



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

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ACROSINA DURANTE
LA CAPACITACIÓN EN ESPERMATOZOIDES CONGELADOS DE PERRO.”**

PAULA RODRIGUES COLLINET

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

PROFESOR GUÍA: DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1060602-1080618

**SANTIAGO, CHILE
2009**

Esta Memoria de Título fue financiada por el Proyecto Fondecyt 1060602-1080618.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Mónica De los Reyes, por su labor como profesora guía así como por su orientación, disposición, apoyo y entrega de invaluable conocimiento.
- A Jaime Palomino M. por su sincera amistad, inagotable paciencia e incondicional apoyo. A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Reproducción Animal, quienes facilitaron la realización de esta memoria a través de la amistad, comprensión y apoyo.
- Al Dr. Ricardo Moreno y a todo el equipo de trabajo de la Unidad de Reproducción y Desarrollo, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
- A mi familia por el eterno e incondicional apoyo. A mi madre, Ivonne Collinet, por confiar en mí; a mi padre, Luiz Carlos Rodrigues (†) por sus enseñanzas; a mi marido Carlos por su confianza y orientación; a mi prima y tías. Sin ustedes nada de esto hubiese sido posible.
- A mis amigos, quienes, de una u otra forma, me ayudaron a recorrer este camino.

INDICE

RESUMEN-----	6
ABSTRACT-----	8
INTRODUCCIÓN-----	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA -----	12
Congelación de espermatozoides caninos-----	12
Capacitación espermática-----	15
Reacción acrosómica-----	18
Acrosina-----	19
HIPÓTESIS.-----	22
OBJETIVO GENERAL.-----	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	22
MATERIAL Y METODOS-----	23
Obtención de semen-----	23
Congelación de semen.-----	23
Actividad enzimática -----	24
- Medición de Actividad Enzimática Mediante Digestión de Gelatina-----	24
- Espectrofotometría con Esteres de Bajo Peso Molecular (BAEE).-----	24
a) Obtención Extracto Espermático-----	24
b) Actividad Enzimática Mediante Espectrofotometría-----	25
Análisis estadístico-----	25
RESULTADOS-----	27
Análisis de la digestión de gelatina en placa-----	27

Análisis de la hidrólisis de esteres de bajo peso molecular (BAEE) a través de espectrofotometría -----	29
DISCUSIÓN-----	31
CONCLUSIÓN-----	35
BIBLIOGRAFÍA-----	36

RESUMEN

Una fecundación exitosa depende, entre otras cosas, de la capacidad que tengan los espermatozoides de experimentar la reacción acrosómica. Este fenómeno es esencial para una adecuada interacción gamética y posterior fecundación del ovocito. El espermatozoide de perro al ser sometido a criopreservación puede verse afectado alterando negativamente este proceso y por tanto, su capacidad fecundante.

En este trabajo se estudió el efecto del tiempo de capacitación en espermatozoides congelados de perro a través de la actividad enzimática de la acrosina, mediante dos métodos de evaluación: hidrólisis de gelatina en placa y por espectrofotometría, la hidrólisis de esteres de bajo peso molecular (BAEE).

La obtención de semen se realizó a partir 5 machos adultos sanos, mediante estimulación manual del pene. Se utilizó la segunda fracción espermática de cada eyaculado, midiendo su volumen en copa recolectora y la motilidad espermática se evaluó en forma subjetiva al microscopio de contraste de fases.

La concentración espermática se determinó mediante recuento en la cámara de Neubauer, de acuerdo a las técnicas estandarizadas en el laboratorio. Se trabajó con semen fresco (control) y semen congelado proveniente de los mismos machos.

El pellet obtenido de cada muestra se ajustó a una concentración de 200×10^6 de esp/ml, incubándolas por períodos de 0, 30, 60 y 90 minutos a temperatura ambiente (21°C) para inducir la capacitación de los espermatozoides.

Luego de cada tiempo de capacitación se realizó la medición de la actividad enzimática de acrosina a través de hidrólisis de gelatina en placa y espectrofotometría de esteres de bajo peso molecular (BAEE).

Los resultados obtenidos en relación a la actividad enzimática de acrosina durante la capacitación espermática en perros se describieron en términos de promedios, y se evaluaron mediante análisis de varianza ANOVA y LSD Fisher *a posteriori*.

Se realizaron 5 replicas experimentales y se usó 1 eyaculado por perro en promedio.

En relación al tipo de población espermática, los espermatozoides congelados y frescos (control) presentaron diferencias ($P < 0,05$) en relación al tamaño de los halos de digestión, observándose un diámetro promedio de halo mayor en espermatozoides frescos en comparación a los congelados de acuerdo a los tiempos de capacitación.

Al evaluar la actividad enzimática de acrosina a través de la hidrólisis de BAEE, se observó que durante los diferentes tiempos de capacitación en los espermatozoides frescos, la actividad enzimática de acrosina presentó variaciones ($P < 0,05$) con mayor actividad enzimática en los espermatozoides a partir de los 60 min, mientras que en espermatozoides congelados la mayor actividad se observó al tiempo 0 de capacitación (no capacitados) ($P < 0,05$).

La actividad enzimática de acrosina en espermatozoides congelados sería menor que en los espermatozoides frescos, tanto en su actividad proteolítica en gelatina, como en espectrofotometría con BAEE. Además, la actividad de proacrosina/acrosina en espermatozoides caninos frescos se vería aumentada a través del tiempo de capacitación a diferencia de los espermatozoides congelados donde no se observó diferencias entre los diferentes tiempos de incubación en medio capacitante, por lo que se sugeriría que los espermatozoides frescos podrían retener mayores cantidades de acrosina que aquellos congelados/descongelados, lo que se traduciría en una acción más gradual en el tiempo observándose la mayor liberación de enzima entre los tiempos 60 y 90 minutos

ABSTRACT

A successful fertilization depends, among other things, to the ability of the sperm to undergo acrosome reaction. This phenomenon is essential for gamete interaction and subsequent fertilization of the oocyte. Cryopreservation of dog spermatozoa can affect this process and thus the fertilizing ability can be altered.

This thesis studied the effect of capacitation time on acrosine activity in frozen dog sperm, using two evaluation methods: hydrolysis of gelatin on plate and the hydrolysis of esters of low molecular weight (BAEE) by spectrophotometry.

The semen was obtained from 5 healthy adult dogs, by manual stimulation of the penis. It was used the sperm rich fraction of each ejaculated. The volume was measuring in a glass recipient, the sperm motility was evaluated subjectively with the phase contrast microscope and the sperm concentration was determined by counting in the Neubauer chamber, according to standardized techniques of the laboratory.

Fresh (control) and frozen semen from the same male were used as one experimental replicate. The samples were centrifugated and the pellet obtained from each one was adjusted to 200mill esp / ml in fert-talp medium. Each sample was incubated, for 0, 30, 60 and 90 minutes at room temperature (21 ° C) to induce sperm capacitation. After each time of culture the enzymatic activity of acrosina was evaluated by hydrolysis of gelatin on plate and spectrophotometry. The results obtained were evaluated by ANOVA and **LSD fisher** *a posteriori*. Five experimental replicates were performed, using one ejaculated per dog.

Frozen and fresh (control) sperm showed differences ($p < 0.05$) in the size of the halos of digestion, higher diameter of halo were observed in fresh sperm as compared to frozen spermatozoa according to time of culture.

Using the hydrolysis of BAEE by spectrophotometry, in frozen sperm, the activity of acrosin was higher ($P < 0.05$) at 60 min than the others times, while the highest activity was observed at time 0 in frozen sperm ($P < 0.05$).

The enzyme activity of acrosin was lower in frozen sperm than in fresh sperm, in both, proteolytic activity in gelatin, and in spectrophotometry with BAEE. In addition, the activity of proacrosin / acrosin in canine fresh sperm increased over time in contrast, frozen sperm did not show differences throughout incubation time. This suggest that fresh sperm could retain more acrosin than those frozen / thawed, resulting in a gradual increasing activity over time until 90 minutes.

INTRODUCCION

Dentro de las biotecnologías reproductivas, la criopreservación de semen cobra importancia debido a las ventajas que ofrece, como permitir un mayor tiempo de almacenaje, aumentando las posibilidades de cruzar razas desde diferentes partes del mundo debido a la posibilidad de utilizar reproductores alejados geográficamente. Por otro lado, permite también sobrepasar el efecto de la edad del macho, o bien, utilizar semen de machos después de muertos (De los Reyes, 2004). No obstante lo anterior, la congelación de los espermatozoides, produce daño a las estructuras espermáticas, pudiendo alterar la viabilidad celular en casos más severos o modificar su capacidad fecundante (Parks y Graham, 1992; Rota *et al.*, 1999). Lo anterior se ha visto reflejado en menores índices de preñez en comparación al uso del semen fresco o refrigerado (Linde-Forsberg, 1995).

La reducción de la fertilidad en el semen congelado ha sido atribuida, en gran medida, a alteraciones en la membrana plasmática del espermatozoide durante el enfriamiento, congelación y descongelación (Parks y Graham, 1992; De los Reyes, 2004). El proceso de congelación, según algunos estudios promovería cambios relacionados con el proceso de capacitación del espermatozoide que afectarían la interacción gamética y la posterior fecundación.

Durante la capacitación espermática, el espermatozoide debe completar dos procesos claves antes de fecundar al ovocito: expresar una motilidad hiperactiva y sufrir la reacción acrosómica (RA) (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). Durante la hiperactivación flagelar, el espermatozoide experimenta un aumento en la velocidad y fuerza de batir del flagelo (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002). La RA permite la liberación del contenido acrosomal, incluyendo la activación del sistema proacrosina/acrosina (Baba *et al.*, 1989; Barros *et al.*, 1996).

Se piensa que en la RA, el sistema proacrosina/acrosina participa en diferentes eventos: durante la hidrólisis específica de glicoproteínas de la zona pelúcida (ZPGs), y como un “receptor secundario” durante la penetración espermática por la zona pelúcida (Barros *et al.*, 1993; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002). Además durante la reacción acrosómica, la acrosina puede fragmentar algunas proteínas acrosomales

específicas, las cuales conducirían a una liberación gradual y coordinada del contenido vesicular (Moreno *et al.*, 2002).

Recientemente se ha podido detectar la presencia de acrosina en espermatozoides frescos y congelados de perro mediante el uso de anticuerpo monoclonal anti acrosina humana en espermatozoides no capacitados (Cortés *et al.*, 2006) y capacitados (De los Reyes *et al.*, 2009b) determinándose una pérdida más precoz de acrosina en espermatozoides congelados, que podría implicar una actividad más temprana o más breve, lo que plantea la necesidad de evaluar en forma comparativa la actividad enzimática de acrosina durante diferentes tiempos de capacitación en espermatozoides frescos y congelados, ya que se ha demostrado por otra parte, que la actividad de acrosina sería un índice adecuado para evaluar el daño celular luego de la congelación en los espermatozoides de esta especie (Froman *et al.*, 1984).

Evaluar en perros la actividad de la acrosina a diferentes tiempos de capacitación como parámetro de funcionalidad espermática, permitiría establecer protocolos más adecuados para el uso de semen congelado en esta especie.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- **Congelación de Espermatozoides Caninos**

Los espermatozoides fueron las primeras células satisfactoriamente congeladas y descongeladas, debido al descubrimiento del glicerol como crioprotector (Polge *et al.*, 1949). En 1969, Seager obtuvo la primera gestación exitosa en perras utilizando semen congelado (Seager, 1969). Sin embargo, las diferencias individuales en semen de perros en relación a la tolerancia al enfriamiento, es una de las fuentes de variación en las tasas de preñez (Linde-Forsberg, 1995).

Se han propuesto diferentes diluyentes para la preservación del semen canino (Pinto *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Ponglowhapan *et al.*, 2004; Verstegen *et al.*, 2005) y la finalidad de ellos es disminuir el daño provocado por el frío, protegiendo a los espermatozoides para preservar la motilidad y fertilidad.

A diferencia del semen refrigerado, el semen que se somete al proceso de congelación a -196°C , debe tener un agente crioprotector permeable. Los agentes crioprotectores son sustancias esenciales, 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 ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$) y algunos azúcares no permeables de bajo peso molecular se han descrito como exitosos en la congelación en la especie canina y en otras especies animales, siendo el glicerol el agente crioprotector más utilizado (Parks y Graham, 1992; Watson, 2000; De los Reyes *et al.*, 2002; De los Reyes, 2004). 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). La adición y remoción del crioprotector genera un importante estrés osmótico y tóxico sobre la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de criopreservación. El daño dependerá, entre otras cosas, de la permeabilidad de la membrana celular a éste (Hammerstedt *et al.*, 1990; England, 1993; Silva y Verstegen, 1995; Watson, 2000). 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).

Además, los diluyentes contienen sustancias como yema de huevo o 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 (England, 1993; Linde-Forsberg, 1995; Linde-Forsberg *et al.*, 1999).

La susceptibilidad a las bajas temperaturas varía según la especie. Los espermatozoides caninos serían relativamente resistentes a la criopreservación, debido a una menor relación de ácidos grasos saturados y poliinsaturados en los fosfolípidos de membrana (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 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 Capacitación Espermática 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 naturaleza del daño de membrana generado por las bajas temperaturas se debería a un reordenamiento de los lípidos de membrana 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; 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).

Se ha sugerido que los procedimientos de congelación y/o la descongelación de espermatozoides mamíferos, inducirían cambios equivalentes a la capacitación, tales como activación de enzimas, ruptura de membrana plasmática y un incremento en la concentración de calcio intracelular (Bravo *et al.*, 2005; Fuller y Whittingham, 1997; Schembri *et al.*, 2002), acortando el periodo de tiempo de vida luego la descongelación, y disminuyendo la fertilidad del espermatozoide criopreservado (Rota *et al.*, 1999).

El enfriamiento celular hace que la membrana se torne más permeable luego de la congelación (Watson, 2000) y se genera la depolimerización prematura de los filamentos de actina, lo que permitiría el acercamiento de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa promoviendo la RA (Spungin *et al.*, 1995). 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).

Durante la criopreservación se producen alteraciones en los canales de calcio, aumentando el influjo de este ión a la célula, del cual es dependiente el proceso de capacitación (Mahi y Yanagimachi, 1978; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). Los sistemas de regulación de calcio 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).

- **Capacitación Espermática (CE)**

El espermatozoide que ha madurado en el epidídimo aunque puede moverse progresivamente, no posee la capacidad de fecundar un ovocito. Esta capacidad se adquiere después de permanecer en el tracto reproductivo de la hembra por un cierto periodo de tiempo, variable entre las especies, donde el espermatozoide experimenta diversos cambios fisiológicos y bioquímicos, denominados colectivamente capacitación espermática (Austin, 1951; Chang, 1951; Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Kawakami *et al.*, 1998).

El cambio total durante la capacitación es un efecto combinado de múltiples modificaciones en las proteínas/glicoproteínas y componentes lipídicos de la membrana plasmática del espermatozoide, que incluyen modificaciones en los canales de iones (Yanagimachi, 1994), resultando en un incremento en la fluidez de membrana y remodelación de la superficie espermática (Breitbart, 2002). La capacitación espermática involucra los cambios para la hiperactivación y Reacción Acrosómica (RA).

La capacitación es un fenómeno dependiente del tiempo, y estos tiempos en estudios *in vitro* varían entre especies, individuos e incluso entre subpoblaciones de espermatozoides dentro de un eyaculado (Harrison, 1996), también, entre espermatozoides epididimales y eyaculados. Este proceso depende de la composición del medio de capacitación utilizado (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994; Guérin *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999). 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 previas han descrito que los espermatozoides caninos congelados necesitarían un menor tiempo de capacitación para lograr unión a la ZP de los ovocitos (2 a 4 horas) (Guérin *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2005; De Los Reyes *et al.*, 2009a). 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).

En estudios de fecundación *in vitro* en caninos se ha determinado que en al inicio de la coincubación gamética, el porcentaje de penetración a la ZP es mayor con espermatozoides congelados, en comparación a los frescos, no obstante esta relación se ve invertida en tiempos mayores de coincubación (De los Reyes *et al.*, 2009; Palomino y De los Reyes, 2008), lo que sugeriría un proceso de capacitación más temprana en los espermatozoides congelados.

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 (Petrunkina *et al.*, 2003).

La capacitación y RA de los espermatozoides mamíferos, puede ocurrir en ausencia de ovocitos, en condiciones *in vitro* adecuadas que imitan el ambiente fisiológico del tracto reproductivo de la hembra (Yanagimachi, 1994; Hewitt y England, 1997), induciendo a través de ciertos constituyentes específicos el proceso de capacitación.

A pesar de existir algunas diferencias en los constituyentes de estos medios de capacitación, todos ellos deben poseer algunos compuestos que son fundamentales para que el espermatozoide de perro experimente la capacitación, como la albúmina, el bicarbonato, el calcio y la glucosa (Mahi y Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1994; Harrison, 1996; Bavister, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003).

Los constituyentes que forman parte de estos medios, deben cumplir con ciertos requisitos como: a) aportar nutrientes como fuente de energía, b) proteger las células contra el efecto nocivo del enfriamiento, c) evitar cambios de pH, d) mantener presión osmótica y balance electrolítico, e) inhibir la proliferación bacteriana, f) dar el volumen necesario para que éste pueda ser utilizado en las inseminaciones, g) tener crioprotectores que protejan a los espermatozoides durante el congelamiento (De los Reyes, 2004).

La albúmina sería fundamental ya que la sobrevida de los espermatozoides caninos disminuye en ausencia de ella (Mahi y Yanagimachi, 1978). Dentro de sus funciones, la albúmina induciría cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática, removiendo colesterol y aumentando los niveles de fosfolípidos, eventos esenciales para la capacitación (Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). La ausencia de esta macromolécula tendría un efecto detrimental sobre la motilidad del espermatozoide y además haría que éstos se adhirieran a las superficies de los recipientes plásticos, lo cual dificultaría el manejo del semen.

La glucosa presentaría un efecto similar a la albúmina favoreciendo la RA en el espermatozoide canino (Mahi y Yanagimachi, 1978; Fraser, 1995), preservando la reserva de energía intracelular y por lo tanto la motilidad espermática (Ponglowhapan *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2006).

El calcio por su parte sería el elemento más relevante para la ocurrencia de la reacción acrosómica (Bedford, 1983; Harrison, 1996), siendo el componente más crítico (Mahi y Yanagimachi, 1978; Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001). La presencia de este ión en el medio de capacitación permitiría su influjo a la célula, induciendo la capacitación y por lo tanto la RA del espermatozoide (Mahi y Yanagimachi, 1978; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). En cambio, la ausencia de calcio disminuye la supervivencia de los espermatozoides e impide la exocitosis acrosomal (Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001).

El bicarbonato es otro componente de los medios inductores de la capacitación, el cual mantiene el pH básico requerido para que los espermatozoides se mantengan móviles y experimenten la RA (Mahi y Yanagimachi, 1978). A pH 8 la motilidad disminuye lo cual provoca una menor capacidad de penetración de la ZP por parte de los espermatozoides (Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

Reacción Acrosómica (RA) :

La ocurrencia de la RA ha sido utilizada como un indicador de la culminación del proceso de capacitación (Yanagimachi, 1994). 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). 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 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). La ZP genera reacciones de fosforilación y desfosforilación en 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).

En el proceso de RA, 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) dentro de esta la acrosina (Cortés *et al.*, 2006).

La RA ocurre en las cercanías o en contacto con las cubiertas del ovocito y en espermatozoides de perros se ha observado que tanto los espermatozoides reaccionados como los no reaccionados, serían capaces de unirse a la zona pelúcida de ovocitos caninos (Kawakami *et al.*, 1993; Palomino y De los Reyes, 2009).

La RA en el espermatozoide mamífero es calcio dependiente, los medios con concentraciones elevadas de calcio producirían un incremento en el número de espermatozoides reaccionados en perro, mientras que bajas concentraciones producirían una disminución de los mismos (Sirivaidyapong *et al.*, 1999).

- **Acrosina**

La acrosina es una glicoproteína hidrosoluble con propiedades serino-proteasa, que se encuentra en su forma zimógena (proacrosina) en el acrosoma del espermatozoide de mamífero. La proacrosina se transforma en su forma activa, acrosina, mediante un proceso de auto activación durante la reacción RA. (Baba *et al.*, 1989; Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002).

En el modelo del cerdo, la activación de proacrosina *in vitro* implica un clivaje autocatalítico entre los aminoácidos Arg23 y Val24, resultando en una molécula de dos cadenas. El nuevo fragmento formado por 23 aminoácidos (cadena liviana) está unido por puentes disulfuro al resto de la molécula (cadena pesada). Esta, tiene un peso molecular de 49 kDa, y es la forma enzimáticamente activa, y constituye la alfa acrosina (α -acr) (Baba *et al.*, 1989; Tranter *et al.*, 2000; Raterman y Springer., 2008). El segundo y tercer clivaje, tienen lugar en el carboxilo terminal entre Lys363 y Arg367, y entre Arg322 y Pro323, respectivamente. Estos clivajes conducen a una pérdida secuencial de 18 a 43 fragmentos residuales (Baba *et al.*, 1989 Tranter *et al.*, 2000; Raterman *et al.*, 2008). Estos últimos eventos resultan en la formación de la forma estable enzimáticamente activa de 36kDa denominada beta acrosina (β -acr) (Schleuning *et al.*, 1976; Topfer-Petersen y Checova, 1990). La acrosina se activa de diferentes formas dependiendo de la especie animal; es así como se ha observado que los espermatozoides de ratón la activación de la proacrosina ocurre mientras el espermatozoide está en contacto con el ovocito, y no durante la RA (Bhattacharyya *et al.*, 1979). En los espermatozoides de cerdo, se ha visto que la acrosina se encuentra inactivada por un inhibidor presente en el plasma seminal que es eliminado o inactivado durante la permanencia 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). La localización y determinación de la actividad de la proacrosina-acrosina en el acrosoma se ha descrito como herramienta para la evaluación de la RA y de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides de diversas especies (Froman *et al.*, 1984; Cortés *et al.*, 2006). Se ha demostrado la presencia de acrosina mediante el uso de técnicas de inmunocitoquímica, en el acrosoma intacto de varias especies mamíferas, tales como: cobayo, hámster, humano (Barros *et al.*, 1992), bovino (De los Reyes y Barros,

2000), conejo (Valdivia *et al.*, 1994), porcino y ovino (Fléchon *et al.*, 1977) y últimamente en perros (Cortés *et al.*, 2006; De los Reyes *et al.*, 2009b).

La relevancia fisiológica de la acrosina durante el proceso de fecundación en los mamíferos se ha inferido a partir de estudios en algunas especies como el hámster, que han mostrado que los inhibidores de esta enzima impiden la fecundación *in vitro* (De Ioannes *et al.*, 1990) e *in vivo* (Dudkiewicz, 1984). En base a estos y a otros estudios, se han sugerido las principales funciones para la acrosina durante la fecundación en mamíferos, las que serían: servir como una proteína de unión espermática secundaria a la ZP y ayudar en la penetración del espermatozoide a través de la ZP (Moreno y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002). Otros estudios han demostrado una relación entre la actividad de proacrosina/acrosina con el potencial fecundante de espermatozoides humanos (Shimizu *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 1997), además de ser un método efectivo de evaluación de la función espermática *in vitro* (Ball *et al.*, 1997).

El sustrato natural de la acrosina es la ZP de los ovocitos (Barros *et al.*, 1996), lo que regula que la RA ocurra principalmente en la superficie de la ZP (Cortés *et al.*, 2006).

La participación de la acrosina en la penetración del espermatozoide a través de la ZP ha sido evidenciada experimentalmente (Urch, 1986; Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000). Es así como al acrosina digiere la ZP, permitiendo que los espermatozoides, que han experimentado la RA, penetren a la ZP (Urch *et al.*, 1985). A través del bloqueo de la unión del espermatozoide con ciertos tipos de polisacáridos sulfatados, se ha propuesto que este proceso es esencialmente una interacción entre proacrosina y una glicoproteína de la ZP (ZP2), específicamente su porción glicosilada (Jones *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1999). Esta unión no sólo permitiría al espermatozoide mantenerse fuertemente unido a la ZP del ovocito, sino que además estaría involucrada en los primeros pasos de la conversión de la proacrosina en acrosina (Barros *et al.*, 1996).

En relación a la actividad enzimática, en los espermatozoides caninos se ha determinado una disminución de la actividad de acrosina al aumentar el tiempo de capacitación en espermatozoides congelados/descongelados en comparación a los espermatozoides frescos (Froman *et al.*, 1984).

Al dañarse el acrosoma, por un trastorno celular como el provocado por el frío, podría generarse la activación de la acrosina y su dispersión junto a la matriz acrosomal (Kawakami *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2006). Sin embargo, se describe que además de activarse, esta enzima se vería desestabilizada por acción del frío (Polakoski *et al.*, 1973; Froman *et al.*, 1984).

Mediante inmunofluorescencia indirecta y utilizando anticuerpos monoclonales anti acrosina humana, se ha observado la presencia de esta enzima en espermatozoides caninos, demostrándose que aquellos congelados presentaron exocitosis acrosomal entre 0 y 30 minutos al incubar a los 20° C y durante la incubación a 37° C se produjo exocitosis acrosomal entre los 30 y 60 minutos de capacitación (Aretio, 2006). En dicho trabajo 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.

A través de *western blots* y por ensayos de actividad enzimática, se ha descrito que espermatozoides caninos congelados/descongelados tendrían una mayor proporción de acrosina activa (beta acrosina) que espermatozoides frescos al inicio de la capacitación (De los Reyes *et al.*, 2009b). Lo anterior sugiere que la acrosina, probablemente en la forma de beta acrosina, se perdería desde el acrosoma durante o después de la congelación y/o descongelación de los espermatozoides (De los Reyes *et al.*, 2009b).

HIPÓTESIS

La actividad de acrosina en espermatozoides de perro se verá modificada cuando los espermatozoides son sometidos a preservación a bajas temperaturas (congelados/descongelados), lo que implicará diferencias, que se manifestará en una activación más rápida de esta enzima en comparación a los espermatozoides frescos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la actividad enzimática de proacrosina/acrosina en espermatozoides caninos congelados/descongelados durante el proceso de capacitación espermática.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar las diferencias de la actividad de proacrosina/acrosina en espermatozoides caninos frescos y congelados/descongelados, preincubados durante diferentes tiempos en medio capacitante.
- Determinar posibles diferencias en la actividad enzimática de acrosina entre los diferentes tiempos de incubación en medio inductor de la capacitación
- Evaluar y comparar la actividad enzimática de acrosina en espermatozoides congelados de perro, mediante la actividad proteolítica en sustratos de alto peso molecular (gelatina) y espectrofotometría con ésteres de bajo peso molecular, Benzoil Arginina Etil Ester (BAEE).

MATERIAL Y MÉTODO

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La evaluación con espectrofotometría se hizo en la Unidad de Reproducción y Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile

- **Obtención de Semen**

El semen se obtuvo de 5 machos adultos sanos, mediante estimulación manual del pene. Se utilizó la segunda fracción espermática de cada eyaculado, evaluándose el volumen en copa recolectora y la motilidad espermática en forma subjetiva con microscopía de contraste de fases.

La concentración espermática se determinó mediante recuento en la cámara de Neubauer, de acuerdo a las técnicas estandarizadas en el laboratorio. Se trabajó con semen fresco (control) y semen congelado proveniente de los mismos machos.

- **Congelación de Semen**

Los espermatozoides se lavaron del plasma seminal mediante centrifugación (700 X g por 5 min.) en buffer TRIS (tris-hidroximetil-aminometano), (Rota *et al.*, 1999), en una proporción 1:2 y el pellet se resuspendió a temperatura ambiente en un diluyente de congelación en base a tris-citrato, fructosa y yema de huevo con 5% de glicerol de acuerdo a las técnicas descritas previamente en De los Reyes *et al.* (2006).

El semen diluido se envasó en pajuelas francesas de 0,25mL, selladas con polyvinilalcohol (PVA; Sigma), dejándolas en vapores de nitrógeno líquido durante 9 minutos para posteriormente sumergirlas en nitrógeno líquido a -196°C, donde se almacenaron en el estanque de congelación hasta su utilización.

Se descongelaron un mínimo de 4 pajuelas por réplica experimental (una por cada tiempo de capacitación) las que provenían del mismo eyaculado. Las pajuelas se descongelaron en baño de agua a 60°C durante 8 segundos.

- **Actividad Enzimática**

Tanto las muestras en estado fresco como descongelado se lavaron en forma separada del semen y del diluyente de congelación respectivamente, mediante centrifugación a 100 X g durante 15 min. El pellet obtenido de cada muestra se resuspendió en medio Fert Talp (pH 7,2), para obtener una concentración de 200×10^6 de esp/ml, manteniendo los espermatozoides en incubación por 0, 30, 60 y 90 minutos a temperatura ambiente (21°C) para capacitación. Luego de cada tiempo de capacitación se realizó la medición de la actividad enzimática de acrosina a través de dos métodos:

A. Medición de Actividad Enzimática Mediante Digestión de Gelatina.

Sobre un portaobjetos limpio y previamente refrigerado, se depositó en un extremo de este una gota de 100 μ L de una solución de gelatina (Sigma) 2,5%. Luego las placas se mantuvieron a temperatura ambiente (21°C) hasta su completo secado. Posteriormente, se fijaron en solución glutaraldehído (0,05% en PBS), se lavaron 2 veces con PBS y se almacenaron toda la noche en cámara húmeda a 4°C. (Valdivia *et al.*, 1994; Sillerico *et al.*, 1996).

Luego, sobre los portaobjetos con gelatina, se depositaron 50 μ l de las muestras de espermatozoides (frescos y descongelados de cada uno de los tiempos de capacitación). Las muestras se extendieron en el portaobjetos y se incubaron a 38°C y 5% de CO₂ por 24 h.

Posteriormente se tiñeron con Azul de Coomasie (Sigma), 1% por 5 min observándose los halos de digestión al microscopio de contraste de fases.

Los halos de digestión se clasificaron cualitativamente de acuerdo a ausencia o presencia de halo y cuantitativamente de acuerdo al diámetro de los halos en micrones, para lo cual se utilizó un ocular cuadrulado de 10 x milimetrado. Se observaron un total de 200 espermatozoides por placa, para cada tiempo de capacitación en las muestras tanto frescas como congeladas/descongeladas.

B. Espectrofotometría con Esteres de Bajo Peso Molecular (BAEE).

B.1 Obtención de Extracto Espermático

Las muestras de espermatozoides frescas y descongeladas se centrifugaron a 100 X g durante 10 minutos, el pellet obtenido se resuspendió en 125 µl de solución ácida según Moreno *et al.* (1998), dejándola toda la noche a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 9.184 X g durante 30 min y el sobrenadante se almacenó a -20°C en tubos eppendorf, hasta su evaluación.

La concentración (mg/mL) de enzima utilizada se estimó previamente mediante la curva de calibración de albúmina de acuerdo a lo descrito en Bradford (1976).

B.2. Actividad Enzimática Mediante Espectrofotometría

Se utilizó 10 µL de muestra más 3 mL de BAEE (pH8) en tubos eppendorf (Moreno *et al.*, 1999), se incubó por 30 min a 37°C en baño de agua, deteniéndose luego la reacción por frío, colocando los tubos directamente en hielo picado. Posteriormente, se midió la absorbancia a la luz U.V a una longitud de onda (λ) de 253nm. Se usó una lámpara de Deuterio (D) y una cubeta de cuarzo de 1ml

La unidad de actividad (U) fué 1µmol de BAEE hidrolizado/min/mg de proteína:

$$U = CE * \Delta DO * [enzima] * dilución / tpo \text{ incubación (min)}$$

Donde:

ΔDO = Diferencial de Densidad Optica = Absorbancia inicial - Absorbancia final.

CE = Coeficiente de Extinción Molar = $(1150M)^{-1} * cm^{-1}$

U = Unidad de Actividad Específica = µMol/min/mg

- **Análisis estadístico**

En relación al tipo de población espermática, los espermatozoides congelados y frescos se analizaron en cuanto a actividad proteolítica de acrosina, siendo las variables consideradas la actividad enzimática de los espermatozoides. De acuerdo a la digestión de gelatina en placa, se evaluaron los promedios de los diámetros de los halos de digestión de gelatina, en cada tiempo de capacitación y para cada tipo de espermatozoides.

Del mismo modo la actividad con BAEE se evaluó de acuerdo a la cantidad de BAEE hidrolizado /min/mg de proteína en cada tiempo de capacitación y para cada tipo de espermatozoides.

Para establecer si existían diferencias significativas entre éstos promedios, se realizó un análisis de varianza. Las eventuales diferencias entre los promedios de los halos de gelatina, se evaluaron a través de la prueba de Tukey.

Se utilizó el siguiente modelo estadístico por separado, para la evaluación de actividad sobre gelatina y sobre BAEE, respectivamente:

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

Donde:

y_{ijkl} = Variables experimentales (diámetros de halos de gelatina y μmol de BAEE/min/mL de proteína)

μ = Media poblacional.

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

P_j = Efecto fijo del j -ésimo período de capacitación *in vitro* ($j = 1, \dots, 4$: tiempos de capacitación).

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

e_{ijkl} = Error experimental.

Todos los análisis se realizaron con el programa Infostat®, versión 2004, Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina y se consideró un valor de $p < 0,05$ como significativo.

RESULTADOS

La actividad enzimática de acrosina durante la capacitación espermática en perros se describió en términos de promedios, realizando 6 réplicas experimentales en el caso de la Hidrólisis de Esteres de Bajo Peso Molecular y 5 réplicas experimentales en el caso de la Digestión de Gelatina en Placa.

I. Análisis de la Digestión de Gelatina en Placa

Para la evaluación de los halos de digestión de gelatina en placa, se realizaron 5 réplicas experimentales, evaluando un total de 4.000 espermatozoides, de los cuales 2.000 fueron sometidos a congelación y 2.000 se procesaron como frescos. En cada tipo de muestra se contabilizaron 200 espermatozoides por cada tiempo de capacitación y se clasificaron de acuerdo al tamaño de diámetro de halo de digestión en: A, sin halo de digestión; B, halo hasta 10 μm de diámetro; C, halo con diámetro de digestión entre 10 y 20 μm y D, halo de digestión mayor a 20 μm (Figura 1),

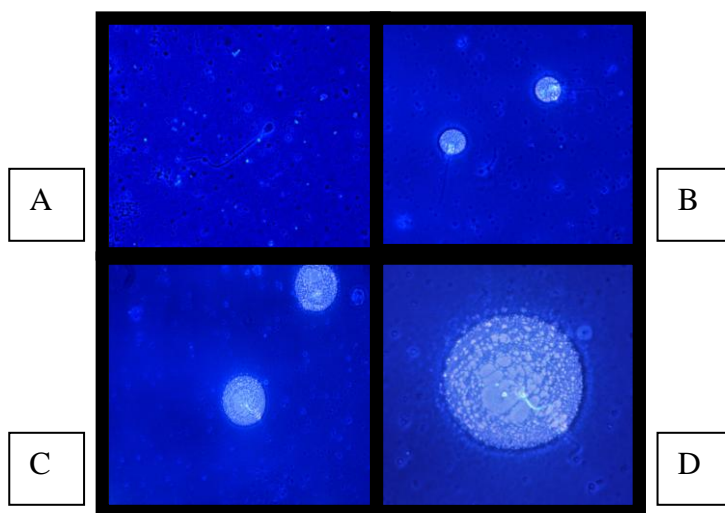


Figura 1: Fotomicrografías de halos de digestión de gelatina obtenidas con el microscopio de contraste de fases (x200). Ensayos de digestión de gelatina en placa con espermatozoides frescos y congelados de perro.

Los promedios y desviación estándar (DS) de los diferentes diámetros de halos obtenidos en cada tiempo de capacitación a partir de espermatozoides frescos y congelados muestran en la figura 2.

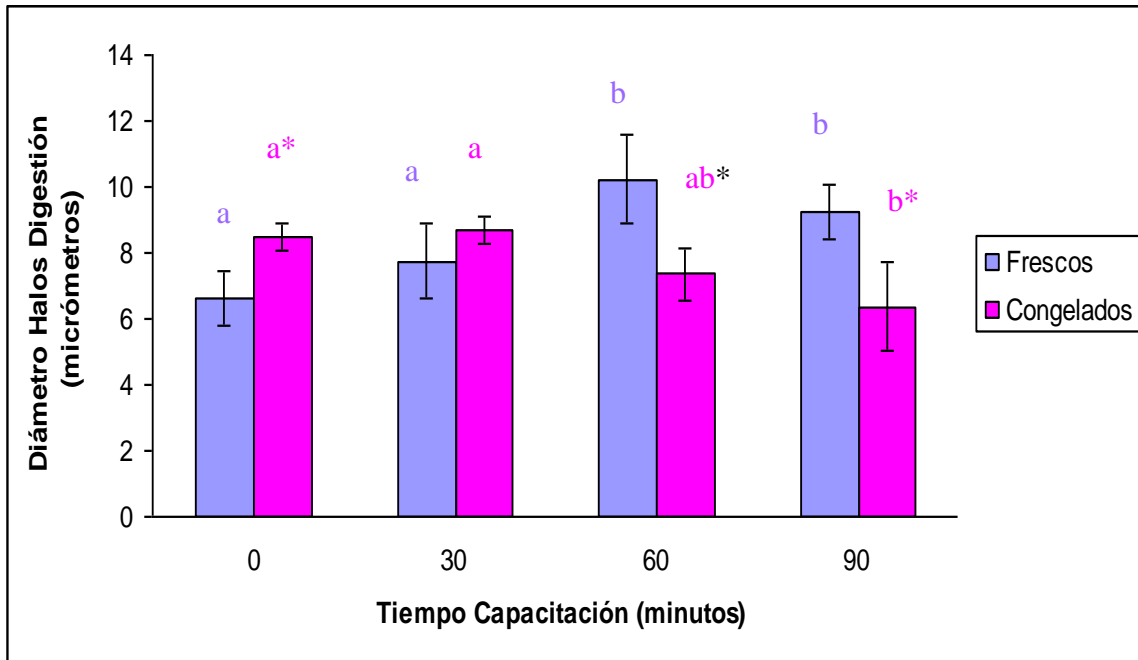


Figura 2: Valores de los diámetros de los halos de digestión de gelatina de espermatozoides frescos y congelados sometidos a diferentes tiempos de capacitación. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre diámetros de halos dentro de un mismo tipo de espermatozoide. Los asteriscos indican diferencias entre espermatozoides frescos y congelados cuando son comparados a los mismos tiempos de capacitación.

Se observó que durante los diferentes tiempos de capacitación los espermatozoides congelados presentaron actividad enzimática a partir del tiempo 0, presentando una leve variación a lo largo del tiempo. Los espermatozoides frescos, presentaron un notorio aumento de actividad en el tiempo 60 (Fig.2) los espermatozoides congelados presentaron un tamaño de halo mayor al presentado por aquellos frescos. Sin embargo, en el tiempo 60, los espermatozoides frescos presentaron un tamaño de halo de digestión notoriamente

mayor ($p < 0,0001$) al presentado por los espermatozoides congelados, manteniendo esta tendencia a los 90 min.

II- Análisis de la Hidrólisis de Esteres de Bajo Peso Molecular (BAEE) a través de Espectrofotometría

La concentración (mg/mL) de enzima utilizada se estimó previamente mediante la curva de calibración de albúmina de acuerdo a lo descrito en Cortés *et al.* 2006

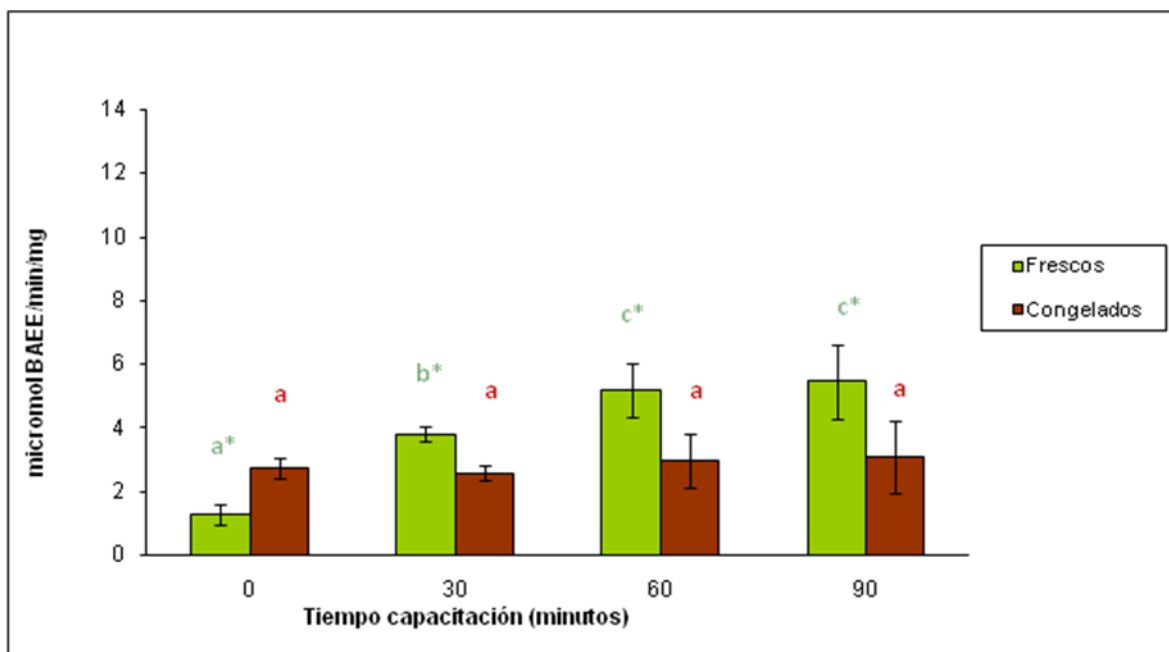


Figura 3: Actividad de acrosina sobre BAEE en extractos de espermatozoides Frescos y Congelados de perros. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre diámetros de halo dentro de un mismo tipo de espermatozoides. Los asteriscos indican diferencias entre espermatozoides frescos y congelados cuando son comparados a los mismos tiempos de capacitación.

Al comparar ambas poblaciones espermáticas (frescos y congelados) se observó que en tiempo 0 de capacitación, el promedio de la actividad de acrosina determinada mediante hidrólisis de BAEE, obtenida con espermatozoides congelados fue significativamente mayor que en los espermatozoides frescos (figura 3). Sin embargo, a partir del tiempo 30 de

capacitación, la actividad de acrosina fue significativamente mayor en los espermatozoides frescos en comparación a los congelados. Esta tendencia se mantuvo hasta los 90 min.

DISCUSIÓN

El presente estudio demostró que el tiempo de incubación durante la capacitación espermática *in vitro* de espermatozoides caninos frescos y criopreservados tiene una influencia directa sobre la actividad de acrosina, indicativa del proceso de RA.

Se encontraron diferencias en la actividad de acrosina entre espermatozoides frescos y congelados sometidos a diferentes tiempos de capacitación *in vitro*. Estas diferencias se pudieron observar mediante evaluación a través de dos métodos: digestión de gelatina en placa e hidrólisis de BAEE.

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 caninos, mediante anticuerpos mono y policlonales (Cortés *et al.*, 2006), como también a través de su actividad enzimática (Froman *et al.*, 1984; Kawakami *et al.*, 1993; Cortés *et al.*, 2006).

En el presente estudio la actividad enzimática de acrosina se midió hasta los 90 minutos de capacitación *in vitro*. La mayor actividad enzimática observada en espermatozoides frescos fue a partir de los 60 minutos de capacitación, tanto en digestión de gelatina en placa como en hidrólisis de BAEE, sin encontrar variaciones hasta los 90 min. Sin embargo, la presencia de la enzima en espermatozoides frescos de perro, pareciera ser más temprana, de acuerdo a otros estudios, utilizando anticuerpos monoclonales (Gutiérrez, 2007).

Con respecto a los espermatozoides congelados evaluados mediante hidrólisis de gelatina en placa, se observó que éstos presentaron mayor actividad enzimática que aquellos frescos, a partir del tiempo 0 de capacitación, disminuyendo su actividad hasta los 90 minutos a diferencia de los espermatozoides frescos, que presentaron un incremento en su actividad a través del tiempo. A los 60 min de incubación, los espermatozoides frescos tuvieron un tamaño de halo de digestión notoriamente mayor al de los espermatozoides congelados, manteniendo esta tendencia a los 90 min. A pesar que los tamaños de halos

registrados en este trabajo, fueron menores a lo obtenido por Ficsor *et al.*, (1983) en espermatozoides frescos de perros incubados por 30 min, es coincidente el incremento en la actividad enzimática a través del tiempo de capacitación en los espermatozoides frescos.

Utilizando el método de hidrólisis en BAEE, la actividad enzimática también se incrementó en los espermatozoides frescos pero, sin embargo se mantuvo constante a lo largo de todo el ensayo en los espermatozoides congelados a diferencia de lo observado en la evaluación efectuada por digestión en placa, donde se observó que la actividad de acrosina disminuía a partir de los 60 min de incubación. Esta diferencia significativa entre ambas técnicas empleadas podría ser atribuida a que la medición de halos, en la técnica en placa, fue corroborada con el uso de anticuerpos antiacrosina, lo que permitió una evaluación más específica que el BAEE, ya que este último incluye todas las proteasas del acrosoma pudiendo resultar en actividad enzimática menos precisa (y/o sobrevalorada) que la observada en el ensayo con digestión de gelatina en placa.

Resultados obtenidos en espermatozoides caninos sin capacitar, han observado una mayor actividad de acrosina en espermatozoides congelados/descongelados con respecto a los frescos, inmediatamente después de la descongelación (Cortés *et al.*, 2006), lo que indicaría una activación más temprana en los espermatozoides sometidos al proceso de criopreservación. Del mismo modo, otros estudios realizados en espermatozoides caninos sometidos a criopreservación; [congelación (Aretio, 2006) y refrigeración (Becker, 2007)], demostraron que los mayores porcentajes de pérdida o liberación de acrosina ocurría en los primeros tiempos de capacitación espermática, lo que podría estar asociado a una mayor actividad de la enzima, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo. Esto último, sería coincidente a lo descrito en espermatozoides caninos congelados/descongelados, los cuales exhibirían una disminución de la actividad de acrosina al aumentar el tiempo de capacitación (Froman *et al.*, 1984).

Estudios de fecundación *in vitro* mediante microscopia electrónica de barrido, con espermatozoides caninos frescos y congelados, indican que a la primera hora de coincubación con ovocitos de perra, el porcentaje inicial 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 y De Los Reyes, 2009). Además,

se ha descrito que espermatozoides de ratón congelados/descongelados serían capaces de penetrar la ZP en menor tiempo que los espermatozoides frescos (Fuller y Whittingham, 1997), lo que, de acuerdo a los resultados de este trabajo, podría estar asociado a la mayor actividad de acrosina en tiempos más tempranos de capacitación *in vitro* en los espermatozoides criopreservados.

Por otro lado, Peña *et al.*, (2004) demostraron 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, lo que podría deberse a la disminución de la viabilidad de los espermatozoides. Del mismo modo, de acuerdo al presente estudio, en tiempos de incubación más avanzados, en muchos espermatozoides ya se ha activado la enzima acrosina, lo cual se ha observado a través de western blot en espermatozoides caninos congelados (De los Reyes *et al.*, 2009b).

Los espermatozoides frescos estudiados en este trabajo, podrían retener mayores cantidades de acrosina que aquellos congelados/descongelados, lo que se traduciría en una acción más gradual en el tiempo, observándose la mayor actividad de la enzima entre los tiempos 60 y 90 minutos. Esto, concordaría con estudios en caninos, que demuestran que los espermatozoides frescos pueden retener por mayor tiempo su capacidad fecundante a través del tiempo en relación a espermatozoides congelados (Palomino y De los Reyes, 2009; De los Reyes *et al.*, 2009^a). Espermatozoides caninos congelados/descongelados exhiben una disminución de la actividad de acrosina al aumentar el tiempo de capacitación en comparación con los espermatozoides frescos (Froman *et al.*, 1984), sin embargo, la mayor actividad enzimática inicial de los espermatozoides congelados en comparación a los frescos observados en este trabajo podría asociarse a que espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación, liberarían (ya sea por autoactivación de la proacrosina o por una lisis del acrosoma espermático en el proceso de congelamiento) la acrosina más temprano que los espermatozoides frescos capacitados *in vitro*, lo que se reflejaría por tanto, en una disminución más rápida de la actividad enzimática así como una menor actividad enzimática en general en comparación a los frescos.

Se ha descrito que en espermatozoides criopreservados disminuye la capacidad fértil, en comparación a los espermatozoides frescos (Ivanova *et al.*, 1999; De los Reyes *et al.*, 2009; Palomino y De los Reyes, 2009), probablemente debido a las alteraciones estructurales provocadas por el enfriamiento y congelación (Strom-Holst *et al.*, 1998; Nishizono *et al.*, 2004), que modificarían la secuencia normal de los eventos que ocurren en un espermatozoide que se traducen en el caso de los espermatozoides sometidos a congelación en una menor fertilidad en comparación a los espermatozoides frescos y refrigerados (Parks y Graham, 1992; England, 1993; Pinto *et al.*, 1999; Watson, 2000; Thomassen *et al.*, 2001). De este modo, si bien en este trabajo se observó una actividad de acrosina mayor al inicio del período de capacitación en espermatozoides congelados en comparación a los frescos, esta actividad fue significativamente menor después de 1 hora de capacitación.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan información para protocolos de fecundación *in vitro* más avanzadas utilizando espermatozoides congelados, para mejorar las tecnologías reproductivas en caninos, pudiendo utilizarse eventualmente además, en programas de preservación de otros cánidos silvestres.

CONCLUSIONES

- La actividad de proacrosina/acrosina en espermatozoides caninos frescos y congelados/descongelados se ve modificada al ser preincubados a diferentes tiempos de capacitación *in vitro*.
- La actividad enzimática de acrosina en espermatozoides congelados es menor cuando comparada con los espermatozoides frescos, tanto en actividad proteolítica en gelatina, como en espectrofotometría con BAEE.
- Los espermatozoides congelados/descongelados de perro presentarían una actividad de acrosina más precoz que aquellos frescos, pero que no logran mantener esta actividad a los 90 min.
- los espermatozoides caninos frescos presentan una actividad creciente de acrosina a través del tiempo de capacitación *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ARETIO, C.** 2006. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides caninos congelados-descongelados sometidos a diferentes condiciones de capacitación *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 50 pp.
2. **AUSTIN, C.R.** 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. 4:581-596.
3. **BABA, T.; KASHIWABARA, S.; WATANABE, K.; ITOH, H.; MICHIKAWA, Y.; KIMURA, K.; TAKADA, M.; KUKAMIZU, A.; ARAI, Y.** 1989. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. J. Biol. Chem. 264: 11920-11927.
4. **BALL, B.A.; FAGNAN, M.S.; DOBRINSKI, I.** 1997. Determination of acrosin amidase activity in equine spermatozoa. Theriogenology 48 (7): 1191-1198.
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. Biol. Res. 25:31-40.
6. **BARROS, C.; VALDIVIA, M.; YUNES, R.; MELÉNDEZ, J.** 1993. Acrosina en la penetración espermática en mamíferos. En: Progresos en Biología Celular, J Becerra & JM Pérez-Fígares (editores), Universidad de Málaga, Málaga, pp 113-119.
7. **BARROS, C., CROSBY, J.A., MORENO R.D.** 1996. Early step of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. Cell Biol. Int. 20(1):33-39.

8. **BAVISTER, B.** 2002. Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction* 124:181-196.

9. **BECKER, G.** 2007. Presencia de acrosina en espermatozoides caninos refrigerados a diferentes condiciones de capacitación *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp. 41-50.

10. **BEDFORD, J.M.**1983. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Rep.* 28(1):108-20.

11. **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.

12. **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. *Theriog.* 34: 147-157

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

14. **BRAVO, M. M.; APARICIO, I. M.; GARCIA-HERREROS, M. C.; PENA, F. J.; GARCIA-MARIN, L. J.** 2005. Changes in tyrosine phosphorylation associated with trae capacitation and capacitation-lie state in boar spermatozoa. *Mol. Reprod. Develop.*71:88-96.

15. **BREITBART, H.** 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol. Cell End.*187(1-2):139-144.

16. **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. *Mol. Reprod. Develop.* 60:491- 497.
17. **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.
18. **CHANG, M.C.,** 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168:697-698.
19. **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.* 64(4): 844-854.
20. **CORTÉS, C. J.; CODELIA, V.A.; MANOSALVA, I.; DE LANGE, J.; DE LOS REYES, M.; MORENO, R. D.** 2006. Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 93 (1-2):165-175.
21. **DE IOANNES A.; BECKER, M.I.; PÉREZ, C.; BARROS, C.** 1990. Role of acrosin and antibodies to acrosin in gamete interaction. In: N. Alexander, D. Griffin, J. Spieler & G. Waites (editors) *Gamete Interaction: Prospects for Immunocontraception.* Wiley Liss. New York: pp 185-195.
22. **DE LOS REYES, M.; BARROS, C.** 2000. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. *Anim. Reprod. Sci.* 58:215-228.

23. **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.
24. **DE LOS REYES, M.** 2004. Congelación de Semen. En *Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latino americanos*. Ed. Grafica Latina, Buenos Aires, Argentina Pp 17-26.
25. **DE LOS REYES, M.; CARRION, R.; BARROS, C.** 2006. *In vitro* fertilization of in vitro matured canine oocytes using frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 66: 1682-1684.
26. **DE LOS REYES, M.; DE LANGE, J.; ANGUITA, C.; PALOMINO, J.; BARROS, C.** 2009a. In vitro sperm penetration through the zona pellucida of immature and in vitro mature canine oocytes using fresh, chilled and frozen dog semen. *Anim. Reprod. Sci.* 110 (1 – 2): 37 – 45.
27. **DE LOS REYES, M.; MEDINA, G.; PALOMINO, J.** 2009b. Western blot analysis of preacrosin/acrosin in frozen dog sperm during in vitro capacitation. *Reprod. Dom. Anim.* 44 (Suppl. 2): 350-353.
28. **DUDKIEWICZ, A.B.** 1984. Purification of boar acrosomal arylsulfatase A and possible role in the penetration of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 30:1005-1014
29. **ENGLAND, G.C.W.** 1993. Criopreservation of dog semen: a review. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 183-184.

30. **FICSOR, G.; GINSBERGER, L.; OLDFORD, G.; SNOKE, R.; BECKER, R.** 1983. Gelatin-substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. *Fertil. Steril.* 39:548-552.
31. **FLÉCHON, J.E.; KRAEMER, D.C.; HAFEZ, E.S.** 1977. Scanning microscopy of the early stages of embryonic development of baboons (*Papio cynocephalus*): oocyte, penetration of the zona pellucida, and morula. *C R Academical Science. Hebd. Seances Acad. Sci. D.*; 284(3):223-225.
32. **FRASER, L.R.**1995. Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 1:22-30.
33. **FROMAN, D. P.; AMANN, R. P.; RIEK, P. M.; OLAR, T. T.** 1984. Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. *J. Reprod. Fertil.* 70 (1): 301-308.
34. **FULLER, S. J.; WHITTINGHAM, D. G.** 1997. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol. Reprod. Develop.* 46:318-324.
35. **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.
36. **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.
37. **GUTIÉRREZ, M.** 2007. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides frescos de perro sometidos a capacitación *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario,

Santiago, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp: 33-41.

38. **HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P.** 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Andro.* 11:73-88.

39. **HARRISON, R.A.,** 1996. Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Develop.* 8(4):581-594.

40. **HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.** 1997. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51:83-91

41. **HOLT, W.** 2000. Basic aspect of frozen storage of sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 62:3-22.

42. **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.

43. **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.

44. **JONES, R.; BROWN, C.R.; LANCASTER, R.T.** 1988. Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. *Development.* 102:781-792.

45. **KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C. A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J. W.** 1993. Induction of acrosome reaction of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol. Reprod.* 48:841-845.

46. **KAWAKAMI, E.; HORI, T.; TSUTSUI, T.** 1998. Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. *J. Vet. Med. Sci.* 60:197-202.
47. **KAWAKAMI, E.; ARAI, T.; OISHI, I.** 1999. Changes in hyaluronidase, acrosin, and N-acetylhexosaminidase activities of dog sperm after incubation. *J. Vet. Med. Sci.* 61:183-184.
48. **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. *J. Biol. Chem.* 257: 3095-3099.
49. **LINDE-FORSBERG, C.** 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin. Vet. Med. Surg.* 10: 48-58.
50. **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.
51. **MAHI, C. A.; YANAGIMACHI, R.** 1978. Capacitation, acrosome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Res;* 1: 101-109.
52. **MORENO, R. D.; HOSHI, M.; BARROS, C.** 1999. Functional interactions between sulphated polysaccharides and proacrosin: Implications in sperm binding and digestion of zona pellucida. *Zygote* 7: 105-111.
53. **MORENO, R. D.; BARROS, C.** 2000. A Basic 18-amino acid peptide contains the polysulfate-binding domain responsible for activation of the boar proacrosin/acrosin system. *Biol. Reprod.* 62:1536-1542.

54. **MORENO, R.D.; BUSTAMANTE, E.; SCHATTEN, G.; BARROS, C.** 2002. Inhibition of mouse in vitro fertilization by an antibody against a unique 18–amino acid domain in the polysulfate-binding domain of proacrosin/acrosin. *Fertil. Steril.* 77:812-817.
55. **NISHIZONO, H.; SHIODA, M. TAKEO, T.; IRIE, T.; NAKAGATA, N.;** 2004. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biol. Reprod.* 71:973-978.
56. **PALOMINO, J., DE LOS REYES, M.** 2009. A scanning electron microscopy study of frozen/thawed dog sperm during in vitro gamete interaction. *Reprod. Dom. Anim.* 44:278-283
57. **PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K.** 1992. Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 38:209-222.
58. **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. *Anim. Reprod. Sci.* 84(1-2):193-210.
59. **PETRUNKINA, A. M.; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A.; TÖPFER-PETERSEN, E.** 2003. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *J. Andro.* 24: 423-437
60. **PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.** 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology.* 52: 609-616

61. **POLAKOSKI, K.L.; MC RORIE, R.A.** 1973. Boar Acrosin. II Classification, inhibition, and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes. *J. Biol. Chem.* 248:8183-8188.
62. **POLAKOSKI, K.L.; MC RORIE, R.A.; WILLIAMS, W.L.** 1973. Boar acrosin. I. Purification and preliminary characterization of a proteinase from boar sperm acrosomes. *J. Biol. Chem.* 248(23):8178-8182.
63. **POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKS, A.S.** 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:166.
64. **PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDE FORSBERG, C.** 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriog.* 2004 Nov;62(8):1498-517
65. **RATERMAN, D.; SPRINGER, M.S.** 2008. The molecular evolution of acrosin in placental mammals. *Mol. Reprod. Develop.* 75(7):1196-207
66. **ROTA, A.; PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.** 1999. *In vitro* capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 57:199-215.
67. **SCHEMBRI, M. A.; MAJOR, D. A.; SUTTIE, J. J.; MAXWELL, W. M.; EVANS, G.** 2002. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reprod. Fertil. Develop.* 14: 225-233.
68. **SCHLEUNING, W. D.; HELL, R.; FRITZ, H.;** 1976. Multiple forms of human acrosin: isolation and properties. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357: 855-865.

69. **SEAGER, S. W. J.** 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *A. I. Digest* 17 (12): 6, 16.
70. **SHIMIZU, Y.; KODAMA, H.; FUKUDA, J.; TANAKA, T.** 1997. Evidence of proacrosin molecule abnormality as a possible cause of low acrosin activity and unexplained failure of fertilization in vitro. *J. Andro.* 18: 281-288.
71. **SILLERICO, T.; VALDIVIA, M.; DE IOANNES, A.; BARROS, C.** 1996. Proacrosin and acrosin determination during capacitation and acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Biocell* 20 (1): 133-142.
72. **SILVA, L.D.; VERSTEGEN, J.P.;** 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology.* 44:571-579.
73. **SIRIVAIDYAPONG, S.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B.** 1999. Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. *J. Andro.* 20(4):537-44
74. **SIRIVAIDYAPONG, S.; CHENG, F.P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W.F.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B.** 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology.* 53: 789-802.
75. **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. *J. Cell Sci.* 108:2525-2535.
76. **STROM-HOLST, B.; ROTA, A.; ANDERSEN-BERG, K.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 1998. Canine sperm head damage after freezing-

thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod. Dom. Anim.* 33, 77-82.

77. **THOMASSEN, R.; FARSTAD, W.; KROGENAES, A.; FOUGNER, J.A.; BERG, K.** 2001. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. *J. Reprod. Fertil. Supplement* 57:341-346.

78. **TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte-sperm interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:653-662.

79. **TOPFER-PETERSEN, E.; CECHOVA, D.;** 1990. Zona pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin. In. *J. Andro.* 13: 190-196.

80. **TRANTER, R.; READ, J.A.; JONES, R.; RADY, L.** 2000. Effector sites in the three-dimensional structure of mammalian sperm β -Acrosin. *Structure* 8: 1179–1188.

81. **TSUTSUI, T.; TEZUCA, T.; MIKASA, Y.; SUGISAWA, H.; KIRIHARA, N.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.** 2003. Artificial insemination with canine semen stored at low temperature. *J. Vet.Med. Sci.* 65:307-312.

82. **URCH, U.A.** 1986.The action of acrosin on the zona pellucida. *Adv. Exp. Med. Biol.* 207:113-32.

83. **URCH, U.;WARRIP, N.; HEDICK, J.** 1985. Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J. Exp. Zool.* 233:479-483.

84. **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. *Mol. Reprod. Develop.* 37:216-222.

85. **VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M.** 2005. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*. 64(3):720-733.
86. **WASSARMAN, P.M.** 1999. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. *Cell* 96:175-183.
87. **WATSON, P .F.** 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:481-492.
88. **WATSON, P. F.** 1995. Recent developments and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Develop.* 7:871-891.
89. **WHEELER, M.B.; SEIDEL, G.E.** 1987. Zona pellucida penetration assay for capacitation of bovine sperm. *Gamete Research* 18:237-250.
90. **YAMADA, S.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y.;** 1992. Maturation, fertilization and development of dog oocytes in vitro. *Biol.Reprod.* 46:853-858.
91. **YANAGIMACHI, R.** 1994. Mamalian Fertilization. In: *The physiology of Reproduction*. Segunda Edición. Ed. E. Knobil and J. Neill. New York, USA.