



UNIVERSIDAD DE CHILE

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



**PRESENCIA DE ACROSINA EN
ESPERMATOZOIDES CANINOS REFRIGERADOS
SOMETIDOS A DIFERENTES CONDICIONES DE
CAPACITACIÓN *IN VITRO***

GISELA ANDREA BECKER BUGMANN

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

PROFESORA GUÍA: MÓNICA DE LOS REYES S.

Financiamiento: Proyectos ENL 05/8 DID; FONDECYT 1060602

**SANTIAGO, CHILE
2007**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



PRESENCIA DE ACROSINA EN ESPERMATOZOIDES CANINOS REFRIGERADOS SOMETIDOS A DIFERENTES CONDICIONES DE CAPACITACIÓN *IN VITRO*

GISELA ANDREA BECKER BUGMANN

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : MÓNICA DE LOS REYES S.
PROFESOR CONSEJERO : ALEJANDRO LÓPEZ V.
PROFESOR CONSEJERO : VÍCTOR PARRAGUEZ G.

SANTIAGO, CHILE
2007

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

*Dedicada a mi familia, sobretodo a mi madre,
por su incansable apoyo
durante toda la carrera.*

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quisiera agradecer a mi padre por incentivarme a que viniera a Santiago a estudiar y conocer nuevas opciones de vida, que me enriquecieron de experiencias. Además, por su inagotable fuerza para salir adelante, ejemplo importante para mi vida futura.

A mi madre, sin su apoyo y cariño durante toda la carrera, este momento no estaría sucediendo. A mis hermanos, que aunque distantes, siempre han estado conmigo.

A mi gran amiga Antonella, sin su constante apoyo y divertidas conversaciones el periodo universitario no hubiese sido tan agradable.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, por los buenos momentos que vivimos juntas durante la realización de esta tesis.

A la Doctora Mónica De los Reyes, por su paciencia y estímulo para la realización de esta tesis.

Al Dr. Martínez y Dra. Valeria, por su colaboración en la realización de esta memoria.

Al Dr. Barros y Dr. Moreno, por facilitar el trabajo desarrollado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

A Jaime Palomino, por su inagotable paciencia y ayuda en la realización de esta tesis.

Por último quisiera agradecer a todos los que influyeron de una u otra forma para que lograra terminar mi carrera.

ÍNDICE

I RESUMEN	1
II ABSTRACT	3
III INTRODUCCIÓN	5
IV REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1.1. Refrigeración de espermatozoides	7
1.2. Diluyentes en la refrigeración del semen	9
2. Daños producidos por el frío	11
3. Capacitación espermática	13
3.2. Capacitación <i>in vivo</i>	15
3.3. Capacitación <i>in vitro</i>	16
4. Acrosina	19
V HIPÓTESIS	22
VI OBJETIVOS	22
1. Objetivo General	22
2. Objetivos Específicos	22
VII MATERIALES Y MÉTODOS	23
a) Obtención de espermatozoides	23
b) Des-refrigeración de los espermatozoides	24
c) Determinación de acrosina mediante inmunofluorescencia indirecta... ..	24

d) Análisis estadístico	25
VIII RESULTADOS	27
Inmunomarcaje	27
Motilidad espermática	30
IX DISCUSIÓN.....	31
X CONCLUSIONES	39
XI BIBLIOGRAFÍA	40

RESUMEN

El estudio de las biotecnologías reproductivas ha conducido a generar nueva y mejor información sobre la reproducción en mamíferos. Sin embargo, en caninos estos estudios se han desarrollado de manera más lenta que en otras especies. Es así como las técnicas de criopreservación de espermatozoides de perro representan aún un tópico que necesita ser más estudiado con el fin de lograr mejores índices de preñez. El objetivo del presente trabajo fue inmunolocalizar la enzima acrosina en espermatozoides caninos refrigerados/entibiados y capacitados *in vitro*, con el fin de determinar el efecto del tiempo y temperatura de incubación sobre la cinética de liberación de la acrosina durante la Reacción del Acrosoma (RA).

Se recolectó un total de 7 eyaculados de 3 perros mediante manipulación digital. En cada muestra se evaluó la concentración y motilidad progresiva (MP). Los espermatozoides de cada eyaculado se refrigeraron con un diluyente en base a TRIS, fructosa, ácido cítrico y yema de huevo (20%). Luego de 24 horas en refrigeración (4° C), cada muestra libre del diluyente y resuspendida en medio de capacitación canino (CCM) fue dividida en 7 alícuotas, las que fueron incubadas separadamente por 0, 1, 2 y 3 horas a 20° y 37° C. Cada muestra en las diferentes condiciones de incubación de tiempo y temperatura fue procesada para inmunofluorescencia indirecta, empleando un anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10 y luego un anticuerpo secundario "antimouse" fluorescente. Mediante un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot2), se evaluó la ausencia (no marcados) o presencia (marcados) de marca fluorescente a nivel acrosomal, indicativo de la liberación de acrosina o la permanencia de ésta dentro del acrosoma, respectivamente.

Los porcentajes de no marcados (sin marca fluorescente) obtenidos fueron aumentando significativamente a través del tiempo de incubación desde 45,14% a la hora 0 a 81,21% a las 3 h de incubación a 20° C ($P < 0,05$). Los

espermatozoides incubados a 37° C presentaron un aumento significativo del patrón no marcado; desde 45,14% a la hora 0 a 78, 86% a las 3 horas de incubación, presentando la mayor pérdida a la segunda hora de incubación.

La MP fue evaluada subjetivamente, mediante microscopía de contraste de fases, para determinar la viabilidad espermática. Se obtuvo que a medida que transcurrió el tiempo de capacitación la MP fue disminuyendo de 78,57% a la hora 0 a 55% en la tercera hora a 20° C ($P < 0,05$). La MP a 37° C no experimentó una variación significativa en el tiempo.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que en espermatozoides caninos refrigerados/entibados y capacitados *in vitro*, la liberación de acrosina es dependiente del tiempo, y que esta liberación se produce de manera más acelerada al aumentar la temperatura a 37° C. La motilidad, sin embargo, se vio afectada sólo por el tiempo de capacitación, sin mostrar efecto significativo la temperatura de incubación.

ABSTRACT

The study of reproductive biotechnologies has led to improve the knowledge on mammalian reproduction. However, these studies have been less developed in dogs than in other species. The cryopreservation techniques in canine spermatozoa represent still an issue that needs to be acutely studied to achieve better pregnancy rates. The aim of the present work was to immunolocalize the enzyme acrosin in chilled/rewarmed canine spermatozoa and capacitated *in vitro*, in order to determine the effect of time and temperature of incubation on the kinetics of the release of the acrosin during the Acrosome Reaction (AR).

Seven ejaculates were collected from 3 dogs by digital manipulation. The concentration and progressive motility (PM) were assessed in the seven samples. The spermatozoa of each ejaculate were diluted in a TRIS-fructose-citric acid and egg-yolk (20%) extender and cooled at 4° C. After 24 hours at 4° C, each sample was centrifuged and the pellet resuspended in canine capacitation medium (CCM) and then alicuoted into seven tubes which were incubated separately for 0, 1, 2 and 3 hours at 20° and 37° C. At each time and temperature the samples were processed for immunofluorescence stain using human antiacrosin monoclonal antibody C5F10 and antimouse fluorescent as a second antibody. The samples were assessed by Epifluorescence Microscopy (Nikon Optihot 2), the absence of label (unlabeled) or the fluorescent label (labeled) on the acrosomal region indicated the release of acrosin from acrosome or the presence of the enzyme, respectively.

The percentages of unlabeled spermatozoa increased through the incubation time from 45.14% on hour 0 to 81.21% at the third hour of incubation at 20° C ($P < 0.05$). Spermatozoa incubated at 37° C showed a significant increase of unlabeled pattern; 45.14% on hour 0 to 78.86% after 3 hours of culture, displaying the highest loss of acrosin at the second hour of incubation.

The progressive motility (PM) was evaluated subjectively by Phase Contrast Microscopy in order to determine sperm viability. The PM decreased from 78.57% at the beginning of culture (time 0) to 55% (3 H), when the culture was performed at 20° C ($P < 0,05$). At 37° C there was no significant difference on motility though the time.

It can be conclude that the release of acrosin on *in vitro* capacited chilled/rewarmed canine spermatozoa is a time-depending process. The acrosin release occurs earlier at 37° C than 20°C. The sperm motility was affected significantly by the time of culture, but it was not influenced by culture temperature.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación implica la mantención de la viabilidad de ciertas células, como los espermatozoides, por períodos largos (congelación) o cortos (refrigeración), permitiendo su utilización por más tiempo, a diferencia del semen fresco. El semen refrigerado tiene una mayor viabilidad posterior a su preservación que el semen congelado (Bouchard *et al.*, 1990; Pinto *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999), lo que posibilita obtener mejores porcentajes de preñez (Linde-Forsberg, 1995; Rota *et al.*, 1995; England y Ponzio, 1996; Pinto *et al.*, 1999; Iguer-ouada y Verstegen, 2001), utilizando incluso técnicas de inseminación artificial de baja complejidad como la inseminación intravaginal (Linde-Forsberg, 1995). Sin embargo, esta técnica de criopreservación produce un detrimento en diversas características espermáticas relacionadas con la capacidad fecundante de los espermatozoides (Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000; Manosalva *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006); lo que hace necesario el estudio de estos efectos negativos que puedan afectar directamente los procesos en relación a la interacción gamética y fecundación, como es la capacitación espermática.

En caninos, el estudio de la capacitación espermática es importante para profundizar el conocimiento de la fecundación, en orden a poder implementar biotecnologías reproductivas que aumente su eficiencia, como por otro lado, poder evitarla en el caso de algunas poblaciones (Hewitt y England, 1998; Farstad, 2000; Bavister, 2002).

La capacitación se desarrolla *in vivo* en el tracto reproductivo de la hembra (Yanagimachi, 1994), donde los espermatozoides adquieren las propiedades necesarias para fecundar el ovocito (Austin, 1951). Durante la capacitación, el espermatozoide se hiperactiva, lo que se caracteriza por un movimiento del flagelo más vigoroso y rápido, que finalmente culmina en las cercanías de las cubiertas ovocitarias con la Reacción Acrosómica (RA) (Yanagimachi, 1994; Barros *et al.*,

1996). Durante la RA se produce la exposición de la matriz acrosomal con la liberación de enzimas, como la acrosina (Froman *et al.*, 1984; Kawakami *et al.*, 1999; De los Reyes y Barros, 2000; Cortés *et al.*, 2006). Esta última, es una serin-proteasa que participa en la unión y penetración de la zona pelúcida (ZP) (Sillerico *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Toshimori, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2006). Se ha visto que su liberación prematura desde el acrosoma provocaría una pérdida en la capacidad de los espermatozoides de cruzar la ZP (Barros *et al.*, 1992; Barros *et al.*, 1993; De los Reyes y Barros, 2000). Esta enzima es la que se encuentra en mayor proporción en el acrosoma del espermatozoide de mamíferos en forma de zimógeno proacrosina, activándose durante la RA (Moreno *et al.*, 2002). En caninos, a pesar de haberse estudiado su actividad en dos estudios previos (Froman *et al.*, 1984; Kawakami *et al.*, 1999), su presencia sólo se ha demostrado recientemente (Cortés *et al.*, 2006; Aretio, 2006), detectándose en los espermatozoides de perro congelados/descongelados sin capacitación, un incremento en la forma activa, a diferencia de los espermatozoides frescos (Cortés *et al.*, 2006). El efecto de la refrigeración en relación a la liberación de la acrosina no ha sido determinada en los caninos, como tampoco durante la capacitación espermática, por lo que su estudio ayudaría a complementar el conocimiento de la capacitación *in vitro*, tendiente a la fecundación en esta especie.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Refrigeración de espermatozoides

La refrigeración es una técnica que permite mantener vivos a los espermatozoides por varios días, debido a la reducción de su metabolismo celular (Bouchard *et al.*, 1990; Linde-Forsberg, 1995; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Ponglowhapan *et al.*, 2004), lo que se basa en la disminución del consumo de energía y el bajo índice de utilización de oxígeno (Bouchard *et al.*, 1990). La primera inseminación artificial exitosa con semen canino refrigerado fue reportada por Harrop en 1954, quien usó semen diluido en leche, almacenado por 100 horas a 4° C (Pinto *et al.*, 1999). El proceso de refrigeración a diferencia de la congelación, provocaría un menor daño en las estructuras espermáticas (Oettlé, 1986; Bouchard *et al.*, 1990; Parks y Graham, 1992; England y Ponzio, 1996; Rota *et al.*, 1999; Ström Holst *et al.*, 2000; Iguer-ouada y Verstegen, 2001), lo que se traduce en mejores porcentajes de viabilidad pos refrigeración, más similares al semen fresco (Bouchard *et al.*, 1990; Pinto *et al.*, 1999; Iguer-ouada y Verstegen, 2001).

La refrigeración posee también ventajas adicionales entre las que se cuentan: protocolos de procesamiento del semen de baja complejidad, transporte del semen a distancias considerables, técnicas de inseminaciones artificiales más simples, como son aquéllas de tipo vaginal (Linde-Forsberg, 1995), logrando porcentajes de preñez superiores a los que se obtienen con el semen congelado (Pinto *et al.*, 1999). Un estudio reciente realizado por Hermansson y Linde-Forsberg (2006), propuso la posibilidad de refrigerar semen previa al congelamiento, situación que potencia la utilización de esta técnica según la condición del ciclo estral de la perra que se desea inseminar.

No obstante las ventajas de esta técnica, también existen desventajas dadas por los cambios de temperatura sufridos por los espermatozoides durante el

procesamiento, generando alteraciones en la membrana plasmática (Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Iguer-ouada y Versteegen, 2001), la cual necesita permanecer intacta para mantener el microambiente iónico, el pH y la integridad celular (Bouchard *et al.*, 1990; Harrison y Vickers, 1990; England y Ponzio, 1996; Iguer-ouada y Versteegen, 2001). Durante el enfriamiento, las proteínas de superficie experimentarían cambios negativos (Parks y Graham, 1992), lo que alteraría su función de reconocimiento a ligandos de la ZP, afectando de esta manera la interacción ovocito-espermatozoide (Watson, 2000; De los Reyes, 2004), así como también la función de canales iónicos, lo que aumentaría la permeabilidad de la membrana (Parks y Graham, 1992; Rota *et al.*, 1995; Watson, 2000).

Otra consecuencia que tienen los cambios de temperatura, es alterar el transporte de iones, como por ejemplo el calcio, que en casos severos comprometería la viabilidad celular (Watson, 2000). Sin embargo, en el espermatozoide de perro no se ha observado este efecto (Brewis *et al.*, 2001), por lo que podría ser considerado relativamente más resistente al frío (Bouchard *et al.*, 1990; Rota *et al.*, 1999). Sumado a esto, está la evidencia que el espermatozoide canino, al igual que el de humanos, aves y conejos, poseen un bajo índice de fosfolípidos unidos a ácidos grasos saturados:poliinsaturados en la composición de su membrana plasmática, situación que le conferiría una mayor estabilidad de membrana y, por tanto, una mayor tolerancia al frío (Bouchard *et al.*, 1990).

Una de las alteraciones escasamente consideradas, pero de gran consecuencia que podrían causar los cambios de temperatura, es el daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) espermático, que podría provocar posteriormente una mayor mortalidad embrionaria (Watson, 2000), decreciendo el tamaño de camada en las especies multíparas.

Al permanecer los espermatozoides refrigerados viables por sólo determinado tiempo (England y Ponzio, 1996; Ponglowhapan *et al.*, 2004), se requiere su

utilización pocos días luego de su obtención y procesamiento, ya que a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento a 4° C, se reduciría la capacidad de los espermatozoides caninos para adherirse a la ZP (Ström Holst *et al.*, 2000; Ponglowhapan *et al.*, 2004), y probablemente luego de algún tiempo más prolongado de preservación en frío, la fertilidad del semen refrigerado no superaría a la del semen congelado, ya que se ha probado que luego de 4,9 días de almacenamiento, la fertilidad de este semen sería menor que la del congelado (England y Ponzio, 1996).

1.2. Diluyentes en la refrigeración del semen

En orden de reducir los daños generados por el enfriamiento, la refrigeración de los espermatozoides requiere de un medio adecuado que proporcione a los gametos la energía y la protección necesaria. La composición del diluyente influye sobre la viabilidad y fertilidad lograda (De los Reyes *et al.*, 2002; De los Reyes *et al.*, 2006). Si los espermatozoides son refrigerados en un diluyente adecuado, pueden sobrevivir por aproximadamente 3 semanas (Ponglowhapan *et al.*, 2004), aunque la fertilidad se mantendría sólo durante 4 a 5 días (England y Ponzio, 1996). Se ha demostrado en diversos trabajos que componentes tales como TRIS (trishidroximetilaminometano), azúcares (glucosa/fructosa u otros) y citrato de sodio, serían elementos importantes en los porcentajes de sobrevivencia de los espermatozoides de perro, lográndose motilidades aceptables luego de 4 días de refrigeración (England y Ponzio, 1996; Pinto *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999; Iguerouada y Verstegen, 2001). El mayor efecto de los azúcares en los espermatozoides es la mantención de la motilidad y los patrones de movimiento (Ponglowhapan *et al.*, 2004). De los azúcares empleados en los diluyentes, el más utilizado por los espermatozoides caninos refrigerados sería la glucosa (Ponglowhapan *et al.*, 2004). Sin embargo, en un estudio realizado con semen fresco se observó que la fructosa induce un patrón de motilidad más rápido y lineal que la glucosa, que produjo un movimiento más oscilatorio (Rigau *et al.*, 2001). Si

bien se ha observado que concentraciones bajas (1-10 mM) serían las más apropiadas para el semen fresco (Rigau *et al.*, 2001), otro estudio que utilizó semen canino refrigerado demostró que concentraciones relativamente altas de azúcar tendrían resultados más satisfactorios al evaluar la motilidad espermática, la membrana plasmática, la integridad acrosomal y el tiempo de sobrevivencia de los espermatozoides (Ponglowhapan *et al.*, 2004), como también la penetración a la ZP de ovocitos caninos (De los Reyes *et al.*, 2006).

Otro componente esencial en los diluyentes comúnmente utilizados que protege a los espermatozoides de los efectos nocivos del frío, son compuestos como la yema de huevo (Linde-Forsberg, 1995; Iguer-ouada y Verstegen, 2001), la leche descremada pasteurizada (Bouchard *et al.*, 1990; England y Ponzio, 1996; Pinto *et al.*, 1999), y la crema (Rota *et al.*, 1995).

Se describe que la fracción lipoproteica de baja densidad (fosfolípidos) de la yema de huevo evitaría la pérdida de fosfolípidos de la membrana espermática o bien modularía los efectos detrimentales de los cambios de temperatura (Parks y Graham, 1992). Esta protección se desarrollaría a través de las lipoproteínas de la yema de huevo que se unirían a la membrana celular del espermatozoide y favorecerían la preservación de la integridad celular durante el almacenamiento (Bouchard *et al.*, 1990), específicamente las lipoproteínas catiónicas, las que serían efectivas en la protección contra el shock frío (Rota *et al.*, 1995). Sumado a esto, se describe que la yema de huevo posee colesterol (Moreno y Barros, 1991), esterol de mayor presencia en la membrana plasmática del espermatozoide, que modula la fluidez y estabilidad de la bicapa lipídica, a través de interacciones esteéricas con los fosfolípidos de membrana (Parks y Graham, 1992).

La utilización de leche descremada como crioprotector comenzó en 1954, cuando Harrop logró la primera inseminación artificial con semen refrigerado (Tsutsui *et al.*, 2003). Posteriormente se han realizado otros trabajos, pero con bajos porcentajes de concepción (Tsutsui *et al.*, 2003). En un estudio realizado por

Bouchard *et al.* (1990) se utilizó un diluyente a base de leche descremada en polvo y demostró que es superior al diluyente de citrato-yema de huevo en porcentaje de motilidad general, motilidad progresiva y velocidad en los patrones de enfriamiento medio y rápido. No obstante, se debe tener en cuenta que el diluyente en base a yema de huevo utilizado en este estudio, presentaba una osmolaridad menor. Algunos autores concuerdan que el diluyente de elección es el Tris-yema de huevo más azúcares, que mantiene mejor la motilidad de los espermatozoides y la integridad del acrosoma, lo que se traduce en una mayor viabilidad celular durante el periodo de almacenamiento (Parks y Graham, 1992; Rota *et al.*, 1995; Iguer-ouada y Verstegen, 2001; De los Reyes *et al.*, 2002; De los Reyes *et al.*, 2006). Conjuntamente, se describe que este tipo de diluyente protege a los espermatozoides de la RA falsa, que ocurre en asociación con la muerte espermática o en daños irreversibles (Rota *et al.*, 1995; Iguer-ouada y Verstegen, 2001).

La osmolaridad del diluyente es de importancia debido a que estudios señalan que podrían ocurrir injurias durante una dilución excesiva de los espermatozoides en el medio de refrigeración (Oettlé, 1986; Linde-Forsberg, 1995; De Jong *et al.*, 2005). Se ha descrito que los espermatozoides caninos serían sensibles al estrés osmótico, pudiendo tolerar un rango moderado de osmolaridades sin una reducción de la fertilidad (Ponglowhapan *et al.*, 2004). Osmolaridades cercanas a 280-302 mOsmoles en los diluyentes no deberían producir efectos dañinos en los espermatozoides caninos refrigerados (Mahi y Yanagimachi, 1978, Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

Se ha reportado que la concentración espermática de 200 millones de espermatozoides/mL favorecería la preservación de la motilidad a 5° C (Bouchard *et al.*, 1990), así como la integridad de la membrana plasmática y, por tanto, la longevidad de los espermatozoides caninos que han sido refrigerados (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Por lo demás, esta concentración espermática es la que se

ha reportado adecuada en estudios de inseminación artificial en caninos (Pinto *et al.*, 1999; Stornelli *et al.*, 2001).

2. Daños producidos por el frío

Numerosos autores han descrito diversos efectos negativos que provoca la disminución de la temperatura en las estructuras y fisiología de los espermatozoides mamíferos (Harrison y Fléchon, 1980; Oettlé, 1986; Bouchard *et al.*, 1990; Harrison y Vickers, 1990; Moreno y Barros, 1991; Parks y Graham, 1992; Linde-Forsberg, 1995; Rota *et al.*, 1995; England y Ponzio, 1996; Fuller y Whittingham, 1997; Pinto *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Ström Holst *et al.*, 2000; Watson, 2000; Iguer-ouada y Verstegen, 2001; Stornelli *et al.*, 2001; Ponglowhapan *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2005). Estas alteraciones se concentrarían en su mayoría sobre la membrana plasmática y acrosomal externa (Oettlé, 1986; Ström Holst *et al.*, 2000; De los Reyes *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2006), siendo la primera de ellas la más afectada (Harrison y Vickers, 1990; Ponglowhapan *et al.*, 2004). Sin embargo, el estado acrosomal necesita ser conservado cuando los espermatozoides son manejados en protocolos en cultivos como la fecundación *in vitro*, debido a que si éstos experimentan la RA prematuramente, no podrían penetrar la ZP (Barros *et al.*, 1993; Sirivaidyapong *et al.*, 2000), lo que reduciría la capacidad fértil de los espermatozoides (Cortés *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que en los espermatozoides criopreservados, ya sea refrigerados o congelados, se generan cambios que podrían ser similares a la capacitación espermática (Fuller y Whittingham, 1997; Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000; Ponglowhapan *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006), efectos que se han atribuido en parte a la desestabilización que produce el frío en la membrana plasmática (Harrison y Vickers, 1990; Watson, 2000). Conjuntamente, a medida que la temperatura desciende, el movimiento de los fosfolípidos se

restringe y esto induciría incrementos en el calcio intracelular (Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Watson, 2000), que estimularían la RA espontánea (Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Watson, 2000). Además, el frío generaría una depolimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto, lo que permitiría una aproximación de las membranas plasmática y acrosomal externa, promoviendo así la fusión, fenestración y exocitosis acrosomal (Spungin *et al.*, 1995; Watson, 2000).

Con respecto a la motilidad espermática, Ponglowhapan *et al.* (2004), postulan que los cambios de temperatura generados por la refrigeración y entibiamiento posterior a que son sometidos los espermatozoides caninos, provocarían una disminución de ésta, debido a la sensibilidad térmica de la bomba ATPásica de sodio y potasio, sumado a la salida de iones (Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000; Ponglowhapan *et al.*, 2004), dada por el aumento en la permeabilidad de membrana (Parks y Graham, 1992; Rota *et al.*, 1995; Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000).

A pesar de que existen similitudes entre la capacitación fisiológica y la producida por el enfriamiento (Rota *et al.*, 1999), se ha descrito que la segunda podría ser una versión desorganizada de la primera (Watson, 2000), lo que probablemente afectaría la capacidad fecundante de los espermatozoides. Además, todavía no está claro si los espermatozoides realmente experimentan todos los cambios de la RA o proceden directamente a la exocitosis acrosomal (Watson, 2000). De cualquier manera, en los espermatozoides refrigerados de ratón se describe que se evitaría la necesidad de una capacitación previa antes de la incubación con los ovocitos, debido a que se lograrían índices de fecundación *in vitro* similares al semen fresco capacitado previamente (Fuller y Whittingham, 1997).

3. Capacitación espermática

Los espermatozoides mamíferos recién eyaculados no son aún aptos para fecundar los ovocitos, debido a que necesitan experimentar previamente una serie de cambios fisiológicos conocidos genéricamente como “capacitación espermática” (Austin, 1951; Chang, 1951). Este proceso involucra diversas alteraciones en la membrana plasmática, como la salida de colesterol, lo que aumenta la fluidez de ésta (Moreno y Barros, 1991; Parks y Graham, 1992; Yanagimachi, 1994; Sirivaydiapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Toshimori, 2000; Risopatrón *et al.*, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003). Se ha descrito que esta modificación provocaría una reducción en el índice colesterol:fosfolípidos de la membrana, lo que causaría una disminución de la microviscosidad, así como también la salida de fosfolípidos (Sirivaydiapong *et al.*, 2000; Risopatrón *et al.*, 2002), situación que aumentaría la permeabilidad de la membrana, permitiendo el ingreso de iones al citoplasma espermático (Rota *et al.*, 1999; Sirivaydiapong *et al.*, 2000; Risopatrón *et al.*, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003).

En este proceso de capacitación se inician diversos cambios como la reorganización de los lípidos en la superficie espermática (Petrunkina *et al.*, 2003), lo que fomentaría la modificación y relocalización proteica (Toshimori, 2000; Risopatrón *et al.*, 2002; Tienthai *et al.*, 2004). Es así como los antígenos de membrana experimentan modificaciones en su estructura y posición, migrando desde la cola hacia la cabeza espermática y viceversa, para lograr posteriormente un reconocimiento adecuado con el ovocito (Yanagimachi, 1994). A su vez, se produce un influjo de calcio desde el extracelular, debido a la mayor permeabilidad que existe en la membrana (Yanagimachi, 1994; Rota *et al.*, 1999; Farstad, 2000; Sirivaydiapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Toshimori, 2000; Risopatrón *et al.*, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003); el metabolismo celular se incrementa, a través de la participación de la adenilciclase, el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la tirosina que genera la fosforilación de proteínas

(Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Toshimori, 2000; Petrunkina *et al.*, 2003; Tienthai *et al.*, 2004).

Durante la capacitación espermática, el flagelo cambia su patrón de movimiento, el cual se vuelve menos lineal, menos progresivo, pero más amplio y vigoroso que el de los espermatozoides recién eyaculados (Yanagimachi, 1994; Petrunkina *et al.*, 2003). Este proceso se conoce con el nombre de “hiperactivación” y permite que los gametos masculinos se liberen del epitelio del istmo oviductal, y atraviesen las células del cúmulo (Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Bavister, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003). Si los espermatozoides experimentan la hiperactivación prematuramente, podría resultar en un agotamiento de las reservas energéticas de los espermatozoides y, por tanto, no alcanzarían el sitio de fecundación o fallarían en este proceso (Yanagimachi, 1994).

Luego de que ha ocurrido esta serie de eventos desestabilizadores, el espermatozoide se encuentra apto para experimentar otro fenómeno que caracteriza a la capacitación espermática, que se denomina Reacción Acrosómica (RA), proceso que es gatillado por el aumento de calcio intracelular (Brewis *et al.*, 2001; Ramalho-Santos *et al.*, 2002) y que involucra la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana citoplasmática y su posterior fenestración (Moreno y Barros, 1991; Yanagimachi, 1994; Yudin *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Watson, 2000; Brewis *et al.*, 2001; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Este fenómeno ocurre en la cercanía o en contacto con las cubiertas ovocitarias (Yanagimachi, 1994; De los Reyes y Barros, 2000; Brewis *et al.*, 2001; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Durante la RA se liberan enzimas acrosomales como la acrosina que tienen como función la unión y digestión de la ZP y, por tanto, permitir posteriormente la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito y penetrar al citoplasma ovular (Yanagimachi, 1994; De los Reyes y Barros, 2000; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2006).

La RA fue demostrada inicialmente en 1958, cuando se observó que los espermatozoides perdían sus acrosomas al penetrar la ZP (Bavister, 2002). Una hipótesis señala que la RA sería un prerrequisito para el desarrollo de la fusionabilidad entre gametos, ya que dejaría apta a la membrana plasmática a nivel pos-acrosomal o membrana acrosomal interna para fusionarse con el ovocito (Barros *et al.*, 1993). Existen varios eventos que se cree serían esenciales para que se desencadene la RA, entre los que están: un flujo de calcio hacia el intracelular, un incremento en el pH intracelular y la producción de componentes fusogénicos (Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). Las especies estudiadas hasta la fecha, presentarían un flujo transitorio de calcio al ser inducidas con progesterona y proteínas de la ZP (Brewis *et al.*, 2000), sin embargo, en los espermatozoides caninos este flujo sería gradual y de mayor duración, pero de rápida inducción, lo que sugiere que el rol del calcio en el gatillamiento inicial de la RA podría ser diferente en el perro (Brewis *et al.*, 2001),

3.1. Capacitación *in vivo*

In vivo la capacitación ocurre en el tracto reproductivo de la hembra (Yanagimachi, 1994; Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001); en caninos se ha descrito que sería principalmente en el epitelio columnar del istmo del oviducto (Yanagimachi, 1994; Brewis *et al.*, 2001). Este sitio particular tendría la capacidad de mantener viables a los espermatozoides, modulando la capacitación y los cambios en la motilidad (Brewis *et al.*, 2001), debido a que es rico en receptores adrenérgicos y buena perfusión sanguínea, facilitando la llegada de hormonas ováricas, lo que sugiere que esta zona podría ser sensible a ligeros cambios en el perfil de estas hormonas, como progesterona y estrógenos (Yanagimachi, 1994).

In vivo los espermatozoides de muchas especies no inician la RA hasta que entran en contacto con la ZP (Moreno y Barros, 1991; Yanagimachi, 1994); en

espermatozoides de perro se ha señalado que tanto los que han reaccionado, como los sin reaccionar, podrían unirse a la ZP (Kawakami *et al.*, 1993; Ström Holst *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001). La ZP es una cubierta interna del gameto femenino, que generaría reacciones de fosforilación y desfosforilación que activarían a los espermatozoides, induciendo la exposición de enzimas acrosomales (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). Estas reacciones no se generan al azar, tienen un orden muy preciso para poder lograr una adecuada coordinación entre capacitación espermática y maduración ovocitaria y obtener una fecundación exitosa, ya que algunos trabajos en capacitación de espermatozoides caninos señalan que en las primeras etapas de capacitación se fosforilan las proteínas de la pieza media del espermatozoide y se genera, de esta forma, la motilidad hiperactivada. La fosforilación de las proteínas de la cabeza parece completar una serie de eventos desestabilizadores, que corresponden a la activa capacitación, conduciendo a la RA espontánea (Petrunkina *et al.*, 2003).

3.2. Capacitación *in vitro*

La capacitación espermática puede ocurrir en ausencia de ovocitos, bajo condiciones que imitan las características del ambiente uterino (Hewitt y England, 1998). En orden de conseguir esto, se han desarrollado medios con diversos constituyentes que logran la capacitación *in vitro* de los espermatozoides, como los medios que derivan de la solución Tyrode y Krebs-Ringer, suplementados con fuentes energéticas y albúmina (Yanagimachi, 1994). En caninos se han utilizado medios como el de capacitación canino (CCM), el medio de capacitación mínimo (MCM), el BWW (Biggers *et al.*, 1971; Mahi y Yanagimachi, 1978), el modificado (MCCM) (Sirivaidyapong *et al.*, 2000) y el Sperm-TALP (Farstad, 2000), sin embargo, el primero ha sido el más utilizado en los espermatozoides de esta especie, con algunas modificaciones en los diversos trabajos. Los constituyentes que posee este medio inductor artificial de la capacitación, han demostrado ejercer

diferentes acciones sobre la estructura del espermatozoide de perro, que lograría facilitar la ocurrencia de este evento.

Se ha demostrado que el calcio es el componente más crítico para la capacitación espermática *in vitro* (Mahi y Yanagimachi, 1978; Rota *et al.*, 1999; Farstad, 2000; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001). Su acción es activar sistemas enzimáticos que estimulan la vía de transducción de señales que involucran a la proteína kinasa-A y la fosforilación proteica (Toshimori, 2000), tendientes a generar factores fusogénicos, facilitando la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa (Yanagimachi, 1994). Conjuntamente este ión se requeriría para el comienzo de la motilidad hiperactivada, a través de la estimulación de la adenilciclase (Yanagimachi, 1994). Por tanto, la ausencia de calcio en el medio de capacitación impide que los espermatozoides experimenten la RA, la hiperactivación y la sobrevivencia sería más corta (Mahi y Yanagimachi, 1978).

Se ha descrito, además, que el ionóforo de calcio A23187 lograría inducir la capacitación y la RA *in vitro* de una manera similar que el calcio en espermatozoides caninos (Hewitt y England, 1998; Farstad, 2000; Brewis *et al.*, 2001).

El bicarbonato es otro componente de los medios inductores de la capacitación y RA, el cual mantiene el pH básico requerido para que los espermatozoides se mantengan móviles y experimenten la RA (Mahi y Yanagimachi, 1978; Farstad, 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; Tienthai *et al.*, 2004), 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).

La albúmina evita que los espermatozoides se adhieran al recipiente, en el cual se encuentran contenidos (Mahi y Yanagimachi, 1978; Rota *et al.*, 1999). Se ha descrito que esta proteína extrae el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Yanagimachi, 1994, Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000; Toshimori, 2000; Bavister, 2002; Risopatrón *et al.*, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003), evento considerado esencial para el inicio de la capacitación. Se ha observado que esta proteína removería al zinc por quelación; estos iones mantienen la estabilidad de la membrana, por lo que su disminución provocaría un desequilibrio, permitiendo de esta manera que ocurra la fusión de las membranas (Bavister, 2002). Además, la presencia de albúmina es fundamental para el desarrollo de la capacitación espermática *in vitro*, debido a que su ausencia disminuye la sobrevivencia de los espermatozoides caninos (Mahi y Yanagimachi, 1978) e imposibilita la ocurrencia de la RA (Bavister, 2002) y, por tanto la fecundación.

Otro componente esencial del medio de capacitación es la glucosa, sustrato energético que preservaría la reserva de energía intracelular y, por tanto, la motilidad (Ponglowhapan *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, se describe que la glucosa favorece la RA en el espermatozoide canino (Mahi y Yanagimachi, 1978; Farstad, 2000; Sirivaidyapong *et al.*, 2000), puesto que se ha demostrado que la fosforilación de tirosina depende de la glucosa, la que induce un aumento intenso y rápido de todas las fosforilaciones de esta proteína (Petrunkina *et al.*, 2003).

Se ha sugerido que la capacitación *in vitro* se podría lograr también usando compuestos fisiológicos como el líquido folicular (Bavister, 2002; Risopatrón *et al.*, 2002). Barros *et al.* (1993) demostraron que los líquidos folicular y oviductal, tanto homólogo como heterólogo, inducirían la RA en espermatozoides de hámster, lo que se ha descrito también en espermatozoides caninos (Petrunkina *et al.*, 2004). Conjuntamente, se ha demostrado que la progesterona y las proteínas solubles de ZP inducirían la RA en espermatozoides mamíferos (Moreno y Barros, 1991;

Ramalho-Santos *et al.*, 2002), incluidos los caninos (Kawakami *et al.*, 1993; Brewis *et al.*, 2001). Sin embargo, sólo los espermatozoides capacitados son aptos para responder a inductores naturales de la RA (Ramalho-Santos *et al.*, 2002).

Para lograr una adecuada fecundación del ovocito se requiere la ocurrencia de la RA, proceso que permite la liberación del contenido acrosomal, que posee diversas enzimas hidrolíticas como la acrosina (Yanagimachi, 1994), identificada como una de las enzimas involucradas en la penetración espermática (Polakoski *et al.*, 1973; Elce *et al.*, 1986; Töpfer-Petersen *et al.*, 1990; Barros *et al.*, 1992; Valdivia *et al.*, 1994; Sillerico *et al.*, 1996; Kawakami *et al.*, 1999; Valdivia *et al.*, 1999; De los Reyes y Barros, 2000).

4. Acrosina

La acrosina es una serina-proteasa que se encuentra almacenada en forma de zimógeno, como proacrosina, en el compartimiento acrosomal del espermatozoide intacto (Sillerico *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Toshimori, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2006). Se ha descrito que se mantiene inactivada por un inhibidor de proteasas presente en el plasma seminal (Polakoski *et al.*, 1973; Harrison y Fléchon, 1980), el cual es removido o inactivado durante la permanencia de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino como parte del proceso de capacitación (Polakoski *et al.*, 1973).

Al estar en cercanía o entrar en contacto directo con la ZP, el espermatozoide experimenta la RA y se gatilla la activación del zimógeno hacia acrosina (De los Reyes y Barros, 2000). Yanagimachi (1994) señala que esta conversión estaría dada específicamente por los carbohidratos presentes en la ZP, cubierta ovocitaria que sería el sustrato natural de la acrosina (Barros *et al.*, 1993; De los Reyes y Barros, 2000). Luego que ha ocurrido la RA, esta enzima permanecería unida al espermatozoide (Harrison y Fléchon, 1980), específicamente a la superficie de la

membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1994; De los Reyes y Barros, 2000; Cortés *et al.*, 2006). Se ha descrito que también se dispersaría gradualmente junto con las proteínas acrosomales (Yamagata *et al.*, 1998; Cortés *et al.*, 2006), en orden a facilitar la penetración espermática a través de la ZP (Toshimori, 2000). Los espermatozoides sin acrosina han mostrado un retraso en la liberación del contenido acrosomal durante la inducción de la RA (Yamagata *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2002).

La exposición de la matriz acrosomal genera la pérdida de la primera unión ovocito-espermatozoide, sin embargo, los espermatozoides penetrados siguen adheridos a la ZP, gracias a la adquisición de un segundo tipo de interacción, que se establecería nuevamente entre los carbohidratos de la ZP y el sistema proacrosina/acrosina (Barros *et al.*, 1993; De los Reyes y Barros, 2000).

Se cree que la acrosina tendría dos funciones fisiológicas: el reconocimiento y adhesión del espermatozoide a la ZP en las etapas iniciales de la fecundación (Moreno *et al.*, 2002) y la proteólisis limitada de la matriz glicoproteica de la ZP del ovocito (Barros *et al.*, 1993; 1996). Además, se ha reportado que la acrosina está implicada en el desarrollo de la fusionabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide (Barros *et al.*, 1993).

La salida prematura de acrosina desde el acrosoma conduciría a la pérdida de la capacidad espermática de cruzar la ZP (Barros *et al.*, 1993; 1996), lo que fue demostrado por Barros *et al.* (1992), que observaron que los espermatozoides de hámster preincubados por largo tiempo serían incapaces de cruzar la ZP.

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, por lo tanto, la medición de esta enzima podría considerarse una buena medición de este daño (Harrison y Fléchon, 1980; Kawakami *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2006). Sin embargo, se describe que además de activarse, la

acrosina se vería desestabilizada por acción del frío (Polakoski *et al.*, 1973; Froman *et al.*, 1984). A temperaturas de refrigeración (4° C) se ha señalado que se reduciría el contenido de proacrosina, pero no la actividad total de acrosina (Froman *et al.*, 1984). El calcio podría activar y estabilizar a esta enzima (Polakoski *et al.*, 1973). Por otra parte, se ha demostrado que la autoactivación de la acrosina en espermatozoides caninos sería inhibida por este ion (Froman *et al.*, 1984).

La localización de la proacrosina/acrosina en el acrosoma de espermatozoides refrigerados de perro no ha sido evaluada. Su estudio sería una herramienta adecuada para determinar el grado de exocitosis acrosomal durante la capacitación y RA, en espermatozoides preservados a temperatura de refrigeración y/o la integridad de la membrana espermática en esta especie.

HIPÓTESIS

La presencia de la enzima acrosina en espermatozoides refrigerados de perro se verá modificada de acuerdo a los diferentes tiempos y temperatura de capacitación *in vitro* a que sean sometidos estos espermatozoides.

OBJETIVOS

1.- Objetivo General

Detectar la presencia de acrosina en espermatozoides de perro sometidos a refrigeración y capacitados *in vitro*.

2.- Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto del tiempo (0, 1, 2 y 3 horas) de capacitación en la liberación de acrosina en espermatozoides caninos.
- Comparar dos temperaturas de incubación (20° y 37° C) para la capacitación espermática *in vitro*, en la liberación de acrosina en espermatozoides de perro.
- Relacionar la presencia de acrosina, en las diferentes condiciones de cultivo, con la viabilidad espermática posrefrigeración, a través de la motilidad espermática.

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 la evaluación por microscopía de epifluorescencia, en el Laboratorio de Embriología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

a) Obtención y refrigeración de espermatozoides.

El semen se obtuvo a través de estimulación digital del pene a tres perros adultos fértiles, de diferentes razas, sanos y pertenecientes a privados. Se utilizó la segunda fracción del eyaculado correspondiente a la fracción espermática, la cual fue recolectada en copas previamente entibiadas. Se registró el color, olor y volumen seminal obtenido. La motilidad progresiva (MP) se evaluó en forma subjetiva mediante microscopía de contraste de fases. La concentración espermática se obtuvo a través de recuento en la cámara de Neubauer, de acuerdo a las técnicas establecidas en el Laboratorio (De los Reyes y Barros, 2000).

El plasma seminal se retiró por centrifugación a 700 x G por 5 minutos en buffer TRIS (preparado en base a trishidroximetilaminometano, Merck) (Rota *et al.*, 1999), en proporción 2:1 (TRIS: semen). Al pellet obtenido se le extrajo el sobrenadante y se resuspendió en el diluyente de refrigeración (Tabla 1), en orden a obtener una concentración de 200 millones de espermatozoides por mL.

Los espermatozoides ya resuspendidos en el diluyente, se colocaron en un vaso precipitado con agua a temperatura ambiente, que luego se llevó a refrigeración a 4° C, durante 24 horas.

Tabla 1. Composición del diluyente de refrigeración canino.

Compuesto	Cantidad
TRIS	249 mM
Acido cítrico	88,4 mM
Fructosa	69,3 mM
Yema de huevo	20%
Bencil penicilina	2,8 mM
Sulfato Dihidroestreptomicina	0,68 mM

b) Entibiamiento de los espermatozoides.

Luego de 24 h en refrigeración, las muestras fueron incubadas a 37° C por 10 minutos. Luego se centrifugaron a 300 x G por 5 minutos, para extraer el diluyente y el pellet fue resuspendido en el medio de capacitación canino o CCM (Mahi y Yanagimachi, 1978), en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/mL. Cada muestra se alicuotó en 7 partes iguales para ser evaluadas a distintos tiempos (0, 1, 2 y 3 horas) a temperatura ambiente (20° C) y 1, 2 y 3 horas a temperatura de incubación (37° C). Debido a que cuando los espermatozoides son entibiados (luego de la refrigeración), éstos sólo alcanzan una temperatura que bordea los 20° C, no existe hora 0 para los espermatozoides incubados a 37° C. En cada muestra y en cada tiempo se midió el porcentaje de MP espermática mediante microscopio de contraste de fases.

c) Determinación de acrosina mediante inmunofluorescencia indirecta.

Para la fijación de los espermatozoides se utilizó L-polilisina al 1% (Sigma), para que los espermatozoides se adhirieran al cubreobjeto, en el cual fueron fijados posteriormente con paraformaldehído (Merck) al 4%.

Luego de esto se añadió Metanol 99% (Fisher Scientific) por diez minutos a 4° C y Triton x-100 (Sigma) al 1% en PBS para permeabilizar las células. Los sitios de unión no-específicos fueron bloqueados con PBS-BSA 1% (preparado con BSA, fracción V, Sigma) más Glicina (Sigma) 100 µM. Posteriormente las muestras se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-acrosina humana C5F10 (Biosonda) (Cortés *et al.*, 2006), previamente diluido en 1:100 en PBS-BSA 1% por 24 h. Posteriormente, las muestras fueron incubadas (protegidas de la luz) con un segundo anticuerpo anti-mouse fluorescente (Pierce), diluido en 1:100 PBS-BSA 1% por 1 h. Las muestras se montaron en un portaobjeto utilizando antifade (Vectashield, Vector) y se observaron mediante un microscopio de Epifluorescencia (Nikon Optiphot 2).

d) Análisis estadístico.

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

Los resultados del inmunomarcaje de acrosina en los espermatozoides procesados para inmunofluorescencia, se clasificaron en: a) Marcados (marca fluorescente a nivel acrosomal) y b) No Marcados (sin marca fluorescente a nivel acrosomal). Esta variable binomial se analizó mediante un modelo de regresión polinómica de tipo cuadrática (Mendenhall y Scheaffer, 1973), el cual permitió estimar si existían diferencias entre los distintos protocolos de capacitación espermática a través del tiempo, utilizando SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA).

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

El modelo estadístico que se utilizó es el siguiente:

$$Y_{ij} = \beta_{0i} + \beta_{1i} T_j + \beta_{2i} T_j^2 + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Inmunomarcaje de Acrosina (variable binomial (1= no marcado; 0= marcado)).

β_{0i} = Intercepto.

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

T_j = Tiempo de incubación.

β_{2i} = Coeficiente de regresión de Y_{ij} sobre el tiempo T_j^2 (para cada tratamiento).

T_j^2 = Tiempo de incubación al cuadrado.

ε_{ij} = Error.

La evaluación de la motilidad espermática a través del tiempo de capacitación y temperatura de incubación, se realizó mediante análisis de varianza (ANDEVA) utilizando la Prueba de Tukey-Kramer para determinar la significancia de las diferencias, entre los protocolos de capacitación espermática. Las diferencias de $P \leq 0,05$ se consideraron significativas.

RESULTADOS

Inmunomarcaje

El inmunomarcaje fue clasificado en **No marcado** o sin presencia de acrosina (Figura 1.2 a), cuando el acrosoma no emitió fluorescencia y en **Marcado** (Figura 1.2 b), cuando el acrosoma emitió fluorescencia verde.

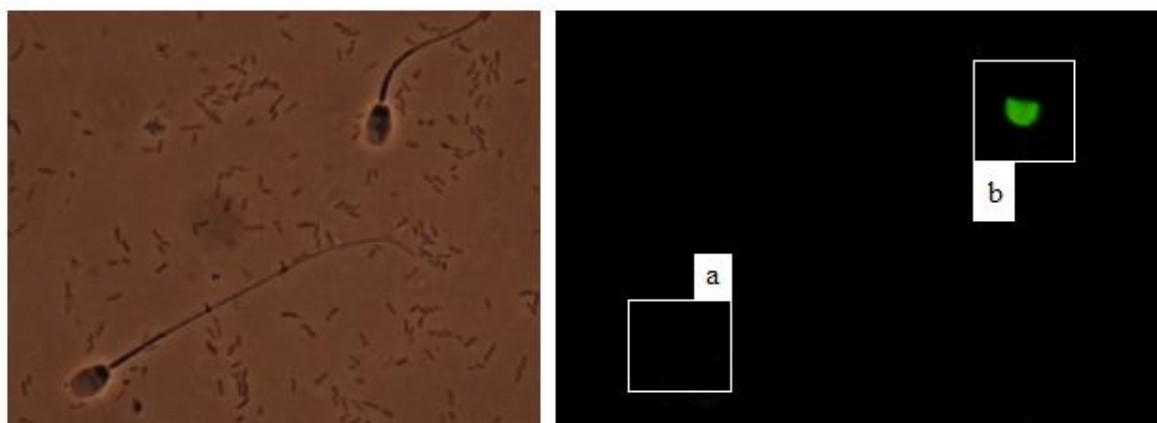


Figura 1.1. Microscopía de contraste de fases.

Figura 1.2. Microscopía de epifluorescencia (400x).

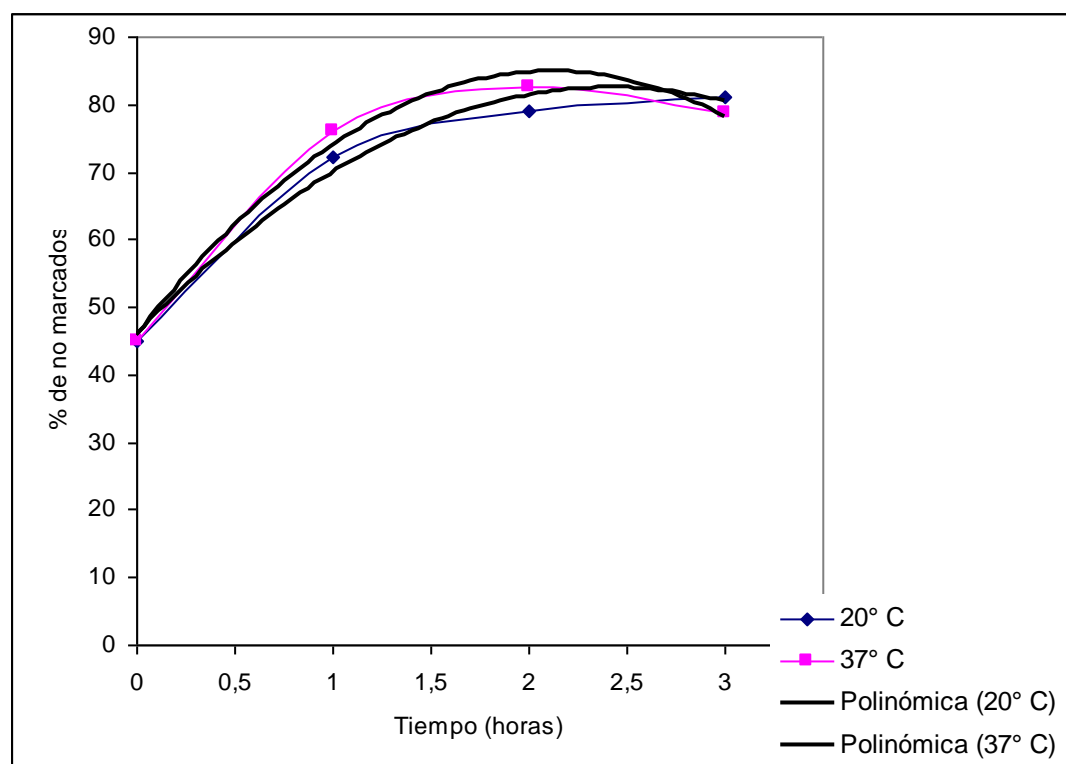
Se observó que a medida que transcurrió el tiempo de incubación en medio de capacitación de 0, 1, 2, 3 horas, la probabilidad de encontrar espermatozoides no marcados aumentó ($P < 0,0001$) (Figura 2), presentando coeficientes de regresión que fueron estadísticamente diferentes y significativos entre las horas 0, 1, 2 y 3.

La temperatura de incubación a partir de la primera hora influyó en forma significativa sobre la variación en el porcentaje de espermatozoides no marcados ($P < 0,0001$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas temperaturas a la hora 0.

El nivel de confianza de este análisis estadístico presentó un R^2 de 0,98 para la temperatura de 20° C y de 0,99 para 37° C, lo que permite concluir que el modelo estadístico para este estudio es altamente confiable.

Independiente del tiempo, la probabilidad de encontrar espermatozoides no marcados fue mayor a 37° C que a 20° C, exceptuando la tercera hora de incubación (Figura 2).

Figura 2. Diagrama de Regresión Polinómica de tipo Cuadrática de los espermatozoides No Marcados a los diferentes tiempos de capacitación (TC) y temperaturas de incubación (TI).



*El tiempo cero a los 37° C fue obtenido mediante extrapolación de los datos obtenidos.

Los espermatozoides no marcados incubados a 20° C y 37° C tuvieron la mayor pérdida de la marca fluorescente durante la primera hora de incubación, lo que se observó de manera más notoria en los incubados a mayor temperatura (Figura 2), que además exhibieron este comportamiento durante todo el tiempo, aunque,

luego de la segunda hora de incubación, estos espermatozoides mostraron una desaceleración en la pérdida de marca fluorescente. En contraste, los espermatozoides incubados a 20° C mostraron una pérdida sostenida en el porcentaje de marcación a través del tiempo, observándose la mayor pérdida de marca a las 3 horas de incubación. Esta disminución a través del tiempo fue inferior a la experimentada por los incubados a 37° C, según se observa en las líneas de tendencia (color negro) (Figura 2).

Los valores absolutos y porcentuales de los espermatozoides sin marcación, se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Espermatozoides no marcados (N° y %) en los diferentes tiempos de capacitación (TC) y temperaturas de incubación (TI).

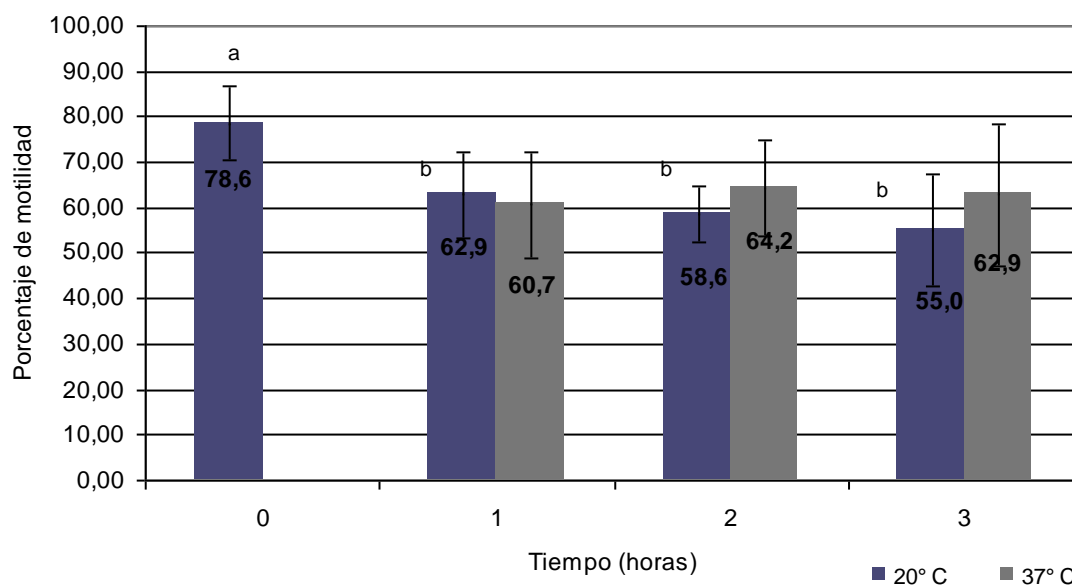
TIEMPO (Horas)	TEMPERATURA					
	20° C			37° C		
	N	n	%	N	N	%
0	1400	632	45,14 %	1400	632	45,14%
1	1400	1012	72,29 %	1400	1066	76,14 %
2	1400	1106	79,00 %	1400	1158	82,71 %
3	1400	1137	81,21 %	1400	1104	78,86 %
Total	5600	3887	69,41 %	4200	3328	79,24 %

N : número de espermatozoides evaluados.
n : número de espermatozoides no marcados.

Motilidad espermática (ME)

Los resultados de motilidad espermática se muestran en la Figura 3. Se observó que la ME disminuyó sólo entre el tiempo 0 y el resto de los tiempos de incubación ($P < 0,0001$).

Figura 3. Motilidades promedio y Desviación Estándar de los espermatozoides a los distintos tiempos y temperaturas de incubación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Al evaluar los resultados de la ME entre ambas temperaturas de incubación, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$). Se evaluó cada temperatura por separado en el tiempo y se obtuvo que la motilidad se modificó sólo a 20° C ($P < 0,0004$). Esta variación significativa se registró entre la hora 0 y las restantes horas de incubación ($P < 0,05$) (Figura 3).

DISCUSIÓN

Este trabajo demostró una influencia del tiempo y de la temperatura, sobre la liberación de acrosina en espermatozoides caninos refrigerados/entibiados y capacitados *in vitro* en medio inductor de la capacitación espermática.

La exocitosis de enzimas acrosomales como la acrosina, ha sido estudiada para evaluar, entre otras cosas, la Reacción Acrosómica (RA) (Harrison y Fléchon, 1980; Froman *et al.*, 1984; Barros *et al.*, 1992; 1993; Valdivia *et al.*, 1994; Sillerico *et al.*, 1996; Yamagata *et al.*, 1998; Kawakami *et al.*, 1999; Valdivia *et al.*, 1999; De los Reyes y Barros, 2000), como también su relación con la capacidad fecundante de los espermatozoides (Barros *et al.*, 1993; Yamagata *et al.*, 1998; Kawakami *et al.*, 1999; Valdivia *et al.*, 1999; Yudin *et al.*, 1999; De los Reyes y Barros, 2000). Por otra parte, la localización de esta enzima se ha investigado para precisar la cinética de su liberación durante la RA en espermatozoides de hámster, cobayos, humano (Barros *et al.*, 1992), conejo (Valdivia *et al.*, 1994; Sillerico *et al.*, 1996; Valdivia *et al.*, 1999), ratón (Yamagata *et al.*, 1998) y bovino (De los Reyes y Barros, 2000), así como también los efectos negativos que promovería la criopreservación en los espermatozoides (Harrison y Fléchon, 1980; Aretio, 2006; Cortés *et al.*, 2006).

En el presente estudio, se detectó la presencia de acrosina en espermatozoides caninos refrigerados y capacitados *in vitro*, mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo monoclonal antiacrosina humana C5F10, evidenciándose que a medida que transcurrió el tiempo de incubación en medio de capacitación, aumentó la cantidad de espermatozoides que no mostraron marca fluorescente, indicativo de la presencia de acrosina, lo que sugiere que estos espermatozoides lograron capacitarse y experimentar la RA, liberando así el contenido acrosomal, con la consiguiente pérdida de acrosina. Durante la primera hora de incubación se comprobó un importante incremento en el número de espermatozoides sin marca fluorescente (no marcados), mientras que en los

siguientes tiempos este aumento fue menos notorio. Estos resultados podrían ser concordantes a los obtenidos por Rota *et al.* (1999), donde el mayor incremento en la capacitación de espermatozoides refrigerados, evaluado mediante el ensayo de Clortetraciclina (CTC), se produjo dentro de las dos primeras horas de incubación y con los resultados obtenidos por Manosalva *et al.* (2005), quienes obtuvieron un alto porcentaje de espermatozoides caninos capacitados y reaccionados a las 3 horas de incubación, empleando el mismo medio capacitante que en este trabajo y evaluados mediante SBTI-Alexa 488 (soybean trypsin inhibitor, conjugado con Alexa Fluor 488) e inmunofluorescencia indirecta.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Aretio (2006), con espermatozoides caninos congelados/descongelados, utilizando la misma metodología de inmunofluorescencia con el anticuerpo C5F10, de este estudio, los espermatozoides también experimentaron el mayor porcentaje de pérdida de marca fluorescente durante la primera hora de incubación. Sin embargo, de acuerdo a lo planteado previamente en otro estudio, la alteración en la liberación de la acrosina debido al frío sería distinta en la congelación respecto de la refrigeración, ya que según algunos autores, la refrigeración produciría sólo la autoactivación de la proacrosina, pero no reduciría su actividad total, a diferencia que la congelación si lo provocaría (Froman *et al.*, 1984), sugiriendo que el congelamiento produciría una lisis del acrosoma espermático (Froman *et al.*, 1984; Watson, 2000; Cortés *et al.*, 2006). Por el contrario, en trabajos con espermatozoides frescos de perro, procesados bajo el mismo protocolo que en este estudio, muestran un aumento tardío en la pérdida de marca fluorescente (datos no publicados¹) en relación a los congelados/descongelados (Aretio, 2006) y los refrigerados, presentados en este trabajo, lo que concuerda con la actividad mostrada por la acrosina de espermatozoides frescos capacitados en el mismo medio, que aumenta significativamente sólo después de 7 horas de incubación (Kawakami *et al.*, 1999).

¹ Memoria en curso, 2007, Mitchel Gutierrez.

En las siguientes horas de incubación, la cantidad de espermatozoides sin marca fluorescente registró sólo un aumento leve, indicando que la pérdida de acrosina luego de la hora de incubación en medio inductor de capacitación sería menos drástica. Es probable que un porcentaje importante de los espermatozoides hayan experimentado la capacitación previamente, lo que concordaría con el 76% de espermatozoides no marcados a la primera hora de incubación a 37° C. Se ha descrito que los espermatozoides de perro se podrían unir a la zona pelúcida (ZP) tanto reaccionados como sin reaccionar (Kawakami *et al.*, 1993), sin embargo, se ha demostrado que los espermatozoides refrigerados penetrarían los ovocitos madurados *in vitro* antes que los espermatozoides frescos (hora 1), y luego de este tiempo, esto se revertiría y los espermatozoides almacenados a 4° C penetrarían a una tasa más lenta que los frescos (Anguita, 2006). Esto sería coincidente con el mayor porcentaje de no marcados a comienzos de la incubación, obtenido en este trabajo, indicando por tanto, que es posible que la acrosina, que participa en la penetración espermática a través de la ZP, se liberaría más temprano en aquellos espermatozoides sometidos a procesos de refrigeración y congelación (Aretio, 2006).

Al inicio de la incubación en medio capacitante (hora 0) a 20° C, casi la mitad de los espermatozoides no presentaban marca fluorescente, pudiendo haber liberado la enzima, debido a daño acrosomal o al inicio más precoz del proceso de RA, producto del tratamiento de refrigeración, ya que según un estudio reciente que empleó espermatozoides frescos bajo las mismas condiciones de incubación (datos no publicados¹) obtuvo sólo un 14 % de espermatozoides sin marca al comienzo de la capacitación, confirmando lo señalado previamente por Rota *et al.* (1999), donde habrían diferencias significativas en los patrones de capacitación (medido mediante CTC) entre los espermatozoides de perro frescos y criopreservados, exhibiendo estos últimos una alta proporción de capacitación al inicio de la incubación.

¹ Memoria en curso, 2007, Mitchel Gutierrez.

Ambas temperaturas de incubación mostraron una influencia significativa en la pérdida de la marca fluorescente, indicativa de acrosina. Tanto los espermatozoides incubados a 20° C como a 37° C presentaron la mayor pérdida de la marca durante la primera hora de incubación en medio capacitante, siendo más notorio a 37° C que a 20° C, lo que indicaría que estos espermatozoides perdieron la acrosina tempranamente, y por tanto, se habrían capacitado.

Los espermatozoides incubados a 37° C mostraron la mayor cantidad de pérdida de inmunomarcaje a las 2 horas de incubación, evento que ocurrió a las 3 horas de capacitación a los 20° C. Probablemente, el hecho que la temperatura de 37° C sea la más cercana a la temperatura corporal, favorecería que la capacitación se desarrollara en un ambiente similar al fisiológico. Conjuntamente, una temperatura mayor incrementaría el metabolismo de los espermatozoides (England y Ponzio, 1996), respecto de la aceleración de los procesos enzimáticos (Stryer *et al.*, 2003).

Por otra parte, se observó que los espermatozoides incubados a 37° C experimentaron una desaceleración en el proceso de capacitación, de acuerdo a la pérdida de la marca fluorescente, luego de las 2 horas de incubación, lo que podría deberse a que la mayoría de los espermatozoides incubados a esta temperatura habrían experimentado más tempranamente este proceso de capacitación y RA. Esto concuerda con lo descrito por Rota *et al.* (1999), al evaluar la RA mediante ensayos de CTC, donde los espermatozoides refrigerados y luego capacitados a 37° C presentaron el mayor incremento de RA durante las primeras 2 horas de incubación. Los espermatozoides incubados a 20° C, en contraste, mostraron una pérdida sostenida de marca a través del tiempo de incubación, porcentaje que fue inferior a los incubados a 37° C, exceptuando la tercera hora, lo que podría atribuirse a que los espermatozoides incubados a 20° C requerirían más tiempo para capacitarse.

Existen pocos estudios de capacitación espermática en que sea evaluada la temperatura de 20° C; la mayoría de los trabajos han utilizado temperaturas de

incubación similares a las encontradas *in vivo*, las que fluctúan entre 37° C y 39° C (Mahi y Yanagimachi, 1976; 1978; Kawakami *et al.*, 1993; Hewitt y England, 1998; Kawakami *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Ström Holst *et al.*, 2000; Brewis *et al.*, 2001; Petrunkina *et al.*, 2003). Sin embargo, Sirivaidyapong *et al.* (2000), observaron que aunque los espermatozoides frescos capacitados a 20° C muestran porcentajes de RA similares a los espermatozoides incubados a 37° C, el proceso sería más lento a 20° C, lo que concuerda con un estudio reciente en capacitación de espermatozoides caninos frescos *in vitro* a 20° y 37° C (datos no publicados¹) donde no hubo variaciones significativas en el porcentaje de espermatozoides sin acrosina entre las temperaturas de incubación. No obstante, el aumento de aquéllos sin acrosina fue menor a 20° C. Estos trabajos coincidirían con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde los espermatozoides refrigerados sin marca fluorescente, incubados a 20° C, liberaron la acrosina en forma más gradual que los incubados a 37° C, situación que puede deberse a posibles diferencias en la fluidez de la membrana plasmática y la composición lipídica a 20° C y 37° C (Sirivaidyapong *et al.*, 2000), pudiendo enlentecerse la cinética de capacitación en los espermatozoides incubados a menor temperatura.

Al observar los porcentajes de espermatozoides sin marca fluorescente luego de la primera hora a 20° C y 37° C, se aprecian leves incrementos del porcentaje de no marcados en ambas temperaturas, lo que podría deberse a que la mayoría de los espermatozoides ya se habrían capacitado.

Con el fin de estimar la viabilidad de los espermatozoides sometidos a capacitación, se evaluó además la motilidad espermática. Esta característica resultó ser afectada por el tiempo de incubación, mientras que la temperatura de incubación no ejerció efectos significativos en la motilidad.

¹ Memoria en curso, 2007, Mitchel Gutierrez.

El porcentaje de motilidad progresiva (MP) es un parámetro importante en la evaluación de métodos de preservación de espermatozoides (Strom *et al.*, 1997), no obstante, debe asociarse con otras evaluaciones de fertilidad para lograr una correlación más certera de lo que ocurre *in vivo* (Bouchard *et al.*, 1990). En espermatozoides caninos frescos, la MP generalmente es de 90% (Rota *et al.*, 1995; Rota *et al.*, 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Risopatrón *et al.*, 2002; Sánchez, *et al.*, 2002; Manosalva *et al.*, 2005), mientras que en los espermatozoides que han sido congelados/descongelados los porcentajes de motilidad han variado entre un 47% a 73%, según el protocolo de congelación/descongelación que se haya utilizado (Strom *et al.*, 1997; Rota *et al.*, 1999; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Ström Holst *et al.*, 2000; Sánchez, *et al.*, 2002). En los espermatozoides refrigerados, ésta ha fluctuado entre 73-90%, dependiendo del medio de refrigeración empleado (Bouchard *et al.*, 1990; Rota *et al.*, 1995; Pinto *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 1999; Ström Holst *et al.*, 2000; Iguer-ouada y Versteegen, 2001; Tsutsui *et al.*, 2003; Ponglowhapan *et al.*, 2004; Manosalva *et al.*, 2005).

En este estudio los espermatozoides caninos refrigerados por 24 horas presentaron un 78,5% de motilidad al inicio de la incubación (hora 0), similar a la motilidad de 73% observada previamente en espermatozoides caninos refrigerados por 24 horas (Manosalva *et al.*, 2005). Esta disminución en la motilidad se describe en los espermatozoides tratados con frío (Rota *et al.*, 1999; Watson, 2000; De los Reyes *et al.*, 2002) y se debería a que este movimiento depende de la actividad mitocondrial, la que se ve afectada por efecto de la refrigeración (Manosalva *et al.*, 2005).

La motilidad espermática proporcionaría información respecto de las reacciones espermáticas frente a ambientes adversos (Bouchard *et al.*, 1990). Se observó, en este trabajo, que la motilidad disminuyó a medida que transcurrió el tiempo de capacitación, así como lo demuestran estudios de capacitación en caninos con espermatozoides frescos (Kawakami *et al.*, 1993; Kawakami *et al.*, 1999; Rota *et*

al., 1999; Sirivaidyapong *et al.*, 2000; Risopatrón *et al.*, 2002; Petrunkina *et al.*, 2003) y congelados (Rota *et al.*, 1999; Ström Holst *et al.*, 2000; Aretio, 2006). La disminución significativa de la motilidad en el tiempo, se produjo entre la hora 0 y 1, lo que coincide con el mayor aumento de los espermatozoides sin marca fluorescente. Esto podría indicar que luego de capacitarse, los espermatozoides experimentarían una merma en su motilidad, lo que podría acompañarse además, de muerte celular (Petrunkina *et al.*, 2003). Este fenómeno ocurre tanto en los espermatozoides frescos como criopreservados, debido a que se agotarían las reservas energéticas necesarias para desencadenar el movimiento del flagelo (Yanagimachi, 1994). Además, se ha descrito que la actividad de la tirosina de la pieza media del espermatozoide, responsable de la hiperactivación, se reduciría luego del movimiento hiperactivado, lo que tendría como consecuencia una disminución de la motilidad (Petrunkina *et al.*, 2003). Este descenso ocurre lentamente en los espermatozoides caninos frescos, en los que se ha visto que luego de 4 horas de capacitación, se iniciaría la disminución significativa de este parámetro (Kawakami *et al.*, 1993). Por el contrario, en los espermatozoides congelados/descongelados, se ha observado que este proceso ocurriría durante la primera media hora de capacitación (Aretio, 2006). En el estudio realizado por Rota *et al.* (1999), la motilidad de los espermatozoides refrigerados disminuyó alrededor de un 15 % durante las primeras dos horas de incubación, situación que difiere de lo ocurrido en este trabajo, puesto que esto sucedió durante la primera hora, lo que puede deberse al hecho de que la primera medición de motilidad fue realizada en la segunda hora de incubación en el estudio de Rota *et al.* (1999).

Luego de la primera hora de incubación, la motilidad no disminuyó significativamente, por lo que no hubo diferencias importantes entre las restantes horas de incubación.

La temperatura de incubación no influyó en forma significativa sobre la disminución de la motilidad, aunque se observó una declinación constante de la motilidad a 20° C. Por el contrario, la motilidad a 37° C se mantuvo relativamente

estable en el tiempo. Este comportamiento de la motilidad difiere del obtenido en el trabajo realizado por Aretio (2006), en el que los espermatozoides congelados/descongelados experimentaron una disminución significativa de la motilidad, la que fue más pronunciada a 37° C en relación a la temperatura de 20° C. Sin embargo, los espermatozoides congelados/descongelados experimentarían mayores daños durante el proceso de congelamiento (England y Ponzio, 1996), lo que los haría por tanto, menos resistentes.

Al evaluar la motilidad en cada temperatura, se observó que sólo a 20° C hubo disminuciones significativas en el tiempo, las que se registraron entre la hora 0 y 1. Esto se asemeja a lo ocurrido en el ensayo realizado por Aretio (2006), donde la mayor disminución de la motilidad espermática se produjo en la primera hora de capacitación en los espermatozoides congelados/descongelados incubados a 20° C. Al no existir hora 0 para la temperatura de incubación de 37° C, se extrapola la motilidad del inicio de la incubación, y se observó una reducción similar a la observada a 20° C.

En el presente estudio, los espermatozoides caninos refrigerados/entibiados y capacitados *in vitro* experimentaron la mayor liberación de acrosina durante la primera hora de incubación en medio capacitante, lo que resultó ser concomitante con la disminución de la motilidad. Esto podría indicar que la RA se llevaría a cabo al inicio de la incubación. Sin embargo, se debe considerar, que se ha descrito que durante la refrigeración se desencadenarían daños acrosomales que podrían conllevar a una RA degenerativa o prematura (Rota *et al.*, 1995), por lo que estos espermatozoides no podrían penetrar la ZP (Barros *et al.*, 1993; Sirivaidyapong *et al.*, 2000), reduciéndose su capacidad fecundante (Cortés *et al.*, 2006). Es por esto que se hace necesario el estudio de la fertilización *in vitro* de ovocitos de perra, utilizando semen canino refrigerado y capacitado *in vitro*.

CONCLUSIONES

- La liberación de la enzima acrosina en espermatozoides refrigerados de perro se vio influenciada por el tiempo y la temperatura de capacitación *in vitro* a los que fueron sometidos estos espermatozoides.
- Los espermatozoides se capacitaron más rápidamente durante la primera hora de incubación y a 37° C, por lo que en futuros ensayos de fecundación *in vitro* debiera utilizarse esta temperatura para lograr índices exitosos.
- La motilidad progresiva, como expresión de viabilidad espermática, disminuyó a través del tiempo de incubación, experimentando su mayor descenso durante la primera hora de incubación., por lo que los espermatozoides refrigerados deberían ser sometidos a capacitación *in vitro* en tiempos breves.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ANGUITA, C.** 2006. Fecundación *in vitro* en caninos: evaluación de la penetración espermática en el tiempo utilizando semen fresco y refrigerado con ovocitos en diferentes estados de maduración. Memoria Título Médico Veterinario, Santiago, Chile, U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Pp. 21-38.
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. Pp. 28-40.
3. **AUSTIN, C. R.** 1951. Observations on the penetration of spermatozoa into the mammalian egg. Australian Journal Science Research 4: 581-596.
4. **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.
5. **BARROS, C.; MELENDEZ, J.; VALDIVIA, M.; RIOS, M.; YUNES, R.** 1993. Sperm passage through the egg coats. Biology Research 26: 417-427.
6. **BARROS, C.; CROSBY, J. A.; MORENO, R. D.** 1996. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. Cell Biology International 20: 33-39.
7. **BAVISTER, B. D.** 2002. Early history of *in vitro* fertilization. Reproduction 124: 181-196.

8. **BIGGERS, J. D.; WHITTEN, W. K.; WHITTINGHAM, D. C.** 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. In JC Daniel (ed): "Methods in Mammalian Embryology." Sn. Fco: WH Freeman. Pp. 86-116.
9. **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.
10. **BREWIS, I. A.; MORTON, I. E.; MOHAMMAD, S. N.; BROWES, C. E.; MOORE, H. D. M.** 2000. Measurement of intracellular calcium and membrane potential in human spermatozoa using flow cytometry. *Journal of Andrology* 21: 238-249.
11. **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.
12. **CHANG, M. C.** 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.
13. **CORTÉS, C. J.; CODELIA, V.; MANOSALVA, I.; DE LANGE, J.; MORENO, R.; 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.
14. **DE JONG, C. E.; JONSSON, N.; FIELD, H.; SMITH, C.; CRICHTON, E. G.; PHILLIPS, N.; JOHNSTON, S. D.** 2005. Collection, seminal characteristics and chilled storage of spermatozoa from three species of free-range flying fox (*Pteropus spp*). *Theriogenology* 64: 1072- 1089.

15. **DE LOS REYES, M.** 2004. Congelación de semen canino. En: Gobello C. "Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latinoamericanos". Editorial Gráfica Latina. Buenos Aires. Argentina. Pp. 2:17-26.
16. **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.
17. **DE LOS REYES, M.; SÁENZ, L.; LAPIERRE, L.; CROSBY, J.; BARROS, C.** 2002. Evaluation of glucose as a cryoprotectant in boar semen. *Veterinary Record* 151: 477-480.
18. **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.
19. **ELCE, J. S.; GRAHAM, E. J.; ZBORIL, G.; LEYTON, L.; PEREZ, E.; CROXATTO, H. B.; DE IOANNES, A.** 1986. Monoclonal antibodies to bovine human acrosin. *Biochemistry and Cell Biology* 64: 1242-1248.
20. **ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P.** 1996. Comparision of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 46: 165-171.
21. **FARSTAD, W.** 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175-186.
22. **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.

23. **FULLER, S. J.; WHITTINGHAM, D. G.** 1997. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Molecular Reproduction and Development* 46: 318-324.
24. **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.
25. **HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E.** 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 88: 343-352.
26. **HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C.** 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology* 65: 584-593.
27. **HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W.** 1998. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science* 51: 321-332.
28. **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.
29. **KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.; MAHI-BROWN, C.; OVERSTREET, J.** 1993. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biology of Reproduction* 48: 841-845.
30. **KAWAKAMI, E.; ARAI, T.; OISHI, I.** 1999. Changes in hyaluronidase, acrosin, and N-acetylhexosaminidase activities of dog sperm after incubation. *Journal of Veterinary Medical Science* 61: 183-184.

31. **LINDE-FORSBERG, C.** 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. Seminar of Veterinary Medical Surgery (Small Animal) 10: 48-58.
32. **MAHI, C. A.; YANAGIMACHI, R.** 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. Journal of Experimental Zoology 196: 189-196.
33. **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.
34. **MANOSALVA I.; CORTÉS 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.
35. **MENDENHALL, W., SCHEAFFER, R. L.** 1973. Mathematical Statistics with applications. Impreso en North Scituate, Massachusetts, Estados Unidos de América. Editorial Duxbury Press. Capítulo 11.9. Pp. 406-407.
36. **MORENO, R. D.; BARROS, C.** 1991. Effect of test-yolk upon human sperm acrosome reaction. Microscopía Electrónica y Biología Celular 15: 107-117.
37. **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.

38. **OETTLÉ, E. E.** 1986. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science* 12: 145-150.
39. **PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K.** 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
40. **PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C.** 2000. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718.
41. **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.
42. **PETRUNKINA, A. M.; SIMON, K.; GÜNZEL-APEL, A. R.; TOPFER-PETERSEN, E.** 2004. Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct? *Theriogenology* 61: 1617-1634.
43. **PINTO, C. R. F.; PACCAMONTI, D. L.; EILTS, B. E.** 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52: 609-616.
44. **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.

45. **PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSON, 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.
46. **RAMALHO-SANTOS, J.; SCHATTEN, G.; MORENO, R.** 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 67: 1043-1051.
47. **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.
48. **RISOPATRÓN, J.; CATALÁN, S.; MISKA, W.; SCHILL, W-B.; SÁNCHEZ, R.** 2002. Effect of albumin and polyvinil alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 347-351.
49. **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.
50. **ROTA A.; PEÑA A. I.; LINDE – FORSBERG C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ 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.
51. **SÁNCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, R.** 2002. Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hipoosmotic swelling test. *Archivos de Medicina Veterinaria* 34: 131-134.

52. **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.
53. **SIRIVAIYAPONG, S.; CHENG, F. P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W. F.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B.** 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine. *Theriogenology* 53: 789-802.
54. **SPUNGIN, B.; MARGALIT, I.; BREITBART, H.** 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and filaments in membrane fusion. *Journal of Cell Science* 108: 2525-2535.
55. **STORNELLI, M. A.; STORNELLI, M. C.; ARAUZ, M. S.; DE LA SOTA, L.** 2001. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado, aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria* 21: 58-66.
56. **STRÖM HOLST, B.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2000. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility* 119: 201-206.
57. **STRYER, L.; BERG, J.; TYMOCZKO, J.** 2003. *Bioquímica*. 5a Edición. Impreso en España. Editorial Reverté, S.A. Capítulo 8. Pp. 189-225.
58. **THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A.; BALL, B. A.** 2005. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65: 1531-1550.

59. **TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Animal Reproduction Science* 80: 131-146.
60. **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.
61. **TÖPFER-PETERSEN, E.; PETRUNKINA, A. M.; EKHLANSI-HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte-sperm interactions. *Animal Reproduction Science* 60-61: 653-662.
62. **TOSHIMORI, K.** 2000. Sperm plasma membrane modifications associated with fertilization in mammals. *The Journal of Reproduction and Development* 46: 65-78.
63. **TSUTSUI, T.; TEZUCA, 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.
64. **VALDIVIA, M.; YUNES, 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 and in spermatozoa recovered from perivitelline space. *Molecular Reproduction and Development* 37: 216-222.
65. **VALDIVIA, M.; SILLERICO, T.; DE IOANNES, A.; BARROS, C.** 1999. Proteolytic activity of rabbit perivitelline spermatozoa. *Zygote* 7: 143-149.

66. **WATSON, P. F.** 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61: 481-492.
67. **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. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 10470-10474.
68. **YANAGIMACHI, R.** 1994. Mammalian fertilization. En: Knobil, E. y Neill, J. D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*. 2^a ed. Editorial Raven Press, Nueva York. USA. Pp. 189-317.
69. **YUDIN, A. I.; VANDEVOORT, C. A.; LI, M-W.; OVERSTREET, J. W.** 1999. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development* 53: 350-362.