



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ACROSINA DURANTE LA
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA, EN
ESPERMATOZOIDES CANINOS REFRIGERADOS**

FRESIA NATALIA GODOY MUÑOZ

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

PROFESOR GUÍA: DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.
Financiamiento: Proyectos FONDECYT 1060602-1080618

SANTIAGO, CHILE
2010



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ACROSINA DURANTE LA
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA, EN
ESPERMATOZOIDES CANINOS REFRIGERADOS**

FRESIA NATALIA GODOY MUÑOZ

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: MONICA DE LOS REYES S.
PROFESOR CONSEJERO	: VICTOR MARTINEZ M.
PROFESOR CONSEJERO	: SOLEDAD FERNÁNDEZ.

**SANTIAGO, CHILE
2010**

***Dedicada a la memoria de mi abuelo,
por su incansable apoyo.***

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres por su inagotable paciencia, apoyo, confianza y cariño durante toda la carrera, que permitieron que este momento sucediera.
- A mis hermanos, familia y amigos, por su incondicional apoyo, preocupación y cariño entregado.
- A la Dra. Mónica De los Reyes, por permitirme trabajar con ella, entregándome invaluable conocimientos, orientación y disposición como profesora guía.
- A Jaime Palomino M. por su sincera amistad, apoyo, inagotable paciencia e infinita comprensión.
- A todo el equipo de trabajo y amigos del Laboratorio de Reproducción Animal, por los buenos momentos que vivimos juntos durante la realización de esta tesis.
- 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.

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
Refrigeración de semen canino	11
Capacitación espermática y Reacción Acrosómica	12
Acrosina	15
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES Y METODOS	19
Obtención y Procesamiento de semen	19
Actividad Enzimática	20
Digestión de Gelatina en Placa	20
Hidrólisis de Esteres de Bajo Peso Molecular (BAEE) a través de espectrofotometría	21
Obtención Extracto Espermático Acido	21
Medición de Concentración Proteica	22
Medición de la Actividad Enzimática	22
Análisis Estadístico	23
RESULTADOS	25
Digestión de gelatina en placa	25
Hidrólisis de esterres de bajo peso molecular (BAEE) a través de espectrofotometría	27
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

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

La obtención de semen se realizó a 4 perros adultos sanos, mediante estimulación digital del pene, utilizando sólo la fracción espermática de cada eyaculado. El volumen, la motilidad y la concentración espermática se evaluaron de acuerdo a las técnicas estandarizadas en el laboratorio. El trabajo se realizó con semen fresco (control) y semen refrigerado proveniente de los mismos machos. Las muestras obtenidas fueron incubadas a temperatura ambiente con medio Fert Talp durante diferentes tiempos de capacitación (0, 1, 2 y 3 horas), para inducir la capacitación.

Luego de cada tiempo de capacitación se evaluó la actividad enzimática de acrosina mediante ambas técnicas señaladas. En la digestión de gelatina se midió el tamaño de los halos obtenidos a través de un microscopio de contraste de fase, obteniendo un promedio de los tamaños de cada tiempo. Mediante la hidrólisis de ester de bajo peso molecular (BAEE), se midió la actividad de acrosina a través de la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro. Se realizaron 4 replicas experimentales y los resultados obtenidos se evaluaron mediante análisis de varianza ANOVA y LSD Fisher a posteriori.

Se observó que la actividad enzimática de acrosina de los espermatozoides refrigerados, medida a través del tamaño de los halos de digestión de gelatina, no mostró variaciones estadísticas durante los diferentes tiempos de incubación ($p > 0,05$). Mientras que los espermatozoides frescos mostraron un aumento significativo de su actividad durante el tiempo 1 ($p < 0,05$).

Al medir la actividad enzimática de acrosina a través de la hidrólisis de ester de bajo peso molecular (BAEE), no se observó en los espermatozoides refrigerados diferencias entre los

tiempos de incubación ($p > 0,05$). Sin embargo, los espermatozoides frescos mostraron un aumento significativo de su actividad a la primera hora de incubación ($p < 0,05$).

Al comparar la actividad enzimática de la acrosina de los espermatozoides refrigerados y frescos, no se observaron diferencias ($p > 0,05$) en los diferentes tiempos de incubación, tanto en su actividad proteolítica de gelatina como en espectrofotometría con BAEE. Esto podría indicar que el daño o alteraciones sufridas por los espermatozoides refrigerados, durante el proceso de criopreservación, no produciría un cambio significativo en la actividad de acrosina.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of the capacitation time on the acrosin activity in chilled dog sperm, using two evaluation methods: digestion of gelatin on plate and hydrolysis of esters of low molecular weight (BAEE) by spectrophotometry.

Ejaculates were obtained from 4 healthy adult dogs, by manual stimulation of the penis, using only the sperm rich fraction of each ejaculate. Volume, sperm motility, and sperm concentration were measured according to the standardized techniques of the laboratory. Fresh semen (control) and chilled semen from the same males were used in the experiments. The samples were cultured in Fert Talp medium during different periods of time (0; 1; 2; and 3 hours) at room temperature in order to induce capacitation.

After each culture time, acrosin activity was measured using the two methods above mentioned. The digestion of gelatin on plate measured the size of the halos of digestion, and it was measured with light microscopy and obtaining a size average in each time. By using the hydrolysis of esters of low molecular weight (BAEE) acrosin activity was measured by the absorbance of the samples in the spectrophotometer. Four experimental replicates were performed and the data collected was evaluated by ANOVA and means were compared by LSD Fisher.

The acrosin activity of the chilled sperm, measured by the size of the halos of digestion, did not show significant differences during the time of incubation ($p > 0.05$). Interestingly, fresh sperm showed a significant increase of activity during the first hour of time ($p < 0.05$).

When acrosin activity was measured by the hydrolysis of esters of low molecular weight (BAEE), chilled sperm did not show significant differences during the periods of incubation ($p > 0.05$). However, fresh sperm showed a significant increase of the acrosin activity during the first period of time ($p < 0.05$).

When the acrosin activity of chilled sperm were compared with the activity of fresh sperm, significant differences were not observed during the different times of incubation ($p > 0.05$),

either measured in his proteolytic activity of gelatin or by its spectrophotometry with BAEE. These results suggest that the damage or alterations suffered by the chilled sperm, during the cryopreservation process, does not induce significant changes in acrosin activity.

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones científicas en el perro doméstico permiten su extrapolación a otros cánidos silvestres, especialmente en aquellos que se encuentran en peligro de extinción, por lo que el uso de las biotecnologías reproductivas ayudarán a estudiar y preservar mejor estas especies, tendiente a un mayor rendimiento reproductivo por medio de técnicas como la inseminación artificial y la criopreservación de espermatozoides, las cuales se han ido desarrollando más fuertemente en los últimos años en los caninos.

La criopreservación de espermatozoides, ya sea a través de la congelación o refrigeración del semen, es una excelente forma de almacenamiento y transporte de material genético de alto valor. Es así como la refrigeración ha permitido preservar el semen por un período de tiempo limitado, siendo una técnica de gran utilidad en el manejo de semen canino. Sin embargo, se ha descrito que los espermatozoides pueden experimentar daños tanto en la membrana plasmática como probablemente, a nivel del acrosoma asociados al proceso de refrigeración (**Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Iguer-Ouada y Vestergen, 2001; Manosalva *et al.*, 2005**). Estos daños son provocados por la exposición de los espermatozoides a cambios de tipo osmóticos, químicos y mecánicos; los que causan la muerte de algunos espermatozoides y la disminución de la capacidad fecundante de los sobrevivientes (**Watson, 1995**). En varias especies se ha descrito que los daños o cambios de la membrana plasmática, provocados por la criopreservación o refrigeración de los espermatozoides, son similares a los inducidos por la capacitación espermática (**Watson, 2000**).

La capacitación espermática dice relación a los cambios fisiológicos que los espermatozoides de mamíferos deben tener en el tracto genital de la hembra, como un prerequisite para la fecundación del ovocito. Este proceso fue descrito por primera vez por **Austin (1951)**; pudiendo realizarse posteriormente *in vitro* en espermatozoides de diversas especies, incluidos los caninos (**Rota *et al.*, 1999; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Cortes *et al.*, 2006**), lo que ha permitido estudiar más detalladamente este evento. Durante la capacitación espermática, se pueden identificar claramente dos fenómenos, que corresponden a la hiperactivación flagelar, durante la cual el espermatozoide experimenta

un aumento en la velocidad y fuerza de batir del flagelo, y la reacción acrosómica (RA) (**Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Marin-Briggiler *et al.*, 2003**).

La RA es inducida en la cercanía o en la unión del espermatozoide a la zona pelucida (ZP) del ovocito, e involucra la fusión y fenestración de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana externa del acrosoma (**Barros *et al.*, 1996**). Como consecuencia de la RA, las enzimas del compartimiento acrosomal son liberadas. Entre estas enzimas, se encuentra la acrosina (**Barros *et al.*, 1996**), la cual juega un rol en la unión secundaria del espermatozoide a la ZP y en el paso a través de ella (**Moreno *et al.*, 2002; De los Reyes y Barros, 2000**).

La capacitación y RA, y por tanto la liberación del contenido acrosomal, son fenómenos dependiente del tiempo que varía entre las especies (**Yanagimachi, 1994**). Estudios *in vitro* sobre la acrosina canina indicarían que la actividad enzimática de ésta, junto con otras enzimas acrosomales, determinada en espermatozoides frescos, aumentaría en relación al tiempo de incubación en medio de capacitación (**Kawakami *et al.*, 1999; De los Reyes *et al.*, 2009^a**). En semen congelado la mayor actividad se ha registrado luego de la descongelación (**Cortés *et al.*, 2006; De los Reyes *et al.*, 2009^a**). Sin embargo, no se ha descrito la actividad de esta enzima durante la capacitación espermática en semen refrigerado canino, su investigación permitiría conocer mejor la capacidad fecundante de los espermatozoides refrigerados, de modo de poder mejorar los protocolos de capacitación para la utilización del semen canino refrigerado.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Refrigeración de semen canino

La criopreservación de semen permite el almacenamiento y transporte de material genético ayudando a la conservación de especies y facilitando la preservación de espermatozoides por periodos limitados de tiempo, lo que permite un mayor margen para su utilización, a diferencia del semen fresco (**Watson, 2000; De los Reyes, 2004**). Las dos opciones de criopreservación son congelación y refrigeración, esta última si bien provoca en general menos daños espermáticos que la congelación, no se sabe específicamente el alcance de estos, específicamente a nivel de las enzimas acrosomales.

Al realizar una comparación entre ambas técnicas de criopreservación, congelación vs refrigeración, con la congelación el almacenamiento puede ser indefinido (**Ponglowhapan et al., 2004**), sin embargo, provoca daños significativos en el espermatozoide, lo que causa tasas de preñez menores que las obtenidas con semen refrigerado (**Linde-Forsberg y Forsberg, 1993; Iguer-Ouada y Vestergen, 2001; Nizanski, 2006**). Asimismo, los efectos de la refrigeración sobre la motilidad, morfología, serían menos perjudiciales que los de la congelación (**England y Ponzio, 1996; Hermansson y Linde Forsberg, 2006**). Sin embargo, al ser refrigerados los espermatozoides deben ser utilizados dentro de un corto periodo de tiempo, ya que durante periodos mas largos de almacenamiento la calidad del semen se deteriora, asemejándose al semen congelado, incluso inferior después de cierto tiempo (**England y Ponzio, 1996**). Por este motivo, la utilización de semen refrigerado requiere de una planificación cuidadosa, de tal forma de preservar la viabilidad y la capacidad fecundante de las células espermáticas (**Ponglowhapan et al., 2004**).

Al comparar las tasas de preñez obtenidas con semen fresco *versus* refrigerado, las tasas de preñez con semen fresco son superiores (alrededor del 84%), que con semen refrigerado (45% y 65%) (**Linde-Forsberg y Forsberg, 1989; Linde-Forsberg, 2001**). Los espermatozoides que han sido refrigerados mantienen su viabilidad debido a la reducción de su metabolismo celular (**Bouchard et al., 1990; Linde-Forsberg, 1995; Sirivaidyapong et al., 2000; Ponglowhapan et al., 2004**), pero experimentan daños o

alteraciones a través del tiempo tendientes a disminuir su capacidad fecundante. Algunos autores han denominado estos cambios como “criocapacitación”, considerando estas alteraciones funcionales y estructurales similares a las que ocurren durante el proceso de capacitación espermática (**Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Watson, 2000; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006**). Estas alteraciones que ocurren a nivel del acrosoma provocarían que el espermatozoide disminuya su capacidad fecundante hasta perderla (**Peña y Linde-Forsberg, 2000; Aurich, 2005**), ya que la integridad del acrosoma es vital para la interacción gamética y posterior fecundación (**Hay *et al.*, 1997; Strom Holst *et al.*, 1998; De los Reyes *et al.*, 2009^b**).

La membrana plasmática del espermatozoide sufre cambios morfológicos durante la criopreservación, tales como la separación de los fosfolípidos con las proteínas integrales de membrana (**Sirivaidyapong *et al.*, 2000; De los Reyes, 2004**), alterando además los canales de calcio, lo que produce un aumento del influjo de calcio a la célula, acelerando el proceso de capacitación y reacción acrosómica (**Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2007**). Estas alteraciones que podrían adelantar los eventos celulares que ocurren durante la capacitación, afectan la capacidad fértil de la población de espermatozoides que logran sobrevivir al proceso (**De los Reyes, 2004; Ponglowhapan *et al.*, 2004**).

Capacitación espermática y Reacción Acrosómica

Los espermatozoides de mamíferos requieren permanecer un cierto periodo de tiempo en el tracto reproductivo de la hembra para experimentar una serie de cambios, lo que es conocido como capacitación espermática (**Chang, 1951; Barros *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Rodriguez-Martinez, 2007**).

El proceso de capacitación espermática produce la remoción o alteración de sustancias integradas en la membrana plasmática del espermatozoide, resultando en cambios de permeabilidad y composición iónica intracelular (**Yanagimachi, 1994**). Dentro de los cambios que se producen durante la capacitación se encuentran el eflujo de colesterol; el aumento de fluidez de membrana; cambios en la arquitectura de los fosfolípidos de

membrana; aumento en los procesos de fosforilación de proteínas de membrana y cambios en las concentraciones de iones intracelulares, aumentando el pH y el influjo de calcio desde el extracelular debido a la mayor permeabilidad de la membrana (**Töpfer-Petersen et al., 2000; Harrison, 2004**).

Además, el espermatozoide capacitado cambia el patrón de batido flagelar adquiriendo una motilidad hiperactivada la cual se caracteriza por un movimiento menos lineal y menos progresivo, pero mas vigoroso, aumentando la amplitud y la fuerza del movimiento flagelar (**Yanagimachi, 1994; Barros et al., 1996; Töpfer-Petersen et al., 2000; Petrunkina et al., 2003; O'Flaherty et al., 2006; De Lamirande y O'Flaherty, 2007**). Este movimiento le permite al espermatozoide despegarse de las células oviductales y atravesar las células del cúmulo que se encuentran rodeando al ovocito, para lograr así la fecundación (**Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen et al., 2000; Petrunkina et al., 2003**).

Por otro lado, cuando el espermatozoide toma contacto con el ovocito experimenta la reacción acrosómica (RA), que es un pre requisito para la penetración de la ZP y para la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, constituyendo un mecanismo de control de la fecundación (**De los Reyes, 2000**). El proceso de RA es altamente regulado, e implica la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide, con la consiguiente fenestración progresiva (**Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen et al., 2000; De los Reyes y Barros, 2000; Kim et al., 2008**), y liberación del contenido acrosomal, compuesto por enzimas hidrolíticas, como el sistema proacrosina/acrosina (**Barros et al., 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Buffone et al., 2008**).

La capacitación espermática y la RA pueden ocurrir *in vitro*, en ausencia del ovocito, utilizando para esto medios especiales (**Parrish et al., 1988; Yanagimachi, 1994; Hewitt y England, 1998; Rota et al., 1999; Williams y Ford, 2001; Feng et al., 2007; Witte y Schafër-Somi, 2007**), que contienen diversos elementos tales como albúmina sérica bovina, calcio, glucosa y reguladores de pH como el bicarbonato (**Mahi y Yanagimachi, 1978; Yamada et al., 1992; Hewitt y England, 1999; Feng et al., 2007; Witte y Schafër-**

Somi, 2007). Dentro de las funciones de la albúmina está la inducción de 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 glucosa, presenta un efecto similar a la albúmina favoreciendo la RA en el espermatozoide canino (**Mahi y Yanagimachi, 1978; Sirivaidyapong et al., 2000**), preservando la energía intracelular y por lo tanto la motilidad espermática (**Ponglowhapan et al., 2004; De los Reyes et al., 2006**). Por su parte el calcio se considera un componente más importante y crítico para la ocurrencia de la RA (**Mahi y Yanagimachi, 1978; Rota et al., 1999; Sirivaidyapong et al., 2000; Töpfer-Petersen et al., 2000; Brewis et al., 2001**), su presencia permite su influjo a la célula, lo que induce 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 un componente que mantiene el pH básico requerido para que los espermatozoides se mantengan móviles y experimenten la RA (**Mahi y Yanagimachi, 1978; Flesch y Gadella, 2000**). En conjunto con el calcio, este ion actúa por medio de la vía de señales de fosforilación proteica dependiente del AMPc, que iniciarían la desestabilización de la membrana plasmática (**Petrunkina et al., 2003; Saravia et al., 2007**), y por otro lado, estimularían el inicio de la motilidad hiperactivada (**Yanagimachi, 1994; Petrunkina et al., 2003**), por lo que su concentración en el medio de capacitación espermático se relaciona con la cinética de la capacitación (**Petrunkina et al., 2003; Bergqvist et al., 2006**).

Por otra parte, el tiempo de capacitación *in vitro* difiere entre especies y es dependiente de la composición del medio de incubación (**Yanagimachi, 1994; Sirivaidyapong et al., 2000; Witte y Schäfer-Somi, 2007; Witte et al., 2009**). Se ha descrito que a medida que el tiempo de incubación en el medio capacitante aumenta, una mayor cantidad de

espermatozoides caninos frescos se capacitan y son capaces de responder a la inducción de la RA (**Kawakami et al., 1993^a**), demostrándose un aumento significativo en la ocurrencia de RA espontánea (**Kawakami et al., 1993^b**). Además, se ha determinado que existiría una diferencia en los tiempos de capacitación de espermatozoides caninos frescos y refrigerados (**Rota et al., 1999; Manosalva et al., 2005**), encontrándose la mayor proporción de espermatozoides capacitados a las 3 horas en fresco y a las 2 horas en espermatozoides refrigerados (**Rota et al., 1999**). Asimismo la reacción acrosómica espontánea, que ocurre después de la capacitación puede iniciarse durante las primeras 2 horas de incubación en espermatozoides caninos refrigerados (**Rota et al., 1999**).

Acrosina

La acrosina es una serino proteasa considerada una enzima tipo tripsina (**Zaneveld et al., 1971; Dunbar et al., 1994**), que se encuentra almacenada en el acrosoma intacto del espermatozoide (**Klemm et al., 1991; De los Reyes y Barros, 2000**). Su presencia se ha demostrado mediante el uso de técnicas de inmunocitoquímicas en varias especies mamíferas, tales como cobayo, hámster, humano (**Barros et al., 1992**), conejo (**Valdivia et al., 1994**), bovino (**De los Reyes y Barros, 2000**) y perro (**Cortés et al., 2006; Aretio, 2006; Becker, 2006; Gutierrez, 2007; De los Reyes et al., 2009^a**).

La acrosina está presente en el acrosoma como un precursor inactivado, la proacrosina (**Barros et al., 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno et al., 2002; Cortes et al., 2006**), la cual puede autocatalizar su propia conversión a acrosina mediante un mecanismo intrazimógeno durante la RA (**De los Reyes y Barros, 2000**). La proacrosina/acrosina es liberada desde el acrosoma en condiciones de capacitación durante la RA, es decir al estar cerca o entrar en contacto directo con la zona pelucida, por lo tanto la activación de la proacrosina en acrosina se considera un indicador de la RA (**De los Reyes y Barros, 2000; Cortes et al., 2006**).

Se piensa que durante la RA el sistema proacrosina/acrosina participa en diferentes eventos tales como en la hidrólisis específica de glicoproteínas de la zona pelucida (ZPGs), y como

un “receptor secundario” durante la penetración espermática por la ZP (**Barros *et al.*, 1993; De los Reyes y Barros, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Furlong *et al.*, 2005; Gaboriau *et al.*, 2007**). Esta unión no sólo permite que el espermatozoide se mantenga unido a la ZP del ovocito, sino que además esta involucrada en los primeros pasos de la conversión de proacrosina en acrosina (**Barros *et al.*, 1996**). Además, durante la RA la acrosina puede fragmentar algunas proteínas acrosomales específicas, las cuales conducirían a una liberación gradual y coordinada del contenido acrosomal (**Moreno *et al.*, 2002**). Es así como espermatozoides sin acrosina han mostrado un retraso en la liberación de las proteínas acrosomales durante la inducción de la RA (**Yamagata *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2002**).

Aunque el rol de esta enzima en la penetración espermática continua siendo debatido, se ha demostrado que acrosina purificada puede digerir la zona pelucida de ovocitos de diferentes especies mamíferas (**Urch, 1991**). Asimismo, se ha evidenciado mediante el uso de microscopía electrónica de barrido que la erosión producida en la superficie de la zona pelucida, se restringe alrededor de la cabeza del espermatozoide (**De los Reyes y Barros, 2000**).

La relación entre la actividad de proacrosina/acrosina con el potencial fecundante de espermatozoides se ha demostrado mediante diversos estudios (**Shimizu *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 1997**), reportándose que los anticuerpos monoclonales anti-acrosina pueden inhibir *in vivo* (**Dudkiewicz, 1983**) e *in vitro* (**De Ioannes *et al.*, 1990; Barros *et al.*, 1993**) la fecundación. Por lo tanto la medición de la actividad de acrosina sería un método efectivo de evaluación de la función espermática *in vitro* (**Ball *et al.*, 1997**).

Por otra parte, en caninos se ha descrito que la actividad enzimática de la acrosina y de otras enzimas acrosomales, aumentaría en relación al tiempo de incubación de los espermatozoides frescos, el cual estaría relacionado directamente con la capacitación espermática (**Kawakami *et al.*, 1999**). Es así como estudios en semen fresco canino muestran un aumento notorio de la actividad de esta enzima, desde la media hora hasta las 7 horas de incubación en medio inductor de la capacitación (**Kawakami *et al.*, 1999**). Esto

también se ha evidenciado en otras especies, como equinos, donde la actividad de acrosina sería baja después de la eyaculación, pero aumentaría después de la incubación de los espermatozoides en medio inductor de la capacitación (**Brandon et al., 1997; Ball et al., 1997**).

En relación a los espermatozoides caninos criopreservados, se ha determinado la presencia del sistema proacrosina/acrosina mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-acrosina en espermatozoides no capacitados (**Cortés et al., 2006**), y capacitados por diferentes tiempos (**Becker, 2006**). La actividad de esta enzima en espermatozoides caninos congelados no sometidos a capacitación, muestra una mayor actividad en comparación a espermatozoides frescos, sugiriéndose que el daño de las membranas plasmática y acrosomal externa puede inducir la activación y liberación de la acrosina desde la matriz acrosomal en estos espermatozoides (**Cortés et al., 2006**). Del mismo modo, recientemente a través de western blot, se observó una prematura activación de proacrosina en espermatozoides congelados de perro (**De los Reyes et al., 2009^b**). En espermatozoides refrigerados, sin embargo, no se encontró diferencias en la activación de la enzima (**Parraguez, 2010**).

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**). Además, sumado al hecho que durante el proceso de criopreservación el plasma seminal se elimina junto con los inhibidores de acrosina presentes en él (**Jonakova et al., 1991; Hermans et al., 1994**), el proceso de refrigeración podría en su conjunto inducir tal vez, una activación más temprana de la acrosina en el proceso de capacitación.

HIPÓTESIS

La actividad de acrosina en espermatozoides de perro se verá modificada cuando los espermatozoides son procesados y sometidos a temperaturas de refrigeración, lo que implicará cambios asociados a una activación más temprana de esta enzima.

OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar la actividad enzimática de acrosina en espermatozoides caninos refrigerados durante el proceso de capacitación espermática.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar posibles diferencias en la actividad enzimática de acrosina entre diferentes tiempos de capacitación espermática en espermatozoides frescos y refrigerados.
- Estudiar las diferencias de la actividad de proacrosina/acrosina entre espermatozoides caninos frescos y refrigerados que han sido previamente capacitados in vitro.
- Evaluar y comparar la actividad enzimática de acrosina en espermatozoides refrigerados de perro, mediante su actividad proteolítica en sustratos de alto peso molecular (gelatina) e hidrólisis con ésteres de bajo peso molecular (Benzoil Arginina Etil Ester) a través de espectrofotometría.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

1. Obtención y procesamiento de semen

Se utilizaron cuatro perros adultos pertenecientes a privados, clínicamente sanos, a los que se les extrajo semen a través de estimulación digital del pene, depositando el eyaculado en copas recolectoras previamente entibiadas. Sólo se utilizó la segunda fracción del eyaculado, correspondiente a la fracción espermática.

Las muestras obtenidas fueron sometidas a un análisis subjetivo de motilidad progresiva (MP), mediante microscopía óptica, utilizando sólo aquellas con motilidad progresiva $\geq 70\%$. Además, se midió la concentración espermática mediante el recuento en la cámara de Neubauer, según protocolo de laboratorio (**De los Reyes *et al.*, 2006**). Se trabajó con muestras de semen fresco (control) y semen refrigerado proveniente de los mismos machos, realizando un total de 8 réplicas experimentales.

Cada eyaculado fue diluido en relación 1:2 con buffer Tris (Trishidroxiaminometano) (**Rota *et al.*, 1999**) y luego centrifugado a 700 G por 5 minutos para retirar el plasma seminal. El pellet de espermatozoides que fue procesado como fresco o control, se resuspendió en medio Fert Talp, suplementado con albúmina sérica bovina (BSA), fracción V (**Parrish *et al.*, 1988**), en una concentración final de 50 millones de espermatozoide por mililitro.

Por otro lado, el pellet de cada una de las muestras que se procesaron como refrigeradas, se resuspendió en el diluyente de refrigeración (Tris 249 mM; Acido Cítrico 88,4 mM; Fructosa 69,3 mM; Bencil penicilina 2,8 mM; Sulfato dihidroestreptomicina 0,68 mM; 20% de yema de huevo) en un volumen suficiente para lograr obtener una concentración de

200 millones de espermatozoides por mililitro. Los espermatozoides diluidos dentro de tubos cónicos (FALCON), se colocaron en un vaso precipitado con agua que se encontraba a temperatura ambiente (20 °C), para luego ser refrigerados a 4°C por un periodo de 24 horas. En cada etapa del proceso se evaluó la motilidad progresiva de los espermatozoides para control de viabilidad.

El entibiamiento se realizó sometiendo a los espermatozoides diluidos a una temperatura de 37°C, dentro de una estufa por 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 400 G para eliminar el diluyente de refrigeración. El sobrenadante fue descartado y el pellet de espermatozoides fue resuspendido en buffer Tris en relación 1:2, evaluándose la motilidad progresiva, para luego ser centrifugado nuevamente por 5 minutos a 300 G. El pellet de espermatozoides obtenido se resuspendió en medio Fert Talp, suplementado con albúmina sérica bovina (BSA), fracción V, para lograr una concentración mínima de 50 millones de espermatozoides por mililitro, de igual forma a lo descrito para las muestras frescas.

Las muestras de espermatozoides frescos y refrigerados fueron mantenidas en el medio Fert Talp a temperatura ambiente (20°C) por un periodo de 0; 1; 2 y 3 horas separadamente para capacitación espermática.

2. Actividad enzimática

La actividad de acrosina de los espermatozoides caninos se determinó mediante dos métodos de evaluación: A) Digestión de gelatina en placa e B) Hidrólisis de ester de bajo peso molecular, Benzoil Arginina Etil Ester (BAEE).

A.- Digestión de gelatina en placa

La digestión de gelatina se estimó mediante la medición de halos de digestión de gelatina (**Ficsor *et al.*, 1983; Thundathil *et al.*, 2001**), los cuales se cuantificaron de acuerdo al tamaño del halo obtenido. Para esto, se usaron portaobjetos mantenidos durante 2 horas a 4°C en cámara húmeda con 5% de CO₂, y una suspensión de gelatina (SIGMA) 2.5%, colocando 100 µl de gelatina disuelta sobre cada portaobjeto previamente refrigerado. Los

portaobjetos fueron posteriormente fijados en una solución de glutaraldeído (0,1% en PBS) por dos minutos. Luego se lavaron dos veces con PBS y se mantuvieron verticalmente durante 24 horas en cámara húmeda a 4°C.

En cada hora de incubación se tomaron separadamente 50µl de las muestras de espermatozoides, frescos (control) y refrigerados, y se colocaron en los portaobjetos con gelatina, los que fueron incubados dentro de una estufa a 38°C y 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, los portaobjetos con las muestras fueron teñidos con Azul de Coomassie (SIGMA) (1%) en PBS durante cuatro minutos y lavados dos veces con PBS, para luego observar los halos de digestión al microscopio de contraste de fases.

Paralelamente de las mismas muestras de espermatozoides sometidos a capacitación, se realizó un control negativo, incubando 50 µl de cada muestra con el anticuerpo monoclonal anti acrosina C5F10, y luego de cada tiempo de capacitación los espermatozoides se procesaron de igual forma a lo descrito anteriormente en la digestión en placa.

Los halos de digestión se clasificaron cuantitativamente de acuerdo al diámetro de los halos en micrones, observándolos al microscopio de contraste de fase con un aumento de 100X y 400X.

B.- Hidrólisis de Ester de Bajo Peso Molecular (BAEE) a través de espectrofotometría

Obtención del Extracto Espermático Acido

La obtención del extracto espermático ácido se realizó según el método descrito por **Leyton et al (1986)**. Donde, luego de cada hora de incubación en el medio inductor de la capacitación (Fert Talp), las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 100 G, evaluándose previamente su motilidad progresiva. Posteriormente para obtener la acrosina, se descarto el sobrenadante y el pellet de espermatozoides se resuspendió en 0,5 ml de solución acida (1mM se HCL; 10% glicerol; 0,02% Azida de Sodio; pH 3), siendo mantenido durante una noche a una temperatura de 4°C. Luego las muestras se centrifugaron por 30 minutos a 1250 G, para recuperar el sobrenadante como extracto

espermático ácido que contenía las proteínas espermáticas. Este extracto se mantuvo en tubos eppendorf a -20°C hasta su posterior medición.

Medición de concentración proteica

La concentración (mg/ml) de proteína presente en la muestra fue cuantificada mediante el Método de Bradford (**Kruger, 1994**), previa calibración con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) a través de espectrofotometría.

Para la medición de la concentración proteica, se tomaron $10\ \mu\text{L}$ del extracto espermático ácido de cada muestra (descongeladas a T° ambiente) y se mezclaron con $90\ \mu\text{l}$ de agua y $900\ \mu\text{l}$ del reactivo de Bradford (100 mg de azul de Comassie; 50 ml de etanol al 95%; 100 ml de ácido fosfórico al 85%), en un tubo eppendorf. Además, para cada muestra se realizó un control que contenía $100\ \mu\text{l}$ de agua y $900\ \mu\text{l}$ del reactivo de Bradford. Luego las muestras fueron incubadas durante 12 minutos y se midió la absorbancia del contenido de cada tubo en el espectrofotómetro, para lo cual se utilizó una cubeta de plástico y una longitud de onda (λ) de 595 nm, extrapolando su resultado a la ecuación de la recta estandarizada previamente.

La ecuación de la recta, anteriormente descrita, se realizó mediante una curva de calibración con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA).

Medición de la actividad enzimática

Una vez conocida la concentración de proteína de la muestra de extracto espermático ácido se midió la actividad enzimática de acrosina, para lo cual se utilizó la hidrólisis de ester de bajo peso molecular (**Whitaker y Bender, 1965**).

Para la medición se preparó una solución de benzoil arginina etil ester (BAEE) en Tris 50mM, CaCl_2 50mM y a pH 8, la cual fue usada como sustrato enzimático. Posteriormente, se colocaron 3 ml de esta solución en un tubo de ensayo para ser incubados con $100\ \mu\text{l}$ de extracto ácido, realizando dos mediciones por muestra. Luego de la incubación durante 30 minutos a 37°C en baño de agua, la reacción se detuvo por frío. La medición de la

absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro se realizó en una cubeta de cuarzo, a una longitud de onda (λ) de 253 nm y con una lámpara de luz ultravioleta (UV).

Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de acrosina (1 mg) que hidroliza 1 μ mol de sustrato (BAEE) en 1 minuto. Para esto, se utilizó un coeficiente de extinción molar de $(1150M)^{-1} * cm^{-1}$ para convertir los cambios de densidad óptica a micromoles de BAEE hidrolizado.

$$U = CE * \Delta DO * [enzima] * dilución / tiempo de incubación (min)$$

Donde:

U = Unidad de Actividad Específica = μ Mol BAEE/min/mg de proteína.

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

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

3. Análisis Estadístico

La actividad enzimática de acrosina durante la capacitación espermática en perros se describió en términos de promedios, desviación estándar y coeficiente de variación. Realizando cuatro replicas experimentales en el caso de la hidrólisis de ester de bajo peso molecular, y cuatro replicas en el caso de la digestión de gelatina.

El modelo estadístico a utilizar fue:

$$y_{ijl} = \mu + T_i + P_j + TixPj + e_{ijl}$$

Donde:

y_{ijl} = variable experimental (tamaño promedio de los halos / absorbancia de las muestras).

μ = media poblacional.

T_i = efecto fijo del i-ésimo tratamiento (refrigerado / fresco; $i = 1,2$).

P_j = efecto fijo del j-ésimo periodo de incubación ($j = 1, \dots, 4$).

$TixPj$ = efecto de la interacción entre el i-ésimo tratamiento y el j-ésimo periodo de incubación.

e_{ijl} = error experimental.

El valor de cada factor del modelo se determinó mediante un Análisis de Varianza y la diferencia entre los promedios de los diferentes efectos se realizó mediante la prueba de Fisher ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A.- Digestión de gelatina en placa

Para la evaluación de los halos de digestión de gelatina en placa, se realizaron 4 replicas experimentales, evaluando un total de 3585 espermatozoides, de los cuales 1159 fueron sometidos a refrigeración y 2426 se procesaron como frescos. Se contabilizó un mínimo de 200 espermatozoides por cada tiempo de capacitación evaluado.

En ambos tipos de espermatozoides (Refrigerados/Frescos) se encontraron halos de digestión de gelatina de diferentes diámetros (Figura 1).

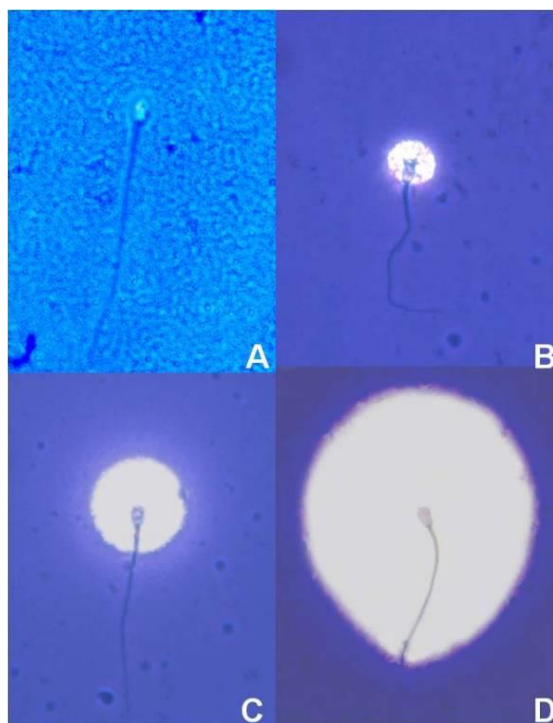


FIGURA 1: Imágenes de halos de digestión de gelatina en placas de espermatozoides frescos y refrigerados, teñidos con Azul de Comassie (1%) y obtenidas con el microscopio de contraste de fases (x 200). Se observan espermatozoides con halos de digestión de diferentes diámetros, los cuales se pueden diferenciar en: espermatozoides sin halo (A), espermatozoides con halos pequeños (B), con halos medianos (C) y halos grandes (D).

La actividad enzimática de acrosina mediante el método de digestión de gelatina en placa, se describió en términos de promedios. Utilizando para el análisis estadístico los valores promedios dados en micrones (μm), de los diámetros de los halos de digestión de gelatina de los espermatozoides (Figura 2).

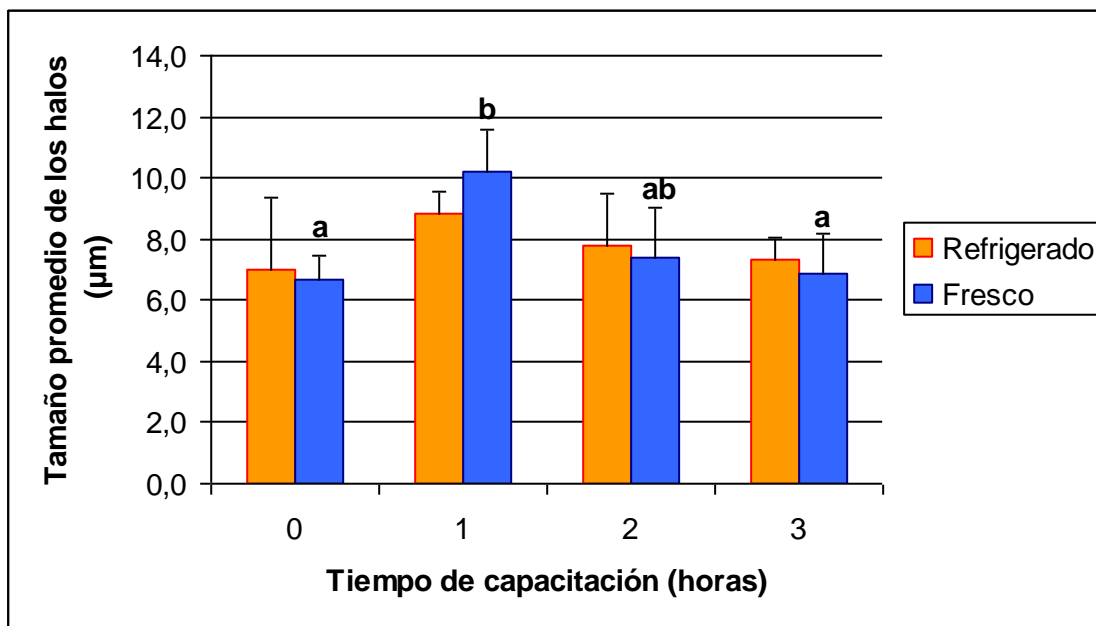


FIGURA 2: Promedio de los diámetros de los halos de digestión de gelatina de espermatozoides frescos y refrigerados sometidos a diferentes tiempos de capacitación. Diferentes letras indican diferencias en el tamaño promedio de los halos dentro de los espermatozoides frescos (barras color azul).

De acuerdo al tamaño de los halos de digestión, en los espermatozoides refrigerados, se observó que durante los diferentes tiempos de capacitación evaluados no se presentaron diferencias ($p > 0,05$).

Sin embargo, los tamaños de los halos de digestión presentados por los espermatozoides frescos (control) durante los diferentes tiempos de capacitación *in vitro*, fueron diferentes entre el tiempo 0 y después de una hora de incubación (tiempo 1; $p < 0,05$); y entre el tiempo 1 y el tiempo 3 ($p < 0,05$), observándose un mayor tamaño de diámetro de halo durante la primera hora de capacitación.

Por otro lado, al comparar el tamaño de los halos de digestión durante los diferentes tiempos de capacitación de los espermatozoides refrigerados y frescos (control), no se presentaron diferencias ($p > 0,05$).

En relación a los controles negativos, incubados con el anticuerpo monoclonal anti acrosina C5F10, no se observaron halos de digestión en las placas de gelatina, lo que implicaría que los halos observados serían provocados por la actividad de acrosina.

B.- Hidrólisis de Ester de Bajo Peso Molecular (BAEE) a través de espectrofotometría

La actividad enzimática de acrosina durante la capacitación espermática se describió en términos de promedios. Se utilizaron para el análisis estadístico los valores promedios dados en unidad de actividad enzimática ($\mu\text{mol BAEE}/\text{min}/\text{mg}$), de los espermatozoides. Los promedios y desviación estándar (DS) obtenidos en cada tiempo de capacitación a partir de espermatozoides frescos y refrigerados se muestran en la Figura 3.

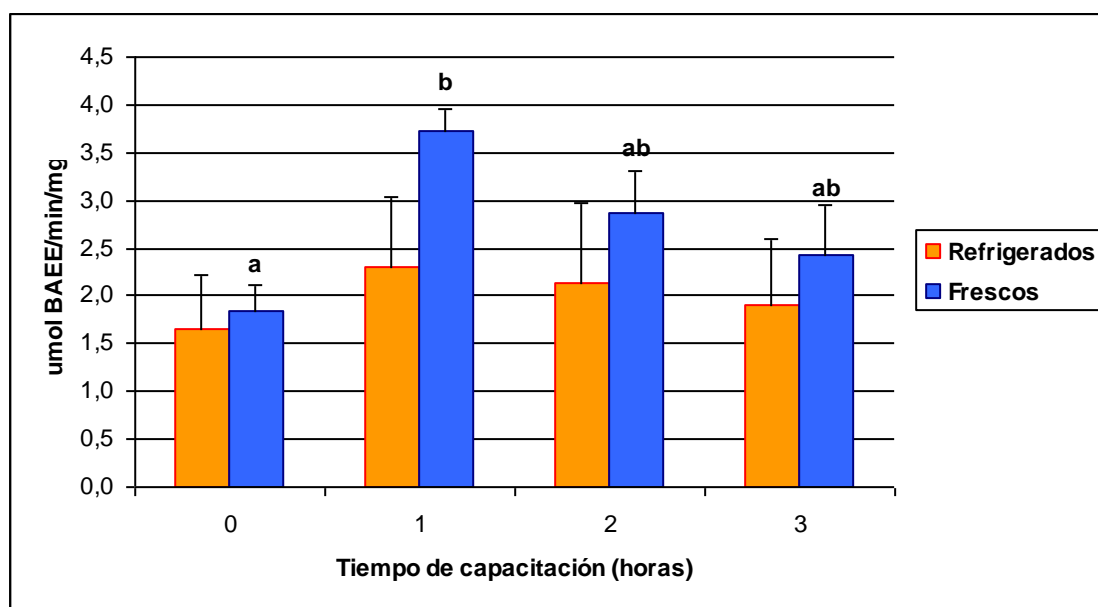


FIGURA 3: Actividad enzimática de acrosina de extractos de espermatozoides frescos y refrigerados, medida como la cantidad de acrosina que hidroliza 1 μmol de BAEE en 1 minuto durante cada tiempo de capacitación evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre la actividad de un mismo tipo de espermatozoide.

En los espermatozoides refrigerados durante los diferentes tiempos de capacitación, la actividad enzimática de acrosina no presentó variaciones ($p > 0,05$).

Al evaluar los espermatozoides frescos durante los diferentes tiempos de capacitación, se pudo observar que entre el tiempo 0 de capacitación y el tiempo 1, existió un aumento de actividad enzimática ($p < 0,05$).

Al comparar entre los espermatozoides refrigerados y frescos (control), no se observó diferencia ($p > 0,05$) en la actividad enzimática de acrosina.

DISCUSIÓN

El presente trabajo evaluó la actividad de la enzima acrosina, durante diferentes períodos de capacitación espermática *in vitro*, de espermatozoides caninos sometidos a refrigeración en comparación a aquellos frescos (control). La actividad de acrosina se demostró en espermatozoides refrigerados de perro a través de la digestión de un sustrato de alto peso molecular (gelatina) y mediante la hidrólisis de un éster de bajo peso molecular (Benzoil Arginina Etil Ester) a través de espectrofotometría. La interpretación de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se basa en la complementariedad de ambas técnicas, ya que los resultados fueron similares en los dos métodos utilizados.

Los espermatozoides sometidos a refrigeración no presentaron variaciones significativas en la actividad enzimática de acrosina durante los diferentes tiempos de capacitación, al ser evaluados con cualquiera de los dos métodos. Estudios previos han demostrado que la criopreservación mediante congelación, produce alteraciones en los espermatozoides similares a los que ocurren durante la capacitación (**Schembri *et al.*, 2002**), lo que podría alterar la estructura acrosomal, provocando una liberación y activación más temprana de la enzima acrosina (**Cortes *et al.*, 2006; Rodrigues, 2009; De los Reyes *et al.*, 2009^b**). Sin embargo, la refrigeración, de acuerdo a los resultados de este trabajo, no causó alteraciones en la actividad enzimática de acrosina, lo cual podría estar asociado al menor daño que sufren los espermatozoides al ser refrigerados, no alcanzando a los niveles de alteración observados en el semen congelado. Se ha demostrado que el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos luego de la refrigeración sufre una moderada disminución (**Oettlè, 1986; Hermansson y Linde Forsberg, 2006**), mientras que en semen congelado se ha evidenciado una disminución mayor, es decir de un 96,5% de espermatozoides con acrosomas intactos en semen fresco, luego de la congelación disminuye a 61,7% (**Hermansson y Linde Forsberg, 2006**), e inclusive a menos de 23% (**Hay *et al.*, 1997**). En espermatozoides refrigerados de cerdo sin capacitar, cerca del 90% mantienen la estructura lipídica de su membrana durante el proceso de refrigeración, siendo menos del 2% el porcentaje de espermatozoides que presentan alteraciones (**Saravia *et al.*, 2007**), lo

que indicaría que tal vez no existan los cambios asociados a capacitación temprana de estos espermatozoides provocados por la refrigeración.

En el semen canino refrigerado por periodos de 24 horas, no se alterarían significativamente las características funcionales y físicas, tales como la reacción del acrosoma (**Kumi-Diaka y Badtram, 1994**), por lo que se puede suponer que es posible que no haya una autoactivación de la proacrosina o una lisis completa del acrosoma durante el proceso de refrigeración, que pudiesen llevar a una variación en la actividad enzimática de acrosina. Este menor daño estructural y funcional de los espermatozoides refrigerados se ha visto reflejado en estudios de interacción gamética *in vitro* en caninos, donde se ha observado que la capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados, tiene un aumento sostenido del porcentaje de ovocitos penetrados durante las primeras 5 horas de co-incubación gamética (**De los Reyes et al., 2009^a**), indicando que los espermatozoides refrigerados requieren de este tiempo para completar la capacitación espermática y llevar a cabo la reacción acrosómica para penetrar las cubiertas ovocitarias.

La identificación de la acrosina en espermatozoides caninos refrigerados y capacitados *in vitro* por 0, 1, 2 y 3 horas, se ha logrado mediante diversos métodos. **Parraguez (2010)**, utilizando la técnica de Western Blot identificó la presencia de proacrosina y acrosina, observando que los espermatozoides caninos refrigerados no presentan variaciones significativas en la liberación de la acrosina durante los diferentes tiempos de capacitación evaluados. Estos resultados coinciden con los encontrados en el presente trabajo, donde la actividad enzimática de los espermatozoides refrigerados no presentó variaciones durante los diferentes tiempos, lo que puede ser asociado a que no existen cambios en la liberación de la enzima. Sin embargo, **Becker (2006)**, detectó la presencia de acrosina mediante inmunofluorescencia indirecta, con una mayor liberación enzimática durante la primera hora. Esta diferencia con los resultados antes señalados podría deberse a que el anticuerpo utilizado en el trabajo de **Becker (2006)**, posee afinidad por el sistema proacrosina/acrosina (**Valdivia et al., 1994**), no logrando la diferenciación de cada una de las formas enzimáticas, por lo que la mayor liberación observada durante la primera hora podría

deberse a la presencia de proacrosina, la cual no se observaría en la medición de actividad por tratarse de la forma inactiva de la enzima.

En el presente trabajo, al evaluar los espermatozoides frescos durante los diferentes tiempos de capacitación, se observó un aumento significativo de la actividad durante la primera hora de capacitación (tiempo 1), mediante los dos métodos de evaluación utilizados. Esta actividad se ha visto más temprana en semen congelado (**Cortés et al., 2006**). La actividad enzimática observada durante la primera hora en el semen fresco, se debería a la mayor estabilidad de las membranas espermáticas presentada por estos espermatozoides que comenzarían más tarde a sufrir cambios en su arquitectura lipídica tendientes a la posterior exocitosis acrosomal; siendo esto coincidente con lo que ocurre durante el tránsito del espermatozoide a través del tracto reproductivo femenino (**Yanagimachi, 1994; Sirivaidyapong et al., 2000; Petrunkina et al., 2003**). Los resultados obtenidos concuerdan con los señalados por **Rodrigues (2009)**, quien observó la mayor actividad enzimática de acrosina en espermatozoides frescos a partir de los 60 minutos de capacitación, tanto en digestión de gelatina en placa como en hidrólisis de BAEE. Asimismo, otros estudios sobre la actividad enzimática de acrosina, determinada mediante espectrofotometría en espermatozoides caninos frescos, indican que ésta aumentaría en relación al tiempo de incubación en medio de capacitación (**Kawakami et al., 1999; De los Reyes et al., 2009^b**), lo cual es coincidente con estudios de fecundación donde se ha observado un incremento en el porcentaje penetración de ovocitos de perra, a medida que transcurre el tiempo de co-incubación (**Palomino y De los Reyes, 2008; De los Reyes et al., 2009^a**).

La actividad enzimática de acrosina a través de la digestión de gelatina en placa descrita en bovinos (**Thundathil et al., 2001**), y perros (**Ficsor et al., 1983**), muestran en promedio halos de digestión de mayor diámetro a los encontrados en el presente estudio y en el estudio de **Rodrigues (2009)** con semen canino congelado, probablemente porque en la evaluación no se consideraron los espermatozoides sin halo. Sin embargo, **Ficsor et al., (1983)**, describe en espermatozoides frescos un incremento en la actividad enzimática a través del tiempo de capacitación, lo que coincide con lo encontrado en el presente estudio.

Al comparar la actividad de la acrosina de los espermatozoides sometidos a refrigeración y frescos, no se evidenciaron diferencias en la actividad enzimática mediante ninguno de los dos métodos de evaluación empleados. Esto podría atribuirse a que la integridad de la membrana acrosomal de espermatozoides caninos es similar en espermatozoides refrigerados y frescos, describiéndose que la refrigeración induciría cambios en la membrana y en la integridad del acrosoma sólo luego de 3 a 6 horas de capacitación *in vitro* (**Manosalva et al., 2005**), por lo que en el presente estudio no se observarían diferencias en la actividad enzimática de espermatozoides frescos y refrigerados, ya que la actividad enzimática de acrosina se midió hasta las 3 horas de capacitación *in vitro*. La similitud entre la actividad enzimática de espermatozoides refrigerados y frescos del presente trabajo, coincidiría con lo observado por **Froman et al (1984)**, donde no se observaron diferencias significativas entre la actividad presentada por estos espermatozoides. Además, si se considera que la acrosina es la enzima que participa en la fecundación facilitando la unión secundaria a la ZP y el paso del espermatozoide a través de ésta (**Barros et al., 1996; Gaboriau et al., 2007**), los resultados del presente trabajo coinciden con estudios de fecundación *in vitro*, donde los espermatozoides refrigerados mantendrían la misma capacidad de unirse y penetrar la zona pelúcida de ovocitos de perra madurados *in vitro*, que los espermatozoides frescos (**Acevedo, 2008**), alcanzando porcentajes similares a través de los mismos tiempos de capacitación que los utilizados en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan información respecto a la actividad de la enzima acrosina cuando los espermatozoides son refrigerados y posteriormente capacitados, siendo útil para definir protocolos de fecundación *in vitro* más avanzados y proponer mejoras en las tecnologías reproductivas en caninos, que pudiesen eventualmente usarse en programas de preservación de otros cánidos silvestres. Además, entrega información de la actividad enzimática de los espermatozoides refrigerados que debe ser considerada para un manejo óptimo del semen, considerando que no puede ser manipulado igual que el semen congelado.

CONCLUSIONES

- Al capacitar durante diferentes tiempos de incubación los espermatozoides caninos sometidos a refrigeración, estos no presentan variaciones en la actividad enzimática de acrosina.
- El proceso de refrigeración no produce alteraciones significativas en los espermatozoides caninos que conduzcan a una variación en la actividad de acrosina.
- Los espermatozoides caninos frescos presentan una actividad de acrosina mayor durante la primera hora de capacitación *in vitro*, producto de la capacitación y RA que experimentarían estos espermatozoides.
- La actividad enzimática de acrosina de espermatozoides refrigerados no presenta diferencias comparada con los espermatozoides frescos, tanto en actividad proteolítica en gelatina, como en espectrofotometría con BAEE.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ACEVEDO, K.P.** 2008. Unión y penetración a la zona pelúcida de ovocitos de perra con espermatozoides caninos capacitados por diferentes tiempos de incubación: estudio con espermatozoides refrigerados. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria.
2. **ARETIO, C.** 2006. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides caninos congelados/descongelados sometidos a diferentes condiciones de capacitación in vitro. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria.
3. **AUSTIN, C.R.** 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Australian Journal Sciences Research 4: 581-596.
4. **AURICH, C.** 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. Animal Reproduction Science 89: 65-75.
5. **BALL, B.A.; FAGNAN, M.S.; DOBRINSKI, I.** 1997. Determination of acrosin amidase activity in equine spermatozoa. Theriogenology 48: 1191- 1198.
6. **BARROS, C.; CAPOTE, C.; PEREZ, C.; CROSBY, J.A.; BECKER, M.; DE IOANNES, A.** 1992. Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. Biological Research 25(1): 31-40.

7. **BARROS, C.; MELENDEZ, J.; VALDIVIA, M.; YUNES, R.; RIOS, M.** 1993. Protease involvement in penetration of egg coats: a comparative approach. *Journal Reproduction Development* 39: 71-72.
8. **BARROS, C.; CROSBY, J.A.; MORENO, R.D.** 1996. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biology International* 20: 33-39.
9. **BECKER, G.A.** 2006. Presencia de acrosina en espermatozoides caninos refrigerados sometidos a diferentes condiciones de capacitación in vitro. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria.
10. **BERGQVIST, A.S.; BALLESTER, J.; JOHANNISSON, A.; HERNÁNDEZ, M.; LUNDEHEIM, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.** 2006. In vitro capacitation of bull spermatozoa by oviductal fluid and its components. *Zygote* 14, 259–273.
11. **BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D.; YOUNGQUIST, R.S.** 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 34: 147-157.
12. **BRANDON, JR.; SRIVASTAVA, C.L.; HEUSNER, G.L.; FAYRER-HOSKEN, R.A.** 1997. Extraction and quantification of acrosin, beta-N-acetylglucosaminidase, and arylsulfatase-A from equine ejaculated spermatozoa. *Journal Experimental Zoology* 279: 301-308.
13. **BREWIS, I.A.; MORTON, I.E.; MOORE, H.D.M.; ENGLAND, G.C.W.** 2001. Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 60: 491-497.

14. **BUFFONE, M.; FOSTER, J.; GERTON, G.** 2008. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *The International Journal of Developmental Biology* 52: 511-522.
15. **CHANG, M.C.** 1951. Fertilising capacity of spermatozoa deposited in the Fallopian tubes. *Nature* 168: 697- 698.
16. **CORTÉS, C.; CODELIA, V.; MANOSALVA, I.; DE LANGE, J.; MORENO, R.D.; DE LOS REYES, M.** 2006. Proacrosin and acrosin quantification as a tool for the evaluation of acrosome integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 93 : 165- 175.
17. **DE IOANNES, A.E.; BECKER, M.I.; PEREZ, C.; CAPOTE, C.; BARROS, C.** 1990. Role of acrosin and antibodies to acrosin in gamete interactions. **In:** Alexander, N., Griffin, D., Spieler, J., Waites, G. (eds). *Gamete Interaction: Prospect for Immuno Contraception*. Alan R. Liss, New York. pp. 185- 196.
18. **DE LAMIRANDE, E.; O'FLAHERTY, C.** 2007. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784: 106-115.
19. **DE LOS REYES, M.** 2000. Inseminación Artificial en Perros. **In:** De los Reyes M, Sanchez A (ed). *Tópicos en Reproducción de Pequeños Animales*. Ediciones Facultad Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile. 1° Ed. Santiago-Chile. 94-106.
20. **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.

21. **DE LOS REYES, M.** 2004. Congelación de Semen. **In:** Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latino Americanos. Gobello C. Editorial Gráfica Latina S.A. Buenos Aires, Argentina. pp 15-24.
22. **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.
23. **DE LOS REYES, M.; PALOMINO, J.; DE LANGE, J.; ANGUIA, CARLA.; BARROS, C.** 2009a. In vitro sperm penetration through the zona pellucida of immature and in vitro matured oocytes using fresh, chilled and frozen canine semen. *Animal Reproduction Science* 110: 37–45.
24. **DE LOS REYES, M.; MEDINA, G.; PALOMINO, J.** 2009b. Western Blot Analysis of Proacrosin/Acrosin in Frozen Dog Sperm During In Vitro Capacitation. *Reproduction in Domestic Animals* 44 (Suppl. 2), 1–4.
25. **DUDKIEWICZ, A.** 1983. Inhibition of fertilization in the rabbit by anti-acrosin antibodies. *Gamete Research* 8: 183- 197.
26. **DUNBAR, E.S; AVERY S., LEE V.; PRASAD, S.; SCHWAHN, D.; SCHWOEBEL, E.; SKINNER, S.; WILKINS, B.** 1994. The mammalian zona pellucida its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression. *Reproduction, Fertility and Development* 6: 331-347
27. **ENGLAND, G.; PONZIO, P.** 1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 46:165-171.
28. **FENG, H.L.; HAN, Y.B.; HERSHLAG, A.; ZHENG, L.J.** 2007. Impact of Ca²⁺ flux inhibitors on acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Journal of Andrology* 28: 561-564.

29. **FICSOR, G.; LEONARD, L.; OLDFOLD, G.; ROY, S.; BECKER, R.** 1983. Gelatin- substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. *Fertil Steril* 39 (4): 548-552.
30. **FURLONG, L.I.; HARRIS, J.D.; VAZQUEZ-LEVIN, M.H.** 2005. Binding of recombinant human proacrosin/acrosin to zona pellucida (ZP) glycoproteins. I. Studies with recombinant human ZPA, ZPB and ZPC. *Fertility and Sterility* 83: 1780-1790.
31. **FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M.** 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta, Rev* 1469, 197–235.
32. **FROMAN, D. P.; AMANN, R. P.; RIEK, P. M.; OLAR, T. T.** 1984. Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 301-308.
33. **GABORIAU, D.; HOWES, E.; CLARK, J.; JONES, J.** 2007. Binding of sperm proacrosin/ β -acrosin to zona pellucida glycoproteins is sulphate and stereodependent. Synthesis of novel fertilization inhibitor. *Development Biology* 306: 646-657.
34. **GUTIERREZ, M.** 2007. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides frescos de perro sometidos a capacitación in vitro. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria.
35. **HARRISON, R.A.P.** 2004. Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Molecular Reproduction and Development* 67, 337–352.

36. **HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L.** 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 51: 99-108.
37. **HERMANS, J.M.; JONES, R.; STONE, S.R.** 1994. Rapid inhibition of the sperm protease acrosin by protein C inhibitor. *Biochemistry* 33: 5440- 5444.
38. **HERMANSSON, U.; LINDE FORSBERG, C.** 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology* 65: 584-593.
39. **HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.** 1998. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science* 51: 321-332.
40. **HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.** 1999. Culture conditions required to induce capacitation and the acrosome reaction of canine sperm in vitro. *Veterinary Record* 144: 22-23.
41. **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.
42. **JONAKOVA, V.; CECHOVA, D.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J.; VESELKY, L.** 1991. Variability of acrosin inhibitors in boar reproductive tract. *Biomedica Biochimica Acta* 50: 691- 695.
43. **KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W.** 1993a. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biology of Reproduction* 48: 841-845.

44. **KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; TOLLNER, T.L.; OVERSTREET, J.W.** 1993b. Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. *Journal Experimental Zoology* 265(5): 599- 603.
45. **KAWAKAMI, E.; ARAI, T.; OISHI, I.** 1999. Changes in hyaluronidase, acrosin, n-acetylhexosaminidase activities of dog sperm after incubation. *Journal of Veterinary Medical Science* 61: 183-184.
46. **KIM, E.; YAMASHITA, M.; KIMURA, M.; HONDA, A.; KASHIWABARA, S.; BABA, T.** 2008. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *The International Journal of Developmental Biology* 52: 677-682.
47. **KLEMM, U.; MÜLLER-ESTERL, W.; ENGEL, W.** 1991. Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. *Human Genetics* 87: 635-641.
48. **KRUGER, N.J.** 1994. The Bradford Method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*. Vol 32.
49. **KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G.** 1994. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology* 41: 1355-1366.
50. **LEYTON, L.; DE IOANNES, A.; CROXATTO, H.B.; GRAHAM, E.J.; ELCE, J.S.** 1986. Two satisfactory methods for purification of human acrosin. *Biochemistry and Cell Biology* 64: 1020- 1024.
51. **LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M.** 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility Supplements* 39: 229.

52. **LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M.** 1993. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 47: 313-323.
53. **LINDE-FORSBERG, C.** 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen- thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery* 10: 48- 58.
54. **LINDE-FORSBERG, C.** 2001. Intra-uterine insemination in the dog using the Scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. En: Concannon PWC, England GCW and Verstegen J. Editors. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service [en línea] <www.ivis.org> [consulta: 2-11-06]
55. **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.
56. **MANOSALVA, I.; CORTES, C.; LEYVA, V.; VALDIVIA, M.; DE LOS REYES, M.; BARROS, C.; MORENO, R.** 2005. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 16:114-128.
57. **MARIN-BRIGGILER, C.I.; GONZALEZ-ECHEVERRIA, F.; BUFFONE, M.; CALAMERA, J.C.; TEZON, J.G.; VAZQUEZ-LEVIN, M.H.** 2003. Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertility and Sterility* 79:1396-1403.
58. **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. *Fertility and Sterility* 77: 812-817.

59. **NIZÁNSKI, W.** 2006. Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology* 66: 470-483.
60. **OETTLÉ, E.E.** 1986. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science* 12: 145-150.
61. **O'FLAHERTY, C.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C.** 2006. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine* 41: 528-540.
62. **PALOMINO, J.A.; DE LOS REYES, M.** 2008. A Scanning Electron Microscopy Study of Frozen / Thawed Dog Sperm During In Vitro Gamete Interaction. *Reproduction in Domestic Animals*. Volume 44 (2), Pages 278 – 283.
63. **PARRAGUEZ, M.J.** 2010. Identificación de proacrosina/acrosina por western blot en espermatozoides caninos refrigerados y capacitados in vitro en distintos tiempos. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria.
64. **PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, A.; FIRST, N.** 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology Reproduction* 38: 1171-1180.
65. **PEÑA, A.; LINDE- FORSBERG, C.** 2000. Effect of spermatozoal concentration and post- thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703- 718.

66. **PETRUNKINA, A. M.; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A.; TÖPFER-PETERSEN, E.** 2003. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *Journal of Andrology*. 24: 423-437.
67. **PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; FORSBERG, C.L.** 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62:1498-1517.
68. **RODRIGUES, P.** 2009. Evaluación de la actividad enzimática de acrosina durante la capacitación en espermatozoides congelados de perro. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria.
69. **RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*. 68: 138–146.
70. **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. *Animal Reproduction Science* 57:199-215.
71. **SARAVIA, F.; HERNÁNDEZ, M.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.** 2007. Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *International Journal of Andrology* 30, 485–499.
72. **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. *Reproduction Fertility Development* 14: 225-233.

73. **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. *Journal Andrology* 18: 281-288.
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. **STRÖM-HOLST, B.; ROTA, A.; ANDERSEN- BERG, K.; LINDEFORSBERG, C.; RODRIGUEZ- MARTINEZ, H.** 1998. Canine sperm head damage after freezing- thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reproduction Domestic Animal* 33: 77-82.
76. **THUNDATHIL, J.; PALOMINO, J.; BARTH, A.; MAPLETOFT, R.; BARROS, C.** 2001. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented acrosomes. *Animal Reproduction Science* 67: 231-243.
77. **TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A.M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte–sperm interactions. *Animal Reproduction Science* 60–61: 653-662.
78. **URCH, U.A.** 1991. Biochemistry and function of acrosin. **In:** Wassarman, P.M. (Ed). *The Biology of Mammalian Fertilization*. CRL Press, Chicago. pp 233- 248.
79. **VALDIVIA, M.; YUNES, R.; MELÉNDEZ, J.; DE IOANNES, A.; LEYTON, L.; BECKER, M.I.; BARROS, C.** 1994. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in rabbit sperm during acrosome reaction and in spermatozoa recovered from the perivitelline space. *Molecular Reproduction and Development* (2) 37: 216-222.

80. **WATSON, P. F.** 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Rep. Fert. Dev.* 7:781-891.
81. **WATSON, P.F.** 2000. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60- 61: 481- 492.
82. **WHITTAKER, J.R.; BENDER, H.L.** 1965. Kinetics of papain- catalyzed hydrolysis of a N-benzoyl-L-arginine ethyl ester and a N-benzoyl-L-argininamide. *Journal of the American Chemical Society* 87: 2728- 2737.
83. **WILLIAMS, A.C.; FORD, W.C.** 2001. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *Journal of Andrology* 22: 680-695.
84. **WITTE, T.S.; SCHÄFER-SOMI, S.** 2007. Involvement of cholesterol, calcium, and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 102: 181- 193.
85. **WITTE, T.S.; SCHÄFER-SOMI, S.; KUSHAR, A.; MÖSTL, E.; IBEN, C.; AURICH, C.** 2009. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 110: 293-305.
86. **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.
87. **YAMAGATA, K.; MURAYAMA, K.; OKABE, M.; TOSHIMORI, K.; NAKANISHI, T.; KASHIWABARA, S-I.; BABA, T.** 1998. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry* 273: 10470-10474.

88. **YANAGIMACHI, R.** 1994. Mammalian fertilization. **In:** The Physiology of Reproduction. Segunda Edición. Knobil, E y Neill, J.D (eds). Roar Press, Ltd. Nueva York, USA. pp 189-317.
89. **ZANEVELD, L.D.J.; ROBERTSON, R.T.; KESSLER, M.; WILLIAMS, W.L.** 1971. Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic and seminal plasma trypsin inhibitors. Journal of Reproduction and Fertility 25: 387- 392.