y la temperatura de incubación, desde un 67,14% a un 41,43% a 20° C ($p < 0,05$) y desde un 45% a un 25,71% a 37° C ($p < 0,05$).

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la ocurrencia de la liberación de la enzima acrosina en espermatozoides caninos congelados es afectada tanto por el tiempo de CE, como por la temperatura de incubación, traduciéndose en mayores porcentajes de liberación o pérdida de la enzima. Asimismo, la motilidad espermática disminuye a través del tiempo y al aumentar la temperatura de incubación.

ABSTRACT

There are few reports about sperm capacitation in cryopreserved canine spermatozoa and the factors involved in this process. The final step of capacitation, known as Acrosome Reaction (AR), culminates with the release of the enzyme acrosin, a protease contained in the acrosome of mammalian spermatozoa involved in the binding and penetration of the Zona Pellucida (ZP). The aim of this study was to determine the effect of time and temperature on the kinetics of acrosin release, using an indirect immunofluorescence assay for its location.

Semen was collected using digital stimulation. Each ejaculate was evaluated for Progressive Motility (MP) which was subjectively determined. Spermatozoa were then frozen in a Tris-fructose-citric acid extender, containing 20% of egg yolk and 5% glycerol. Samples were thawed in water at 60° C for 8 seconds. Frozen-thawed sperm were capacitated using Canine Capacitation Medium (CCM) for different periods and incubation temperatures, after which they were assessed for immunofluorescence stain using human antiacrosin monoclonal antibody C5F10. The presence of fluorescent stained acrosin in the acrosomal region of spermatozoa was evaluated through Epifluorescence Microscopy (Nikon Optihot 2). Two sperm patterns were possible to determine according to the acrosin immunolabel in the acrosome region of each spermatozoa: a) without fluorescent immunolabel or no labeled pattern and b) with fluorescent immunolabel or labeled pattern. The first pattern responded to spermatozoa that have undergone AR and therefore acrosin enzyme was released from the acrosome, while those spermatozoa which have not undergone the AR would correspond to the second pattern containing the enzyme inside the acrosome.

Sperm incubation in CCM during 0, 30, 60 and 90 minutes at both temperatures (20 and 37° C) increased the percentage of reacted spermatozoa or without fluorescent label from 29.71% to 65.43% and from 50.29% to 73.43% for 20° C and 37° C, respectively. In each capacitation procedure (considering time and temperature) sperm viability was subjectively determined through sperm motility, which was established using a phase-contrast

microscope. The results showed a decreased motility (from 67.14% to 41.43% ($p < 0, 05$) and from 45% to 25.71% ($p < 0, 05$) at 20° C and 37° C, respectively) when incubation time and temperature increased.

Based on the results obtained here, it is possible to conclude that the release of acrosine enzyme in frozen dog spermatozoa is affected by sperm capacitation time as well as by incubation temperature, resulting in an increased of enzyme release, loosing it from the acrosome as temperature and time increased. Moreover, sperm motility decreases through out the time and also when the incubation temperature rises.

INTRODUCCION

El aumento que ha experimentado la utilización de semen criopreservado, hace necesaria la investigación de los efectos que genera el proceso de criopreservación sobre los espermatozoides, que se traducirían en el detrimento de su capacidad fecundante (Parks y Graham, 1992; Watson, 2000), factor crucial en términos de logro de preñez. En este contexto, cobran importancia estudios que permitan determinar los daños en la función espermática que puedan afectar los procesos involucrados en la interacción gamética y fecundación.

La adecuada interacción de los gametos y posterior fecundación dependen en gran medida del proceso de Capacitación Espermática (CE) y Reacción Acrosómica (RA) que deben experimentar previamente los espermatozoides y que ocurre, naturalmente, dentro del tracto reproductivo de la hembra (Austin, 1951; Chang, 1951; Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996). Este proceso ha podido realizarse *in vitro* en diversas especies, incluidos los caninos, lo que ha permitido estudiar más detalladamente estos eventos (Mahi y Yanagimachi, 1978; Rota *et al.*, 1999; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006).

Durante la capacitación, el espermatozoide adquiere el movimiento hiperactivado, con lo cual la velocidad y fuerza de batir del flagelo aumenta (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Rota *et al.*, 1999; Petrunkina *et al.*, 2003). Además, experimenta la RA (Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000), evento que genera la exocitosis del contenido acrosomal, liberándose, entre otros compuestos, la enzima acrosina (Barros *et al.*, 1996; Cortés *et al.*, 2006), glicoproteína serino-proteasa que, según diversos estudios, ayuda al espermatozoide a unirse y penetrar la Zona Pelúcida (ZP) del ovocito (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000). Se ha sugerido que los patrones de liberación de la acrosina, determinados con técnicas de inmunocitoquímica en espermatozoides de cobayo, humano, hámster, conejo y bovino, representarían diferentes estados de la RA de estos espermatozoides (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000).

Se ha determinado que el acrosoma en espermatozoides que han sido congelados, sería una de las estructuras que se verían más fuertemente afectadas luego de la congelación y descongelación (De los Reyes *et al.*, 2002; De los Reyes, 2004; Cheng *et al.*, 2005).

Estudios previos han sugerido que la menor viabilidad pos descongelación de los espermatozoides que han sido criopreservados, respecto a los eyaculados frescos, se debería en parte, a que los espermatozoides experimentarían cambios similares a los ocurridos en la CE durante el proceso de congelación y descongelación (Watson, 1995; Fuller y Whittingham, 1997; Watson, 2000). Durante la criopreservación se producen alteraciones a nivel de la membrana, especialmente en los canales de calcio, aumentando el influjo de calcio a la célula, del cual es dependiente el proceso de capacitación (Mahi y Yanagimachi, 1978; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). Sin embargo, aun no está claro si los espermatozoides que han sido congelados experimentan cambios debido a la CE propiamente tal o si dichas alteraciones permiten el paso directo a la exocitosis acrosomal (Watson, 2000).

Debido a que la acrosina es una de las enzimas más abundantes del acrosoma y es liberada durante la RA, su estudio en espermatozoides criopreservados cobra importancia en orden de entender la dinámica de la RA en espermatozoides criopreservados (Barros *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; De los Reyes, 2004). En la especie canina existen pocos estudios en relación a la acrosina; recientemente, se ha podido detectar su presencia en espermatozoides de perro no capacitados, frescos y congelados, mediante el anticuerpo monoclonal anti acrosina-proacrosina humana C5F10 (Cortés *et al.*, 2006). La actividad enzimática de acrosina canina, junto con otras enzimas acrosomales en espermatozoides frescos, aumentaría en relación al tiempo de incubación en medio de capacitación (Kawakami *et al.*, 1999). No ha sido descrito aun la presencia y liberación de esta enzima durante el proceso de capacitación en esta especie y su investigación permitirá profundizar los conocimientos en relación a los eventos involucrados directamente en la capacidad fecundante de los espermatozoides caninos que han sido criopreservados, lo que ayudará a entender mejor la disminución en su capacidad fértil.

REVISION BIBLIOGRAFICA

La investigación en el área de la reproducción canina se ha incrementado fuertemente en los últimos años, esto asociado al gran interés que actualmente se desarrolla en el mundo entero en relación al ámbito de las mascotas (De los Reyes, 2004).

Sin embargo, el desarrollo de las biotecnologías reproductivas ha sido menor en esta especie en comparación con otros animales domésticos (Farstad, 2000), debido a variadas razones, donde la carencia de interés comercial y el bajo nivel de fertilidad obtenido, serían algunas de las más importantes (Parks y Graham, 1992; Gobello y Corrada, 2004). Además, las particulares características fisiológicas que presenta el gameto de las hembras caninas en comparación con otros mamíferos, dadas por el ambiente folicular y el estado meiótico del ovocito en la ovulación, han complicado la aplicación del conocimiento obtenido en otras especies (Parks y Graham, 1992; England, 1993; Farstad, 2000; De los Reyes, 2004; Gobello y Corrada, 2004). Es por esto que, en la práctica, las técnicas reproductivas asistidas en caninos se han limitado mayormente al uso de Inseminación Artificial (IA) y Criopreservación de semen, mientras que las tecnologías más avanzadas, tales como Maduración de Ovocitos *in vitro* (MIV), Fecundación *in vitro* (FIV), Producción *in vitro* de Embriones (PIV) y Transferencia de Embriones (TE), aun están sólo en el campo de la investigación en esta especie (England, 1993; Farstad, 2000; De los Reyes, 2004; Gobello y Corrada, 2004).

La utilización de la IA y Criopreservación de semen en caninos abre diferentes perspectivas en relación a la transferencia de material genético entre países, aumentando la variabilidad genética y el tiempo de utilización de machos reproductores, ya que permiten preservar genes y utilizarlos incluso después de la muerte del animal (De los Reyes, 2004; Gobello y Corrada, 2004). Además, estudios realizados en la especie canina permiten obtener conocimientos aplicables a otras especies de cánidos silvestres, lo que adquiere mayor importancia en aquéllas que se encuentran en peligro de extinción (Parks y Graham, 1992; England, 1993; Farstad, 2000).

Inseminación Artificial

La IA es una de las biotecnologías reproductivas esenciales para el mejoramiento reproductivo, preservación de la biodiversidad y el desarrollo de investigaciones científicas (De los Reyes, 2004; Gobello y Corrada, 2004), además de ser considerada una herramienta clínica en la especie canina cuando el macho o la hembra presentan dificultades para la cruce en forma natural (De los Reyes, 2004). Esta técnica consiste básicamente en manipular el encuentro entre los ovocitos y espermatozoides, introduciendo instrumentalmente el semen, el cual puede estar procesado como fresco, refrigerado o congelado, dentro del tracto reproductivo de la hembra.

La primera IA exitosa en caninos fue realizada en el año 1780, por el científico italiano Lazaro Spallanzani utilizando semen fresco, logrando obtener el primer nacimiento de cachorros generados por IA (England, 1993; Farstad, 2000). La IA se ha ido desarrollando en caninos con semen fresco (Tsutsui *et al.*, 1988; Linde-Forsberg, 1995), refrigerado y congelado (Linde-Forsberg, 1995; Linde-Forsberg *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 2003), observándose que el semen congelado posee una menor fertilidad, generando menores tasas de preñez, en comparación con el semen fresco y refrigerado (Tsutsui *et al.*, 1988; Hammerstedt *et al.*, 1990; Hay *et al.*, 1997; Linde-Forsberg, 1995; Thomassen *et al.*, 2001; Eilts, 2005), lo que es atribuido principalmente a la disminución significativa de la viabilidad espermática que provoca el proceso de criopreservación (Parks y Graham, 1992; England, 1993; Pinto *et al.*, 1999; Watson, 2000).

En términos generales, en orden de obtener una mayor tasa de preñez al utilizar espermatozoides congelados-descongelados, la IA debe realizarse intrauterinamente y cercana al momento de la ovulación (England, 1993; Rota *et al.*, 1999; Farstad, 2000; Watson, 2000) debido a que a medida que la inseminación se realiza más cercana al lugar de la fecundación, sería necesario un menor número de espermatozoides viables para lograr mayores porcentajes de fertilidad (England, 1993; Watson, 2000); así también, la mayor cercanía entre la inseminación y el momento de la ovulación, permitiría obtener mayores porcentajes de preñez (Watson, 2000). La fertilidad del semen criopreservado declinaría

dramáticamente, en comparación con el semen fresco y refrigerado que mantienen su fertilidad por un mayor periodo de tiempo (Ström Holst *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002; Tsutsui *et al.*, 2003; Eilts, 2005).

Criopreservación de semen

Los espermatozoides fueron las primeras células satisfactoriamente congeladas y descongeladas, debido al descubrimiento del glicerol como crioprotector (Polge *et al.*, 1949). El glicerol es un crioprotector permeable que, a pesar de sus ventajas en la congelación de espermatozoides de variadas especies (Watson, 2000; De los Reyes, 2004), genera, al igual que otros crioprotectores, un efecto citotóxico que está en directa relación con la concentración a la cual es utilizado (Parks y Graham, 1992; England, 1993). Su utilización como crioprotector ha sido determinante para el desarrollo de la IA con semen congelado, ya que es una sustancia esencial para la sobrevivencia de los espermatozoides criopreservados (Parks y Graham, 1992; Sánchez *et al.*, 2002). La sobrevivencia celular durante el proceso de criopreservación depende de la interacción entre el crioprotector y la tasa de congelación y descongelación (Hay *et al.*, 1997; Rota *et al.*, 1999).

La criopreservación de espermatozoides, así como la mantención de la capacidad fecundante de los mismos, ha sido descrita como exitosa en variadas especies (Farstad, 2000; Holt, 2000^a; Holt, 2000^b). Sin embargo, la susceptibilidad a las bajas temperaturas varía según la especie. Es así como, por ejemplo, los espermatozoides de verraco son más sensibles al shock térmico que los espermatozoides de otras especies como los de conejo, humano y perro (Bouchard *et al.*, 1990). Se ha descrito que los espermatozoides caninos deben su mayor resistencia a una menor relación de ácidos grasos saturados y poliinsaturados unidos a los fosfolípidos de membrana, lo que los haría más resistentes (De los Reyes, 2004). No obstante, los espermatozoides, independiente de la especie, experimentan daños durante el proceso de congelación y descongelación (Parks y Graham, 1992) que se traducen en la menor fertilidad que posee el semen congelado en comparación con el semen fresco y refrigerado (Parks y Graham, 1992; England, 1993; Pinto *et al.*, 1999; Watson, 2000; Thomassen *et al.*, 2001).

Esta menor fertilidad se debería a la menor viabilidad y funcionalidad de la población de espermatozoides sobrevivientes posterior a la descongelación, producto de las alteraciones funcionales y estructurales que sufre la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide durante este proceso, los cuales podrían promover cambios relacionados con la CE y apoptosis celular (Parks y Graham, 1992; Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000; Cortés *et al.*, 2006). De esta forma, parte de la población sobreviviente de espermatozoides se encontraría desestabilizada y susceptible de perder la capacidad de fecundar ovocitos (Rota *et al.*, 1999).

La membrana plasmática del espermatozoide es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, funciones que permiten al espermatozoide adaptar su metabolismo al medio en que se encuentra, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Hammerstedt *et al.*, 1990). Por esto, la mantención de la integridad de membrana no sólo es fundamental para el metabolismo del espermatozoide, sino que también para una adecuada CE y RA, jugando un rol específico en la fertilidad del gameto (Yanagimachi, 1994; Watson, 2000).

La naturaleza del daño de membrana generado por las bajas temperaturas no está totalmente clara, pero se cree sería debido a un reordenamiento de los lípidos de membrana que tendría lugar durante la congelación y la descongelación del semen y que afectaría las asociaciones entre lípidos y proteínas necesarias para una adecuada función de la membrana espermática (Bouchard *et al.*, 1990; Hammerstedt *et al.*, 1990; Parks y Graham, 1992; England, 1993; Linde-Forsberg, 1995; Watson, 2000).

Durante la criopreservación se generaría la separación lateral de la fase lipídica con las proteínas integrales, debido a que más del 90% del agua osmóticamente activa es removida desde, la célula afectándose la estructura de membrana (Parks y Graham, 1992), daño que sería parcialmente revertido durante la descongelación (Buhr *et al.*, 1994; De los Reyes, 2004). Sin embargo, las fracturas celulares generadas por la criopreservación sugieren que la agrupación de las proteínas de membrana durante la fase de separación de lípidos no es totalmente reversible, alterándose su función de reconocimiento de receptores y la

interacción ligando-receptor, lo que afectaría la relación del espermatozoide con el epitelio oviductal y las cubiertas ovocitarias (Watson, 2000; Cheng *et al.*, 2005).

Las alteraciones estructurales y funcionales de la membrana espermática 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).

El estrés térmico puede considerarse como un estado extremo de estrés celular continuo, el que se cree perduraría bajo los 0° C y que entre los 5 y -15° C tiene su máxima expresión, considerándose este rango de temperatura como el momento en el cual se generarían la mayor cantidad de alteraciones de membrana. Otros autores afirman que los primeros daños de membrana ocurren entre los -15 y -60° C, durante la congelación y descongelación y no durante su conservación en nitrógeno líquido (England, 1993).

Diferentes son los componentes de la membrana espermática que experimentan alteraciones debido al estrés térmico, es así como las proteínas de membrana que se encuentran unidas por fosfolípidos experimentan cambios estructurales que se traducen en una alteración funcional, tal como ocurre con las proteínas que actúan como canales de iones. Esto hace que la membrana se torne más permeable luego de la congelación (Watson, 2000). Elementos del citoesqueleto también son sensibles a las bajas temperaturas. Como producto de la criopreservación se genera la depolimerización prematura de los filamentos de actina, que se cree sería un paso esencial que permitiría el acercamiento de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa promoviendo la RA (Spungin *et al.*, 1995). Por esto se ha postulado que la congelación contribuiría a una fusión desorganizada de ambas membranas (Watson, 2000).

Por otra parte, los sistemas de regulación de calcio también se verían afectados por el enfriamiento celular, generando alteraciones que en ocasiones son incompatibles con la viabilidad del espermatozoide (Watson, 2000; Cortés *et al.*, 2006). Sin embargo, en los espermatozoides caninos no se ha observado que el influjo de calcio durante el enfriamiento sea tóxico, como lo es en otras especies animales, por lo que se considera a

los espermatozoides caninos relativamente más resistentes a la criopreservación (Rota *et al.*, 1999).

Otra causa de las alteraciones estructurales y funcionales que experimentan los espermatozoides son las tasas de congelación y descongelación, las cuales determinan en parte la sobrevivencia de los espermatozoides. De estas tasas depende la formación y disolución de cristales de hielo intra y extracelulares durante el proceso de criopreservación, dañinos para los espermatozoides ya que generan estrés osmótico (Watson, 2000). Cuando se utiliza una adecuada velocidad de congelación y la célula es permeable al agua, se produce una deshidratación celular progresiva, que se traducirá en un adecuado funcionamiento celular pos descongelación (England, 1993; Watson, 2000). Esto se logra cuando la tasa de congelación es lo suficientemente lenta como para permitir una adecuada salida del agua desde el interior de la célula, por osmosis, previniéndose la formación de hielo intracelular y cuando es lo suficientemente rápida como para minimizar el efecto negativo de la exposición de la célula a altas concentraciones de solutos (England, 1993; De los Reyes, 2004).

Por otro lado, la adición y remoción del crioprotector también genera un importante estrés osmótico y tóxico sobre la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de criopreservación. El daño dependerá, entre otras cosas, del crioprotector utilizado y de la permeabilidad de la membrana celular a éste (Hammerstedt *et al.*, 1990; England, 1993; Silva y Verstegen, 1995; Watson, 2000) siendo el glicerol el más utilizado para la congelación de espermatozoides de perro (De los Reyes, 2004). El glicerol es osmóticamente activo e ingresa a la célula reemplazando al agua, generando cambios volumétricos durante la congelación y descongelación celular que en ocasiones exceden los fisiológicamente tolerables (Parks y Graham, 1992; Watson, 2000).

Extensores para la congelación de espermatozoides caninos

Para reducir los daños generados por el enfriamiento, la congelación de los espermatozoides requiere de un medio que le proporcione a los gametos la energía y

protección necesaria durante el proceso de criopreservación. Es así como los extensores utilizados en el proceso contienen soluciones buffer como el TRIS, azúcares (glucosa, fructosa, sucrosa, etc.) y sales como citrato de sodio, que se han demostrado son de importancia en la sobrevivencia espermática y en la mantención de la motilidad de los espermatozoides caninos congelados (Pinto *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999), debido a que otorgan energía exógena a los espermatozoides y actúan como componentes osmóticos (England, 1993). Los agentes crioprotectores son sustancias esenciales dentro de los extensores, ya que permiten la sobrevivencia de los espermatozoides durante el proceso de congelación, protegiendo a la célula de daños causados por el enfriamiento (England, 1993; De los Reyes, 2004). El glicerol y algunos azúcares no permeables de bajo peso molecular han sido descritos como exitosos en la congelación en la especie canina y en otras especies animales (Parks y Graham, 1992; Watson, 2000; De los Reyes *et al.*, 2002; De los Reyes, 2004).

Además, los extensores contienen sustancias como la yema de huevo o la leche descremada, que actúan como protectores celulares frente a los efectos nocivos de las bajas temperaturas a las cuales son sometidos los espermatozoides (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Tsutsui *et al.*, 2003). La fracción lipoproteica de baja densidad (fosfolípidos) presente en la yema de huevo, evitaría la pérdida de fosfolípidos desde la membrana espermática y modularía los efectos dañinos generados por los cambios de temperatura, previniendo la disrupción grave de la membrana (Parks y Graham, 1992; England, 1993; Linde-Forsberg, 1995; Linde-Forsberg *et al.*, 1999). La concentración requerida depende de la especie, pero es comúnmente utilizada en concentraciones de 3-25% (v/v) (England, 1993).

Capacitación espermática

El espermatozoide mamífero, después de ser eyaculado, debe permanecer cierto tiempo dentro del tracto reproductivo femenino, para experimentar una serie de modificaciones bioquímicas, denominadas genéricamente CE (Austin, 1951; Chang, 1951; Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996), proceso que llevará a la hiperactivación del gameto y a la RA,

eventos que lo transformarán en un espermatozoide con capacidad de fertilizar (Yanagimachi, 1994). Sólo los espermatozoides que han experimentado el proceso de CE son capaces de reconocer el ovocito y responder adecuadamente ante las señales que éste emite (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001), por lo que es considerado como un proceso desestabilizante positivo que necesariamente debe experimentar el espermatozoide mamífero (Barros *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

Durante la CE el espermatozoide experimenta un reordenamiento de la arquitectura de los fosfolípidos de su membrana plasmática y un aumento en la fluidez de la misma, dado por el eflujo de colesterol y por procesos de fosforilación de proteínas de membrana (Petrunkina *et al.*, 2004). El ión bicarbonato activa la adenilciclase, generando el incremento intracelular del Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPC), el que afectaría funciones celulares, presumiblemente mediante la fosforilación de proteínas específicas. La fosforilación de la tirosina, proteína de membrana que estaría involucrada en la capacitación e hiperactivación espermática, ocurre en las primeras etapas de la CE y es aparentemente regulada por una protein quinasa dependiente de AMPC (Petrunkina *et al.*, 2003; Petrunkina *et al.*, 2004). Los antígenos de membrana experimentan modificaciones en su estructura y posición, migrando desde la cola hacia la cabeza espermática y viceversa, para lograr posteriormente un reconocimiento adecuado con el ovocito (Yanagimachi, 1994). A su vez, se produce un cambio de la actividad enzimática y de las concentraciones de iones intracelulares, como el calcio (Ca^{2+}), generándose un influjo de calcio desde el espacio extracelular, debido a la mayor permeabilidad que adquiere la membrana (Sirivaidyapong *et al.*, 2000). El pH intracelular también se ve afectado, generándose la hiperpolarización de la membrana plasmática (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Petrunkina *et al.*, 2003).

Además, el espermatozoide capacitado cambia los patrones del movimiento flagelar, hiperactivándose, evidenciando un aumento de la amplitud y del vigor del movimiento del flagelo (Yanagimachi, 1994; Brewis *et al.*, 2001; Bavister, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003). La hiperactivación le permitiría despegarse de las células oviductales, interactuar y

atravesar las cubiertas que rodean al ovocito, permitiéndole llevar a cabo la fecundación (Yanagimachi, 1994; Barros, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

La culminación de la CE es la RA, fenómeno demostrado por primera vez por Austin y Bishop (1958). En este proceso, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide se fusionan produciéndose posteriormente una fenestración progresiva, permitiendo la salida gradual del contenido acrosomal al medio extracelular (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2006), liberándose de esta forma las enzimas acrosomales (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Wassarman, 1999; Cortés *et al.*, 2006).

La enzima más abundante del acrosoma es la acrosina, que le confiere al espermatozoide la capacidad de unirse y luego penetrar la ZP, para finalmente fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000).

- Capacitación *in vivo*:

In vivo, la CE ocurre en el interior del tracto reproductivo de la hembra (Austin, 1985; Smith y Yanagimachi, 1989; Yanagimachi, 1994); en la especie canina, se ha descrito que se llevaría a cabo en el epitelio columnar del istmo (Petrunkina *et al.*, 2004) y que sería responsable de la iniciación y modulación de la CE ya que presenta un gran número de receptores adrenérgicos y cuenta con irrigación sanguínea directa desde la arteria uterina y ovárica, lo que sugiere que esta zona sería sensible a ligeros cambios en el perfil hormonal (Yanagimachi, 1994; Kawakami *et al.*, 1998; 2000). Esto tendría especial importancia en la especie canina, ya que estudios *in vitro* en espermatozoides caninos han permitido demostrar que, tanto las proteínas de ZP, como la progesterona generan una respuesta del espermatozoide caracterizada por un gradual, pero marcado influjo de calcio al interior de su acrosoma (Brewis *et al.*, 2001). El aumento en las concentraciones de calcio sería clave para gatillar la cascada de eventos que involucra la RA (Brewis *et al.*, 2001; Bavister, 2002). Por esto se postula que los receptores de progesterona presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides caninos jugarían un rol muy importante en esta especie,

debido a la alta concentración de esta hormona presente en sangre periférica de la hembra canina durante el proceso de fecundación, en comparación con la de otras especies animales (Brewis *et al.*, 2001). Esto permite especular que en el sitio de la fecundación la concentración de progesterona también sería mayor y estimularía la RA de los espermatozoides caninos, por lo cual la mayoría de éstos alcanzarían el ovocito en estado reaccionado (Brewis *et al.*, 2001; Gobello y Corrada, 2004; Cheng *et al.*, 2005). Por su parte, la ZP genera reacciones de fosforilación y desfosforilación que activarían a los espermatozoides, induciendo la RA (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). Estas reacciones ocurrirían en un tiempo y orden exacto para una adecuada coordinación entre CE y maduración ovocitaria para lograr una fecundación exitosa (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Petrunkina *et al.*, 2003). Algunos estudios en capacitación de espermatozoides caninos señalan que en las primeras etapas de la capacitación se fosforilan las proteínas de la pieza media del espermatozoide, generándose de esta forma la motilidad hiperactivada; la fosforilación de las proteínas de la cabeza del espermatozoide parece completar una serie de eventos desestabilizadores que corresponden a la capacitación, culminando en la RA espontánea (Petrunkina *et al.*, 2003).

- Capacitación *in vitro*

In vitro esta condición (CE), puede ser inducida con medios especiales (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yamada *et al.*, 1992; Kawakami *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994; Rota *et al.*, 1999). Diferentes medios inductores se han utilizado en la capacitación de espermatozoides, como las soluciones Tyrode y Krebs-Ringer, con diferentes suplementos, como albúmina y sustratos energéticos (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yamada *et al.*, 1992; Yanagimachi, 1994; Hewitt y England, 1999; Farstad, 2000). En la especie canina se han utilizado diversos medios dentro de los cuales se encuentran el Tyrode modificado (TYH) (Yamada *et al.*, 1992), el Medio de Capacitación Canino (CCM) (Mahi y Yanagimachi, 1978), el Medio de Capacitación Canino Modificado (MCCM) (Sirivaidyapong *et al.*, 2000), el Medio de Capacitación Mínimo (MCM) y el BWW (Mahi y Yanagimachi, 1978). Así también, ha sido demostrado que el líquido folicular y oviductal tendrían una acción inductora en la capacitación de los espermatozoides caninos (Kawakami *et al.*, 1998;

Metcalf, 1999), similar a lo que ocurre en otras especies animales (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994; Bavister, 2002).

El CCM es el medio capacitante artificial más utilizado en la especie canina y sus constituyentes han demostrado ejercer diferentes acciones sobre la estructura del espermatozoide para facilitar la ocurrencia de la CE y RA (Mahi y Yanaginachi, 1978; Kawakami *et al.*, 1993; Rota *et al.*, 1999). Entre los componentes esenciales de este medio se encuentran la albúmina, la glucosa, el calcio y el bicarbonato de sodio como regulador de pH (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yamada *et al.*, 1992; Hewitt y England, 1999; Farstad, 2000).

Estudios en espermatozoides caninos han demostrados que éstos no sobreviven en medios inductores libres de albúmina. Esta proteína ayuda a inducir la RA, favoreciendo el eflujo de colesterol (Yanagimachi, 1994; Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000). Su ausencia produce un efecto detrimental sobre la motilidad espermática y hace que los espermatozoides se adhieran a la superficie de los recipientes plásticos, haciendo más difícil su manejo (Mahi y Yanagimachi, 1978; Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Bavister, 2002).

La glucosa ejerce un efecto similar a la albúmina (Mahi y Yanagimachi, 1978), favoreciendo la ocurrencia de la RA (Sirivaidyapong *et al.*, 2000). Sin embargo, su ausencia en el medio capacitante no afecta la motilidad espermática, pero sí disminuye la ocurrencia de la RA (Mahi y Yanagimachi, 1978; Farstad, 2000).

El calcio es fundamental en el medio de capacitación; su influjo a la célula activa sistemas enzimáticos que facilitan la fusión de la membrana plasmática y acrosomal externa. Además, estimula la adenilciclasa que gatilla la motilidad hiperactivada (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). La ausencia de este ión, disminuye notablemente la sobrevivencia de los espermatozoides e impide que se produzca la exocitosis acrosomal (Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001).

El pH del medio de capacitación cumple un rol importante en la RA y la posterior penetración de la ZP. El aumento del pH del medio de capacitación, al incrementar la concentración de bicarbonato, facilita la RA; sin embargo, al acercarse el pH del medio capacitante a 8, la motilidad espermática disminuye, reduciendo la capacidad de los espermatozoides para penetrar la ZP (Mahi y Yanagimachi, 1978; Sirivaidyapong *et al.*, 2000). Además, el bicarbonato activaría el sistema adenilciclasa (Petrunkina *et al.*, 2003).

La utilización de los espermatozoides en estudios de fecundación *in vitro* hace necesaria la mantención de la integridad acrosomal, ya que si éstos resultan dañados pueden experimentar precozmente la RA, perdiendo la capacidad de penetrar la ZP (Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

Estudios en espermatozoides criopreservados indican que los procesos a los cuales son sometidos generan cambios estructurales y funcionales en la membrana plasmática que serían equivalentes a la CE (Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000), siendo en parte las bajas temperaturas las responsables de esta desestabilización de la membrana (Watson, 2000).

A medida que disminuye la temperatura, se limita el movimiento de los fosfolípidos de membrana incrementándose el calcio intracelular lo que induciría la RA (Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Watson, 2000). Se generaría, además, la depolimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto, que facilitaría la aproximación, fusión y posterior fenestración de las membranas plasmática y acrosomal externa, lo que finalmente desencadenaría la exocitosis acrosomal (Spungin *et al.*, 1995; Watson, 2000).

Es así que algunas de las alteraciones que experimenta la membrana espermática durante el proceso de criopreservación son consideradas por algunos autores como cambios similares a los que ocurren durante la CE, también llamados cambios de “criocapacitación” (Watson 1995; Fuller y Whittingham, 1997).

Hay evidencia de que los espermatozoides refrigerados y congelados de toro (Wheeler y Seidel, 1987), ratón (Fuller y Whittingham, 1997) y caninos (Rota *et al.*, 1999) alcanzan el estado capacitado en un menor lapso que los espermatozoides frescos, cuando son incubados en medios capacitantes (Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000), presentando una reactividad de membrana equivalente a la de un espermatozoide capacitado (Watson, 1995; Rota *et al.*, 1999; Holt, 2000^a; Holt, 2000^b); sin embargo, aun no se sabe si estos cambios son producto de la capacitación propiamente tal o si ellos permiten al espermatozoide el paso directo a la RA, sin haber cursado la CE (Watson, 1995). Se ha demostrado que espermatozoides refrigerados tienen un incremento del calcio intracelular similar al que ocurre en los espermatozoides capacitados. No obstante, se ha determinado que el patrón de fosforilación de tirosina en espermatozoides congelados de cerdo, no es igual al que experimentan los espermatozoides que se capacitan naturalmente (Watson, 2000).

En semen congelado de perro se ha observado, además un incremento significativo de espermatozoides reaccionados entre las 0 y 2 horas de incubación en medio capacitante, evaluados mediante el ensayo de Clortetraciclina (CTC) (Rota *et al.*, 1999), tiempo menor que en espermatozoides frescos. En otras especies, como el ratón, al comparar semen congelado con semen fresco, se observa que los primeros son capaces de penetrar la ZP en menor tiempo que los espermatozoides frescos (Fuller y Whittingham, 1997).

Los primeros trabajos en capacitación de espermatozoides caninos (Mahi y Yanagimachi, 1978), demostraron que este proceso en espermatozoides en estado fresco, podía realizarse *in vitro* en un lapso de siete horas, utilizando medios inductores de la capacitación, como el medio CCM. Sin embargo, estudios posteriores en semen fresco, demostraron que la incubación espermática por 4 a 5 horas en medio capacitante permitiría a los espermatozoides caninos penetrar la ZP ovocitaria (Yamada *et al.*, 1992). Investigaciones recientes han descrito que los espermatozoides caninos frescos necesitarían un menor tiempo de capacitación para lograr la unión a la ZP de los ovocitos (2 a 4 horas) (Guérin *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2005).

Acrosina

La acrosina es una glicoproteína hidrosoluble, con propiedades serino- proteasa, presente en el acrosoma intacto de los espermatozoides mamíferos (Bhattacharyya *et al.*, 1979; Barros *et al.*, 1992; Barros *et al.*, 1996). Se encuentra en forma de zimógeno, proacrosina (Bhattacharyya *et al.*, 1979; Froman *et al.*, 1984; Barros *et al.*, 1996; Yamagata *et al.*, 1998; Cortés *et al.*, 2006) y experimenta autoactivación a su forma proteolítica activa, acrosina, durante la RA (Barros *et al.*, 1996; Yamagata *et al.*, 1998; De los Reyes y Barros, 2000; Cortés *et al.*, 2006), debido a que esta molécula tiene una estructura poco compacta que le permite estar preparada para experimentar autodigestión (Polakoski y Mc Rorie, 1973). La activación de la enzima es diferente según la especie animal, en los espermatozoides de ratón la activación de la proacrosina no ocurre durante la RA, sino que mientras el espermatozoide está en contacto con el ovocito (Bhattacharyya *et al.*, 1979). La acrosina de los espermatozoides del eyaculado de cerdo se encuentra inactivada por un inhibidor presente en el plasma seminal que es eliminado o inactivado durante la residencia de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra siendo parte del proceso de CE (Polakoski y Mc Rorie, 1973; Kennedy *et al.*, 1982).

El sustrato natural de la acrosina es la ZP de los ovocitos (Barros *et al.*, 1996), lo que regula que la excitosis acrosomal o RA ocurra principalmente en la superficie de la ZP (Cortés *et al.*, 2006). Allí cumpliría importantes funciones durante la fecundación: como ser proteína de unión secundaria entre espermatozoide y ZP, además de ayudar en la interacción y penetración del espermatozoide a través de la ZP, permitiendo su unión a la membrana plasmática del ovocito, eventos claves durante la fecundación (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Cortés *et al.*, 2006). Sin embargo, Kawakami *et al.*, 1993, postula que tanto espermatozoides caninos reaccionados y no reaccionados podrían unirse a la ZP del ovocito canino.

La localización y determinación de la proacrosina-acrosina en el acrosoma es una adecuada herramienta para la evaluación de la RA y de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides de diversas especies (Cortés *et al.*, 2006). La acrosina ha sido inmunolocalizada en espermatozoides de diversas especies, como cobayo, humanos,

hámster (Barros *et al.*, 1992), conejo (Valdivia *et al.*, 1994) y bovinos (De los Reyes y Barros, 2000), mediante anticuerpos mono y policlonales. Recientemente se ha podido determinar mediante inmunofluorescencia indirecta, con el anticuerpo monoclonal anti acrosina humana C5F11, ya que tiene reacción cruzada con la acrosina de espermatozoides caninos, de mono y de ratón (Cortés *et al.*, 2006). Este anticuerpo puede reconocer todas las formas moleculares de proacrosina/acrosina en espermatozoides frescos de perro y aquéllos congelados/descongelados, por lo que evaluar la presencia de esta enzima puede ser un efectivo método para evaluar la RA durante la capacitación del espermatozoide congelado/descongelado.

A través del uso de este anticuerpo y utilizando inmunofluorescencia indirecta, se pretende estudiar la presencia de esta enzima en espermatozoides de perro sometidos a congelación y descongelación, durante el proceso de CE.

HIPOTESIS

La presencia de la enzima acrosina en la superficie acrosomal de espermatozoides caninos congelados y descongelados se verá modificada de acuerdo a las diferentes condiciones de inducción de la capacitación *in vitro* a que sean sometidos los espermatozoides.

OBJETIVOS

I.- Objetivo General

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

II.- Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto del tiempo de capacitación en la liberación de acrosina en espermatozoides caninos congelados-descongelados.
- Comparar dos temperaturas de incubación (20° C y 37° C) para capacitación espermática *in vitro*, a través de la presencia de acrosina en espermatozoides de perro.
- Relacionar la presencia de acrosina en las diferentes condiciones de cultivo, con la viabilidad espermática post descongelación, a través, de la motilidad espermática.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y la evaluación de las muestras mediante inmunofluorescencia se llevó a cabo en el laboratorio de Embriología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

1. Obtención y congelación de semen

Se utilizaron 3 perros de diferentes razas, entre 1 y 6 años de edad, clínicamente sanos, a los que se les extrajo semen a través de manipulación digital del pene, recolectando la segunda fracción del eyaculado, en copas graduadas previamente entibiadas.

Cada muestra fue sometida a un análisis subjetivo de motilidad progresiva (MP), mediante microscopía de contraste de fases, utilizándose aquellas muestras seminales con $MP \geq 70\%$; además, se midió el volumen total y la concentración espermática del eyaculado, la que fue determinada mediante cámara de Neubauer, utilizando una dilución 1:100 según protocolo del laboratorio (De los Reyes, 2000).

El procesamiento del semen para congelación, se realizó de acuerdo a lo descrito previamente por De los Reyes *et al.* (2006). Las muestras fueron diluidas en Buffer TRIS pH 7, preparado previamente en base a TRIS (Trishidroxiaminometano, Merck; Rota *et al.*, 1999), en relación 1:2 (semen: TRIS), para luego ser centrifugadas a 700 x g por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el concentrado de espermatozoides se resuspendió en el diluyente de congelación en cantidad suficiente para obtener una concentración de 200 millones de espermatozoides por mililitro (De los Reyes *et al.*, 2006). La composición del diluyente de congelación se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición diluyente de congelación para semen canino.

TRIS	19,811 mM
Ácido Cítrico	6.662 mM
Fructosa	4.44 mM
Penicilina	0.168 mM
Estreptomina	0.068 mM
Yema de Huevo	20%
Glicerol	5%

Los espermatozoides diluidos en el extensor, fueron llevados a 4° C por una hora. En cada etapa del proceso fue evaluada la MP de los espermatozoides. Posteriormente las muestras fueron envasadas en pajuelas francesas de 0,25 mL y selladas con Polivinil alcohol (PVA, Sigma). Una vez cargadas, las pajuelas fueron colocadas a 3 cm del nitrógeno líquido por 9 minutos, con lo cual alcanzaron -70° C. Cumplido el tiempo, fueron totalmente sumergidas en nitrógeno líquido donde alcanzaron -196° C.

La descongelación de las pajuelas se realizó en agua a 60° C por 8 segundos. Se determinó la MP de las muestras después de ser descongeladas.

Luego las muestras fueron resuspendidas buffer TRIS en relación 1:2 (semen: TRIS) (Rota *et al.*, 1999), se evaluó la MP de acuerdo a lo descrito anteriormente para luego ser centrifugadas a 300 x g por 5 minutos para eliminar el diluyente de congelación. El pellet de espermatozoides fue resuspendido en el Medio de Capacitación Canino (CCM) (Rota *et al.*, 1999), en cantidad suficiente para obtener una concentración de 40 millones de espermatozoides por mL.

Los espermatozoides resuspendidos fueron distribuidos en tubos tipo Eppendorf en 7 partes iguales; una primera alícuota, considerada como muestra control (tiempo cero), fue inmediatamente evaluada en su MP y procesada para inmunofluorescencia. Otras tres alícuotas se colocaron a temperatura ambiente (20° C) y las tres restantes fueron llevadas a 37° C y mantenidas a esta temperatura. No hubo tiempo cero a esta temperatura ya que ese tiempo correspondió a muestras inmediatamente descongeladas y por tanto no incubados

aun. En cada temperatura de incubación se tomó una alícuota a los 30, 60 y 90 minutos para evaluar su MP y procesarlas para inmunofluorescencia.

2. Inmunofluorescencia

Fijación de espermatozoides

De cada muestra se colocó 100µL de la suspensión de espermatozoides en un cubreobjetos previamente tratado con L-polilisina 1% (Sigma) y Buffer Fosfato Salino, pH 7,0 (PBS). Luego de 5 minutos se descartó el exceso de PBS y el cubreobjeto fue depositado en Paraformaldehido al 4% (Merck) por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, la muestra se mantuvo en PBS a 4° C.

Aplicación de anticuerpos

Las muestras fueron tratadas con Metanol 99% (Fisher Scientific) por 10 minutos a 4° C, posteriormente secadas a temperatura ambiente y luego tratadas con Triton x-100 (Sigma) 1% en PBS por 30 minutos. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados incubando posteriormente las muestras con PBS con Albúmina Sérica Bovina (BSA; fracción V; Sigma) al 1% + glicina (Sigma) 100 µM por una hora.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti acrosina-proacosina humana C5F10 (en dilución 1:100 en solución PBS-BSA 1%) (Cortés *et al.*, 2006), incubándose durante toda la noche con el anticuerpo, a temperatura ambiente y bajo ambiente húmedo. Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron dos lavados de las muestras en PBS por 5 minutos cada uno.

Luego se aplicó el anticuerpo secundario o anticuerpo fluorescente (Pierce Biotechnology) diluido a 1:100 en solución PBS-BSA 1%, incubándose por 1 hora bajo condiciones de oscuridad. Posteriormente se realizaron dos lavados de las muestras en solución PBS-BSA 1% por 5 minutos cada uno.

Observación de las Muestras

Las muestras fueron montadas sobre cubreobjetos utilizando Vectashield (Vector) y observadas mediante Microscopia de Epifluorescencia (Nikon Optishot 2). Se evaluó la presencia de acrosina en los espermatozoides de perro congelados-descongelados capacitados *in vitro*, a través de las marcas fluorescentes que presenten en la región acrosomal.

3. Análisis Estadístico

Se realizaron siete réplicas experimentales (repeticiones del experimento) en las diferentes condiciones de cultivo. En cada una de las muestras y en cada protocolo de capacitación (tiempo y temperatura), se evaluaron por inmunofluorescencia, 200 espermatozoides.

Los resultados del inmunomarcaje 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). Esta variable binomial se analizó mediante un modelo de regresión logística, el cual permitió estimar si existían diferencias entre los distintos protocolos de capacitación espermática a través del tiempo, utilizando SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA). 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)).

T_{1j} = Tiempo de incubación.

β_{0i} = Intercepto.

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

ε_{ij} = Error.

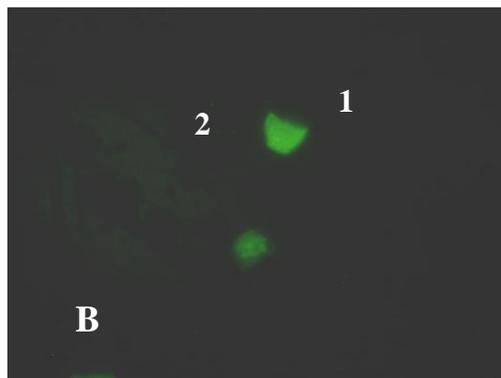
La motilidad espermática fue evaluada en cada una de las muestras y en cada protocolo de capacitación (tiempo y temperatura). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante ANDEVA, utilizando la Prueba de Tukey para determinar la significancia de las diferencias, entre los protocolos de capacitación espermática.

RESULTADOS

Inmunomarcaje

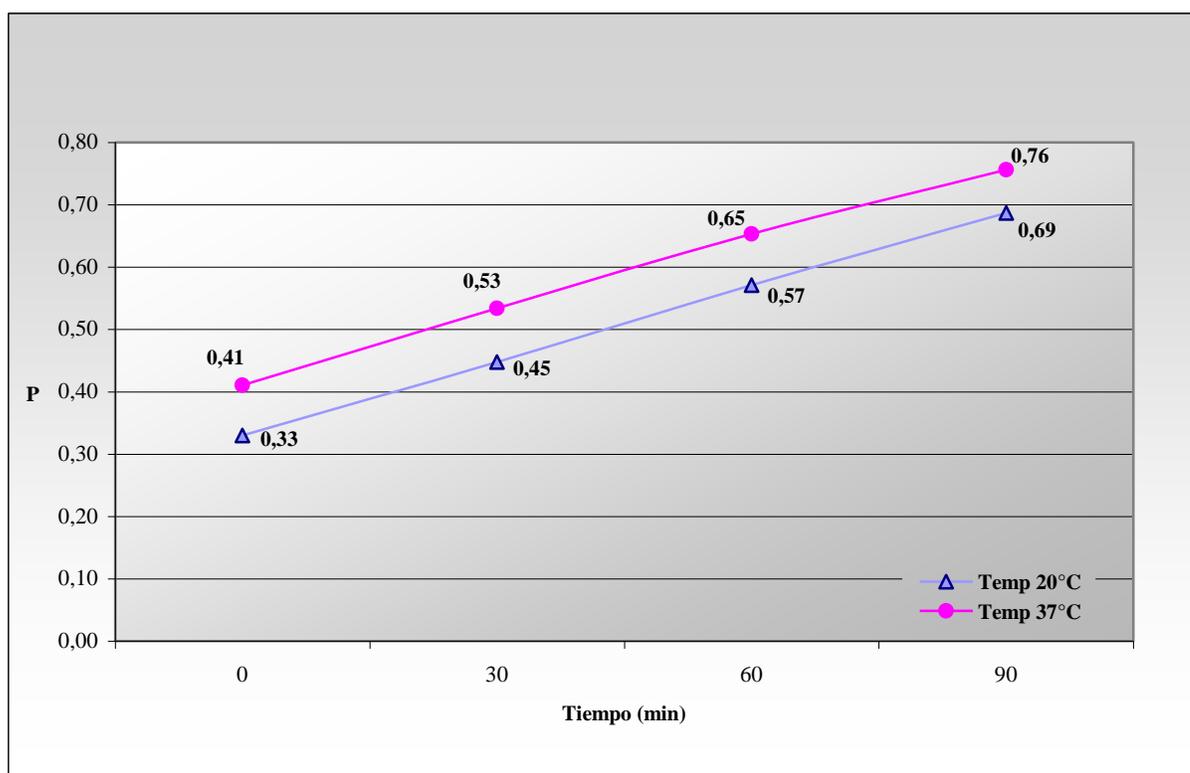
De tres reproductores caninos, se evaluaron 9.800 espermatozoides congelados-descongelados sometidos a capacitación *in vitro*, por diferentes tiempos (0, 30, 60 y 90 minutos) y temperaturas (20° C y 37° C), a través de un total de siete réplicas experimentales. Los espermatozoides fueron clasificados de acuerdo a los patrones de inmunofluorescencia previamente establecidos: Marcados (marca fluorescente a nivel acrosomal; Figura N° 1 B1) y Nulos (sin marca fluorescente a nivel acrosomal; Figura N° 1 B2). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un modelo de regresión logística, utilizando los valores relativos de inmunomarcaje. Los resultados mostraron que el tiempo de capacitación y la temperatura de incubación influyeron en forma significativa ($p < 0,05$) pero independiente entre sí, sobre el porcentaje de inmunomarcaje (Figura N° 2), observándose que al aumentar el tiempo de CE *in vitro* y la temperatura de incubación, había un incremento de los espermatozoides que exhibían el patrón de inmunomarcaje Nulo.

Fig. N° 1. Espermatozoides Caninos Capacitados *in vitro* observados por microscopía, a través de Contraste de Fases (A) y Epifluorescencia (B) (400x).



Los espermatozoides caninos capacitados *in vitro* y tratados con técnica de inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10, permitió observar marcas fluorescentes en los sitios donde se localizó la enzima acrosina (nivel acrosomal). La presencia de acrosina/proacrosina durante la capacitación se clasificó como marca fluorescente a nivel acrosomal figura 1 (B1) y sin marca fluorescente figura 1 (B2).

Fig. N° 2. Diagrama de la Regresión Logística que muestra las probabilidades de existencia de espermatozoides Nulos a los diferentes tiempos de capacitación (TC) y temperatura de incubación (TI).



En este diagrama, el tiempo cero a los 37° C fue calculado extrapolando los datos obtenidos.

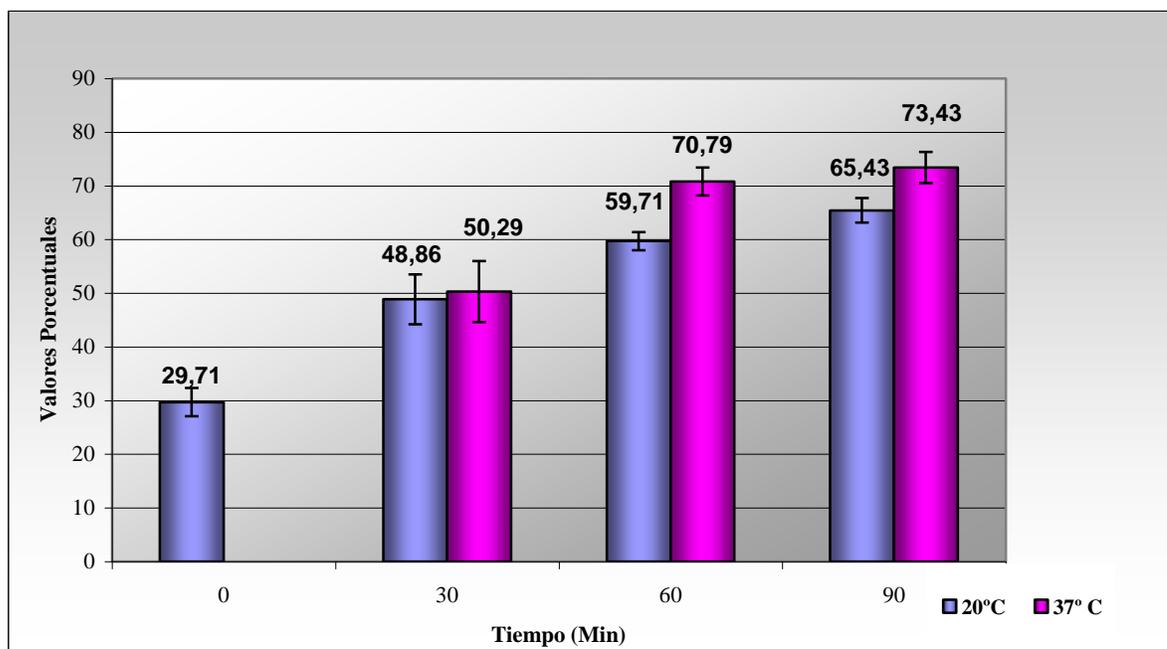
Al analizar la incubación a 20° C se observó que el mayor incremento del patrón de inmunomarcaje Nulo se produjo entre los 0 y 30 minutos de incubación, mientras que durante la incubación a 37° C el mayor incremento del patrón de inmunomarcaje Nulo se produjo entre los 30 y 60 minutos de incubación en medio capacitante (Tabla N° 1)

Tabla N° 1. Valores absolutos y porcentuales de los espermatozoides Nulos a 20° C y 37° C de incubación en los distintos tiempos de capacitación espermática *in vitro*.

Tiempo (min)	TEMPERATURA					
	20° C			37° C		
	n	N	%	n	N	%
0	1400	416	29,71%	---	---	---
30	1400	684	48,86%	1400	704	50,29%
60	1400	836	59,71%	1400	991	70,79%
90	1400	916	65,43%	1400	1028	73,43%
Total	5600	2852	50,93%	4200	2723	64,83%

Al comparar las dos temperaturas empleadas, se observó que el mayor porcentaje de espermatozoides nulos correspondía a aquellos incubados a 37° C a partir de los 60 y 90 minutos de incubación, registrándose el valor más alto a los 90 minutos de capacitación *in vitro* a 37° C (Figura N° 3).

Fig. N° 3. Valores porcentuales y error promedio de espermatozoides caninos con patrón de inmunomarcaje de acrosina/proacrosina nulo a los diferentes tiempos y temperaturas de incubación.



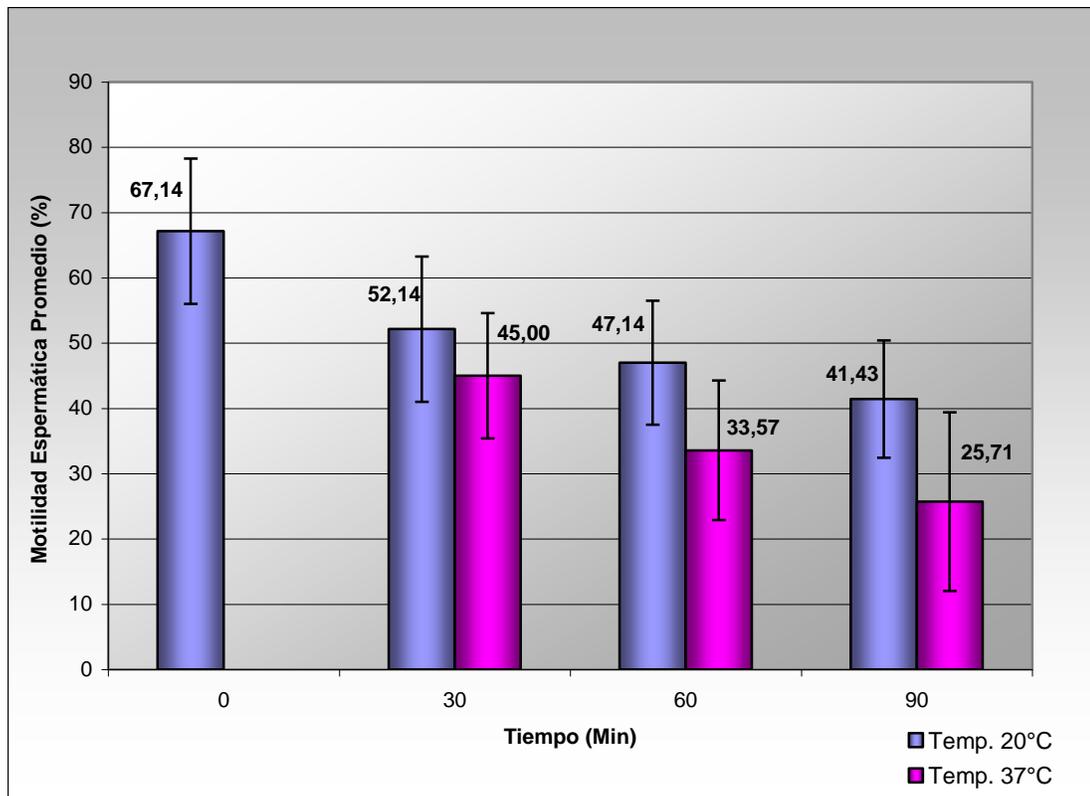
Motilidad espermática

La viabilidad de los espermatozoides caninos congelados-descongelados capacitados *in vitro* se evaluó a través de la motilidad espermática, la que fue observada mediante microscopía de contraste de fases, a través de todos los tiempos y temperaturas de incubación. La medición de la motilidad espermática de los espermatozoides incubados a 37° C comenzó desde los 30 minutos de incubación, por lo señalado anteriormente.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante ANDEVA, utilizando la Prueba de Tukey para determinar la significancia de las diferencias. Este análisis mostró diferencias significativas de la motilidad ($p < 0,05$) en las dos variables en estudio, tiempo de capacitación (0, 30, 60, 90 minutos) y temperatura de incubación (20° C y 37° C).

Al evaluar la motilidad espermática, se observa que ésta disminuye a medida que transcurre el tiempo de capacitación y al aumentar la temperatura de incubación (Figura N° 4).

Fig. 4. Motilidades promedio y Desviación Estándar de los Espermatozoides a los Distintos Tiempos y Temperaturas de Incubación.



La motilidad progresiva promedio disminuyó a través del tiempo de capacitación espermática, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre los 0 y 60 minutos de incubación y entre los 0 y 90 minutos de incubación a 20° C. Mientras que durante la incubación a 37° C la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) se observó entre los 30 y 90 minutos de capacitación.

Las diferencias estadísticamente significativas de los porcentajes de motilidad espermática entre ambas temperaturas de incubación (20° C y 37° C) se observaron a los 60 y 90 minutos de incubación ($p < 0,05$).

DISCUSION

El presente estudio demostró que la temperatura y el tiempo de incubación durante la capacitación espermática *in vitro* tienen una influencia directa sobre la liberación de acrosina, indicativa del proceso de RA.

La CE es un proceso biológico que implica que el espermatozoide mamífero experimente la RA (Mahi y Yanagimachi, 1978; Brewis *et al.*, 2001) y libere enzimas acrosomales, entre ellas la enzima acrosina (Barros *et al.*, 1992; Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Wassarman, 1999; Cortés *et al.*, 2006), glicoproteína que ayuda en la interacción espermatozoide-ovocito, permitiendo la fecundación exitosa (Barros *et al.*, 1992; Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Cortés *et al.*, 2006).

El tiempo de CE depende de la especie (Kawakami *et al.*, 1993; Yanagimachi, 1994; Rota, 1999; Petrunkina *et al.*, 2003). Investigaciones en caninos han señalado que la CE puede ser inducida *in vitro* después de diferentes horas de incubación en medios especiales (Mahi y Yanagimachi, 1978; ; Hewitt y England, 1998; Guérin *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001), al igual que en otras especies animales como cobayo (Barros *et al.*, 1992; Barros *et al.*, 1996), hámster (Barros *et al.*, 1992; Barros, *et al.*, 1996), bovino (De los Reyes y Barros, 2000) y humanos (De Ioannes *et al.*, 1990; Barros *et al.*, 1992; Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Cortés *et al.*, 2006). Se ha señalado que la dinámica de la RA podría ser determinada a través del estudio de la liberación del contenido acrosomal (De los Reyes y Barros, 2000; Cortés *et al.*, 2006). Diferentes trabajos han determinado la presencia de acrosina a nivel acrosomal en espermatozoides de algunas especies mamíferas tales como en cobayo, humanos, hámster (De Ioannes *et al.*, 1990; Barros *et al.*, 1992; Barros, *et al.*, 1996), ratas (Bhattacharyya *et al.*, 1979), conejos (Valdivia *et al.*, 1994; Barros *et al.*, 1996), bovinos (De los Reyes y Barros, 2000), cerdos (Polakoski y Mc Rorie, 1973) y últimamente en caninos, mediante anticuerpos mono y policlonales (Kawakami *et al.*, 1993; Cortés *et al.*, 2006), como también su actividad (Froman *et al.*, 1984; Kawakami *et al.*, 1999) mediante técnicas especializadas.

En este trabajo se detectó la presencia de acrosina en espermatozoides caninos mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando el anticuerpo monoclonal C5F10 antiacrosina humana se detectó la presencia de acrosina en espermatozoides caninos durante diferentes tiempos de capacitación. La marca fluorescente a nivel acrosomal se fue perdiendo a través del tiempo de incubación en medio inductor de la capacitación al que fueron sometidos los espermatozoides, aumentando de esa forma el porcentaje de espermatozoides nulos, indicativo de la pérdida de la enzima debido a la exocitosis acrosomal. Los primeros estudios de capacitación *in vitro* en espermatozoides caninos determinaron que en estado fresco necesitaban tiempos de capacitación de siete horas, lográndose la RA y penetración a ovocitos de la especie (Mahi y Yanagimachi, 1978); trabajos posteriores han indicado tiempos de capacitación de 4 a 5 horas en medio capacitante TYH, con la hiperactivación del flagelo a las 3 horas de incubación (Yamada *et al.*, 1992), mientras que estudios recientes han determinado menores tiempos de capacitación en esta especie para lograr la RA medida a través del ensayo de Clortetraciclina (CTC), con tiempos de 3 horas (Guérin *et al.*, 1999) y de 2 horas (Brewis *et al.*, 2001), evaluadas mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales contra epítopes de la membrana acrosomal externa. En el presente trabajo con espermatozoides caninos congelados/descongelados, el tiempo más temprano de exocitosis acrosomal al incubar a los 20° C se observó en el lapso de 0 a 30 minutos y durante la incubación a 37° C se produjo entre los 30 y 60 minutos de capacitación.

La presencia de acrosina, detectada en tiempos tempranos de incubación en el presente estudio, sería concordante con trabajos previos en relación a la capacitación con espermatozoides congelados/descongelados de perros, donde a través de ensayos con CTC se han reportado tiempos de CE, en espermatozoides caninos criopreservados (congelados y refrigerados) de 0 y 2 horas, tiempo significativamente menor que el observado en espermatozoides en estado fresco, de 4 horas (Rota *et al.*, 1999). Al comparar espermatozoides de ratón congelados/descongelados y frescos, los primeros serían capaces de penetrar la ZP en menor tiempo que los espermatozoides frescos (Fuller y Whittingham, 1997). Esto podría estar relacionado a que la liberación de la enzima acrosina desde espermatozoides criopreservados se produciría en tiempos más tempranos de capacitación

in vitro, dada la acción de esta enzima en la unión y penetración a la ZP (Barros *et al.*, 1992; Barros *et al.*, 1996; Cortés *et al.*, 2006; De Ioannes *et al.*, 1990. Estudios en semen de perro congelado y fresco sin capacitar, se ha determinado una menor marca fluorescente de acrosina en espermatozoides congelados luego de la descongelación a diferencia de los frescos (Cortés *et al.*, 2006), lo que concordaría a los resultados del presente trabajo, donde la mayor liberación de la enzima se produjo durante la primera hora de capacitación, entre los 0 y 30 minutos de incubación a 20° C y entre los 30 y 60 minutos de incubación a 37° C. Evaluaciones de espermatozoides caninos mediante microscopia electrónica de barrido indican que a la primera hora de coincubación con ovocitos de perra, el porcentaje de penetración de espermatozoides congelados es mayor que el de espermatozoides frescos, sin embargo, en los restantes tiempos de incubación esta relación se invierte (Palomino, 2006).

Por otra parte, se ha demostrado que la capacidad de los espermatozoides caninos criopreservados, para unirse a la ZP de ovocitos de perra en estado inmaduro, disminuye en un 50 % cuando el tiempo de capacitación espermática aumenta de 2 a 8 horas (Peña *et al.*, 2004), lo que podría deberse a la disminución de la viabilidad de los espermatozoides, como también, a que en tiempos de incubación más avanzados, muchos espermatozoides ya han perdido la enzima acrosina, de acuerdo a lo señalado en otros estudios (De los Reyes y Barros, 2000).

Estudios recientes en espermatozoides caninos refrigerados y frescos (no publicados), utilizando el mismo anticuerpo antiacrosina que el empleado en este trabajo, han indicado que éstos requieren un mayor tiempo de incubación en medio inductor de la capacitación para que un porcentaje significativo de espermatozoides pierdan la marca acrosomal. Esto no coincidiría con el comportamiento de los espermatozoides congelados/descongelados de este estudio, donde el mayor porcentaje de espermatozoides caninos congelados/descongelados sin marca fluorescente de acrosina se produjo durante los primeros tiempos de incubación a 37° C. Ha sido descrito que los espermatozoides criopreservados experimentarían cambios similares a los ocurridos durante la capacitación debido al proceso de criopreservación, siendo aún más drástico en espermatozoides

congelados donde se produciría desestabilización de sus membranas plasmática y acrosomal, generando el mayor influjo de calcio a la célula, promoviendo así eventos asociados a la CE 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).

Estudios en actividad de la acrosina en espermatozoides frescos de perro han demostrado que esta enzima, al igual que otras enzimas acrosomales, incrementa su actividad a través del tiempo, después de 7 horas de incubación, asociado a la capacitación (Kawakami *et al.*, 1999). Por su lado, los espermatozoides caninos congelados/descongelados exhiben la disminución de la actividad de acrosina al aumentar el tiempo de capacitación en comparación con los espermatozoides frescos (Froman *et al.*, 1984). Estudios anteriores han demostrado mediante el uso del anticuerpo monoclonal C5F11 (antiacrosina humana) por inmunofluorescencia, que los espermatozoides caninos criopreservados presentan un menor porcentaje de tinción acrosomal que los espermatozoides frescos. Sin embargo, a través de western blots y por ensayos de actividad enzimática, se encontró que el semen canino congelado-descongelado presenta una mayor proporción de acrosina activa que el semen fresco (Cortés *et al.*, 2006). Esto podría sugerir que durante el proceso de criopreservación (congelación y descongelación) se produce pérdida de acrosina, permitiendo postular que la liberación de la enzima sería debido a la activación de la proacrosina en acrosina (Cortés *et al.*, 2006) proceso similar al que ocurre durante la RA.

Por otro lado, en este estudio se observó que el mayor porcentaje de espermatozoides nulos o sin marca fluorescente de acrosina, se encontró a los 90 minutos de incubación a 37 ° C. A través del estudio *in vitro* se ha determinado que la RA depende de la temperatura a la que se realiza la incubación (Mahi y Yanagimachi, 1973; Flemming y Kuehl, 1985; Yanagimachi, 1994; Sirivaidyapong *et al.*, 2000), siendo entre los 37° C y 38° C la temperatura más indicada para el desarrollo de la CE en la mayoría de los mamíferos (Yanagimachi, 1994), coincidiendo con los resultados de esta investigación, y que se asemeja a la temperatura corporal *in vivo*. Estudios en espermatozoides caninos reportan que la incubación de éstos a 37° C induciría más rápidamente la RA, que la incubación a 20° C (Sirivaidyapong *et al.*, 2000), lo que concuerda con los resultados obtenidos en el

presente trabajo, donde a la primera hora de incubación a 37° C un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides se encontraban capacitados y reaccionados, es decir, sin marca fluorescente a nivel acrosomal, que aquéllos incubados a 20° C. Estudios de capacitación espermática *in vitro* en porcinos y ovinos, han reportado que la temperatura de incubación más adecuada para el desarrollo de la RA es de 39° C, debido a que se asemeja más a su temperatura corporal (Cheng *et al.*, 1986).

Se ha determinado que pequeñas variaciones de la temperatura de incubación de los espermatozoides *in vitro*, generan cambios en la estructura de los lípidos de la membrana plasmática, importantes para la CE (Yanagimachi, 1994; Sirivaidyapong *et al.*, 2000). Situación observada en este estudio ya que la alteración de la temperatura de incubación, generó la reducción de la viabilidad espermática, observada a través de la motilidad, posiblemente debido a que los espermatozoides caninos congelados-descongelados, son también más lábiles (Ström Holst *et al.*, 1997; Ivanova *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999; Ström Holst *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2005; Eilts, 2005), especialmente a mayores temperaturas (Ström Holst *et al.*, 1997; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 1999; Eilts, 2005). Estudios en espermatozoides caninos descongelados han indicado que la motilidad espermática disminuiría más rápidamente al incubarlos a 37° C en comparación a 20° C, posiblemente debido a la disminución en la termoresistencia que exhibirían los espermatozoides posterior a la descongelación (Ström Holst *et al.*, 1997; Sirivaidyapong *et al.*, 2000). Coincidiendo con lo observado en este estudio, donde la incubación a 37° C tuvo un mayor efecto detrimental sobre la viabilidad espermática en comparación con la incubación a 20° C.

La motilidad y viabilidad espermática posterior al descongelamiento son los factores principalmente considerados en los estudios de criopreservación de semen (Ström Holst *et al.*, 1997). Estudios en espermatozoides caninos han reportado porcentajes de motilidad posterior a la descongelación que van desde 24% a 75% (Ström Holst *et al.*, 1997; Hay *et al.*, 1997; Ivanova *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002; Rota *et al.*, 2005) resultados que se asemejan a los obtenidos en este estudio donde se observaron motilidades del 41 al 67 % en los espermatozoides congelados/descongelados incubados en medio capacitante a 20° C

y motilidades de 25,71 a 45% en los espermatozoides congelados/descongelados incubados en medio capacitante a 37° C. Por su parte, la comparación de estos porcentajes con valores de motilidad reportados por diversos autores en estudios anteriores utilizando espermatozoides frescos, que van desde 90 a 96% (Rota *et al.*, 1999), desde 60 a 70% (Yu *et al.*, 2002) y 93% (De los Reyes *et al.*, 2002), permitiría confirmar que el proceso de congelación y descongelación produciría una disminución de la motilidad espermática, fenómeno que se asocia con modificaciones en el metabolismo celular y daños en la membrana espermática (Hammerstedt *et al.*, 1990). El rápido consumo y depleción de ATP y productos metabólicos debido a la gran motilidad inicial que exhiben los espermatozoides pos descongelación, no les permitiría sobrevivir en el tiempo ni mantener por tanto, una adecuada motilidad durante la posterior incubación (Ström Holst *et al.*, 1997). La adaptación al cambio bioenergético pos descongelación (balance iónico y motilidad aumentan) dependería de la especie animal (Hammerstedt *et al.*, 1990) y de la tasa de descongelación, que afectaría la motilidad y termorresistencia de los espermatozoides congelados/descongelados (England, 1993).

El tiempo y temperatura de incubación, afectaron significativamente los porcentajes de motilidad exhibidos por los espermatozoides caninos congelados/descongelados, evidenciando una disminución en este parámetro a medida que aumentó el tiempo y la temperatura en medio capacitante, lo que concuerda con estudios que han demostrado que tanto la motilidad como la viabilidad espermática disminuirían significativamente luego de 4 a 7 horas de incubación (Kawakami *et al.*, 1993). Es importante observar que si bien la viabilidad espermática, medida a través de la motilidad progresiva, disminuyó al aumentar el tiempo de incubación, la cantidad de espermatozoides que exhibían el patrón de inmunomarcaje nulo o sin marca fluorescente a nivel acrosomal, se incrementó a través del tiempo de capacitación, indicando que los espermatozoides experimentaron la RA. El desarrollo de la RA fisiológica o verdadera (Yanagimachi, 1994), se incrementaría a medida que el tiempo y la temperatura de incubación aumentan (Mahi y Yanagimachi, 1973; Sirivaidyapong *et al.*, 2000), sin embargo, durante la CE *in vitro*, a pesar de utilizar optimas condiciones de incubación, existiría un número de espermatozoides que sufren daños en sus estructuras (Yanagimachi, 1994) o que simplemente mueren durante el

proceso, pudiendo liberar su contenido acrosomal, incluida la enzima acrosina, experimentando la RA falsa o degenerativa (Mahi y Yanagimachi, 1976; Yanagimachi, 1994). Para intentar distinguir el proceso fisiológico del degenerativo, se comparó el porcentaje de espermatozoides reaccionados, con los valores de motilidad observados en cada tiempo y en cada temperatura de incubación, ya que una activa motilidad durante la CE se correlaciona con la hiperactivación espermática indicativa de la ocurrencia del proceso fisiológico de capacitación (Mahi y Yanagimachi, 1976). Se observó que la mayor motilidad espermática se produjo durante los primeros tiempos de capacitación espermática *in vitro*. A los 30 minutos de incubación un 48,86 % de los espermatozoides se encontraban reaccionados y exhibían un promedio de motilidad cercana al 50% cuando la incubación se realizó a 20° C, mientras que durante la incubación a 37° C se encontró un 50,29 % de espermatozoides reaccionados a los 30 minutos de incubación con una motilidad espermática de un 45%, lo que podría indicar que la mayor proporción de estos espermatozoides caninos congelados sufrió una RA fisiológica. Sin embargo, al transcurrir el tiempo de incubación los porcentajes de motilidad disminuyeron, mientras que los espermatozoides nulos o sin marca fluorescente fueron en aumento, pudiendo indicar que la RA experimentada por estos espermatozoides fue falsa o degenerativa (Yanagimachi, 1994) o que la mayoría de estos espermatozoides experimentaron la capacitación durante los primeros tiempos de incubación.

CONCLUSIONES

- 1.- La temperatura y el tiempo de capacitación *in vitro* de los espermatozoides caninos congelados-descongelados influye sobre la capacitación espermática y la reacción acrosómica.
- 2.- Los mayores porcentajes de reacción acrosómica en los espermatozoides caninos congelados-descongelados, se obtienen al ser incubados por periodos más prolongados de tiempo y al utilizar una mayor temperatura, concordando con los antecedentes comunicados por la literatura.
- 3.- Utilizando el anticuerpo fluorescente monoclonal antiacrosina humana C5F10 fue posible la detección de la enzima acrosina en la región acrosomal en los espermatozoides de perro congelados –descongelados capacitados *in vitro*.
- 4.- De acuerdo a la marcación observada en los espermatozoides tratados con el anticuerpo monoclonal antiacrosina C5F10, se identificaron 2 patrones de inmunomarcaje en la región acrosomal, similar a los encontrados en otras especies, y que se relacionaría con el grado de reacción acrosómica.
- 5.- La viabilidad celular, evaluada a través de la motilidad espermática, disminuye con el tiempo de incubación en medio capacitante, especialmente a mayor temperatura empleada (37° C v/s 20° C).
- 6.- La capacitación *in vitro* de espermatozoides congelados/descongelados de perro, debería realizarse en períodos reducidos de tiempo (30 minutos) a 20° C, en orden de evitar la mayor excitosis acrosomal antes de la interacción con el ovocito.

BIBLIOGRAFÍA

1. **AUSTIN, C.R.** 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Australian Journal Science Research. 4:581-596.
2. **AUSTIN, C.R.; BISHOP, M.W.H.** 1958. Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. Proceedings of the Royal Society London. Biological Science. 149:234-240.
3. **AUSTIN, C.R.** 1985. Sperm maturation in the male and female genital tracts. En: Metz, C.B. y Monroy, A. (Eds). Biology of fertilization. Volume 2. New York: Academic Press. Pp. 121-155.
4. **BAVISTER, B.** 2002. Early history of *in vitro* fertilization. Reproduction . 124:181-196.
5. **BARROS, C.; CAPOTE, C.; PEREZ, C.; CROSBY, J.A.; BECKER, M.I.; DE IOANNES, A.** 1992. Immunodetection of acrosin during acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. Biological Research. 25:31-40.
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. **BHATTACHARYYA, A. K.; GOODPASTURE, J.C.; ZANEVELD, L.J.D.** 1979 Acrosin of mouse spermatozoa. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism. 237: E40-E44.
8. **BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D.; YOUNGQUIST, R.S.** 1990. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. Theriogenology 34: 147-157.

9. **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.
10. **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.
11. **CHANG, M.C.**, 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 168:697-698.
12. **CHENG, W.T.K.; MOOR, R.M.; POLGE, C.** 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*. 25: 146a.
13. **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. *Theriogenology*. (En prensa).
14. **CORTES, 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*. (En prensa).
15. **DE IOANNES, A.E.; BECKER, M.I.; PÉREZ, C. ; CAPOTE. C.; BARROS, C.** 1990. Role of acrosin and antibodies to acrosin in gamete interactions. *Gamete interaction: Prospects for immunocontraception* 185-196.

16. **DE LOS REYES, M.** 2000. Inseminación artificial en perros. De los Reyes M., Sánchez A. (Ed). En: Tópicos en Reproducción de Pequeños Animales. Ediciones Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 1º Edición. Santiago-Chile. Pp. 94-106.
17. **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. Pp. 2:17-26.
18. **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.
19. **DE LOS REYES, M.; SAENZ, L.; LAPIERRE, L.; CROSBY, J.; BARROS, C.** 2002. Evaluation of glucose as a cryoprotectant in boar semen. *Veterinary Record*. 151:477-480.
20. **DE LOS REYES, M.; CARRION, R.; BARROS, C.** 2006. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured canine oocytes using frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*. (En prensa).
21. **EILTS, B.E.** 2005. Theoretical aspects of canine semen criopreservation. *Theriogenology*. 64: 692-697.
22. **ENGLAND, G.C.W.** 1993. Criopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*. (Supplements). 47:243-255.
23. **FARSTAD, W.** 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*. 53: 175-186.

24. **FLEMMING, A.D.; KUEHL, T.J.** 1985. Effects of temperature upon capacitation of guinea pig spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*. 233: 405-411.
25. **FROMAN, D.P.; AMANN, R.P.; RIEK, P.M.; OLAR, T.T.** 1984. Acrosin activity of canine spermatozoa as index of cellular damage. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70: 301-308.
26. **FULLER, S.J.; WHITTINGHAM, D.G.** 1997. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Molecular Reproduction and Development*. 46:318-324.
27. **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. Pp. 11:107-116.
28. **GUÉRIN, P.; FERRER, M.; FONTBONNE, A.; BÉNIGNI, L. ; JACQUET, M.; MÉNÉZO, Y.** 1999. *In vitro* capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology*. 52:617-628.
29. **HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P.** 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11:73-88.
30. **HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L.** 1997. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*. 48: 1329-1342.
31. **HEWITT, D.A; ENGLAND, G.C.W.** 1998. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science*. 51:321-332.

32. **HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W.** 1999. Culture conditions required to induce capacitation and the acrosome reaction of canine sperm *in vitro*. The Veterinary Record. 144:22-23.
33. **HOLT, W.** 2000^a. Basic aspect of frozen storage of sperm. Animal Reproduction Science. 62:3-22.
34. **HOLT, W.** 2000^b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology. 53:47-58.
35. **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.
36. **IVANOVA, M.; MOLLOVA, M.; IVANOVA-KICHEVA, M.G.; PETROV, M.; DJARKOVA, T.; SOMLEV, B.** 1999. Effect of cryopreservation of zona-binding capacity of canine spermatozoa *in vitro*. Theriogenology. 52:163-170.
37. **KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.; MAHI-BROWN, C.; OVERSTREET, J.** 1993 Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. Biology of Reproduction. 48:841-845.
38. **KAWAKAMI, E.; HORI, T.; TSUTSUI, T.** 1998. Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. Journal of Veterinary Medical Science. 60:197-202.
39. **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.

40. **KAWAKAMI, E.; ARAI, T.; OISHI, I.; HORI, T.; TSUTSUI, T.** 2000. Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in bitches. *Journal of Veterinary Medical Science*. 62: 65-68.
41. **KENNEDY, W.P.; SWIFT, A.M.; PARRISHFJ, R.F.; POLAKOSKI, K.** 1982. Proacrosin conversion inhibitor. Purification and initial characterization of a boar sperm protein which prevents the conversion of proacrosin into acrosin. *The Journal of Biological Chemistry*. 257: 3095-3099.
42. **LINDE-FORSBERG, C.** 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*. 10:48-58.
43. **LINDE-FORSBERG, C.; STRÖM HOLST, B.; GOVETTE, G.** 1999. Comparison of fertility data from vaginal v/s intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*. 52:11-23.
44. **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. *Journal of the Reproduction and Fertility*. 35:55-66.
45. **MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R.** 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*. 196: 189-196.
46. **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.
47. **METCALFE, S.S.** 1999. Assisted reproduction in the bitch. Thesis for the degree of the Master of Science, Monash University, Victoria, Australia.

48. **PALOMINO, J.A.** 2006. Evaluación de la fecundación en caninos con espermatozoides frescos y criopreservados en ovocitos de perra madurados *in Vitro*. Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Escuela de Posgrado y Postítulo. Universidad de Chile.
49. **PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K.** 1992. Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38:209-222.
50. **PEÑA, A.I.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G.** 2004. Zona pellucida binding ability and responsiveness to ionophore challenge of cryopreserved dog spermatozoa after different periods of capacitation *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 84(1-2):193-210.
51. **PETRUNKINA, A.M; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A.R.; 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.
52. **PETRUNKINA, A.M; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A.R.; TÖPFER-PETERSEN, E.** 2004. Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm select by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct? *Theriogenology*. 61: 1617-1634.
53. **PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.** 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*. 52: 609-616.
54. **POLAKOSKI, K.L.; MC RORIE, R.A.** 1973. Boar Acrosin. II Classification, inhibition, and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes. *Journal of biological chemistry*. 248:8183-8188.

55. **POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKS, A.S.** 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164:666.
56. **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.
57. **SANCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, R.** 2002. Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test. *Archivos de medicina veterinaria*. 34:131-134
58. **SILVA, L.D., VERSTEGEN, J.P.** 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 44:571-579.
59. **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.
60. **SMITH, T.T.; YANAGIMACHI, R.** 1989. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *Journal of Reproduction and Fertility*. 86: 255-261.
61. **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.
62. **STRÖM HOLST, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.** 1997. *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48: 247-256.

63. **STRÖM HOLST, B.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2000. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility*. 119: 201-206.
64. **THOMASSEN, R.; FARSTAD, W.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J.A.; BERG, K.** 2001. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 57:341-346.
65. **TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte-sperm interactions. *Animal Reproduction Science*. 60-61:653-662.
66. **TSUTSUI, T.; TESUKA, T.; SHIMIZU, T.; MURAO, I.; KAWAKAMI, E.; OGASA, A.** 1988. Artificial insemination with fresh semen in beagle bitches. *Japan Journal of Veterinary Science*. 50:193-198
67. **TSUTSUI, T.; TEZUCA, T.; MIKASA, Y.; SUGISAWA, H.; KIRIHARA, N.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.** 2003. Artificial insemination with canine semen stored at low temperature. *Journal of Veterinary Medical Science*. 65:307-312.
68. **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.
69. **WABERSKY, D.; WEITZE, K.F.; GLEUMES, T.; SCHWARZ, M.; WILLMEN, T.; PETSOLDT, R.** 1994. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology*. 42:831-840.
70. **WASSARMAN, P.M.** 1999. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. *Cell*. 96:175-183.

71. **WATSON, P.F.** 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7:871–891.
72. **WATSON, P.F.** 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61:481-492.
73. **WHEELER, M.B.; SEIDEL, G.E.** 1987. Zona pellucida penetration assay for capacitation of bovine sperm. *Gamete Research*. 18:237-250.
74. **YAMAGATA, K.; MURAYAMA, K.; OKABE, M.; TOSHIMORI, K.; NAKANISHI, T.; KASHIWABARA, S.; BABA, T.** 1998. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:10470-10474.
75. **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.
76. **YANAGIMACHI, R.** 1994. Mammalian fertilization. En: Knobil, E. y Neill, J.D. (eds). *The Physiology of reproduction*. 2^a ed. Editorial Raven Press. Nueva York. USA. Pp. 189-317.
77. **YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P.** 2002. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*. 44:62-78.

