

UNIVERSIDAD DE CHILE

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



**IDENTIFICACION DE PROACROSINA/ACROSINA POR
WESTERN BLOT EN ESPERMATOZOIDES CANINOS
REFRIGERADOS Y CAPACITADOS *IN VITRO* EN
DISTINTOS TIEMPOS.**

María José Parraguez Núñez

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

PROFESORA GUÍA: DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT 1060602-1080618

SANTIAGO, CHILE

2010

Esta Memoria de Título fue financiada por los proyectos Fondecyt 1060602 y 1080618 a cargo de la profesora Dra. Mónica de los Reyes.

AGRADECIMIENTOS

- A la Doctora Mónica de los Reyes, por su ayuda, apoyo y disposición durante el tiempo de trabajo de esta Memoria de Título.
- A Jaime Palomino por su gran ayuda, disposición, inagotable paciencia e incondicional 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 mis padres, Patricia Núñez y José Parraguez, por su confianza y apoyo. Gracias a ellos pude cumplir mi más anhelado sueño.

ÍNDICE

RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCION.....	1
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
Preservacion de semen canino por refrigeracion.....	4
Capacitacion espermatica y reaccion acrosomica.....	7
Acrosina.....	8
HIPOTESIS.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	13
MATERIAL Y METODO.....	14
- Obtención y evaluación seminal.....	14
- Refrigeracion de semen.....	15
- Capacitación espermática.....	16
- Extracto espermático.....	16
- Cuantificación de proteínas.....	16
- Electroforesis y Western Blot.....	17
- Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS.....	20
DISCUSION.....	26
CONCLUSION.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	32

RESUMEN

La inseminación artificial con espermatozoides refrigerados es empleada en varias especies animales incluidos los perros, sin embargo, aunque en menor grado que la congelación, la refrigeración tiene efectos detrimentales sobre el espermatozoide pudiendo afectar procesos como la capacitación espermática y reacción acrosómica, donde se libera el sistema enzimático proacrosina/acrosina. El objetivo de este trabajo fue evaluar mediante Western Blot en espermatozoides de perro sometidos a refrigeración, la reactividad del sistema proacrosina/acrosina durante diferentes tiempos de capacitación *in vitro*.

Se utilizaron 7 eyaculados de 3 perros adultos. En cada muestra se evaluó la concentración espermática y la motilidad progresiva. Los espermatozoides de cada eyaculado fueron procesados como muestras frescas y refrigeradas. Los espermatozoides frescos fueron resuspendidos en medio Fert Talp en cantidad suficiente para lograr una concentración de 5×10^6 espermatozoides/mL y los que se refrigeraron, se resuspendieron en diluyente en base a TRIS en proporción 2:1 (TRIS-semen), yema de huevo, ácido cítrico, fructosa y antibióticos, en cantidad suficiente para lograr una concentración de 200×10^6 espermatozoides/mL, manteniéndolos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Tanto los espermatozoides frescos (control) como los refrigerados/entibiados, se incubaron en medio de cultivo Fert Talp por periodos de 0 a 3 h para inducir la capacitación espermática. Posterior a cada tiempo de incubación los espermatozoides fueron sometidos a extracción proteica, las que fueron separadas utilizando electroforesis. Luego, a través de Western Blot, las proteínas en estudio se incubaron con el anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10, en donde se observaron bandas correspondientes a proacrosina y las formas activas α -acrosina y β -acrosina en cada tiempo de capacitación espermática en los espermatozoides caninos frescos y en los refrigerados. La densidad óptica de las bandas se analizó mediante análisis de varianza y posterior prueba de Tukey.

Los resultados en espermatozoides frescos mostraron que tanto proacrosina como la forma activa α -acrosina no cambiaron en forma significativa durante los diferentes tiempos de incubación, sin embargo, β -acrosina presentó una mayor actividad a partir de

la 2 h de incubación ($p < 0,05$). En espermatozoides refrigerados, la reactividad con el anticuerpo, de proacrosina como tampoco las de sus formas activas α y β , mostró diferencias significativas durante los diferentes periodos. Sin embargo, al comparar la reactividad presentada por proacrosina, α y β -acrosina entre espermatozoides frescos y aquellos sometidos a refrigeración, proacrosina no presentó diferencias significativas entre ambos tratamientos. Se obtuvieron valores mayores ($p < 0,05$) de densidad óptica de α -acrosina en espermatozoides refrigerados, a partir de las 3 horas de incubación. En relación a β -acrosina, se pudo observar una mayor reactividad de esta molécula con el anticuerpo al inicio del período de capacitación, en espermatozoides refrigerados en comparación a los frescos. A partir de la segunda hora de capacitación *in vitro*, no se observaron diferencias significativas en la detección de β -acrosina entre estos tipos de espermatozoides.

En conclusión, los espermatozoides caninos refrigerados, presentaron una activación más temprana de proacrosina hacia su forma activa β -acrosina, en comparación con los espermatozoides caninos frescos, durante la incubación para capacitación a que fueron sometidos.

ABSTRACT

Artificial insemination with chilled spermatozoa is used in several animal species, including canines. Although, in a minor degree than freezing, this technique has detrimental effects upon spermatozoon affecting sperm capacitation and acrosomal reaction, where proacrosin/acrosin system are involved. The aim of this work was to study by Western Blotting, the activation of proacrosin/acrosin system of chilled dog sperm during different periods of *in vitro* capacitation.

Seven ejaculates were used from 3 adult dogs. Each sample was evaluated according sperm concentration and progressive motility. Each ejaculate was processed as fresh and chilled samples. After centrifugation, fresh spermatozoa were resuspended in Fert Talp medium to a final concentration of 5×10^6 sperm / mL. Chilled samples were re-suspended in a TRIS, egg yolk, citric acid, fructose and antibiotics extender to a final concentration of 200×10^6 sperm/mL, then were maintained at 4° C for 24 h. Fresh and chilled spermatozoa were incubated in Fert Talp medium for periods from 0 to 3 h, for capacitation. After each time, the spermatozoa were subjected to protein extraction and Western Blots analysis using the monoclonal antibody C5F10 against human acrosin. The optical densities of the different reactive bands were evaluated by ANOVA and Tukey test.

The results obtained with fresh spermatozoa showed that both proacrosin and the active form α -acrosin, did not change significantly during the different incubation times. However, β -acrosin presented an increasing reactivity from the second h of incubation ($p < 0,05$). Using chilled spermatozoa, the reactivity of proacrosin as well as active forms α and β -acrosin, did not show significant differences during different periods.

However, when the reactivity of pro, α , and β -acrosin were compared between fresh and chilled spermatozoa, proacrosin did not show significantly differences. High optical density was observed in α -acrosin when chilled samples were examined which was only 3 hours after incubation. With respect to β -acrosin, a significantly high reactivity in chilled spermatozoa, at the beginning of incubation was observed. After two hours of incubation differences in β -acrosin were not observed between fresh and chilled dog sperm.

In conclusion, chilled dog sperm had an early activation of proacrosin to its active form β -acrosin, compared with that in fresh samples during sperm incubation under capacitation conditions.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la investigación en el área de la reproducción canina ha experimentado un incremento debido al papel cada vez más importante que juega el perro dentro de la sociedad. Por esta razón, existe interés por estudiar y profundizar algunas biotecnologías reproductivas en esta especie dentro de las cuales están la criopreservación de espermatozoides e inseminación artificial. Sin embargo, tecnologías reproductivas más avanzadas como fecundación *in vitro*, maduración de ovocitos, producción *in vitro* de embriones y transferencia de embriones se encuentran aún en el ámbito de la investigación en esta especie (England, 1993; De los Reyes, 2004).

La criopreservación permite mantener la viabilidad de ciertas células, como los espermatozoides, por periodos largos de tiempo en el caso de la congelación, o cortos en el caso del semen refrigerado, posibilitando su utilización con un mayor margen de tiempo a diferencia del semen fresco. La refrigeración de semen permite tener un margen mayor de tiempo para su utilización, en comparación al semen fresco, una mayor viabilidad posterior a su preservación y un mayor porcentaje de preñeces logradas comparado con el semen congelado-descongelado (Bouchard *et al.*, 1990, Linde-Forsberg, 1995; Pinto *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999; Iguer-ouada y Vestergen, 2001). No obstante, aunque en menor grado que la congelación, la refrigeración causa alteraciones en las estructuras del espermatozoide, lo que se traduciría en una disminución de su capacidad fecundante (Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000; Manosalva *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006). Estudios en caninos, han descrito el efecto de la refrigeración sobre la motilidad, viabilidad e integridad del acrosoma, indicando una disminución significativa en espermatozoides refrigerados en comparación con espermatozoides frescos (Manosalva *et al.*, 2005), lo que alteraría su capacidad fecundante.

Se ha sugerido que las alteraciones que sufriría el espermatozoide durante el proceso de enfriamiento y congelación, podrían ser similares a los cambios que ocurren durante la capacitación espermática, debido en gran parte a la alteración de la membrana plasmática lo que induciría incrementos en el calcio intracelular (Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Watson, 2000). Este aumento de calcio dentro de la célula es

necesario para que ocurra la reacción acrosómica (RA) (Feng *et al.*, 2007) y para la expresión de la motilidad hiperactivada del espermatozoide (Marin *et al.*, 2003).

La interacción de los gametos y la posterior fecundación dependen del proceso de capacitación y RA que deben experimentar previamente los espermatozoides y que ocurre, durante el trayecto de éstos, a través del tracto reproductivo de la hembra (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Brewis y Moore, 1997; Wassarman, 1999; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; De los Reyes y Barros, 2000). Este proceso ha podido realizarse *in vitro* en diversas especies, incluidos los caninos, lo que ha permitido estudiar en forma más detallada estos eventos (Mahi y Yanagimachi, 1978; Rota *et al.*, 1999; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006). En el proceso de capacitación espermática, el espermatozoide adquiere el movimiento hiperactivado y experimenta la RA donde se libera la enzima acrosina, la cual se encuentra en su forma inactiva, proacrosina (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000). La acrosina es una de las enzimas más abundantes dentro del acrosoma, la cual ha sido involucrada en la unión y la penetración de la ZP (Yanagimachi, 1994; Froman *et al.*, 1984; Kawakami *et al.*, 1999; Aretio, 2006; Cortés *et al.*, 2006; Becker, 2007; Gutiérrez, 2007). Al cumplir un rol fundamental en la interacción gamética y la fecundación, su estudio en semen criopreservado (refrigerado y congelado) cobra gran importancia en la evaluación espermática.

La presencia de acrosina se ha demostrado en algunas especies animales incluyendo bovinos (De los Reyes y Barros, 2000), conejos (Valdivia *et al.*, 1994), hámster, cobayos (Barros *et al.*, 1992) y últimamente en caninos (Cortés *et al.*, 2006; De los Reyes *et al.*, 2009). Estudios realizados en acrosina canina sugieren que la activación de esta enzima se vería inducida por pequeñas fracturas a nivel de la membrana acrosomal y/o membrana plasmática y que sería diferente en espermatozoides congelados, refrigerados en comparación a los frescos (Froman *et al.*, 1984; Kawakami *et al.*, 1999). A través de inmunofluorescencia indirecta en espermatozoides refrigerados, la mayor presencia de esta enzima se observa en tiempos más tempranos de capacitación *in vitro* (Becker, 2007). Además, estudios realizados en caninos utilizando Western Blot, han logrado identificar la acrosina, evidenciando una mayor reactividad con el anticuerpo monoclonal

antiacrosina humana, durante las primeras horas de capacitación en espermatozoides refrigerados en comparación con los frescos (Manosalva *et al.*, 2005). Esto plantea la necesidad de evaluar en forma comparativa la activación de proacrosina durante la capacitación *in vitro* de espermatozoides frescos y refrigerados. El empleo de Western Blot, ha permitido identificar la reactividad de proacrosina y sus formas activas, siendo por tanto, una herramienta válida para la profundización de los estudios de este sistema enzimático y los factores que pueden afectarlo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Preservación de semen canino por refrigeración.

Desde que Harrop (1956) lograra la primera preñez realizando una inseminación artificial con semen canino refrigerado a 4 °C, se han ido desarrollando diversos métodos tendientes a preservar el semen de perro mediante refrigeración.

La refrigeración de los espermatozoides a 4 °C es una técnica que permite preservar los espermatozoides por un periodo corto de tiempo y entre las ventajas que ofrece están: baja complejidad de los protocolos de refrigeración, adecuado transporte de las muestras entre distancias considerables, técnica de inseminación artificial simple y porcentajes de preñez superiores que los obtenidos con semen congelado (Linde-Forsberg, 1995; Pinto *et al.*, 1999; Iguer-Ouada y Vestergren, 2001). Sin embargo, existen también desventajas relacionadas principalmente con las alteraciones producidas en los espermatozoides producto de los cambios de temperatura que deben soportar. Estudios realizados en espermatozoides mamíferos han descrito diversos efectos negativos que produce la criopreservación en el espermatozoide, concentrándose estas alteraciones en su mayoría sobre la membrana plasmática y acrosómica (Bouchard *et al.*, 1990; Rota *et al.*, 1999; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Ström Holst *et al.*, 1998; Watson, 2000; Nishizono *et al.*, 2004; Manosalva *et al.*, 2005; Palomino, 2006).

La disminución de la temperatura afectaría además las proteínas de la superficie de la membrana espermática (Watson, 2000; De los Reyes, 2004), alterando la función de canales iónicos, lo que aumentaría la permeabilidad de la membrana (Parks y Graham, 1992; Watson, 2000) alterando la regulación del calcio. Esto último tendría consecuencias en términos de función celular, lo cual en casos severos podría ser incompatible con la viabilidad del espermatozoide (Watson, 2000; De los Reyes, 2004).

Los diluyentes espermáticos disminuyen los efectos negativos de la refrigeración sobre los espermatozoides (Linde-Forsberg, 1995; Rota *et al.*, 1995; Iguer-Ouada y

Verstegen, 2001; Nishizono *et al.*, 2004; Aurich, 2005), estos tienen la principal función de proteger la integridad y funcionalidad de las membranas espermáticas del daño causado por los cambios de temperatura, además proveen de sustratos energéticos y permiten la mantención del pH y la osmolaridad en el medio extracelular, manteniendo un ambiente adecuado para la sobrevivencia temporal del espermatozoide (Batellier *et al.*, 2001; Ström-Holst *et al.*, 2000; Purdy, 2006). Estudios realizados, han demostrado que la sobrevivencia y motilidad de los espermatozoides es considerablemente mayor en muestras diluidas comparadas con aquellas mantenidas a 4 °C sin diluir (Morton y Bruce, 1989; Linde-Forsberg, 1995, Aurich, 2005). La composición de diluyentes para refrigeración de semen canino incluyen sustancias como citrato de sodio (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001), Tris-glucosa (hidroximetil-aminometano) (Verstegen *et al.*, 2005), Tris-BES (N-Tris 2-hidroximetil-2-ácido sulfónico aminometano), leche descremada en polvo reconstituida y calentada a 92 °C (Province *et al.*, 1984; Bouchard *et al.*, 1990; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Sánchez y Rubilar, 2001) , leche descremada fluida UHT (Bouchard *et al.*, 1990; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Sánchez y Rubilar, 2001), crema esterilizada (Rota *et al.*, 1995) , Tris-fructosa (Tsutsui *et al.*, 2003; Ponglowhapan *et al.*, 2004) , yema de huevo (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Linde-Forsberg , 2001; Tsutsui *et al.*, 2003; Ponglowhapan *et al.*, 2004; Verstegen *et al.*, 2005) y antibióticos (Province *et al.*, 1984; Rota *et al.*, 1995; Bouchard *et al.*, 1990; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001).

La yema de huevo es un componente habitual de los diluyentes debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen al espermatozoide del "shock" de frío (Quinn *et al.*, 1980; Foulkes, 1997; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001). Se ha descrito que la leche descremada pasteurizada (Bouchard *et al.*, 1990; England y Ponzio, 1996; Pinto *et al.*, 1999) y la crema (Rota *et al.*, 1995) cumpliría la misma función.

Los azúcares utilizados poseen variadas funciones tales como proveer un sustrato energético para las células espermáticas durante la incubación, mantener la presión osmótica, actuar como crioprotector y ayudar en la mantención de la motilidad y los patrones de movimiento espermático (Ponglowhapan *et al.*, 2004). Se ha estudiado la influencia de los azúcares, principalmente glucosa y fructosa sobre la motilidad y los patrones de movimiento de espermatozoides caninos refrigerados, ya que ambos azúcares

son metabolizados por vías diferentes, demostrándose que los espermatozoides caninos utilizan preferentemente la glucosa por sobre la fructosa (Ponglowhapan *et al.*, 2004). Sin embargo, la mayoría de los extensores utilizados para refrigeración de espermatozoides caninos, contienen fructosa debido a que este tipo de azúcar, mantendría mejor la motilidad en comparación con extensores que contienen glucosa (Ponglowhapan *et al.*, 2004). Esto se puede explicar, debido a que el metabolismo de la fructosa, produce un aumento en la formación de ATP, a diferencia de lo ocurrido en el metabolismo de la glucosa, en espermatozoides caninos, por lo tanto, un mayor consumo de energía se destina a la mantención de la motilidad espermática, además, se ha observado en espermatozoides frescos, que la fructosa induce un patrón de movimiento más rápido y lineal que la glucosa, la cual produce un movimiento más oscilatorio (Rigau *et al.*, 2001).

De acuerdo a diversos estudios, los espermatozoides refrigerados presentan modificaciones de membrana similares a las ocurridas en espermatozoides capacitados, asociado a la menor longevidad espermática (Rota *et al.*, 1999; Manosalva *et al.*, 2005; Hermansson y Forsberg, 2006) afectando la capacidad fecundante (Aurich, 2005). Las alteraciones estructurales y funcionales de la membrana espermática se producirían a consecuencia del estrés térmico, osmótico y tóxico al que se someten los componentes de dicha membrana durante el proceso de criopreservación (Watson, 2000). Durante el enfriamiento, los fosfolípidos y proteínas de membrana sufren cambios estructurales que se traducen en una alteración funcional, haciendo que la membrana se torne más permeable luego del enfriamiento permitiendo la entrada de calcio al espermatozoide, que podría estimular la reacción acrosómica espontánea (Maxwell y Jonson, 1997; Green y Watson, 2001; De los Reyes, 2004).

Capacitación espermática y Reacción Acrosómica.

El proceso de adquisición de la capacidad fecundante se ha denominado "capacitación" (Austin, 1951; Chang, 1951; Austin, 1952; Yanagimachi, 1994), y ha sido considerado como un requisito fundamental para que el espermatozoide pueda penetrar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000), siendo un fenómeno dinámico, complejo y dependiente del tiempo, que ocurre normalmente en el tracto genital femenino (Yanagimachi, 1994; Rodríguez-Martínez, 2007).

Diversas investigaciones han demostrado que en diferentes especies este proceso se puede inducir *in vitro*, empleando medios de cultivo que contengan elementos como: albúmina sérica bovina, glucosa, calcio y bicarbonato de sodio, que en su conjunto, imitan el ambiente oviductal y ejercen sobre la estructura del espermatozoide diferentes efectos que facilitan la ocurrencia de los eventos asociados a la capacitación (Mahi y Yanagimachi, 1978; Visconti *et al.*, 1999; Williams y Ford, 2001; Feng *et al.*, 2007; Witte y Schäfer-Somi, 2007). La CE difiere entre especies, en relación al tiempo requerido, como también se vería influenciado por los componentes del medio inductor (Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Witte y Schäfer-Somi, 2007; Witte *et al.*, 2009).

El proceso de CE culmina con la reacción acrosómica donde se fusiona la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa del espermatozoide, fenestrándose en distintos puntos, lo que permite la exposición y liberación del contenido acrosomal compuesto por diversas enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina, ésta ha sido la más estudiada y caracterizada (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*, 1996; Buffone *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008), y ha sido involucrada en la penetración espermática a través de la zona pelúcida (Valdivia *et al.*, 1999; De los Reyes y Barros, 2000; Howes y Jones, 2002; Furlong *et al.*, 2005; Gaboriau *et al.*, 2007).

En caninos existen menos estudios del proceso de capacitación espermática en comparación con otras especies domésticas o de laboratorio. Los primeros trabajos en esta especie, mostraron que espermatozoides frescos caninos eran capaces de penetrar la

ZP después de 7 horas de incubación con medio capacitante CCM (Mahi y Yanagimachi, 1978). Estudios posteriores, han demostrado un tiempo menor de capacitación espermática, observándose que la penetración a la ZP era a las 2 y 4 h de coincubación gamética (Kawakami *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993; Petrunkina *et al.*, 2004).

Estudios realizados con semen refrigerado de perro (Rota *et al.*, 1999; Manosalva *et al.*, 2005), sugieren que la reacción acrosomal ocurre antes en comparación con espermatozoides frescos, esto podría ser explicado por una desestabilización de la membrana, producto de la refrigeración, lo cual causaría que la membrana se encuentre más permeable y por lo tanto aumente el influjo de calcio intracelular iniciando el proceso de capacitación y en consecuencia la reacción acrosomal posterior, lo cual podría implicar una liberación prematura del contenido acrosomal, incluyendo a la enzima acrosina. Utilizando espermatozoides caninos criopreservados, sin capacitar (congelados y refrigerados) se ha demostrado que los espermatozoides pudieron capacitarse mientras interactuaban con los ovocitos, presentando mayores tasas de penetración espermática en tiempos menores de co-incubación, en comparación con espermatozoides frescos (De los Reyes *et al.*, 2009), esto indica que el espermatozoide después de ser criopreservado, es funcionalmente diferente a aquellos espermatozoides sin criopreservar.

Acrosina.

La acrosina es una glicoproteína hidrosoluble con propiedades serino proteasas y con especificidad del tipo tripsina (Dunbar *et al.*, 1994), presente sobre la membrana interna del acrosoma de los espermatozoides mamíferos (Barros *et al.*, 1992; Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000), sin embargo, cuando se la compara con otras serino proteasas, presenta características estructurales diferentes, como la activación de su precursor, proacrosina, a través de un doble clivaje en la molécula, lo que podría estar relacionado con su función en la fecundación (Hedrik, 1988; Dunbar *et al.*, 1991; Tranter *et al.*, 2000).

Esta enzima se encuentra almacenada en su forma zimógena, proacrosina (Froman *et al.*, 1984; Barros *et al.*, 1996) y se mantiene en ese estado debido al pH ácido presente dentro del acrosoma (Honda *et al.*, 2002) y además por la presencia en el plasma seminal, de un inhibidor de proteasas (Polakoski *et al.*, 1973; Harrison y Fléchon, 1980), el cual es removido durante el proceso de capacitación espermática, en el tracto reproductivo femenino (Polakoski *et al.*, 1973). Luego, por autoactivación se transforma en sus formas activas durante la RA (Barros *et al.*, 1996; Baba *et al.*, 1989a; Urch, 1991; Honda *et al.*, 2002; Howes y Jones, 2002). Una de ellas, corresponde a una molécula enzimática inestable, α -acrosina, la cual se convierte posteriormente en la forma enzimáticamente activa y estable correspondiente a β -acrosina (Hardy *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1991), estas tres formas de la molécula tienen una fuerte capacidad de unión a la ZP (Jones, 1991; Urch y Patel, 1991). Esta unión específica del espermatozoide con la ZP ocurre por mecanismos que involucran grupos sulfatados en las glicoproteínas de la ZP (Töpfer-Petersen *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1998; Howes y Jones, 2002; Gaboriau *et al.*, 2007), siendo un paso clave durante la fecundación.

Se ha demostrado que la unión secundaria entre espermatozoide y ZP estaría conformada por un sitio de unión a polisulfatos presente en la molécula de proacrosina y glicoproteínas sulfatadas en la ZP (Miller, 1990; Moreno *et al.*, 1999; Moreno y Barros, 2000; Furlong *et al.*, 2005), generándose complejas interacciones entre los grupos polisulfatos de las glicoproteínas de la ZP y acrosina (Crosby *et al.*, 1998; Gaboriau *et al.*, 2007) culminando en una fuerte unión entre el espermatozoide y la ZP.

De acuerdo a la identificación molecular de proacrosina, se ha elaborado un modelo general de su estructura (Baba *et al.*, 1989a; 1989b; Adham *et al.*, 1990). La molécula de proacrosina presenta tres dominios principales: el dominio zimógeno, el catalítico y el carboxilo terminal. El dominio zimógeno está compuesto por un péptido señal y por la cadena liviana. Los dominios catalítico y carboxilo terminal forman la cadena pesada de la molécula de proacrosina (Crosby, 1999).

Cuando el espermatozoide reaccionado se encuentra sobre o atravesando la ZP, proacrosina se autoactiva por un solo sitio de corte en el enlace peptídico entre Arg²³ y

Val²⁴ convirtiéndose progresivamente en una molécula de dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro correspondiente a α -acrosina (Baba *et al.*, 1989a). Parte de proacrosina es liberada desde el acrosoma uniéndose a la superficie de la ZP (Kopečný y Fléchon, 1987; Tesarik *et al.*, 1988), otra parte permanece en el capuchón acrosómico (Barros *et al.*, 1992) y el resto permanece en la matriz acrosomal remanente sobre la membrana acrosómica interna del espermatozoide (Tesarik *et al.*, 1988; 1990; Barros *et al.*, 1992). La forma activa α -acrosina, hidrolizaría la ZP (Urch *et al.*, 1985a; 1985b), para que el espermatozoide reaccionado pueda penetrar esta cubierta ovocitaria. Posteriormente, α -acrosina sufre 2 a 3 cortes en su extremo carboxilo terminal generándose otra forma enzimática de acrosina denominada β -acrosina (Schleuning *et al.*, 1976; Töpfer-Petersen y Cechova, 1990), la que es liberada al medio extracelular (Baba *et al.*, 1989a; Hermans *et al.*, 2003; Howes y Jones, 2002). La subsecuente activación de α -acrosina en β -acrosina, carente del extremo carboxilo, liberaría a β -acrosina de la matriz acrosomal y permitiría al espermatozoide que estuvo unido a través de pro- y α -acrosina, soltarse y seguir avanzando a través de la ZP. Otras moléculas de proacrosina desde la matriz acrosomal continúan los mismos ciclos de hidrólisis, ayudando al espermatozoide a penetrar a través de la ZP hasta alcanzar el espacio perivitelino (O 'Rand *et al.*, 1986; Urch y Patel, 1991). De acuerdo a estudios realizados en espermatozoides caninos frescos y congelados sin capacitar, se ha logrado caracterizar mediante "Western Blot", la proacrosina como una molécula de 40 kDa y las dos formas activas: α -acrosina de 36 kDa y β -acrosina de 27 kDa (Cortés *et al.*, 2006).

Varios estudios han demostrado una correlación entre el sistema proacrosina/acrosina y la capacidad fecundante de los espermatozoides de mamíferos como hámster, cobayos, conejos (Barros *et al.*, 1996) y bovinos (De los Reyes y Barros, 2000), por lo que su localización y determinación en el acrosoma sería una herramienta adecuada para la evaluación de la reacción acrosómica y de la integridad de la membrana espermática de varias especies (Cortés *et al.*, 2006). La acrosina ha sido inmunolocalizada mediante el uso de anticuerpos mono y policlonales. En espermatozoides caninos frescos y criopreservados se ha podido detectar su presencia a través de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales anti acrosina humana tanto en espermatozoides no capacitados (Cortés *et al.*, 2006), como en espermatozoides

sometidos a diferentes tiempos de capacitación *in vitro* (Aretio, 2006; Gutiérrez, 2007; Becker, 2007). Se han utilizado también Western Blot y anticuerpos mono y policlonales para identificar el sistema proacrosina/acrosina. En espermatozoides de conejo (Sillerico *et al.*, 1996), verraco (Moreno y Barros, 2000), humano (Zahn *et al.*, 2002) y en espermatozoides criopreservados de perro (Manosalva *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006), se ha logrado identificar la reactividad del sistema proacrosina/acrosina.

En los estudios de inmunolocalización del sistema proacrosina/acrosina en espermatozoides refrigerados (Becker, 2007) y congelados (Aretio, 2006) de perro se ha determinado que existiría una mayor proporción de pérdida de marca fluorescente, indicativo de la presencia del sistema proacrosina/acrosina, al comienzo de la incubación en medio inductor de la capacitación, en comparación con espermatozoides frescos (Gutiérrez, 2007). Sin embargo, se desconoce la activación de proacrosina a sus formas activas, α y β -acrosina, en estos espermatozoides, por lo que a través de Western Blot, se planteó en esta memoria, evaluar la presencia de proacrosina y sus formas activas en espermatozoides refrigerados y su comparación con aquellos frescos durante la capacitación *in vitro* en caninos.

HIPÓTESIS

La activación de la proacrosina a las formas activas de esta enzima durante el proceso de reacción acrosómica, se verá adelantado en el tiempo en los espermatozoides caninos que han sido refrigerados versus aquellos espermatozoides frescos (controles).

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar la reactividad del sistema proacrosina/acrosina mediante Western Blot durante la capacitación *in vitro* en espermatozoides refrigerados de perro.

2. Objetivos Específicos

- Comparar la presencia del sistema proacrosina/acrosina en relación al tiempo de capacitación a que se someterán los espermatozoides caninos refrigerados.
- Evaluar mediante el patrón de bandeo de Western Blot, el efecto de la refrigeración y entibiamiento en la liberación del sistema proacrosina/acrosina.
- Determinar tiempos de capacitación espermática adecuados para espermatozoides refrigerados de perro, que puedan evitar la pérdida prematura de acrosina.

MATERIAL Y MÉTODOS

El procesamiento del semen se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los procedimientos de cuantificación de proteínas por Método de Bradford, Electroforesis y Western Blot se realizaron en la Unidad de Reproducción y Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

1. Obtención y evaluación seminal.

Se utilizaron 7 eyaculados de 3 perros adultos fértiles de diferentes razas, clínicamente sanos, negativos a *Brucella canis* y con parámetros seminales normales para la especie canina (De los Reyes, 2000). Las muestras de semen fueron obtenidas a través de estimulación digital del pene, recolectándose la segunda fracción del eyaculado en copas graduadas, previamente entibiadas a 38 °C.

De cada uno de los eyaculados obtenidos se evaluó el volumen seminal, motilidad progresiva de manera subjetiva mediante microscopía de contraste de fases, utilizándose aquellas muestras seminales con motilidad progresiva $\geq 70\%$, además, se midió la concentración espermática, mediante recuento en cámara de Neubauer, según protocolos del laboratorio (De los Reyes, 2000).

El plasma seminal se retiró centrifugando cada una de las muestras a 700 x g por 5 minutos, diluyéndolas previamente en "buffer" TRIS (Trishidroxiaminometano; pH 7; Merck) (Rota *et al.*, 1999) en proporción 1:2 (semen: TRIS).

Las muestras fueron procesadas como fresco (control) y refrigerado. Los espermatozoides utilizados como frescos se resuspendieron en medio de capacitación espermática Fert Talp pH 7,4 (Parrish *et al.*, 1988) en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 200 millones de espermatozoides por mililitro.

2. Refrigeración de semen.

Los espermatozoides que se sometieron a refrigeración fueron resuspendidos en el diluyente de refrigeración cuyos componentes se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del diluyente de refrigeración canino.

Compuesto	Concentración
TRIS	249 mM
Acido cítrico	88,4 mM
Fructosa	69,3 mM
Yema de huevo	20%
Bencil penicilina	1477 UI/mL
Sulfato Dihidroestreptomina	10 mg/mL
Agua destilada	100 mL

La cantidad de diluyente utilizada en cada réplica, fue la suficiente para obtener una concentración de 200 millones de espermatozoides por mililitro. Los espermatozoides una vez diluidos, se colocaron en un vaso precipitado con agua a temperatura ambiente (21-22 °C), para ser llevado a 4 °C. Manteniéndose a esa temperatura por 24 h. La motilidad espermática se evaluó en las diferentes etapas de procedimiento en forma subjetiva a través de un microscopio de contraste de fases.

Pasado el tiempo de refrigeración, las muestras se entibieron en una estufa a 37 °C por 10 minutos. Posteriormente, los espermatozoides fueron centrifugados a 400 x g por 5 minutos para extraer el diluyente y el "pellet" obtenido fue resuspendido en TRIS en proporción 1:2, de igual forma a lo realizado con el semen fresco y centrifugado nuevamente a 400 x g por 5 minutos.

El "pellet" de espermatozoides obtenido, se resuspendió en medio Fert Talp, en una proporción 1:2, de igual forma a lo realizado con el semen fresco.

3. Capacitación espermática.

Los espermatozoides resuspendidos en medio Fert Talp tanto de las muestras frescas como de aquellas sometidas a refrigeración fueron distribuidos en cuatro tubos Eppendorf en una cantidad de 1 ml cada uno, los que fueron incubados a temperatura ambiente (21-22 °C) por periodos de 0 a 3 h para capacitación. Luego para cada período, y desde cada muestra se preparó un extracto espermático para poder determinar posteriormente las proteínas en estudio (Cortés *et al.*, 2006).

4. Extracto espermático.

Cada una de las muestras, tanto frescas como refrigeradas a cada hora de incubación para capacitación, se centrifugó a 60 x g por 20 minutos, retirando posteriormente el sobrenadante. Cada uno de los "pellet" obtenidos se suspendieron por separado en "buffer" de Extracción (1% Triton X-100; 1M NaCl; 1mM EDTA; PMSF 10 µg/ml; 20 mM TRIS-HCL pH 7,0) en proporción 1:1, manteniéndose por 12 horas a 4 °C, previa agitación en vortex. Luego las muestras se centrifugaron a 7.000 x g por 10 minutos, recuperando el sobrenadante donde se encuentran las proteínas espermáticas solubles. El extracto obtenido se almacenó a -20°C en tubos Eppendorf, hasta su evaluación.

5. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas totales de cada una de las muestras (µg/ µL), se determinó a través del método descrito por Bradford (1976). Estandarizando previamente una curva en base a concentraciones conocidas de Albúmina Sérica Bovina (BSA). Los extractos proteicos se almacenaron a -20 °C hasta su evaluación.

6. Electroforesis y Western Blot

Los extractos espermáticos obtenidos en cada tiempo de capacitación, ya sea de espermatozoides frescos y refrigerados, se suspendieron en Ácido Tricloroacético (TCA) 10% para precipitar las proteínas incubándose por 1 h en cámara fría (-20 °C), posteriormente las muestras se centrifugaron a 16.000 x g por 15 minutos, retirando el sobrenadante. El "pellet" obtenido se lavó por 10 minutos con Acetona y luego se suspendió en "buffer" de carga 4X (0,125M TRIS-HCL pH 6,8; 4% SDS; 10% mercaptoetanol; 20% glicerol; 0,05% azul de bromofenol). Luego las muestras se calentaron a 100 °C durante 5 minutos en baño María.

Las proteínas presentes en el extracto de espermatozoides caninos frescos y refrigerados capacitados en diferentes tiempos se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones denaturantes y reductoras de acuerdo al método de Laemmli (1970). Se utilizó una cantidad de 50 µg de proteína y se aplicó una diferencia de potencial de 100V, durante 2h. Luego las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa por 1 h, según el método descrito por Towbin *et al.*, (1979). Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados incubando la membrana en una solución de PBS suplementada con BSA 2% pH 7,4, por 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo monoclonal anti-acrosina humana C5F10 (dilución 1:1000 en PBS-BSA 2%) durante toda la noche a 4 °C y con agitación constante. Las membranas fueron lavadas 3 veces con una solución de PBS-Tween 0,1% durante 10 minutos.

Luego se aplicó el anticuerpo secundario antiratón conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1:5000 en PBS 1%, pH 7,3), por 1 h a temperatura ambiente, en agitación. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0,1% por 10 minutos cada uno.

Las bandas de proteínas fueron visualizadas utilizando el método enzimático de la Fosfatasa Alcalina (100 mM TRIS; 100 mM NaCl; 1M MgCl₂; fosfato de bromo-cloro-indolyl, 150 pg/mL (BCIP); nitro blue tetrazolium, 300 pg/mL (NBT), pH 9,5).

La membrana se incubó en la solución hasta la visualización de las bandas de proteínas, deteniendo la reacción adicionando agua corriente.

La identificación del sistema proacrosina y las formas activas α y β -acrosina en cada muestra (fresco y refrigerado) se realizó de acuerdo a los pesos moleculares (kDa) de cada una de ellas (Cortés *et al.*, 2006). Para asegurar que la cantidad de proteína analizada (acrosina) fuera la misma en los diferentes tiempos de capacitación espermática en ambos tratamientos, se realizó un control de carga junto a las proteínas en estudio, utilizando un marcador estándar, correspondiente a proteínas de peso molecular conocido.

7. Análisis Estadístico.

En un total de 7 réplicas experimentales utilizando semen fresco y refrigerado, se evaluó mediante Western Blot la presencia de proacrosina y de acrosina activa, α y β -acrosina. La densidad óptica de estas bandas fue evaluada utilizando el programa Photoshop 8.0, en los diferentes tiempos de capacitación espermática.

Los valores de densidad óptica (píxeles), provenientes de las bandas electroforéticas obtenidas para cada tipo de semen (fresco y refrigerado), se compararon mediante Análisis de varianza y posterior prueba de Tukey para determinar las diferencias entre los promedios de los efectos para ambos tratamientos durante los tiempos de capacitación espermática (0, 1, 2, 3 h).

Las diferencias con $p \leq 0,05$ se consideraron significativas.

Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

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

Donde:

Y_{ijkl} = Variable experimental (bandas de proacrosina)

μ = Media poblacional.

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

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

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

e_{ijkl} = Error experimental.

RESULTADOS

Detección de proacrosina, α -acrosina y β -acrosina mediante Western Blot en espermatozoides caninos frescos y sometidos a refrigeración.

El análisis de Western Blot mostró bandas correspondientes a proacrosina y las formas activas α -acrosina y β -acrosina en cada tiempo de capacitación espermática en los espermatozoides caninos frescos (figura 1) y en los refrigerados (figura 2).

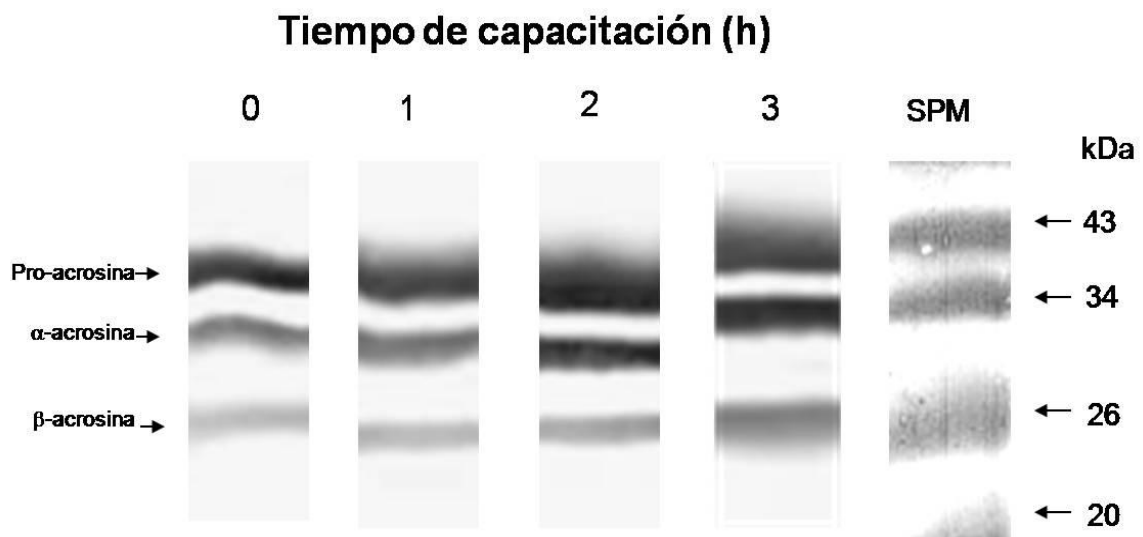


Figura 1. Identificación proacrosina, α y β -acrosina a través de Western Blot en espermatozoides caninos frescos, sometidos a diferentes tiempos de capacitación *in vitro*.

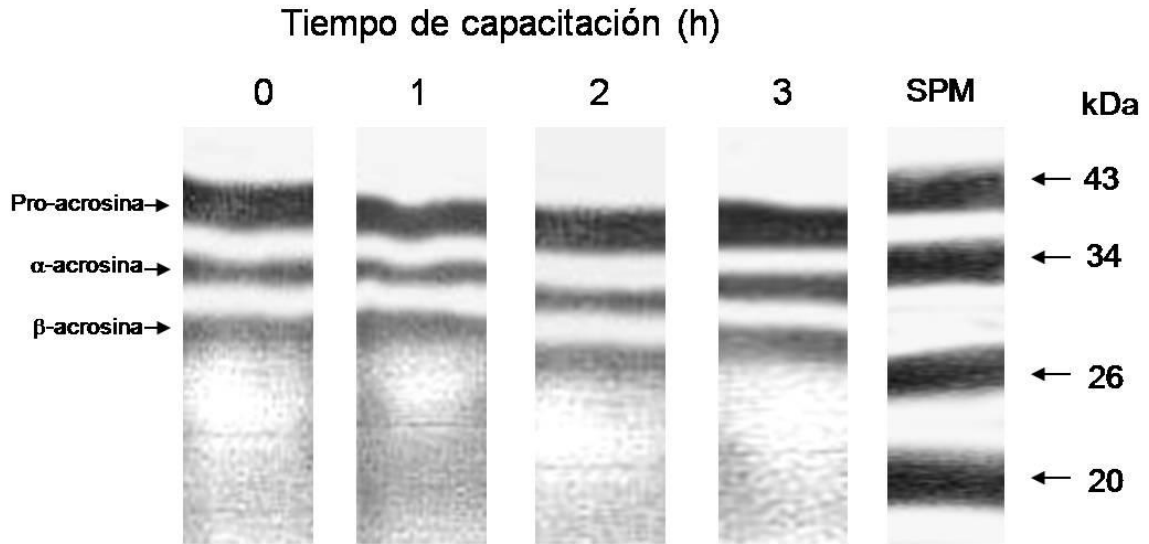


Figura 2. Identificación proacrosina, α y β -acrosina a través de Western Blot en espermatozoides caninos refrigerados, sometidos a diferentes tiempos de capacitación *in vitro*.

Los valores de densidad óptica obtenidos de proacrosina y α -acrosina en espermatozoides frescos no fueron diferentes entre las distintas horas de capacitación espermática (figura 3). Sin embargo, los valores de densidad óptica de β -acrosina a partir de las 2 h de capacitación fueron diferentes con respecto a las horas iniciales de incubación ($p < 0,05$), observándose la mayor reactividad de la enzima a las 3 h de incubación para capacitación (figura 3).

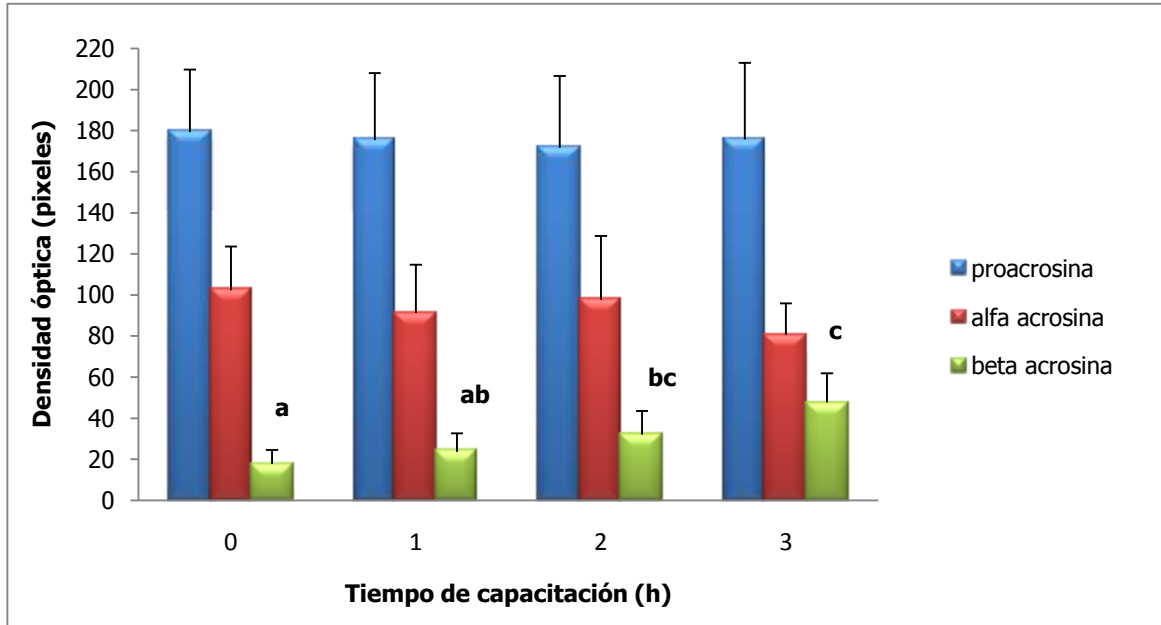


Figura 3. Densidad óptica (píxeles) promedio de proacrosina y acrosina (α y β) en espermatozoides frescos sometidos a diferentes tiempos de capacitación *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Las bandas indican el promedio de 3 réplicas experimentales +/- la desviación estándar.

En espermatozoides refrigerados, los valores de densidad óptica de proacrosina no variaron durante la incubación para capacitación *in vitro* (figura 4). Del mismo modo, la reactividad presentada por las formas activas de acrosina (α y β) con el anticuerpo utilizado, no presentó diferencias significativas entre las diferentes horas de capacitación espermática (figura 4).

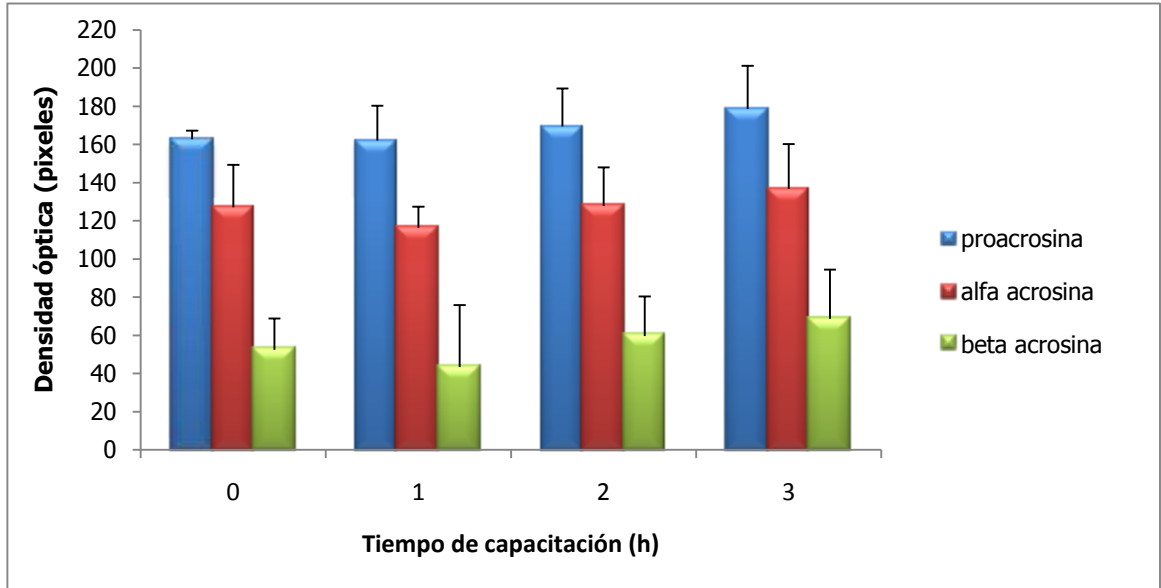


Figura 4. Densidad óptica (píxeles) promedio de proacrosina y acrosina (α y β) en espermatozoides refrigerados sometidos a diferentes tiempos de capacitación *in vitro* ($p > 0,05$). Las bandas indican el promedio de 4 réplicas experimentales \pm la desviación estándar.

Cuando se compararon los espermatozoides frescos versus refrigerados, en relación a los valores de densidad óptica de proacrosina durante cada tiempo de capacitación espermática, tampoco se encontraron diferencias ($p > 0,05$) entre ambos tratamientos (figura 5).

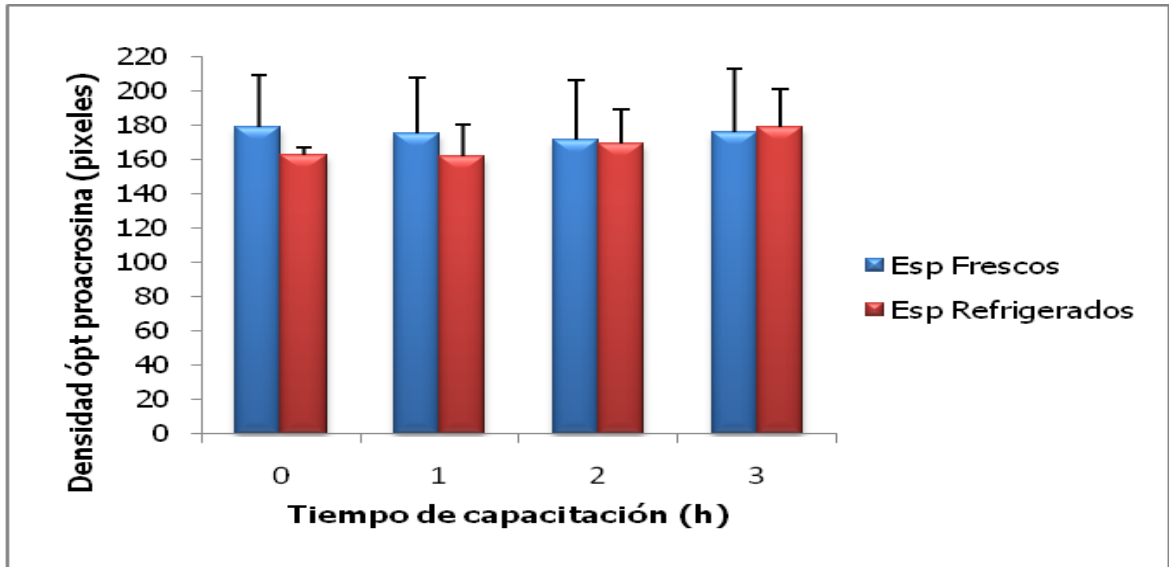


Figura 5. Densidad óptica (pixeles) de proacrosina en los diferentes tiempos de capacitación espermática en espermatozoides caninos frescos y refrigerados ($p > 0,05$).

Al analizar los resultados obtenidos a partir de la enzima activa con sus dos subunidades, se obtuvieron valores mayores ($p < 0,05$) de densidad óptica de α -acrosina (figura 6) en espermatozoides refrigerados respecto a los frescos, a las 3 horas de incubación. En relación a β -acrosina, se pudo observar una mayor detección de esta molécula al inicio del período de capacitación, en espermatozoides sometidos a refrigeración en comparación a los frescos (figura 7). A partir de la segunda hora de incubación para capacitación *in vitro*, no se observaron diferencias significativas en la detección de β -acrosina entre estos tipos de espermatozoides (figura 7).

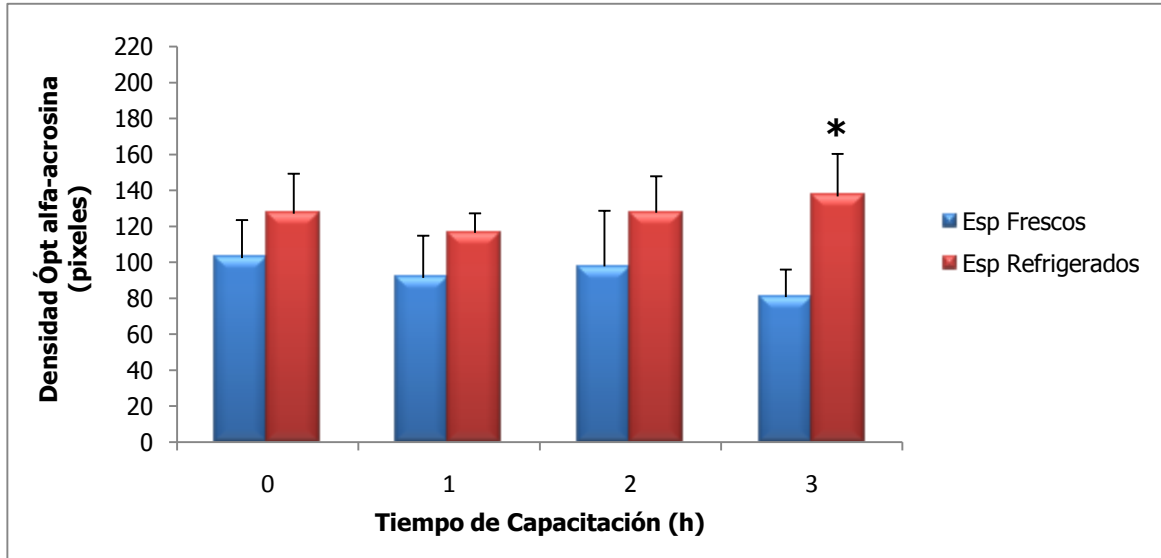


Figura 6. Densidad óptica (píxeles) de alfa acrosina en los diferentes tiempos de capacitación espermática en espermatozoides caninos frescos y refrigerados ($p > 0,05$). (*) Indica diferencias significativas entre tratamientos, para cada tiempo de capacitación *in vitro* ($p < 0,05$).

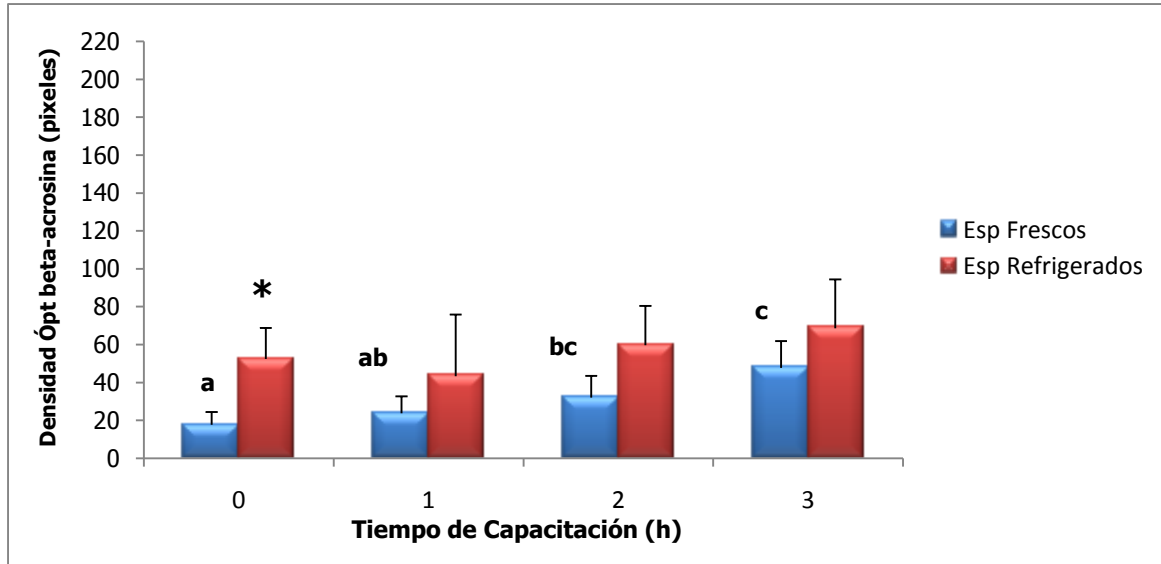


Figura 7. Densidad óptica (píxeles) de beta acrosina en los diferentes tiempos de capacitación espermática en espermatozoides caninos frescos y refrigerados. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). (*) Indica diferencias significativas entre tratamientos, para cada tiempo de capacitación *in vitro* ($p < 0,05$).

DISCUSION

Durante la RA, proacrosina se convierte por autoactivación en sus formas activas α y β -acrosina, lo cual le permite al espermatozoide mantenerse unido y penetrar la ZP (Barros *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 2002). En el presente estudio, utilizando el anticuerpo antiacrosina humana C5F10, que presenta reactividad cruzada con acrosina canina, de acuerdo a ensayos previos en el laboratorio, fue posible inmunolocalizar a través de Western Blot, proacrosina y ambas formas activas en espermatozoides caninos, tanto frescos como refrigerados, preincubados por diferentes tiempos en condiciones capacitantes *in vitro*.

En espermatozoides de varias especies de animales se ha logrado identificar el sistema proacrosina/acrosina, utilizando diversos métodos bioquímicos. La técnica de Western Blot es un método analítico basado en la detección de un antígeno específico (Roitt *et al.*, 1997), en este caso el sistema proacrosina/acrosina. De este modo, se combina la selectividad de la electroforesis en gel de poliacrilamida, que permite separar el antígeno, con la sensibilidad de la prueba inmunoenzimática, que pone en evidencia los complejos antígeno-anticuerpo formados, mediante el uso de anticuerpos (Garfín, 1990). En varios estudios, esta técnica ha permitido identificar específicamente proacrosina y acrosina (α y β) a través del uso de anticuerpos antiacrosina monoclonales y policlonales, en especies como conejos (Valdivia *et al.*, 1994), cerdos (Crosby, 1999), humanos (Mari *et al.*, 2003), caninos (Cortés *et al.*, 2006). Estudios realizados previamente en espermatozoides caninos no capacitados, utilizando Western Blot, han localizado las formas activas de acrosina (α y β) sólo en espermatozoides congelados/descongelados, sugiriendo que proacrosina se ha activado en α y β -acrosina debido a la congelación y descongelación a la que fueron sometidos los espermatozoides (Cortés *et al.*, 2006). Sin embargo, en espermatozoides refrigerados de perro, incubados en diferentes medios de capacitación espermática y utilizando anticuerpos monoclonales antiacrosina humana, se logró identificar tanto a proacrosina como a α y β -acrosina (Manosalva *et al.*, 2005), lo que concuerda con lo obtenido en el presente trabajo ya que durante los diferentes períodos de pre-incubación de los espermatozoides tanto frescos como refrigerados, se obtuvieron bandas de 40, 32 y 27 kDa, correspondientes a proacrosina, α y β -acrosina

respectivamente. En animales como conejos (Valdivia *et al.*, 1994), verracos (Moreno y Barros, 2000) y humanos (Moreno *et al.*, 1998), los pesos moleculares identificados de proacrosina y de las formas activas de acrosina difieren ligeramente de los pesos moleculares del sistema enzimático observado en perros, tanto en éste como en otros estudios realizados hasta la fecha. Estas diferencias estarían asociadas a los cambios que va experimentando el espermatozoide durante el proceso de espermatogénesis, siendo específico en cada especie (Nagdas *et al.*, 1992; Suter y Habenicht, 1998).

En espermatozoides frescos, tanto proacrosina como α -acrosina, no tuvieron cambios significativos durante el tiempo de capacitación espermática, sin embargo, la reactividad presentada por β -acrosina con el anticuerpo fue mayor a medida que transcurrían las horas de capacitación *in vitro*, siendo más notoria después de las 2 h, lo cual podría implicar una activación mayor a partir de esa hora de incubación. La reactividad de β -acrosina encontrada en los espermatozoides frescos, puede estar relacionada con el proceso de capacitación espermática en donde proacrosina y α -acrosina se han activado a β -acrosina, esto coincidiría con estudios realizados en espermatozoides caninos frescos, donde la actividad de acrosina, evaluada mediante espectrometría, aumenta con el tiempo de capacitación (Kawakami *et al.*, 1999). Similarmente, en otro estudio realizado por Gutiérrez, (2007) en donde se utilizó inmunofluorescencia indirecta, se evaluó la presencia de este sistema enzimático en espermatozoides caninos frescos y capacitados por periodos similares al presente trabajo, en donde se observó un aumento significativo de proacrosina/acrosina a través del tiempo, por lo que probablemente este sistema enzimático se habría liberado y activado.

En el presente trabajo, los espermatozoides refrigerados, no tuvieron variaciones significativas en la reactividad del anticuerpo con las diferentes formas de este sistema enzimático, a través de los diferentes tiempos de capacitación estudiados. Este hecho, indicaría por una parte, que el daño celular experimentado por los espermatozoides sometidos a refrigeración, es menor al que ocurre en los espermatozoides congelados, en los cuales se ha visto una disminución marcada de la reactividad del anticuerpo con la forma activa β -acrosina, a medida que aumenta el tiempo de capacitación espermática (Medina, 2009). Froman *et al.*, (1984) en un estudio realizado en espermatozoides

criopreservados de perro (refrigerados/congelados), demostró que la actividad de acrosina se redujo significativamente en los espermatozoides congelados en comparación con aquellos que fueron refrigerados, evidenciando de esta manera que el daño celular generado por la criopreservación sería diferente entre los espermatozoides refrigerados y los congelados. Además, se ha visto que 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, a través de los mismos tiempos de capacitación que los utilizados en este trabajo (Acevedo, 2008). Este menor daño estructural y funcional por parte de los espermatozoides refrigerados, se ha visto reflejado en un sostenido aumento del porcentaje de ovocitos penetrados hasta 5 horas de co-incubación gamética (De los Reyes *et al.*, 2009). Si bien estos porcentajes fueron menores a lo obtenido con los espermatozoides frescos, a partir de las 2 horas de co-incubación, fueron estadísticamente superiores a lo obtenido con espermatozoides congelados (De los Reyes *et al.*, 2009).

Las bandas de Western Blot analizadas en espermatozoides refrigerados mostraron que una de las formas activas de acrosina (β -acrosina), presentó una mayor reactividad con el anticuerpo al inicio del período de capacitación, en comparación con los espermatozoides en estado fresco. Este hecho, podría indicar una activación más temprana de acrosina en los espermatozoides refrigerados, producto de una acelerada también, reacción acrosómica. Sin embargo, en espermatozoides caninos, se ha sugerido que la refrigeración induciría cambios en la membrana del espermatozoide que afectarían la integridad del acrosoma sólo luego de 3 a 6 horas de capacitación *in vitro* (Manosalva *et al.*, 2005). Este resultado, sin embargo concordaría con la mayor densidad óptica de α -acrosina que se observó en este trabajo a las tres horas capacitación *in vitro*, en los espermatozoides refrigerados.

Acrosina es una proteasa acrosomal, sugiriéndose que tendría dos funciones durante la fecundación: participar en la unión secundaria a la ZP y facilitar enzimáticamente el paso del espermatozoide a través de ésta (Barros *et al.*, 1996; Crosby *et al.*, 1998; Gaboriau *et al.*, 2007). En estudios realizados en otros mamíferos, se ha sugerido que la pérdida de la acrosina se relacionaría con la pérdida de la capacidad del

espermatozoide de atravesar la ZP (Barros *et al.*, 1984; De los Reyes y Barros, 2000). En estudios en los cuales se ha evaluado a través de microscopía electrónica de barrido, el efecto de la criopreservación sobre la capacidad de espermatozoides caninos de fecundar ovocitos de perra, se ha descrito que los espermatozoides criopreservados presentan una mayor capacidad de penetrar la zona pelúcida de los ovocitos, al inicio de la co-incubación gamética, en comparación a los espermatozoides frescos (De los Reyes, *et al.*, 2009, Palomino y De los Reyes, 2009). A través de microscopía de epifluorescencia se ha determinado que espermatozoides caninos criopreservados (congelados/refrigerados) presentarían una mayor tasa de penetración espermática a la primera hora de co-incubación gamética, al compararlos con espermatozoides frescos. Sin embargo, se observó que éstas diferencias son más notorias entre espermatozoides congelados y frescos, que entre éstos últimos y los refrigerados (Palomino y De los Reyes, 2009; De los Reyes *et al.* 2009). Además, en estudios en los que se ha evaluado la actividad enzimática de proacrosina/acrosina a través de diferentes métodos, como la digestión de gelatina en placa y la hidrólisis de BAEE, se observó que en espermatozoides caninos criopreservados (congelados) incubados en diferentes tiempos de capacitación espermática, la mayor actividad enzimática se obtuvo al inicio de la capacitación *in vitro* en comparación con lo observado en espermatozoides frescos, lo que indicaría una activación más temprana de la enzima en los espermatozoides criopreservados (Rodrigues, 2009).

En este trabajo, al analizar la reactividad del anticuerpo con las diferentes formas moleculares de la enzima en estudio en los espermatozoides refrigerados, durante las diferentes horas de capacitación espermática, se observa que tanto proacrosina, como sus formas activas α y β -acrosina, reaccionan con el anticuerpo antes de la incubación (tiempo 0), no presentando esta reactividad, una variación significativa durante las horas posteriores de incubación. Sin embargo, la forma activa β -acrosina, se detectó con mayor intensidad al inicio del período de capacitación, lo que podría explicar en parte la mayor tasa de penetración espermática observada en el estudio de interacción gamética publicado por De los Reyes *et al.*, (2009), al inicio del período de co-incubación gamética.

Se ha descrito que la criopreservación induciría cambios similares a los observados en espermatozoides durante el proceso de capacitación (Rota *et al.*, 1995; Ström Holst *et*

al., 1997; Watson, 2000; Nishizono *et al.*, 2004), lo que podría explicar la mayor reactividad del anticuerpo con la forma activa del sistema proacrosina/acrosina, en espermatozoides refrigerados, al inicio de la capacitación, debido probablemente a una liberación y activación prematura de este sistema enzimático. Estudios realizados en espermatozoides caninos utilizando microscopia electrónica de barrido (Palomino, 2006) y microscopia de transmisión (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1993; Nizański y Kuroпка, 2005) concluyen que los procedimientos involucrados en la criopreservación de semen canino provocan alteraciones morfológicas y funcionales en los espermatozoides. Una de las alteraciones más estudiadas producidas por la criopreservación sobre el espermatozoide, es la desestabilización sobre las membranas plasmática y acrosomal principalmente, generando un mayor influjo de calcio a la célula, asociado a la CE y la RA (Barros, 1974), lo que posibilitaría la liberación de proacrosina/acrosina, ya que estudios realizados previamente, han determinado que la activación y actividad hidrolítica de proacrosina/acrosina, se ven influenciadas por los niveles de calcio intracelular, en una manera dosis dependiente (Nagdas, 1992).

En conclusión, estos resultados sugieren que la refrigeración induciría alteraciones en los espermatozoides, que se ven reflejados en una activación prematura de proacrosina, en la que se puede detectar una mayor reactividad de β -acrosina, en comparación a los espermatozoides frescos.

CONCLUSIONES

- Mediante Western Blot es posible detectar proacrosina y las formas activas α y β -acrosina, en espermatozoides caninos frescos y refrigerados durante diferentes tiempos de capacitación espermática.
- La forma activa β -acrosina, se detecta en mayor intensidad al término del período de capacitación en los espermatozoides frescos. Esto indica que durante el transcurso de la capacitación espermática se activó el sistema proacrosina/acrosina.
- El proceso de refrigeración, alteraría la activación del sistema proacrosina/acrosina, detectándose una mayor reactividad de β -acrosina al inicio del periodo de capacitación *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- ACEVEDO, K. 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. 56p.
- ADHAM, I.M; KLEMM, U; MAIER, W.M.; ENGEL, W. 1990. Molecular cloning of human proacrosin cDNA. Human genetics 84: 125-128.
- 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. 50p.
- AURICH, C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. Animal Reproduction Science 89: 65-75.
- AUSTIN, C.R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Australian Journal of Scientific Research 4: 581-596.
- AUSTIN, C.R. 1952. The "Capacitation" of the mammalian sperm. Nature 170: 326.
- BABA, T.; WATANABE, K.; KASHIWABARA, S.; ARAI, Y. 1989a. Primary structure of human proacrosina deduced from cDNA sequence. FEBS letters 27: 296-300.
- BABA, T.; KASHIWABARA, S.; WATANABE, K.; ITOH, H.; MICHIKAWA, Y.; KIMURA, K.; TAKADA, M.; FUKAMIZU, A.; ARAI, Y. 1989b. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. Journal of Biological Chemistry 264: 11920–11927.

- BARROS, C. 1974. Capacitation of mammalian spermatozoa. En :Coutinho E.M., Fuchs F., (Ed). Physiology and Genetics of Reproduction, Vol.2, Chapter 27. New York. Plenum Press. Pp. 3-24.

- BARROS, C.; JEDLICKI, A.; BIZE, I.; AGUIRRE, E. 1984. Relationship between the lengths of sperm preincubation in the golden hamster: A scanning electron microscope study. Gamete Research 9: 31-43.

- BARROS, C.; CAPOTE, C.; PEREZ, C.; CROSBY, J.A.; BECKER, M.I.; DE-IOANNES, A. 1992. Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. Biological Research 25: 31-40.

- BARROS, C.; CROSBY, J.A; MORENO, R.D. 1996. Early steps of sperm-egg interaction during mammalian fertilization. Cell Biology International 20: 33-39.

- BATTELIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G., ARNAUD, G.; YVON, J.; MAGISTRINI, M. 2001. Advances in cooled semen technology. Animal Reproduction Science 68: 181-190.

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

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

- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

- BREWIS, I.A., MOORE, H.D.M. 1997. Molecular mechanisms of gamete recognition and fusion at fertilization. *Human Reproduction (Supplement)* 12: 156-165.
- BUFFONE, M.; FOSTER, J.; GERTON, G. 2008. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *The International Journal of Developmental Biology* 52: 511-522.
- CHANG, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the Fallopian tubes. *Nature* 168: 997-998.
- 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: 844-854.
- CORTES, C.; CODELIA, V.; MANOSALVA, I.; DE LANGE, J.; MORENO, R.; DE LOS REYES, M. 2006. Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 93: 165-175.
- CROSBY, J.; JONES, R.; BARROS, C.; CARVALLO, P. 1998. Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development* 49: 426-434.
- CROSBY, J. 1999. Caracterización molecular de β -acrosina de cerdo, estudio de su participación en la unión secundaria a la zona pelúcida. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, Santiago, Chile, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. 142p.
- DE LOS REYES, M. 2000. Inseminación artificial en perros. En: Tópicos en Reproducción de Pequeños Animales. De los Reyes, M., Sánchez, A. (Ed). Ediciones Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 1ª Edición. Santiago, Chile. Pp: 94-106.

- DE LOS REYES, M. 2004. Congelación de semen canino. En: Gobello, C. (Ed). "Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latinoamericanos". Editorial Gráfica Latina. Buenos Aires. Argentina. Pp. 15-24.

- 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.

- DE LOS REYES, M.; DE LANGE, J.; ANGUIA, C.; PALOMINO, J.; BARROS, C. 2009. *In vitro* sperm penetration through the zona pellucida of immature and in vitro mature canine oocytes using fresh, chilled and frozen dog semen. *Animal Reproduction Science* 110: 37-45.

- DUNBAR, B.S.; PRASAD, S.V.; TIMMONS, T.M. 1991. Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae. En: Dunbar, B.S.; O'Rand, M.G. (Ed.). *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. New York. Plenum press. Pp: 97-114.

- 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.

- ENGLAND, G.C.W. 1993. Criopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility. (Supplements)*. 47:243-255.

- ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. 1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 46: 165-171.

- FARSTAD, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175-186.

- 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.

- FOULKES, J.A. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 49: 277-284.

- 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.

- 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.

- 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.

- GARFIN, D.E. 1990. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 182: 425-441.

- GREEN, C., WATSON, P. 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122: 889-898.

- GUTIERREZ, M. 2007. Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides frescos de perro sometidos a capacitación *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. 49p.

- HARDY, D.M.; ODA, M.N.; FRIEND, D.S.; HUANG, T.T.F. 1991. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochemical Journal* 275: 759-766.

- HARRISON, R. A. P. ; FLÉCHON, J. E. 1980. Immunocytochemical detection of acrosomal damage following cold shock: loss of acrosin from the acrosomal region of ram, bull and boar spermatozoa. *Reproduction Nutrition Development*. 20: 1802-1810.

- HARROP, A.E. 1956. A review of canine artificial insemination. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 12 : 564-567.

- HEDRICK, J.L; URCH, U.A; HARDY, H.D. 1988. The structure-function properties of the sperm enzyme acrosin. En: *Enzymes in Agricultural Biotechnology*. Schoemaker, Sonnet & Whitaker editors. Washington DC. ACS books. Pp. 55-73.

- HERMANS, J.M.; HAINES, D.S.; JAMES, P.S.; JONES, R. 2003. Kinetics of inhibition of sperm beta-acrosin activity by suramin. *FEBS Letters* 544: 119–122.

- HERMANSSON, U.; LINDE FORSBERG, C. 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology* 65: 584-593.

- HONDA, A.; SIRUNTAWINETI, J., BABA T. 2002. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Human Reproduction Update* 8: 405-412.

- HOWES, L.; JONES, R. 2002. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* 53: 181–192.

- 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.

- JONES, R. 1991. Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin the putative egg-binding proteins from mammalian spermatozoa. *Development* 111: 1155-1163.

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

- KAWAKAMI, E.; ARAI, T.; OISHI, I. 1999. Changes in hyaluronidase, acrosin, N-acetylhexosaminidase of dog sperm after incubation. *Journal of Veterinary Medical Science* 61: 183-184.

- 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.

- KOPECNY, V.; FLECHON, J.E. 1987. Ultrastructural localization of labeled acrosomal glycoproteins during *in vitro* fertilization in the rabbit. *Gamete Research* 17: 35-42.

- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- 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.

- 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](http://www.ivis.org) [en línea] <www.ivis.org> [consulta: 2-11-06]

- 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.

- 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.

- MARI, S.; RAWE, V.; BIANCOTTI, J.; CHARREAU, E.; DAIN, L., VAZQUEZ, M. 2003. Biochemical and molecular studies of the proacrosin/acrosin system in patients with unexplained infertility. *Fertility and Sterility* 19: 1676-1678.

- 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.

- MAXWELL, W., JOHNSON, L. 1997. Chlortetraciline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development* 46: 408-418.

- MEDINA, M. 2009. Evaluación de procrosina/acrosina mediante Western Blot en espermatozoides congelados de perro durante la capacitación *in vitro*. Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. 42p.

- MILLER, D.; A.X, R. 1990. Carbohydrates and fertilization in animals. *Molecular Reproduction and Development* 26: 184-198.

- 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. *Biology of Reproduction* 62: 1536-1542.

- MORENO, R. D.; SEPÚLVEDA, M. S.; DE IOANNES, A.; BARROS, C. 1998. The polysulphate binding domain of human proacrosin/acrosin is involved in both the enzyme activation and spermatozoa-zona pellucida interaction. *Zygote* 6: 75-83.

- MORENO, R.D.; HOSHI, M.; BARROS, C. 1999. Functional interactions between sulphated polysaccharides and proacrosin: implications in sperm binding and digestion of zona pellucida. *Zygote* 7: 105-111.

- MORENO, R. D.; BUSTAMANTE, E.; SCHATTEN, G.; BARROS C. 2002. Inhibition of mouse in vitro fertilization by an antibody against a unique 18-aminoacid domain in the polysulfate binding domain of proacrosin/acrosin. *Fertility and Sterility* 77: 812-817.

- MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dog. *Journal of Reproduction and Fertility* 39 (Supplement): 311-316.

- NADGAS, S.K. 1992. Bovine epididymal sperm proacrosin-acrosin system: quantification and partial characterisation. *Andrologia* 24: 171-178.

- NADGAS, S.K.; SKUDLAREK, M.D.; ORGEBIN-CRIST, M.C.; TULSIANI, R.P. 1992. Biochemical alterations in the proacrosin/acrosin system during epididimal maturation of the rat spermatozoa. *Journal of Andrology* 13: 36-43.

- 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. *Biology of Reproduction* 71: 973–978.

- NIŻAŃSKI, W.; KUROPKA, P. 2005. Ultrastructural changes in dog spermatozoa after freezing-thawing of semen extended in Tris-based diluent supplement with Equex STM. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 8, numero 54.

- O'RAND, M.G.; WELCH, J.E.; FISHER, S.J. 1986. Sperm membrane and zona pellucida induction during fertilization. En: Dhindsa, D.S.; Bahl, O.P. (Ed). Molecular and Cellular Aspects of Reproduction. New York. Plenum Press. Pp. 131-144.

- PALOMINO, J. 2006. Evaluación de la fecundación en caninos con espermatozoides frescos y criopreservados en ovocitos de perra madurados *In Vitro*. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 82p.

- PALOMINO, J.; DE LOS REYES, M. 2009. A scanning electron microscopy study of frozen/thawed dog sperm during in vitro gamete interaction. *Reproduction in Domestic Animals* 44:278-283.

- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.

- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, M.A.; WINER, A.; FIRST, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 38: 1171-1180.

- PETRUNKINA, A.; GRÖPER, B.; GÜNZEL, A.; TÖPFER-PETERSEN, E. 2004. Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen. *Reproduction* 128: 829-842.

- PINTO, C.R.F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E. 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52: 609-616.

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

- 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. *Theriogenology* 62: 1498- 1517.

- PROVINCE, C.A.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.K.; SQUIRES, E.L. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 22: 409-415.

- PURDY, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63:215-225.

- QUINN, P.J.; CHOW, P.J.W.; WHITE, I.G. 1980. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility* 60: 403-407.

- RICHARDSON, R. T.; NIKOLAJCZYK, B. S.; ABDULLAH, L. H.; BEAVERS, J. C.; O'RAND, M. G. 1991. Localization of rabbit sperm acrosin during the acrosome reaction induced by immobilized zona matrix. *Biology of Reproduction* 45: 20-26.

- RIGAU, T.; FARRÉ, M.; BALLESTER, J.; MOGAS, T.; PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology* 56: 801-815.

- RODRIGUES, P. 2009. Evaluación de la actividad enzimática de acrosina durante la capacitación en espermatozoides congelados de perro. Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. 47p.

- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*. 68: 138–146.

- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKWALL, H.; LINDE-FORSBERG, C. 1993. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility supplement* 47: 279-285.

- ROITT A; BROSTOFF J.; MALE, D. 1997. Inmunología. 4ta. Edición. Editorial Harcourt-Brace. Madrid-España.

- ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44: 885-900.

- ROTA, A.; PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science* 57: 199-215.

- SANCHEZ, A.; RUBILAR, J. 2001. Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. Primera descripción en Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 33:105-110.

- SILLERICO, T.; VALDIVIA, M.; DE IOANNES, A.; BARROS, C. 1996. Proacrosin and acrosin determination during capacitation and acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Biocell* 20: 133-142.

- SIRIVAIIDYAPONG, S.; CHENG, F.P; MARKS, A.; VOORHOUT, W.F.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine. *Theriogenology* 53: 789-802.

- SCHLEUNING, W.D.; HELL, R.; FRITZ, H. 1976. Multiple forms of human acrosin: isolation and properties. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 357: 855–865.

- STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. 1997. *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48:247-256.

- STRÖM-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 element. *Reproduction in Domestic Animals* 33: 77-82.

- STRÖM-HOLST, B.; LARSON, B.; FOSBERG, L.; RODRIGUEZ, H. 2000. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 119: 77-83.

- SUTER, L.; HABENICHT, U.F. 1998. Characterization of mouse epididymal acrosin: comparative studies with acrosin from boar and human ejaculated spermatozoa. *International Journal of Andrology* 21: 95-104.

- TESARIK, J.; DRAHORAD, J.; PEKNICOVA, J. 1988. Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona penetration. *Fertility and Sterility* 50:133-141.

- TÖPFER-PETERSEN, E.; CECHOVA, D. 1990. Zona pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin. *International Journal of Andrology* 13: 190–196.

- TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A.; EKHLASI-HUNDRIESER, M. 2000. Oocyte-sperm interactions. *Animal Reproduction Science* 60-61:653-662.

- TÖPFER-PETERSEN, E.; FRIESS, A. E.; HENSCHEN, A.; CECHOVA, D.; STEINBERGER, M. 1990. Sperm acrosin and binding to the zona pellucida. *Gamete Interaction* 15: 197-212.

- TOWBIN, H.; STAHELIN T.; GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Acadademy of Science U.S.A* 76: 4350-4359.

- TSUTSUI, T.; TEZUKA, T.; MIKASA, Y.; SUGISAWA, H.; KIRIHARA, N.; HORI, T.; KAWAKAMI, E. 2003. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. *Journal of Veterinary Medical Science* 65: 307-312.
- TRANTER, R.; READ, J.A.; JONES, R.; BRADY, L. 2000. Sites in the three-dimensional structure of mammalian sperm β -acrosin. *Structure* 8: 1179–1188.
- URCH, U.A. 1991. Biochemistry and function of acrosin. En: Wassarman, P.M. (Ed.). *The Biology of Mammalian Fertilization*. CRL Press. Chicago. Pp. 233-248.
- URCH, U.A.; PATEL, H. 1991. The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida and with polysulfated polysaccharides. *Development* 11: 1165-1172.
- URCH, U.A.; WARDRIP, N.J.; HERDRICK, J.L. 1985a. Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: the nature of the hydrolysis product. *The Journal of Experimental Zoology* 233: 239-243.
- URCH, U.A.; WARDRIP, N.J.; HERDRICK, J.L. 1985b. Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *The Journal of Experimental Zoology* 233: 479-483.
- VALDIVIA, M.; R.; MELENDEZ, J.; DE IOANNES, A. E.; LEYTON, L.; BECKER, M. I.; BARROS, C. 1994. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in rabbit sperm during acrosome reaction in spermatozoa recovered from perivitelline space. *Molecular Reproduction and Development* 37: 216-222.
- VALDIVIA, M.; SILLERICO, T.; DE IOANNES, A.; BARROS, C. 1999. Proteolytic activity of rabbit perivitelline spermatozoa. *Zygote* 7: 143-149.
- 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: 720-733.

- VISCONTI, P.E.; STEWART-SAVAGE, J.; BLASCO, A.; BATTAGLIA, L.; MIRANDA, P.; KOPF, G.S.; TEZÓN, J.G. 1999. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biology of Reproduction* 61: 76-84.

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

- WATSON, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61: 481-492.

- 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.

- 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.

- 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.

- YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. 1993. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility (Suppl)* 47: 227-229.

- YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian fertilization. En: Knobil, E; Neil, J.D. (Eds). *The Physiology of Reproduction*. 2ª Edición. Raven Press. Nueva York. Pp. 189-317.

- ZAHN, A.; FURLON, L.I.; BIANCONTTI, J.C. ; GHIRINGHELLI, P., MARIN-BRIGGILER, I. ; VAZQUEZ-LEVIN, M.H. 2002. Evaluation of the proacrosin/acrosin sistem and its mechanism of activation in human sperm extract. *Journal of Reproductive Immunology* 54: 43-63.