

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Identificación y evaluación del mecanismo de
activación del sistema proacrosina/acrosina en
espermatozoides de alpaca (*vicugna pacos*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en Biología
Celular y Genética

AUTOR

Claudia Violeta Rodríguez Llanos

Lima – Perú

2012

**A mis padres y hermanas por estar
conmigo siempre, dándome su amor y
apoyo incondicional para seguir
adelante.**

**A Luis, que con su paciencia y amor
me da fuerzas para continuar.**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por seguir conmigo y dándome cada día un nuevo reto que asumir.

A mis padres y hermanas, por el amor que me dan, tolerando mis desveladas y ausencias.

A la Ms Sc. Martha Valdivia, por abrirme las puertas de su laboratorio cuando aún era una estudiante de pregrado. Por su apoyo, confianza, consejos, críticas y contribución en la realización del presente trabajo de tesis.

A Luis, por estar conmigo en todo momento dándome su amor y confianza. Por compartir muy gratos momentos conversando y riendo juntos.

A mis amigos del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas: Nadia, Fanny, Rosmary, Jonathan, Luis T., Pepe, Ricardo, Cristian, Heydy, Pedro, Miguel. Gracias por los inolvidables momentos que pasamos juntos mientras trabajábamos en el laboratorio.

A todas aquellas personas que no menciono, pero que de alguna u otra manera han estado presente durante el desarrollo de mi carrera profesional.

INDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEORICO.....	2
2.1 El acrosoma.....	2
2.2 Reacción del acrosoma.....	4
2.3 Sistema proacrosina/acrosina.....	6
2.4 Evaluación de la actividad proteolítica de espermatozoides.....	7
2.5 Uso de Inhibidores de proteasas para estudiar la fisiología del espermatozoide.....	8
3. HIPÓTESIS.....	11
3.1 HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	11
3.2 HIPÓTESIS NULA.....	11
4. OBJETIVOS.....	11
4.1 OBJETIVO GENERAL:.....	11
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
5.1 MATERIALES.....	12
5.1.1 Material Biológico:.....	12
5.2 MÉTODOS.....	12
5.2.1 Colección de la muestra.....	12
5.2.2 Capacitación y reacción del acrosoma.....	12
5.2.3 Inhibidores.....	13
5.2.4 Medición de la actividad proteolítica individual.....	13
5.2.5 Evaluación del estado de la membrana acrosomal.....	14
5.2.6 Extracción de enzimas acrosomales.....	15
5.2.7 Evaluación de la proteólisis de extractos ácidos activados a pH8 a diferentes tiempos sobre geles SDS-PAGE de digestión.....	15
5.2.8 Western Blot para identificar el sistema proacrosina/acrosina en extractos ácidos de espermatozoides de alpaca.....	16
5.2.9 Análisis Estadístico.....	16

6. RESULTADOS	17
6.1 Evaluación del estado del acrosoma en presencia de los inhibidores tipo tripsina y quimotripsina.....	17
6.2 Efecto de inhibidores de proteasas sintéticos tipo tripsina y quimotripsina sobre la actividad proteolítica.	22
6.3 Evaluación el patrón de activación del sistema proacrosina/acrosina a través de geles de actividad.	28
7. DISCUSIÓN.....	31
7.1 Efecto de inhibidores sintéticos sobre la reacción del acrosoma en espermatozoides de alpaca	31
7.2 Efecto de inhibidores sintéticos sobre la actividad proteolítica en espermatozoides de alpaca	32
7.3 Identificación y evaluación del patrón de activación del sistema proacrosina/acrosina en espermatozoides de alpaca	34
8. CONCLUSIONES.....	36
9. RECOMENDACIONES	36
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
11. ANEXOS	43
ANEXO 1.....	43
ANEXO 2.....	44

RESUMEN

La reacción del acrosoma (RA), es un evento previo a la penetración de la zona pelúcida (ZP) y fusión de membranas durante la fecundación, está gobernado por la activación de proteasas, en especial por el sistema proacrosina/acrosina en mamíferos. La presencia de este sistema ya ha sido previamente descrito en espermatozoides de alpaca por Valdivia *et al.* (2000); sin embargo, hasta la fecha se desconoce qué sistema de proteasas gobierna la RA en espermatozoides de alpaca ya que recientes estudios en espermatozoides humanos, caninos y bovinos han demostrado que enzimas con actividad tipo tripsina y quimotripsina gobiernan la RA. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes inhibidores de enzimas tipo tripsina y quimotripsina sobre la RA y la actividad proteolítica en espermatozoides de alpaca, con la finalidad de conocer qué sistema enzimático gobierna al espermatozoide de alpaca. Se evaluó el efecto de tres inhibidores de enzimas semejantes a tripsina: Benzamidina (2, 4 y 6mM), Inhibidor de tripsina de frejol de soya (SBTI) (20, 40 y 60 μ M), y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (0.6, 0.8 y 1mM); y de un inhibidor de enzimas semejantes a quimotripsina: tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) (0.25, 0.5 y 1 μ M). Se encontró que la RA y la actividad proteolítica fue más eficientemente inhibida por benzamidina (4mM) y PMSF (0.6mM), cuando estos fueron añadidos 10 minutos antes de la inducción de la reacción del acrosoma por lisofosfatidilcolina. TPCK no tuvo efecto alguno sobre la RA o la actividad proteolítica individual. Al evaluar los extractos ácidos (EAs) de espermatozoides de alpaca a pH3 en geles de actividad, se observó una gran banda de digestión de 55KDa, que corresponde a proacrosina. Los EAs fueron posteriormente activados con el incremento del pH 3 a pH 8. La activación del sistema proacrosina/acrosina fue evaluada a los 15, 30 minutos, 1, 1.5 y 2 horas de activación en geles de actividad. Se observaron tres bandas de digestión: de 55 KDa que corresponde a la proenzima proacrosina, una banda de 47 KDa que corresponde a α -acrosina y una banda de 39 KDa que corresponde a β -acrosina. Este ensayo reveló que a los 15 minutos el sistema proacrosina/acrosina está activo y que a la hora y media de activación la proenzima está

completamente activada. La fusión de membranas acrosomales, la dispersión del contenido acrosomal y la actividad proteolítica de espermatozoide de alpaca está gobernada por el sistema enzimático tipo tripsina proacrosina/acrosina.

Palabras clave: actividad proteolítica, reacción del acrosoma, inhibidores tipo tripsina, inhibidores tipo quimotripsina, acrosina.

ABSTRACT

The acrosome reaction (AR), is an event needed to zona pellucida (ZP) penetration and membrane fusion during fertilization, is controlled by the activation of proteases, especially by the proacrosin/acrosin system in mammals. The presence of that system has been already described by Valdivia et al. (2000); however, to date it is unknown under which system the AR is controlled in alpaca's sperm even though recent studies in human, canine and bovine sperm have demonstrated that trypsin-like and chymotrypsin-like enzymes controlled the AR. The aim of the present study is to evaluate the effect of different trypsin-like and chymotrypsin-like enzyme inhibitors on AR and individual proteolytic activity on alpaca's spermatozoa in order to know under which system are the alpaca's sperm controlled. The effect of three trypsin-like inhibitors: Benzamidine (2, 4 y 6mM), soybean trypsin inhibitor (SBTI) (20, 40 y 60 μ M), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (0.6, 0.8 y 1mM); and one chymotrypsin-like inhibitor, Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK) (0.25, 0.5 y 1 μ M) were tested. The AR and the individual proteolytic activity were more efficiently inhibited by benzamidine (4mM) and PMSF (0.6mM), when they were added 10 minutes before AR induction by Lysophosphatidilcoline. TPCK showed no effect on AR and proteolytic activity. Alpaca's sperm acid extracts (AE) at pH3 were also evaluated on digestion gels, a 55KDa digestion band was observed, it would correspond to proacrosin. AEs were activated by increasing the pH from 3 to 8. The proacrosin/acrosin system activated was evaluated at 15, 30 minutes, 1, 1.5 and 2 hours on digestion gels. Three digestion bands were observed: 55KDa, corresponding to proacrosin, 47KDa corresponding to acrosin- α and 39KDa, corresponding to acrosin- β . This assay reveals that after 15 minutes, the proacrosin/acrosin system is activated and after one hour and a half proacrosin is fully activated. Acrosomal membrane fusion, acrosomal content dispersion and proteolytic activity from alpaca's sperm are gobernated by an enzymatic trypsin-like proacrosin/acrosin system.

Keywords: proteolytic activity, acrosome reaction, trypsin-like inhibitors, chymotrypsin-like inhibitors, acrosin.

1. INTRODUCCIÓN

Debido a la importancia económica que la alpaca representa para el poblador altoandino, actualmente se realizan estudios en biotecnologías reproductivas para mejorar su productividad. La manipulación de gametos *in vitro* y la criopreservación de ellos son algunas biotecnologías reproductivas estudiadas. Sin embargo, una reacción temprana del acrosoma en espermatozoides de alpaca hace que los resultados finales no sean satisfactorios.

La reacción del acrosoma (RA) es un evento necesario previo a la penetración de la zona pelúcida y fusión de membranas durante la fecundación. Por lo tanto, es importante que los espermatozoides conserven el acrosoma intacto cuando se encuentren con el ovocito. La RA está gobernada por proteasas que activan proteínas acrosomales para la posterior degradación de las proteínas de la zona pelúcida, siendo el sistema enzimático proacrosina/acrosina el más importante dentro del acrosoma de mamífero. Inhibidores sintéticos de proteasas acrosomales han sido ampliamente utilizados para estudiar la fisiología espermática e identificar el tipo de actividad enzimática que gobierna la RA.

Actualmente, no se cuentan con estudios suficientes que describan los mecanismos envueltos en la reacción del acrosoma y más aún que describan que tipo de sistema enzimático gobierna el acrosoma de espermatozoides de alpacas. En este contexto, sabiendo que tipo de actividad enzimática gobierna el acrosoma del espermatozoide de alpaca, el uso de inhibidores sintéticos de proteasas específicos para este sistema enzimático pueden ser incluidos en los medios de cultivo para tratar los espermatozoides de tal manera que el acrosoma pueda ser conservado intacto hasta el momento de la fertilización.

2. MARCO TEORICO

2.1 El acrosoma

El acrosoma es una organela espermática que se encuentra cubriendo la parte anterior del núcleo de la cabeza del espermatozoide (Figura 1) y se origina del Aparato de Golgi y contiene enzimas que son esenciales para que el espermatozoide penetre la zona pelúcida del ovocito y pueda fertilizarlo (Yanagimachi 1994).

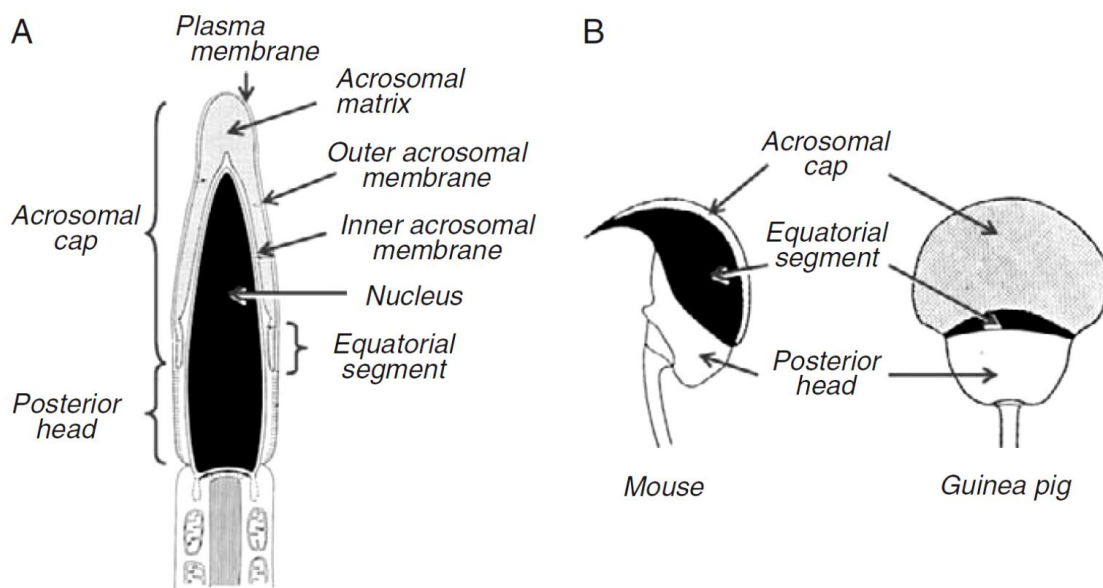


Figura 1. Organización de la cabeza del espermatozoide de mamífero. A: Muestra las organelas internas en la cabeza, que consisten en el núcleo y el acrosoma. B: Compara las características generales que comparten los espermatozoides de ratón (*Mus musculus*) y de cobayo (*Cavia porcellus*), a pesar de poseer formas diferentes. Tomado de Yanagimachi (1994).

La unión del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP) y su posterior penetración son pasos importantes durante la fertilización (Yanagimachi 1994). Estos mecanismos aún permanecen en estudio para muchos mamíferos, entre los que se encuentran los camélidos. En el ratón (*Mus musculus*), el espermatozoide se une a la ZP con el acrosoma intacto y la reacción del acrosoma ocurre sobre la ZP, inducida por una de las glicoproteínas de la ZP, la proteína de la zona pelúcida 3 (ZP3) (Bleil y Wassarman 1988). La forma de

la cabeza, motilidad y actividad de la acrosina del espermatozoide están fuertemente involucradas en la penetración de este a la ZP.

Ultraestructuralmente, la reacción del acrosoma es un evento secretorio que consiste de fusiones específicas y progresivas entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que reviste el acrosoma (Figura 2), resultando en la vesiculación de estas membranas y la dispersión de la matriz acrosomal (Barros *et al.*, 1967, Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Durante este proceso la proacrosina es activada en acrosina, siendo esta conversión importante para la unión y penetración a la ZP (Yanagimachi 1994, 2011).

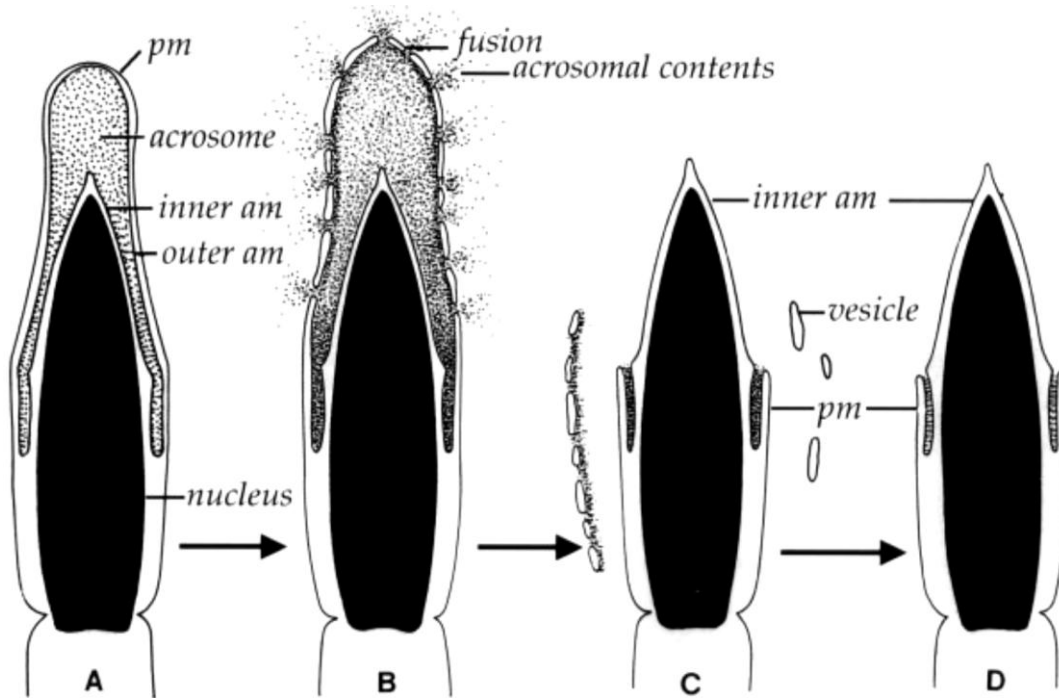


Figura 2. Diagrama que ilustra las características morfológicas de la cabeza de un espermatozoide de ratón (*Mus musculus*) con el acrosoma intacto (A), el acrosoma reaccionando y mostrando cómo se fusionan las membranas (B y C) y después de la reacción del acrosoma (D). Inner a.m.: Membrana acrosomal interna, Outer a.m.: membrana acrosomal externa, PM: membrana plasmática, N: núcleo. Tomado de Yanagimachi (1994).

2.2 Reacción del acrosoma

Cuando se da la interacción entre el espermatozoide y la ZP, ZP3 se une al receptor para la proteína de zona pelúcida 3 (ZRK) que a su vez se une a la proteína G, activando la fosfolipasa C (PLC), para inducir la hidrólisis del fosfatidil inositol difosfato (PIP₂) con generación de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). El DAG activa la proteína quinasa C (PKC), lo que lleva a la apertura de un canal dependiente de voltaje en la membrana plasmática y permite el ingreso de altas cantidades de calcio (Ca⁺⁺) (Baldi *et al.*, 2000). El IP₃ y la proteína quinasa A (PKA) abren un canal en la membrana acrosomal externa, lo que lleva a la disminución del Ca⁺⁺ intraacrosomal, y esto activa el canal de Ca⁺⁺ “capacitante” en la membrana plasmática para promover la entrada de Ca⁺⁺ en el espacio intracelular espermático (Figura 3) (Breitbart *et al.*, 2010, Yamashita *et al.*, 2007).

La proteína G, activa también un intercambiador de sodio/hidrógeno (Na⁺/H⁺) en la membrana plasmática, que promueve la alcalinización del pH citosólico. El incremento de Ca⁺⁺ regula su propia salida tanto en la membrana plasmática como de la acrosomal, mediante la activación de canales de Ca⁺⁺ dependiente de ATP, y de la activación de los intercambiadores de H⁺/ Ca⁺⁺ (Baldi *et al.*, 2000). La PKA fosforila los residuos de serina de las proteínas (PSP); éstas, a su vez, fosforilan los residuos de tirosina de las proteínas citosólicas que junto con el aumento del pH y de Ca⁺⁺ citosólico, permiten la fusión de membranas (citoplasmática y acrosomal externa), y de esta manera se produce la exocitosis del contenido enzimático del acrosoma (Figura 3) (Ickowicz *et al.*, 2012, Lefievre *et al.*, 2002).

Espermatozoides sin acrosoma y sin motilidad no pueden penetrar una ZP intacta (Yamashita *et al.*, 2007, Yanagimachi 1994). Solo espermatozoides capacitados pueden responder a inductores naturales de la reacción del acrosoma, tales como la progesterona o las proteínas de la ZP.

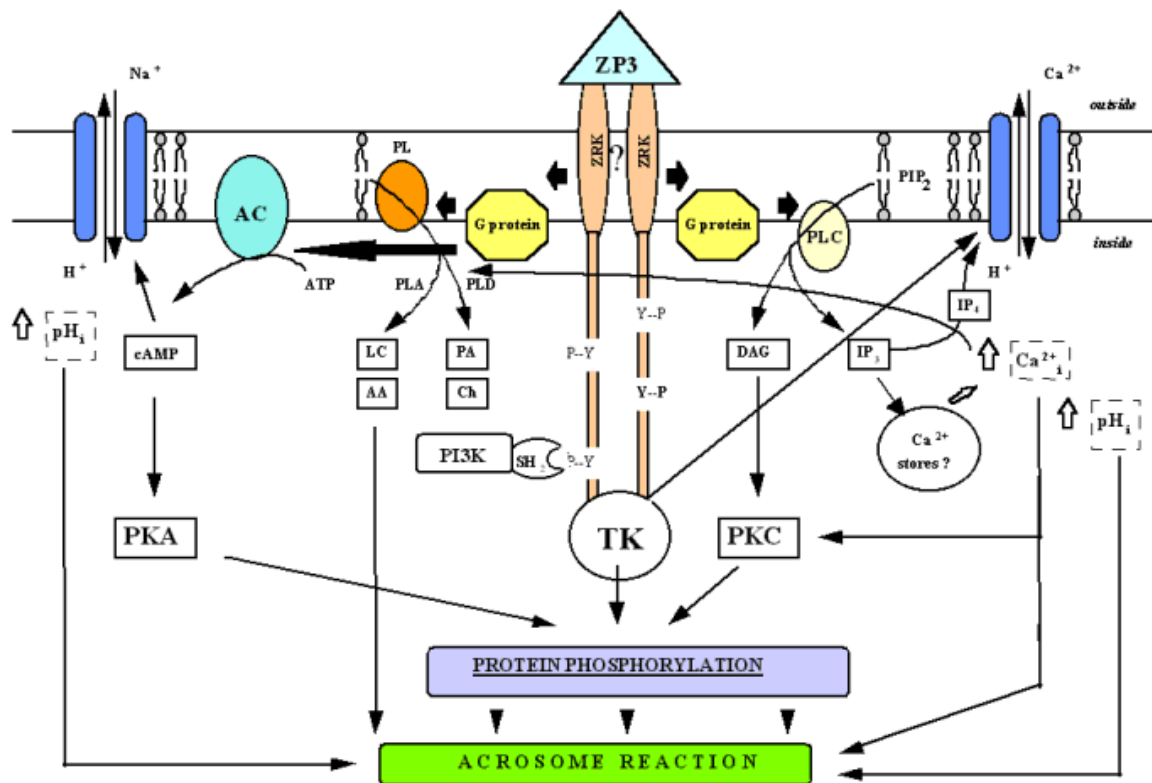


Figura 3. Representación esquemática de los eventos intracelulares en el espermatozoide mamífero previos a la reacción del acrosoma. Después de la interacción de la proteína de zona pelúcida 3 (ZP3) con su respectivo receptor (ZRK) en la membrana plasmática del espermatozoide, el receptor se autofosforila y a través de una proteína G transduce la señal para activar la fosfolipasa C (PLC) e induce la fosforilación de proteínas kinasas (TK). Por acción de esta, se genera inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) y se incrementará el segundo mensajero adenosina monofostado cíclico (cAMP). Como consecuencia, la proteína quinasa C (PKC) y la proteína quinasa A (PKA) son fosforiladas e IP_3 promueve el incremento de calcio (Ca^{++}), iniciando así la reacción del acrosoma. Tomado de Baldi (2000).

La motilidad hiperactivada de espermatozoides capacitados provee al espermatozoide de la fuerza necesaria para penetrar la ZP (Liu *et al.*, 2007). En el acrosoma de los espermatozoides hay proteasas que cumplen principalmente dos funciones: Activación o modulación de proteínas acrosomales y degradación selectiva de proteínas de la ZP, siendo la importancia de esta segunda función cada vez más reconocida. Se ha demostrado que las proteasas están envueltas en procesos mediados por receptores tales como en la modulación del receptor β -adrenérgico del sistema adenilciclasa y en la acción de la insulina (Lampiao y du Plessis 2008).

En el acrosoma de espermatozoides de mamíferos se han identificado proteínas que tienen actividad proteolítica y enzimática, péptidos bioactivos y proteínas con función desconocida (Yanagimachi 1994). Entre las proteínas que se han podido identificar se encuentran: Una peptidasa tipo colagenasa de 110KDa, una proteasa tipo catepsina D, diferentes proteasas tipo tripsina, como la acrosina, una serino proteasa de 75KDa y una dipeptil peptidasa II de 280KDa (Honda *et al.*, 2002).

2.3 Sistema proacrosina/acrosina

De las enzimas presentes en el acrosoma, el sistema proacrosina/acrosina es el que más destaca, ya que media la interacción gamética. Por medio de estudios inmunocitoquímicos en espermatozoides de hámster (*Mesocricetus auratus*), humanos (*Homo sapiens*), cobayo (*Cavia porcellus*) (Barros *et al.*, 1992), conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Richardson *et al.*, 1991, Valdivia *et al.*, 1994) y toro (*Bos taurus*) (De los Reyes y Barros 2000) se ha descrito que este sistema está localizado durante la reacción del acrosoma en el ápice de la cabeza del espermatozoide, luego en la región acrosomal, y finalmente sobre la región ecuatorial y post acrosomal. Hay evidencia de que el sistema proacrosina/acrosina está presente en el acrosoma de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) (Valdivia *et al.*, 2000), pero aún no se ha podido establecer el tipo de actividad de este sistema ni su función dentro del proceso de fertilización.

La acrosina, la enzima acrosomal más extensamente estudiada es una serinoproteasa tipo tripsina que juega un rol importante en la interacción del espermatozoide con la ZP (Topfer-Petersen *et al.*, 1990). Esta enzima está presente en su forma zimógena en el acrosoma, como proacrosina (Polakoski y Parrish 1989) y se ha demostrado que su estructura primaria puede ser dividida en 3 dominios: El dominio I que codifica los aminoácidos de la cadena ligera; el dominio II que tiene residuos de la cadena pesada de la cadena madura; el dominio III que tiene la región carboxi terminal (C-terminal) de la cadena pesada; esta región no está presente en otros miembros de la superfamilia de serino proteasas y es única en su alto contenido de prolina (Baba *et al.*, 1989).

Durante la reacción del acrosoma, la proacrosina se convierte en una enzima madura y es liberada. La proenzima purificada de 55KDa es autoactivada a α -acrosina de 49KDa y luego a β -acrosina de 35KDa *in vitro* a pH básico (Polakoski y Parrish 1989).

Se ha demostrado que la fecundación no ocurre cuando la actividad de la enzima es inhibida (Zaneveld, 1973). Estudios realizados por Stambaugh *et al.* (1969); y Polakoski (1973) demuestran que extractos acrosomales o fracciones purificadas de acrosina de conejo disuelven la ZP *in vitro*. Zahn *et al.* (2002) encontraron que los extractos acrosomales crudos son más efectivos en disolver la zona que la acrosina pura.

Por medio de geles SDS-PAGE de actividad, se ha evaluado el sistema proacrosina/acrosina de extractos crudos acrosomales sin la necesidad de purificar la proteína en espermatozoides humanos (Siegel y Polakoski 1985, Zahn *et al.*, 2002). Logrando identificar y evaluar los intermediarios de activación de este sistema, con regiones proteolíticas de 47 a 54KDa y de 34 a 38KDa. Este ensayo fue usado para estudiar alteraciones en la activación de la proacrosina en acrosina en muestras de pacientes humanos infértiles, logrando con esto identificar una de las causas de la infertilidad de estos hombres.

2.4 Evaluación de la actividad proteolítica de espermatozoides

Gaddum y Blandau (1970), diseñaron un método para estudiar el potencial de las diferentes poblaciones de espermatozoides de penetrar la zona pelúcida y evidenciar su actividad proteolítica, esta técnica se llama test de gelatina. Hasta la fecha esta técnica ha sido usada con resultados muy satisfactorios, en especies como humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*), hámster (*Mesocricetus auratus*), cobayo (*Cavia porcellus*), rata (*Rattus norvegicus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Valdivia *et al.*, 1999), toro

(*Bos taurus*) (De los Reyes y Barros 2000) y perro (*Canis lupus*) (Deppe *et al.*, 2010).

Con respecto de la actividad proteolítica individual de espermatozoides tratados con inhibidores y evaluados con el test de gelatina, se describe que Aprotinina, un inhibidor de enzimas tipo tripsina, en concentraciones de 1 a 10 mmol/L causa de moderada a completa inhibición de la actividad proteolítica en espermatozoides de humano (*Homo sapiens*); y a una concentración de 12.5 a 1000 µg/ml hay completa inhibición de la actividad proteolítica en espermatozoides de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Pakzad 1989).

2.5 Uso de Inhibidores de proteasas para estudiar la fisiología del espermatozoide

Por medio de estudios con microscopía óptica se ha observado que inhibidores sintéticos de tripsina, conocidos por inhibir una variedad de enzimas tipo tripsina incluyendo la acrosina, inhiben la reacción del acrosoma *in vitro* de espermatozoides de hámster (*Mesocricetus auratus*) y de cobayo (*Cavia porcellus*) (Zaneveld *et al.*, 1993). Demostrando que la acrosina, es la proteasa predominante en el acrosoma, jugando un rol importante en la reacción del acrosoma (Liu y Baker 1993). Sin embargo, no siempre los inhibidores actúan al mismo nivel, ello dependiendo de su peso molecular. La vesiculación de membranas de la reacción del acrosoma es inhibido por inhibidores de tripsina sintéticos en espermatozoides de hámster (*Mesocricetus auratus*), (Lui y Meizel 1979); mientras que la dispersión de la matriz acrosomal fue bloqueada, cuando los inhibidores de tripsina sintéticos fueron añadidos previa inducción de la reacción del acrosoma con ionóforo de calcio A23187 en espermatozoides de cobayo (*Cavia porcellus*) (Green 1978).

Varios investigadores han usado diferentes inhibidores sintéticos de tripsina sobre espermatozoides de diferentes especies. Perreault *et al.* (1982), evaluaron el efecto inhibitorio de p-nitrofenil-p-benzoato de guanidina (NPGB),

benzamidina y p-aminobenzamidina (pAB) sobre la reacción acrosomal de espermatozoides de cobayo, encontrando que NPGB a una concentración de $8 \times 10^{-5} \text{M}$ suprime totalmente la reacción del acrosoma, mientras que benzamidina y pAB a concentraciones de $7.5 \times 10^{-4} \text{M}$ y $7.5 \times 10^{-5} \text{M}$ respectivamente, retrasan la ocurrencia de la reacción acrosomal pero no la suprimen. Para los 3 casos, el porcentaje de motilidad de los espermatozoides tratados no fue afectada. Además, mediante estudios de microscopía electrónica, Perreault *et al.* (1982) demuestran que la inhibición en espermatozoides de cobayo (*Cavia porcellus*) es a nivel de la dispersión de la matriz acrosomal y no en la vesiculación de membranas.

De Lamirande y Gagnon (1986), utilizan diversos inhibidores sintéticos, entre los que destacan el inhibidor de tripsina de frejol de soya (SBTI), el inhibidor de tripsina de frejol de lima (LBTI), Aprotinina, benzamidina y leupeptina. El efecto de estos inhibidores fue evaluado sobre la reactivación de espermatozoides de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), rata (*Rattus norvegicus*), toro (*Bos taurus*) y humano (*Homo sapiens*); encontrando que solo aprotinina pudo inhibir la motilidad espermática en un rango de 0.5 a $2.6 \mu\text{M}$ para las cuatro especies evaluadas, demostraron que una serino proteasa está envuelta en la regulación de la motilidad espermática.

Espermatozoides humanos (*Homo sapiens*) y de hámster (*Mesocricetus auratus*) tratados con SBTI a una concentración de $125 \mu\text{M}$ son inhibidos de ligar a sus respectivas ZP, indicando esto que una serina proteasa está envuelta a nivel de unión del espermatozoide a la ZP (De Ioannes *et al.*, 1990). Mientras que espermatozoides humanos capacitados tratados con benzamidina 1mM , logran prevenir el incremento de Calcio intracelular necesario para la reacción acrosómica e iniciado por progesterona. Demostrando que la actividad tipo tripsina en espermatozoides humanos puede estar directa o indirectamente involucrado en el incremento de calcio en el espermatozoide durante la estimulación por progesterona. Adicionalmente, por medio de microscopía electrónica se evidencia que la fusión de membranas de la reacción acrosomal es bloqueada (Pillai y Meizel 1991).

Al evaluar el efecto de SBTI, tosil lisina clorometil cetona (TLCK), tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sobre la reacción del acrosoma y la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida en espermatozoides capacitados de bovinos (*Bos taurus*); se encontró que proteasas tipo tripsina (SBTI Y TLCK) y quimotripsina (TPCK) pero no metaloproteasas (EDTA) ejercen acción sobre la reacción del acrosoma y que ninguna de estas proteasas está envuelta en la unión del espermatozoides a la ZP (Deppe *et al.*, 2008, Sanchez *et al.*, 1995). En un estudio posterior utilizando los inhibidores SBTI, NPGB y TPCK, el mismo grupo describe que la reacción del acrosoma en espermatozoides caninos está gobernado por enzimas tipo tripsina y quimotripsina (Deppe *et al.*, 2010).

En las últimas dos décadas, se han hecho diversos estudios utilizando inhibidores de proteasas sintéticos los cuales han colaborado en el conocimiento básico de los mecanismos involucrados en la reacción acrosomal y en la interacción de gametos.

3. HIPÓTESIS

3.1 HIPÓTESIS ALTERNATIVA

H1: La reacción del acrosoma y la actividad proteolítica de espermatozoides de alpaca está gobernada por un sistema enzimático tipo tripsina.

3.2 HIPÓTESIS NULA

H0: La reacción del acrosoma y la actividad proteolítica de espermatozoides de alpaca no está gobernada por un sistema enzimático tipo tripsina

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Identificar y evaluar el mecanismo de activación del sistema proacrosina/acrosina en espermatozoides de alpaca.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar el efecto de inhibidores sintéticos de las enzimas semejantes a tripsina y quimotripsina sobre la actividad proteolítica del sistema proacrosina/acrosina
2. Evaluar el estado del acrosoma en presencia de los inhibidores de las enzimas semejantes a tripsina y quimotripsina.
3. Evaluar el patrón de activación del sistema proacrosina/acrosina a través de geles de actividad.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Material Biológico:

Testículos de alpacas macho adultos procedentes del camal Municipal de Huancavelica - Perú

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Colección de la muestra

Testículos de alpacas fueron colectados y trasladados en Suero Fisiológico a 4°C hasta el Laboratorio de Fisiología de Reproducción Animal – UNMSM. En el laboratorio se procedió a aislar los epidídimos, de los cuales solo se utilizó la región de la cola. Las colas de los epidídimos fueron aisladas en medio de cultivo HAM-F10 sin suero albumina bovina (SAB) atemperado a 37°C, se procedió a la extracción de los espermatozoides de esa región haciendo pequeñas incisiones en la cola del epidídimo. Todos los reactivos utilizados en el desarrollo del presente trabajo, a menos que se haga una indicación, fueron de marca Sigma.

5.2.2 Capacitación y reacción del acrosoma

Los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo fueron lavados 2 veces en medio HAM-F10 mediante centrifugaciones de 700 revoluciones por minuto (rpm) por 7 minutos cada vez. El precipitado final fue resuspendido en medio HAM-F10 suplementado con 4mg/ml de SAB a una concentración final de 40×10^6 espermatozoides/ml. El medio se añadió lentamente sin remover el precipitado para luego realizar un “swim up” (esta técnica es utilizada para asegurar una población espermática con buena motilidad). Los microtubos fueron incubados a 37°C/5%CO₂ por 4 horas.

Al término de este tiempo se extrajeron alícuotas de 0.125 ml y se agregaran a microtubos que contenían medio HAM-F10 con los inhibidores a evaluar. La concentración final de cada microtubo fué de 5×10^6 espermatozoides/ml. Seguido a un periodo de equilibrio de 10 minutos se añadió lisofosfatidilcolina (LC) 100 μ g/ml como inductor de la reacción del acrosoma.

5.2.3 Inhibidores

Se utilizaron 4 inhibidores sintéticos para este estudio: Inhibidor de tripsina de frejol de soya (SBTI), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Benzamidina y tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK). SBTI es un inhibidor reversible de serino proteasas tipo tripsina. PMSF es un inhibidor irreversible de serino proteasas tipo tripsina y quimotripsina. Benzamidina es un inhibidor reversible de serino proteasas tipo tripsina. TPCK es un inhibidor irreversible de enzimas tipo quimotripsina

SBTI y benzamidina fueron disueltos en el medio HAM-F10 usado inmediatamente antes de su uso. TPCK fue disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO) para hacer el stock inicial y a partir de ahí se hizo una segunda dilución en HAM-F10. PMSF se disolvió en etanol y luego fue diluido en HAM-F10; la concentración final de etanol a la cual estuvieron expuestos los espermatozoides fue de 1%.

5.2.4 Medición de la actividad proteolítica individual

Las láminas con substrato de gelatina fueron preparadas con una solución de gelatina al 2.5%. Los espermatozoides del epidídimo capacitados control (sin ser tratados con inhibidores) y aquellos que fueron tratados con inhibidores por una hora fueron extendidos sobre la superficie de las láminas e incubados a 37°C para permitir la proteólisis de la gelatina por el contenido acrosomal. A intervalos 5, 10, 20, 30 y 60 minutos, 10 μ l de cada tratamiento fueron colocados en las láminas de gelatina y al cabo de un período de

incubación de 24 horas se observaron en el microscopio óptico. La formación de un claro halo alrededor de la cabeza del espermatozoide nos indica la actividad proteolítica de las enzimas del contenido acrosomal.

5.2.5 Evaluación del estado de la membrana acrosomal

Para la evaluación del estado del acrosoma se usó la sonda fluorescente aglutinina de *Pisum sativum* con Isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), la cual nos permitió observar la presencia y el estado del acrosoma en espermatozoides de alpaca.

Para esta evaluación, al mismo tiempo que se extraen alícuotas de cada tratamiento con los inhibidores para la evaluación de la actividad proteolítica individual, en una lámina portaobjeto limpia se coloca una alícuota de 10µl de muestra y se fija con paraformaldehído al 4% por 10 minutos. Luego se lava con buffer fosfato salino (PBS) 1X por 5 minutos. Así la lámina queda lista para realizar la tinción fluorescente con FITC-PSA. Las láminas con las muestras fijadas fueron incubadas con la sonda a 4°C por 30 minutos protegidas de la luz. Luego de esto las láminas fueron lavadas con PBS 1X. El montaje de la lámina se realizó con 1,4-diazobicyclo[2.2.2]octane (DABCO) en glicerol, cubierta con un cubreobjeto y el análisis de los espermatozoides se hizo a 100X.

El criterio de evaluación fue el siguiente:

1. Acrosoma intacto: Fluorescencia en todo el acrosoma porque el fijador permeabiliza las membranas entonces el FITC se adosa en la membrana acrosomal externa.
2. Acrosoma reaccionando: Fluorescencia interrumpida, porque se esta fusionando la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa.
3. Acrosoma reaccionado: Fluorescencia solo en la región ecuatorial o no hay fluorescencia.

Los patrones 2 y 3 fueron considerados como acrosomas reaccionados. Se contabilizaron 100 espermatozoides por lámina.

5.2.6 Extracción de enzimas acrosomales

Las proteínas acrosomales fueron extraídas según el método descrito previamente por Leyton *et al.* (1986). Los espermatozoides de la cola del epidídimo se lavaron centrifugándolos 2 veces con PBS a 800 rpm por 5 minutos cada vez, luego de la última lavada, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 5 ml de solución acuosa de Triton X-100 0.1% y se centrifugó inmediatamente a 1000 rpm por 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con HCl 1mM y glicerol al 10%, se ajustó el pH a 2.8. Finalmente, se incubó toda la noche a 4° C luego, para luego centrifugarlo a 10,000rpm por 30 minutos para rescatar el sobrenadante, el cual se almacenó a -20°C.

5.2.7 Evaluación de la proteólisis de extractos ácidos activados a pH8 a diferentes tiempos sobre geles SDS-PAGE de digestión

El gel SDS-PAGE conteniendo gelatina fue preparado según Siegel y Polakoski (1985), con algunas modificaciones. Los geles de acrilamida al 12% (0.75mm) fueron preparados como esta descrito por Laemmli (1970) excepto que gelatina a una concentración del 0.1% fue solidificada en el gel de resolución. El gel de apilamiento ("stacking") no contiene gelatina.

Los extractos ácidos de espermatozoides de alpaca fueron activados con buffer Tris a pH8 y se evaluó el patrón de activación del sistema proacrosina/acrosina a los 15, 30 minutos, 1, 1.5 y 2 horas. La activación fue detenida añadiendo el buffer muestra (Anexo 1) y almacenando la muestra a -20°C hasta que se realice la electroforesis.

Las muestras se corrieron bajo condiciones no denaturantes a una corriente constante de 20mA a 4°C por aproximadamente 2.5 horas. Luego, los geles se retiraron de la cámara electroforética y fueron colocados en un

reservorio con Triton X-100 al 2.5% en buffer Tris HCl 50mM a temperatura ambiente por una hora; enseguida se hicieron tres lavados uno con agua destilada y los otros dos con buffer Tris HCl 50mM pH 8.0 por 10 minutos cada lavado, para remover el Triton X-100. Luego el gel se incubó en buffer Tris HCl 50mM pH8.0 por 18 horas a 38°C. Al cabo de este tiempo luego de teñir el gel con Serva Blue se pudieron observar bandas claras de digestión.

5.2.8 Western Blot para identificar el sistema proacrosina/acrosina en extractos ácidos de espermatozoides de alpaca

Luego de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45µm de poro. Esta transferencia se lleva a cabo a 350mA constante por 1 hora y 10 minutos a 4°C. La membrana se bloqueó con buffer de bloqueo (Anexo 2) a 4°C toda la noche y luego se lavó con el buffer de lavado (Anexo 2) 3 veces por 5 minutos cada vez. Se incubó con el anticuerpo primario C5F10 (1:1000, Biosonda, Santiago de Chile) disuelto en buffer de incubación (Anexo 2) por 3 horas a temperatura ambiente. La membrana se lavó con buffer de lavado por 3 veces por 5 minutos cada vez. Luego se incubó con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón (1:3000) con una partícula de oro adherida (AuroProbe One GAR), disuelto en buffer de incubación por 3 horas a temperatura ambiente. La membrana fue lavada con buffer de lavado por 3 veces por 5 minutos cada vez, luego con PBS 1X por 3 veces por 5 minutos cada vez y finalmente con agua destilada 2 veces por 5 minutos cada vez. La visualización de la bandas se hizo con el Kit IntenSEM Intense tmM Silver Enhancement (Amersham). Cuando se visualizaron las bandas la reacción se detuvo con agua destilada.

5.2.9 Análisis Estadístico

Se hizo un ANOVA de un factor para comparar medias y la prueba de Tukey para identificar entre que tratamientos hubieron diferencias. Los datos fueron expresados en medias \pm desviación estándar, y las diferencias fueron aceptadas como significativas cuando $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación del estado del acrosoma en presencia de los inhibidores tipo tripsina y quimotripsina.

El efecto de los inhibidores tipo tripsina (SBTI, benzamidina, PMSF) y tipo quimotripsina (TPCK) sobre el estado del acrosoma de espermatozoides de alpaca fue evaluado mediante el uso de la sonda fluorescente FITC-PSA (Figura 1).

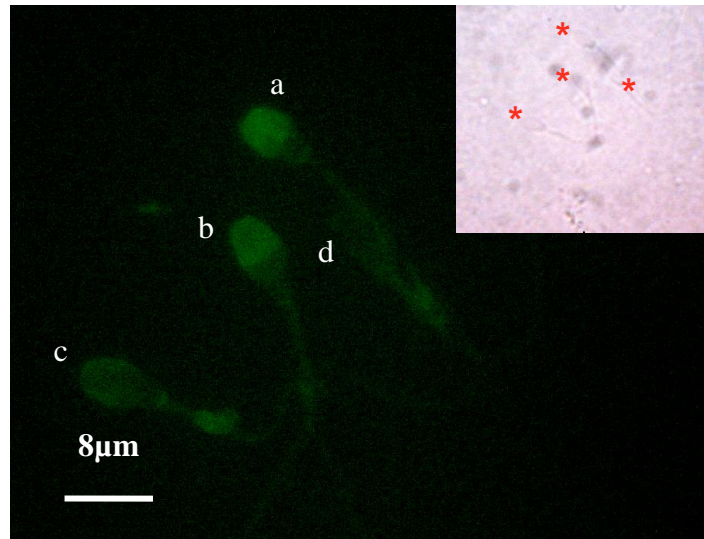


Figura 1. Evaluación del acrosoma en espermatozoides de alpaca por medio de marcaje con FITC-PNA. (a) Espermatozoide con acrosoma intacto, (b) y (c) espermatozoide con acrosoma reaccionando y (d) espermatozoide con acrosoma reaccionado. Los espermatozoides señalados como a, b, c y d son señalados en asterisco rojo en su respectiva imagen en campo claro. Magnificación 1000X.

El inhibidor SBTI (inhibidor reversible de enzimas tipo tripsina), en todas las concentraciones evaluadas, no inhibió la reacción del acrosoma en espermatozoides capacitados de alpaca (Figura 2). Contrariamente, con las tres concentraciones evaluadas de Benzamidina (inhibidor reversible de enzimas tipo tripsina) y de PMSF (inhibidor irreversible de enzimas tipo tripsina), la reacción del acrosoma fue significativamente inhibida en espermatozoides capacitados con respecto al control ($P < 0,05$) (Figura 3 y 4).

Mientras que el inhibidor TPCK (inhibidor de enzimas tipo quimotripsina), en todas las concentraciones evaluadas, no inhibió de la reacción del acrosoma en espermatozoides capacitados de alpaca, no siendo significativamente diferente del Control (Figura 5).

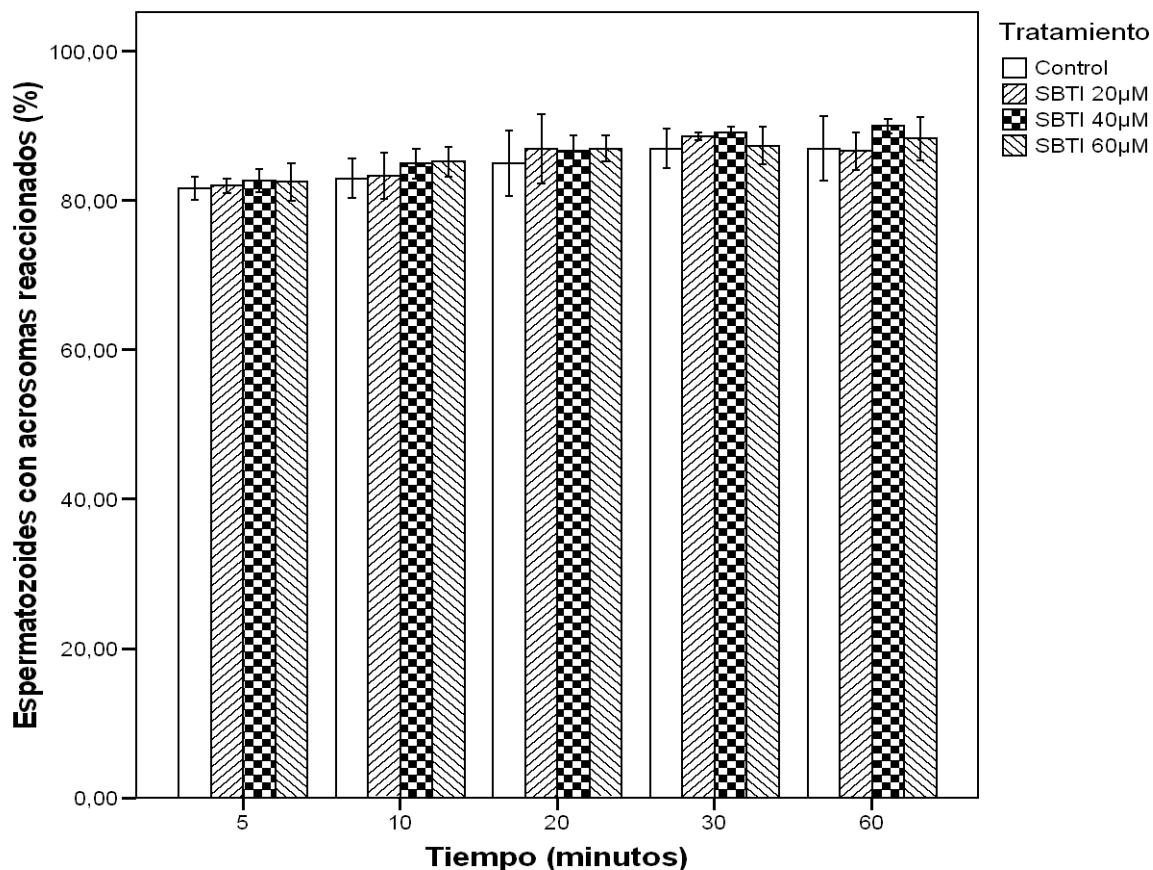


Figura 2.- Efecto del inhibidor SBTI (20, 40 y 60µM) sobre la reacción del acrosoma (RA) en espermatozoides de alpaca. El inhibidor fue añadido a las 3hrs 45 minutos de capacitación con medio HAM-F10. La RA no fue inhibida en presencia de SBTI. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para cada tiempo evaluado. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar (DE) del % de acrosomas reaccionados.

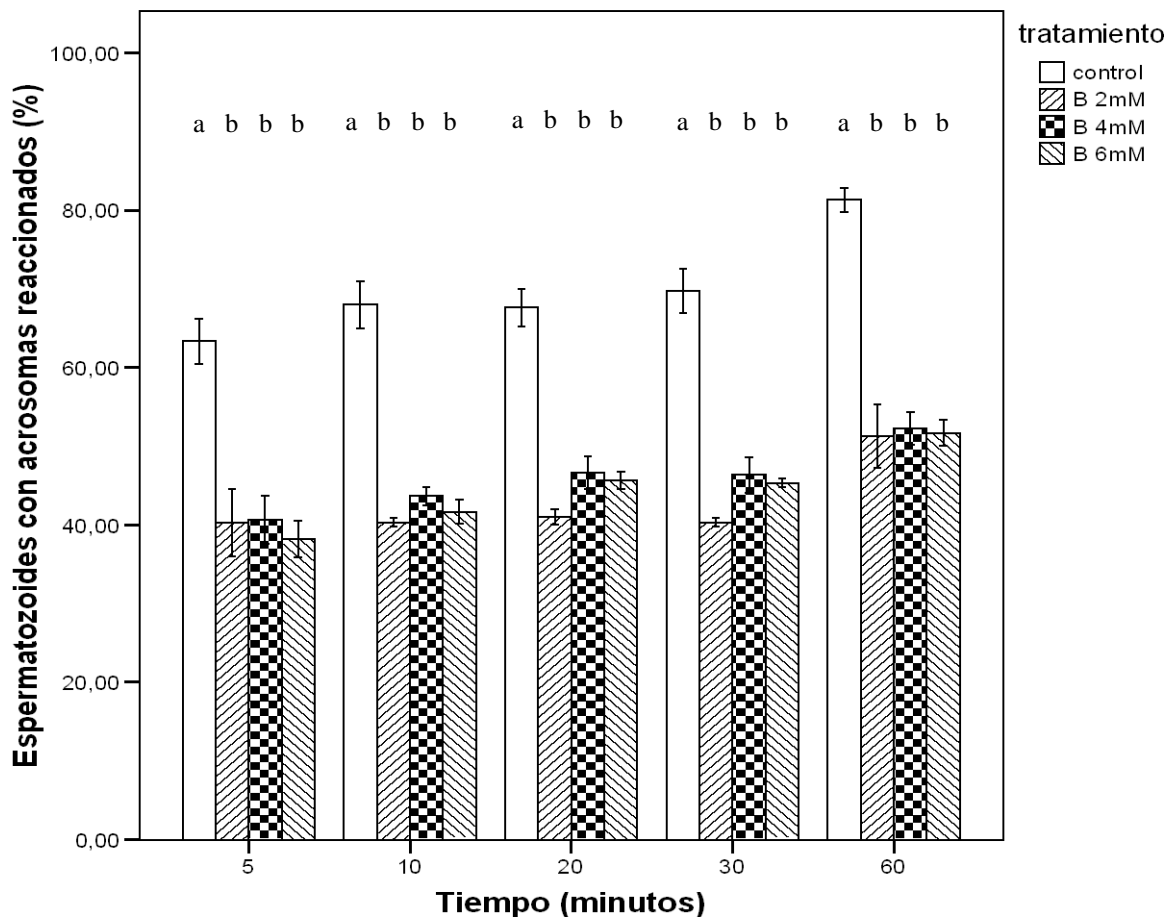


Figura 3.- Efecto del inhibidor Benzamidina (2, 4 y 6 mM) sobre la reacción del acrosoma (RA) de espermatozoides de alpaca. El inhibidor fue añadido a las 3hrs 45 minutos de capacitación con medio HAM-F10. La RA fue significativamente inhibida en presencia de Benzamidina. Cada barra representa el promedio \pm DE del % de acrosomas reaccionados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por cada tiempo evaluado ($P < 0.05$).

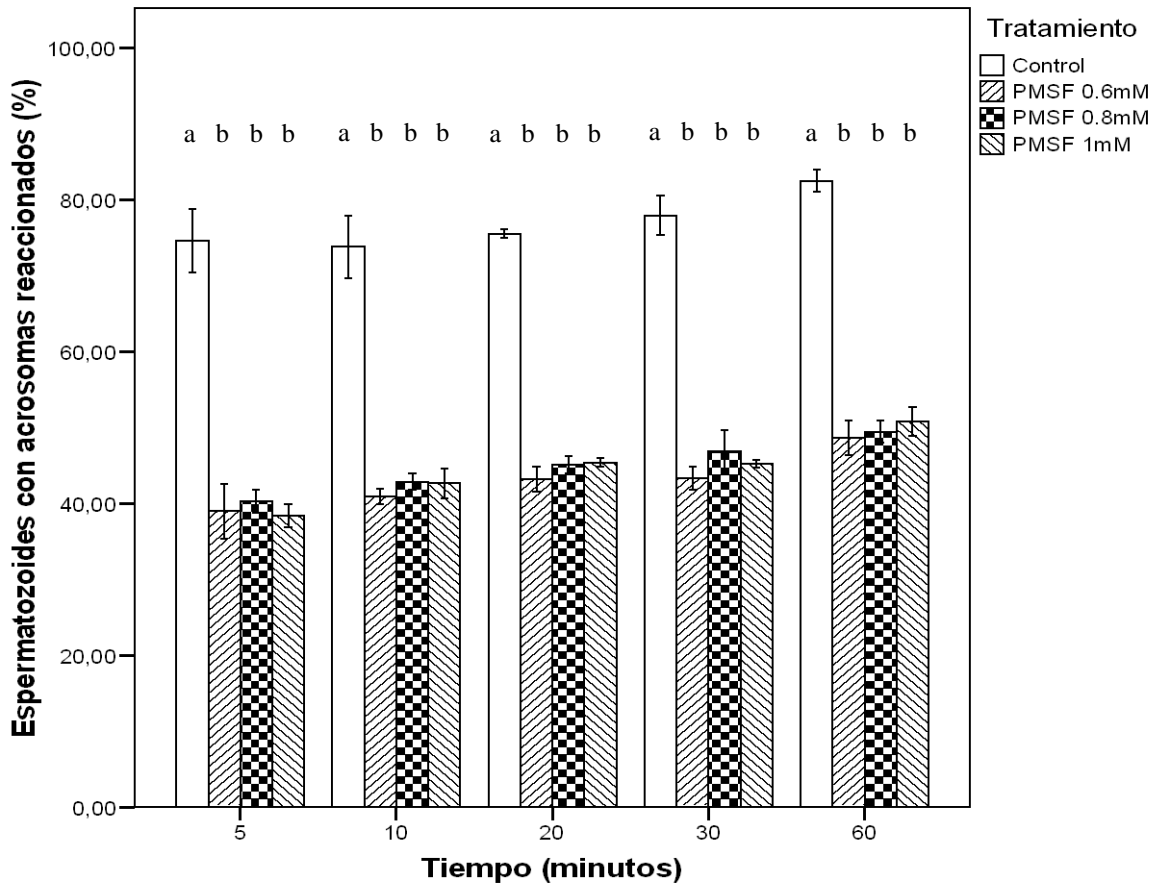


Figura 4.- Efecto del inhibidor PMSF (0.6, 0.8 y 1mM) sobre la reacción del acrosoma (RA) de espermatozoides de alpaca. El inhibidor fue añadido a las 3hrs 45 minutos de capacitación con medio HAM-F10. La RA fue significativamente inhibida en presencia de PMSF. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar (DE) del % de acrosomas reaccionados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por cada tiempo evaluado ($P < 0.05$).

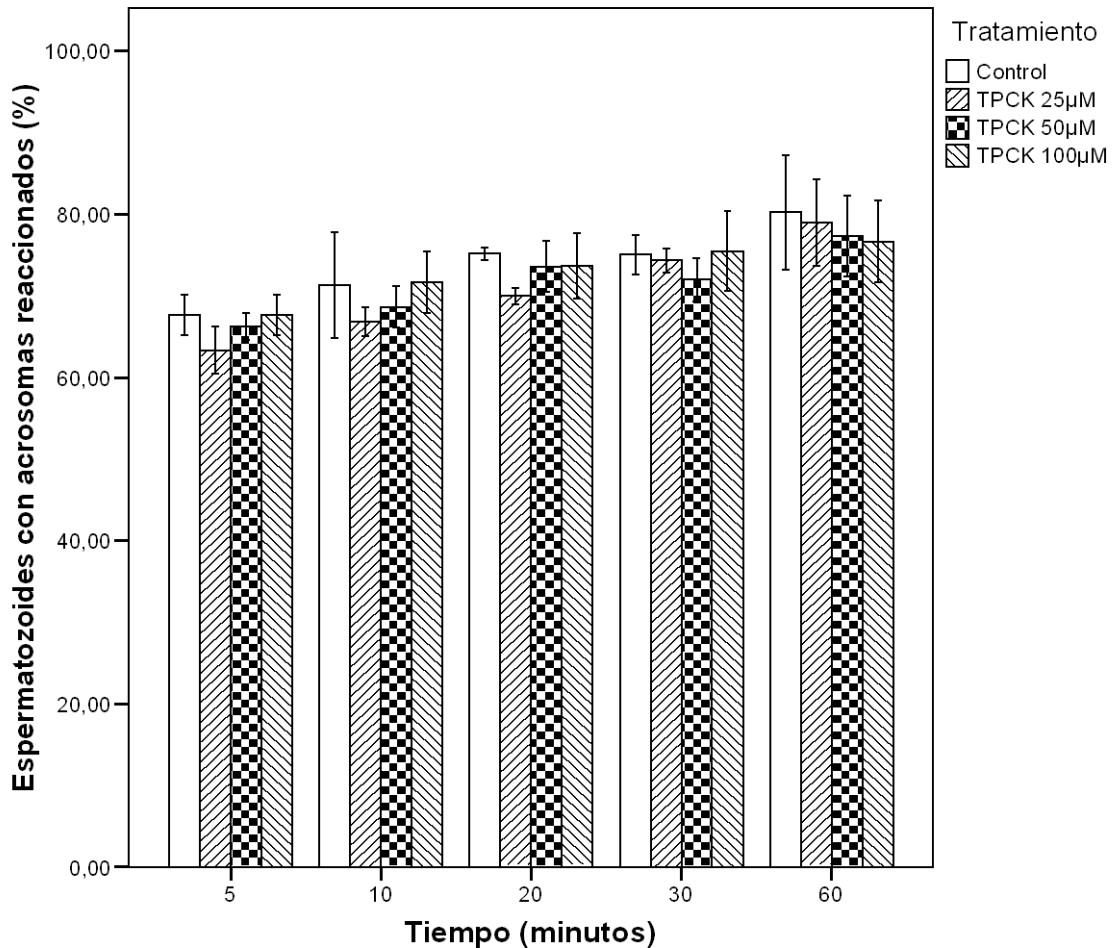


Figura 5.- Efecto del inhibidor TPCK (25, 50 y 100µM) sobre la reacción del acrosoma de espermatozoides de alpaca. El inhibidor fue añadido a las 3hrs 45 minutos de capacitación con medio HAM-F10. La RA no fue inhibida en presencia de TPCK. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para cada tiempo evaluado. Cada barra representa el promedio \pm DE del % de acrosomas reaccionados.

6.2 Efecto de inhibidores de proteasas sintéticos tipo tripsina y quimotripsina sobre la actividad proteolítica.

El efecto de los inhibidores sobre la actividad proteolítica de espermatozoides de alpaca fue evaluado sobre sustratos de gelatina. La presencia de un halo de digestión alrededor de la cabeza del espermatozoide indica actividad proteolítica positiva (Figura 6), mientras que la ausencia de este indica actividad proteolítica negativa (Figura 7).

Bajo los efectos de SBTI (40 y 60 μ M), la actividad proteolítica fue significativamente inhibida a partir de los 5 minutos de evaluación en comparación con el control y SBTI 20 μ M ($P < 0.05$). El efecto inhibitorio de SBTI 20 μ M (14%) fue significativamente más alto que el Control (5.33%) a los 10 minutos ($P < 0.05$), siendo constante hasta los 30 minutos de evaluación. Sin embargo, SBTI 20 μ M (53%) volvió a ser significativamente más alto que el Control (25.67%) a los 60 minutos ($P < 0.05$). Mientras que en los espermatozoides tratados con SBTI 40 y 60 μ M la inhibición permaneció constante durante los 60 minutos de evaluación (Figura 8).

Benzamidina 2, 4 y 6mM inhibieron significativamente la actividad proteolítica de espermatozoides de alpaca en comparación con el Control ($P < 0.05$) durante los 60 minutos de evaluación. Sin embargo, Benzamidina 2mM tuvo un efecto inhibitorio significativamente menor que Benzamidina 4mM y 6mM a los 5 y 10 minutos ($P < 0.05$) (Figura 9).

La adición de PMSF a espermatozoides capacitados de alpaca, inhibió significativa la actividad proteolítica en las tres concentraciones empleadas (0.6, 0.8 y 1mM) con respecto al control ($P < 0,05$) (Figura 10). No se presenta diferencias significativas entre las tres concentraciones evaluadas durante los primeros 30 minutos de evaluación. Sin embargo, a los 60 minutos se observó que la actividad proteolítica inhibida por PMSF 0.8mM (95.33%) fue significativamente mayor que PMSF 0.6 mM (84%) y PMSF 1mM (79.33%) ($P < 0,05$).

La presencia del inhibidor TPCK, no produjo efecto negativo sobre la actividad proteolítica de espermatozoides de alpaca (Figura 11) no siendo significativamente diferente del control.

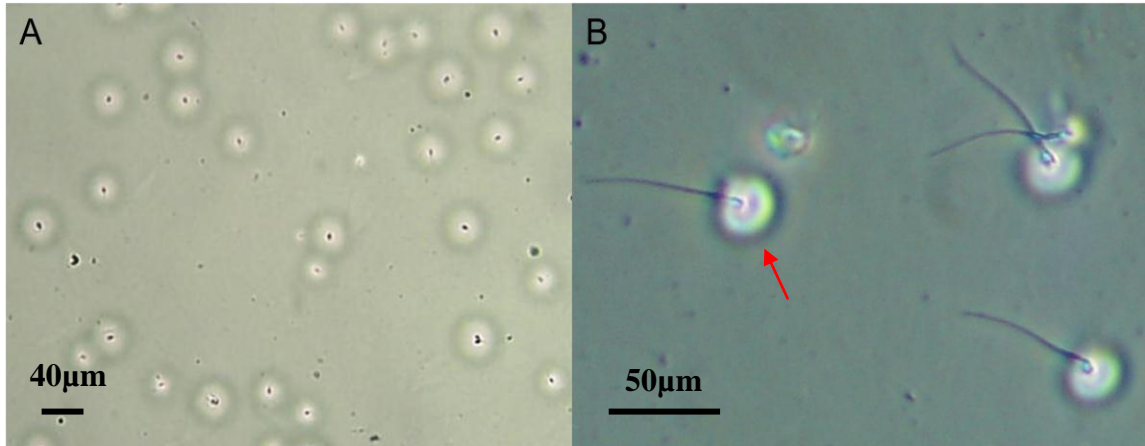


Figura 6.- Halos de actividad proteolítica individual en espermatozoides de alpaca. En A se observan espermatozoides de alpaca con sus respectivos halos de digestión. En B se aprecia en detalle el halo de formado sobre la lámina de gelatina digestión (flecha roja). A: 100X; B: 400X

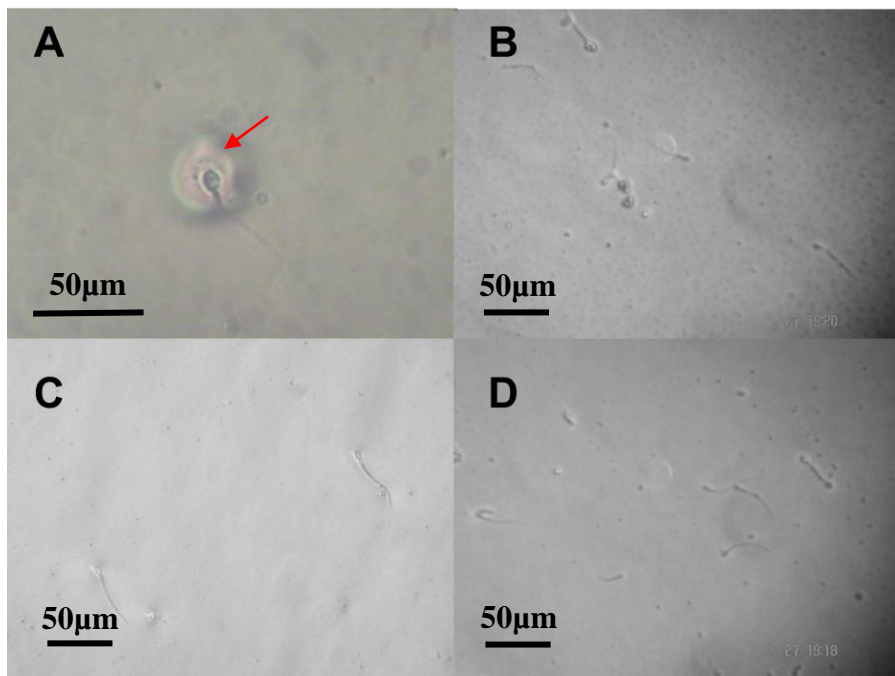


Figura 7.- Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica individual en espermatozoides de alpaca. Se puede observar la formación de halos de digestión (flecha roja) en presencia de TPCK (A), y la inhibición de formación de halos de digestión en la presencia de SBTI (B), PMSF(C) y Benzamidina (D). A: 400X; B, C y D: 200X.

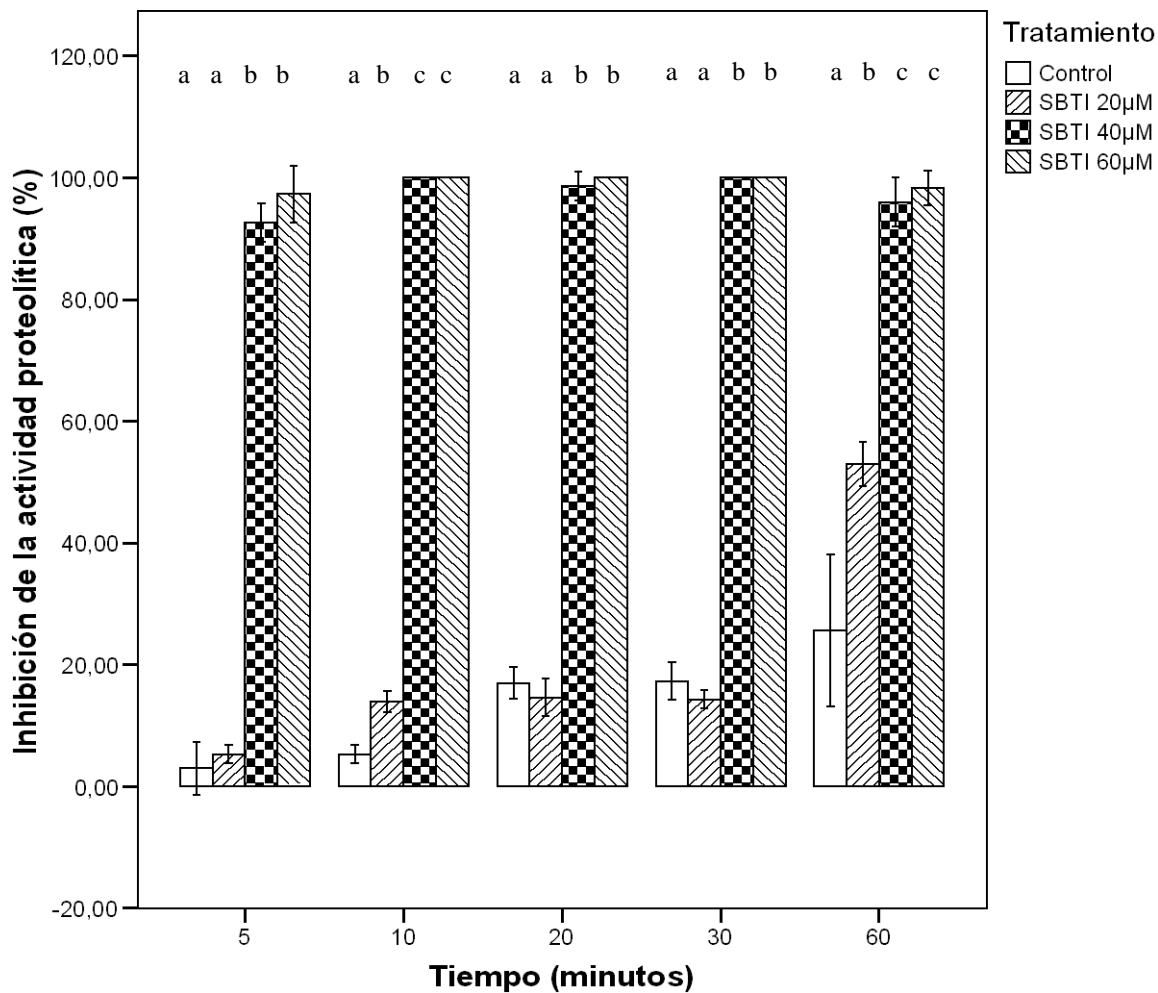


Figura 8.- Efecto del inhibidor SBTI (20, 40 y 60µM) sobre la actividad proteolítica de espermatozoides de alpaca. El inhibidor fue añadido a las 3hrs 45 minutos de capacitación con medio HAM-F10. La actividad proteolítica individual fue inhibida por SBTI (40 y 60µM). Cada barra representa el promedio \pm DE del % de inhibición de formación de halos de digestión. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por cada tiempo evaluado ($P < 0.05$)

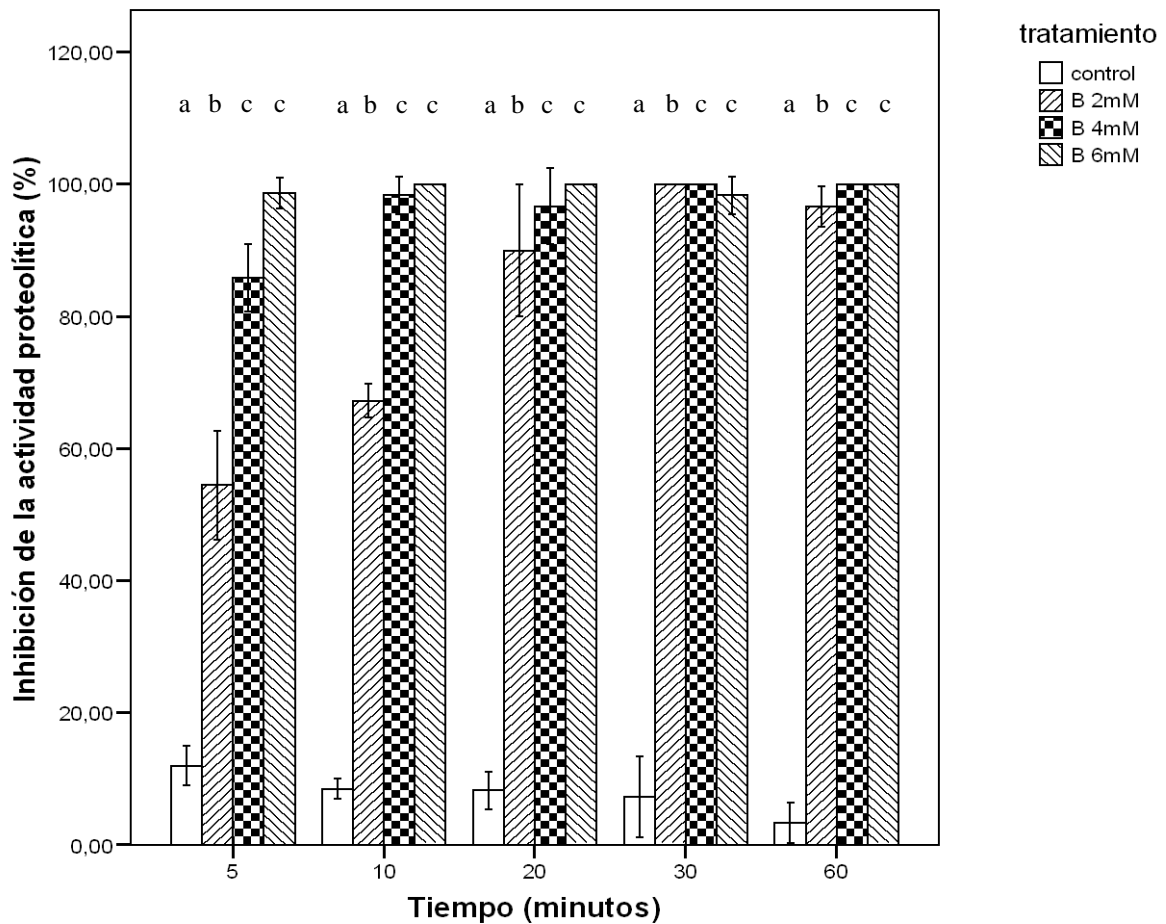


Figura 9.- Efecto del inhibidor Benzamidina (2, 4 y 6 mM) sobre la actividad proteolítica de espermatozoides de alpaca. El inhibidor fue añadido a las 3hrs 45 minutos de capacitación con medio HAM-F10. La actividad proteolítica individual fue inhibida por Benzamidina (2, 4 y 6 mM). Cada barra representa el promedio \pm DE del % de inhibición de formación de halos de digestión. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por cada tiempo evaluado ($P < 0.05$)

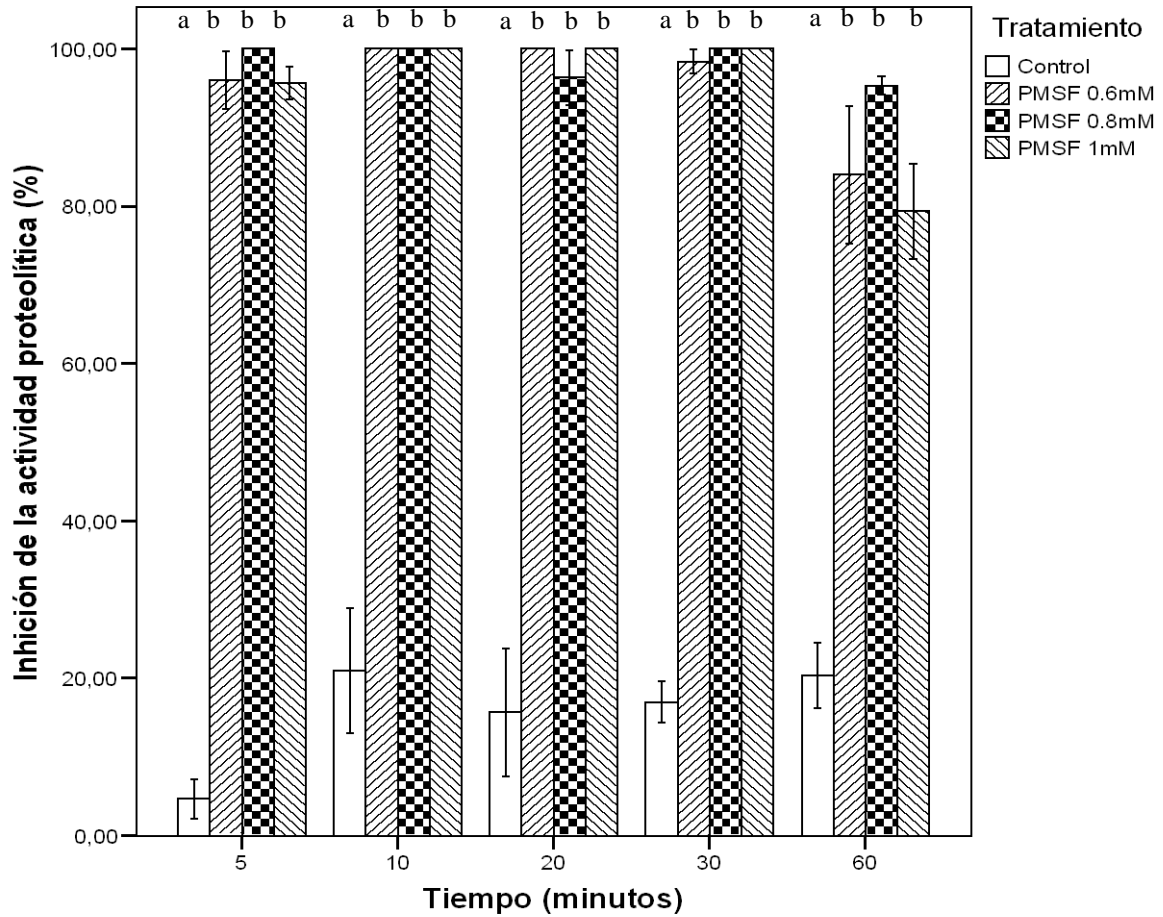


Figura 10.- Efecto del inhibidor PMSF (0.6, 0.8 y 1mM) sobre la actividad proteolítica de espermatozoides de alpaca. El inhibidor fue añadido a las 3hrs 45 minutos de capacitación con medio HAM-F10. La actividad proteolítica individual fue inhibida por PMSF (0.6, 0.8 y 1 mM). Cada barra representa el promedio \pm DE del % de inhibición de formación de halos de digestión. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por cada tiempo evaluado ($P < 0.05$)

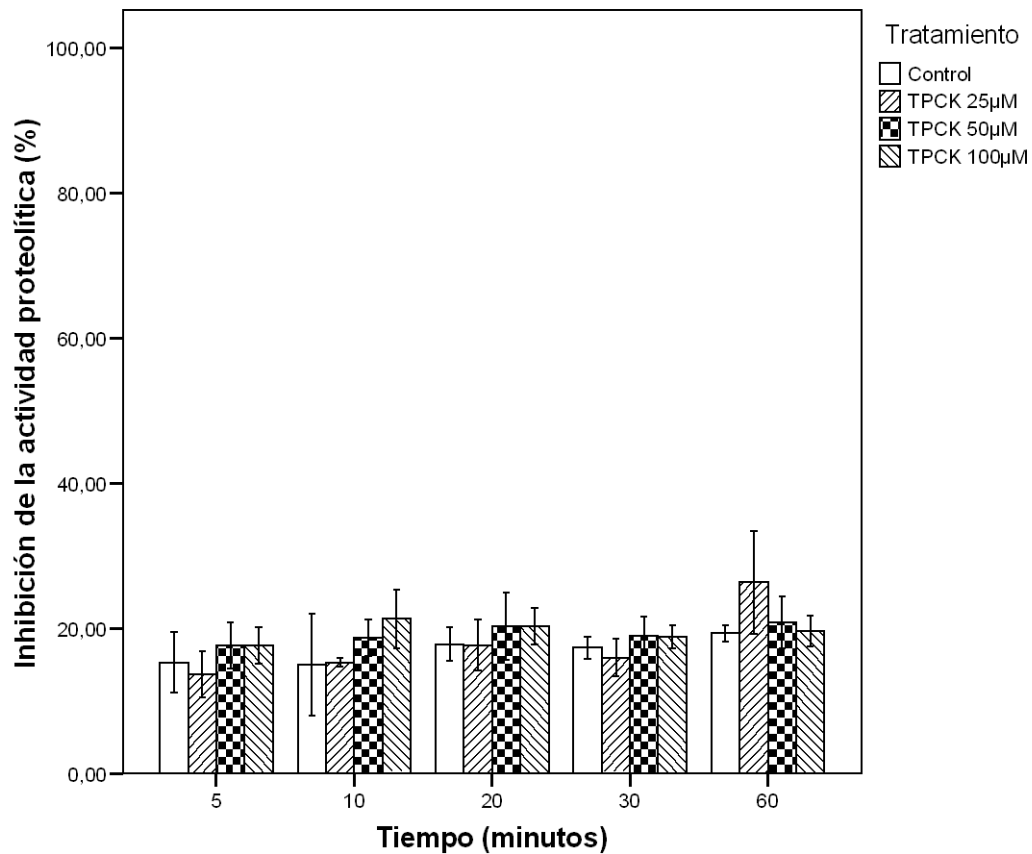


Figura 11.- Efecto del inhibidor TPCK (25, 50 y 100µM) sobre la actividad proteolítica de espermatozoides de alpaca. El inhibidor fue añadido a las 3hrs 45 minutos de capacitación con medio HAM-F10. La actividad proteolítica individual no fue inhibida por TPCK. Cada barra representa el promedio \pm DE del % de inhibición de formación de halos de digestión. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para los tiempos evaluados

6.3 Evaluación el patrón de activación del sistema proacrosina/acrosina a través de geles de actividad.

Utilizando extractos ácidos (EAs) de 30 o 200 millones de espermatozoides de alpaca, el anticuerpo anti-acrosina humana C5F10 (AcrC5F10) identificó a la proenzima proacrosina de 55KDa (Figura 12). Un análisis zimográfico fue realizado para identificar la actividad gelatinolítica de proacrosina, revelando una banda de digestión de 55KDa en ambos EAs. Sin embargo, la banda de digestión observada del EA de 30 millones de espermatozoides fue más débil que la observada en el EA de 200 millones de espermatozoides (Figura 13), por lo que para futuros experimentos se utilizaron EAs provenientes de 200 millones de espermatozoides.

Con el objetivo de evaluar el patrón de activación de la proacrosina de alpaca, se elevó el pH de los EAs de pH 3 a pH 8 y se realizó un análisis zimográfico para observar las bandas de digestión correspondientes a la proacrosina activada. Al activar el EA a pH8 se observaron 3 bandas de digestión de 55, 47 y 39KDa durante los tiempos de evaluación iniciales a la activación (15, 30 minutos y 1 hora). Sin embargo, después de 1.5 y 2 horas solo se observaron 2 bandas de digestión de 47 y 39KDa (Figura 14). Este ensayo revela que a los 15 minutos el sistema proacrosina/acrosina esta activado. Al hacer la inmunodetección en EAs a pH8 con el anticuerpo AcrC5F10, se identificaron 3 bandas correspondientes a proacrosina de 55KDa, α -acrosina de 47KDa y β -acrosina de 39KDa (Figura 15).

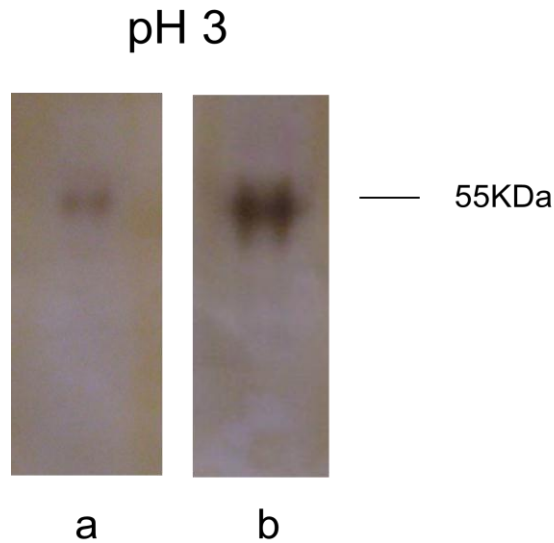


Figura 12. Identificación de proacrosina de alpaca en extractos ácidos de proteínas espermáticas a pH3 usando el anticuerpo anti-acrosina humana C5F10 (1:1000). Extractos de proteínas fueron hechos a partir de dos concentraciones espermáticas diferentes: (a) 30 millones de espermatozoides y (b) 200 millones de espermatozoides. Se detecta una banda más reactiva en b.

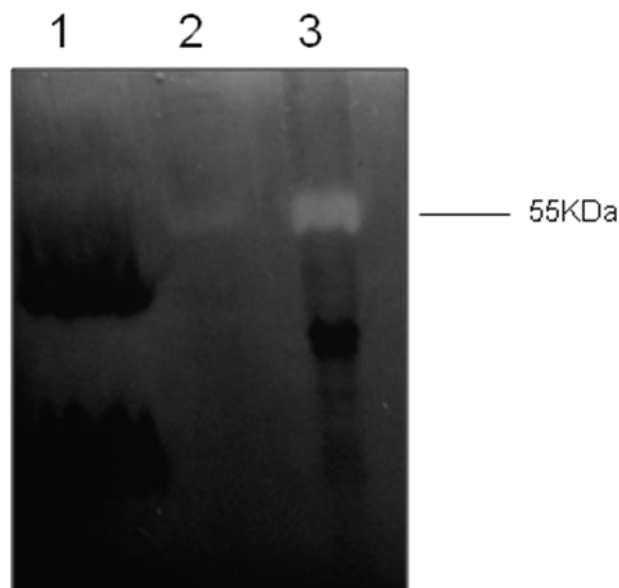


Figura 13. Gel de digestión de extractos ácidos (EA) de espermatozoides de alpaca a pH3. Carril 1: plasma seminal; carril 2: EA alpaca de 30 millones de espermatozoides (5µg/ml); carril 3: EA alpaca de 200 millones de espermatozoides (24µg/ml). Se observa una banda de digestión de 55KDa en carril 2 y 3, siendo la banda de digestión más evidente cuando el EA es preparado a partir de 200 millones de espermatozoides. El gel fue teñido con Serva Blue.

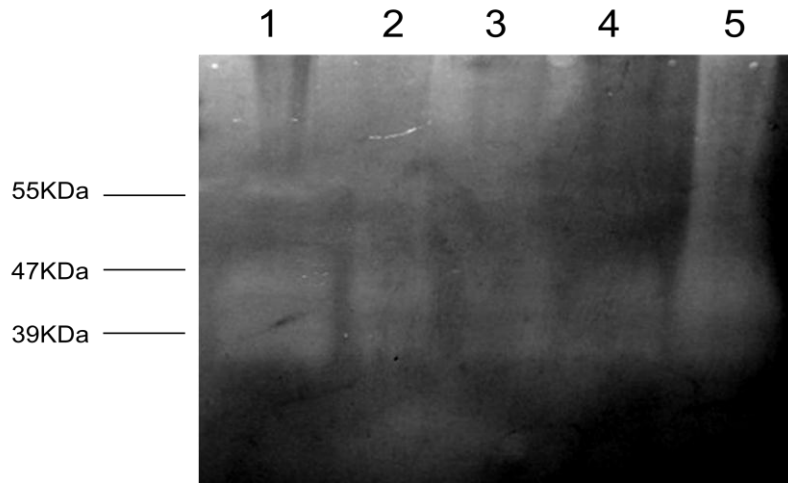


Figura 14. Gel de digestión de extractos ácidos (EA) de espermatozoides de alpaca a pH8. Carril 1: EA alpaca – 15min; carril 2: EA alpaca – 30min; carril 3: EA alpaca – 1h; carril 4: EA alpaca – 1.5h; carril 5: EA alpaca – 2h. Se observan 3 bandas de digestión correspondientes a proacrosina (55KDa), α -acrosina (47KDa) y β -acrosina (39KDa) a los 15, 30 minutos y a una hora después de la activación del EA. Mientras que a partir de las 2 horas solo se observan 2 bandas de digestión correspondiente a α -acrosina (47KDa) y β -acrosina (39KDa). El gel fue teñido con Serva Blue®.

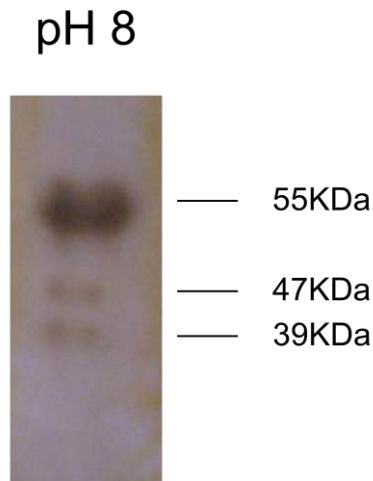


Figura 15. Identificación de proacrosina y acrosina de alpaca en extractos ácidos de proteínas espermáticas a pH8 usando el anticuerpo antiacrosina humana C5F10 (1:1000). Se observan 3 bandas, correspondientes a la proenzima proacrosina (55KDa) y a las enzimas α -acrosina (47KDa) y β -acrosina (39KDa).

7. DISCUSIÓN

El uso de inhibidores de proteasas ha sido ampliamente usado para determinar la función de las proteasas contenidas en el acrosoma de espermatozoides mamíferos e invertebrados en el proceso de la reacción del acrosoma (RA). Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios previos que indiquen que tipo de actividad enzimática (tipo tripsina o quimotripsina) es la que gobierna la RA y la actividad proteolítica en espermatozoides de alpaca.

7.1 Efecto de inhibidores sintéticos sobre la reacción del acrosoma en espermatozoides de alpaca

La RA inducida por la zona pelúcida (ZP), fluido folicular (Llanos *et al.*, 1993), ionóforo de calcio (De Jonge *et al.*, 1989) y progesterona (Pillai y Meizel 1991) es inhibida en espermatozoides humanos pre-incubados con inhibidores tipo tripsina. De la misma manera, la RA inducida por ionóforo de calcio en espermatozoides de hámster (De Ioannes *et al.*, 1990), cobayo (Lui y Meizel 1979, Zaneveld *et al.*, 1993), bovinos (Deppe *et al.*, 2008, Sanchez *et al.*, 1995) y perros (Deppe *et al.*, 2010) es inhibida por inhibidores para enzimas tipo tripsina. En concordancia con estudios previos en otras especies mamíferas, en el presente estudio los inhibidores de tripsina: Benzamidina 2mM y PMSF 0.6mM, fueron efectivos inhibiendo el proceso de la RA inducida por Lisofosfatidilcona, sugiriendo que la reacción del acrosoma en espermatozoides de alpaca está gobernada principalmente por enzimas serinoproteasas tipo tripsina. Ya que para la RA, el aumento de Calcio intracelular también es necesario, futuros estudios deberían ser realizados para estudiar si los inhibidores tipo tripsina pueden prevenir este evento.

Sin embargo, a pesar que SBTI es un inhibidor de enzimas tipo tripsina, la RA no fue inhibida con ninguna de las concentraciones evaluadas (20, 40 y 60 μ M). Postulamos que debido al elevado peso molecular que posee SBTI, su paso a través de la membrana plasmática quedo impedido, evitando así que pueda actuar desde adentro del acrosoma. Coincidente con este resultado,

estudios de inhibición de enzimas tipo tripsina en espermatozoides humanos (Liu y Baker 1993), de macaco (*Macaca mulatta*) (Tollner *et al.*, 2000) y hámster (De Ioannes *et al.*, 1990) usando SBTI, describen que SBTI no inhibió la RA.; sin embargo, bloquea la dispersión de la matriz acrosomal e inhibe la actividad catalítica de acrosina.

Los inhibidores tipo quimotripsina son también efectivos manteniendo la integridad del acrosoma en espermatozoides humanos (Morales *et al.*, 1994), bovinos (Deppe *et al.*, 2008), caninos (Deppe *et al.*, 2010) y de invertebrados (Matsumura y Aketa 1989), sugiriendo que la actividad tipo quimotripsina en estos espermatozoides formaría parte de un complejo multicatalítico conocido como proteasoma espermático (Matsumura y Aketa 1991, Morales *et al.*, 1994), el cual gobierna la RA en estas especies. Contrariamente, bajo las concentraciones evaluadas del inhibidor TPCK, no se observó la inhibición de la RA, lo que indicaría que este sistema no estaría presente en el acrosoma de espermatozoides de alpaca. Sin embargo, al observar en promedio un 40% de RA en espermatozoides de alpaca después del tratamiento con los inhibidores tipo tripsina, sugeriría que junto con el sistema de enzimas tipo tripsina, habría otro tipo de sistema enzimático envuelto en el proceso de la RA en espermatozoides de alpaca.

7.2 Efecto de inhibidores sintéticos sobre la actividad proteolítica en espermatozoides de alpaca

El efecto de los inhibidores tipo tripsina y quimotripsina sobre la actividad proteolítica de las enzimas contenidas en el acrosoma fue evaluada por medio de la formación de halos de digestión sobre láminas de gelatina, técnica utilizada satisfactoriamente en espermatozoides de varias especies mamíferas, (De los Reyes y Barros 2000, Deppe *et al.*, 2010, Ficsor *et al.*, 1983, Gaddum y Blandau 1970, Liu y Baker 1993, Rodríguez *et al.*, 2006, Valdivia *et al.*, 2003, Valdivia *et al.*, 1994). Utilizando inhibidores de serinoproteasas tipo tripsina, la actividad proteolítica individual queda completamente inhibida en espermatozoides de conejo (Pakzad 1989, Valdivia *et al.*, 1994), humanos

(Ficsor *et al.*, 1983, Liu y Baker 1993), mono, perro, ratón y rata (Ficsor *et al.*, 1983). Al incubar espermatozoides capacitados de alpaca con inhibidores de serinoproteasas tipo tripsina como SBTI, PMSF y Benzamidina, la actividad proteolítica es inhibida, evidenciando que la actividad enzimática del contenido acrosomal de espermatozoides de alpaca está gobernada por enzimas serinoproteasas tipo tripsina.

De cada inhibidor estudiado, se utilizaron diferentes concentraciones con la finalidad de encontrar una concentración óptima de uso en espermatozoides de alpaca. SBTI presenta una inhibición cercana al 100% durante todos los tiempos de incubación en las concentraciones de 40 μM y 60 μM , mientras que a la concentración de 20 μM no es suficiente para lograr diferencias significativas con respecto al control hasta después de una hora de incubación. Este inhibidor tiene la característica de formar complejos fuertes con las enzimas tipo tripsina, del tipo estequiométrico en una relación 1:1 (Ozawa y Laskowski 1966). Estos complejos se pueden revertir a temperaturas de entre 80 - 90°C o entre 2 – 8°C y cuando ocurren variaciones de pH. El pH trabajado durante los experimentos fue de 7.4 aproximadamente y la temperatura fue de 37°C, valores que se encuentra dentro del óptimo para este inhibidor. Sugiriendo que la falta de efectividad de SBTI 20 μM pueda ser debido a la presencia de mayor cantidad de enzima por inhibir que de inhibidor presente en el ensayo.

Así mismo, benzamidina presenta una inhibición óptima durante todos los tiempos de incubación en las concentraciones de 4mM y 6mM, mientras que a la concentración de 2mM a pesar que la inhibición de formación de halos de digestión es mayor con respecto del control es significativamente menor en comparación con las otras dos concentraciones evaluadas durante los primeros 10 minutos de evaluación. Previamente, Perreault *et al.* (1982) describen que la inhibición de enzimas tipo tripsina en hámster al usar benzamidina 0.75mM no fue constante durante el tiempo de evaluación.

A pesar que PMSF inhibe de manera eficaz la actividad proteolítica tan pronto como a los 5 minutos de incubación, su actividad inhibitoria a los 60 minutos

empieza a decaer. Esto se debe muy probablemente a la inestabilidad que presenta este inhibidor en soluciones acuosas después de los 30 minutos de incubación.

La elevación del pH y el aumento en la concentración de calcio intracelular es la forma natural para activar las proteasas contenidas en el acrosoma (especialmente acrosina) durante la RA; sin embargo, existen factores mecánicos tales como manipulación *in vitro*, repetidas centrifugaciones y especialmente después del congelamiento/descongelamiento de espermatozoides que inducen una RA falsa positiva (Sanchez *et al.*, 1995, Schill y Wolff 1973). Por lo tanto, si se incluyera el uso de inhibidores reversibles tipo tripsina al momento de evaluar la reacción del acrosoma la evaluación mejoraría al evitar tener falsos negativos así como la prematura activación de la actividad proteolítica de los espermatozoides. En tal sentido, recomendamos la pre-incubación de espermatozoides de alpaca con el inhibidor reversible Benzamidina 4mM al momento de hacer este tipo de evaluaciones.

7.3 Identificación y evaluación del patrón de activación del sistema proacrosina/acrosina en espermatozoides de alpaca

Acrosina es una serinoproteasa localizada en la matriz acrosomal como zimógeno, convertida en su forma activa durante la RA (Yanagimachi 1994). Con el del anticuerpo anti acroC5F10, el sistema proacrosina/acrosina ha sido previamente identificado en espermatozoides de alpaca (Valdivia *et al.*, 2000). Encontrando a la forma zimógena, proacrosina, en EAs de espermatozoides a pH3, con un peso molecular de 55KDa, peso molecular dentro del rango descrito previamente para otras especies que va desde 50KDa hasta 75KDa (Cortes *et al.*, 2006, Gallo *et al.*, 1991, Valdivia *et al.*, 1994, Zahn *et al.*, 2002).

Durante la reacción del acrosoma ocurre una elevación del pH acrosomal (Yanagimachi, 1994), que induce cambios conformacionales en la proacrosina que conllevan a su activación (Meizel y Mukerji 1976, Polakoski y Parrish 1977, Siegel *et al.*, 1986). De esta manera, EAs de alpaca fueron llevados a pH8 y el patrón de activación de la proenzima proacrosina fue evaluado. A pH8, se encontraron 3 bandas reactivas al anticuerpo antiacrosina acroC5F10, correspondiendo a proacrosina de 55KDa, acrosina- α de 47KDa y acrosina- β de 39KDa. Contrario a lo descrito en bovinos (Polakoski y Parrish 1977) y humanos (Zahn *et al.*, 2002), donde se encuentran varios intermedios de activación de acrosina, cuyo peso molecular va desde 43KDa a 16KDa (Baba *et al.*, 1989, Zahn *et al.*, 2002). Al evaluar el tiempo de activación del sistema proacrosina/acrosina, el sistema se encuentra activo tan pronto como a los 15 minutos de evaluación, no observándose la presencia de la proenzima a la hora y media de activación. Lo que sugeriría que este sistema es completamente activado durante la reacción del acrosoma en alpacas, contrario a lo descrito en conejos donde parte del sistema proacrosina/acrosina queda inactivo aún después de haber penetrado la zona pelúcida (Valdivia *et al.*, 1999).

Las pruebas descritas en el presente trabajo permitieron la evaluación del sistema proacrosina/acrosina en espermatozoides de alpaca, así como los intermedios de activación de la proenzima en extractos ácidos espermáticos sin la necesidad de purificar la proteína, poniendo de manifiesto su participación en la RA. Adicionalmente, estas pruebas pueden ser fácilmente usadas para evaluar el efecto de factores del plasma seminal, otros tipos de inhibidores de proteasas o proteínas que pueda alterar la activación de este sistema.

8. CONCLUSIÓN

1. La reacción del acrosoma y la actividad proteolítica que permite a los espermatozoides de alpaca atravesar la zona pelúcida está gobernada principalmente por enzimas serinoproteasas tipo tripsina que corresponden al sistema enzimático proacrosina/acrosina.

9. RECOMENDACIÓN

1. Estudios que correlacionen las tasas de fecundación en alpacas con alteraciones en el patrón de activación de la acrosina, podrían ser hechos para determinar si las bajas tasas de fertilidad en alpacas sean debido a alteraciones asociadas con la enzima acrosina.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABA T., MICHIKAWA Y., KASHIWABARA S., ARAI Y. Proacrosin activation in the presence of a 32-kDa protein from boar spermatozoa. 1989. *Biochem Biophys Res Commun* vol: 160 n° 3. p. 1026-1032.
- BALDI E., LUCONI M., BONACCORSI L., MURATORI M., FORTI G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. 2000. *Front Biosci* vol:5 p. 110 -123.
- BARROS C., BEDFORD J. M., FRANKLIN L. E., AUSTIN C. R. Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. 1967. *J Cell Biol* vol: 34 n° 3. p. C1-5.
- BARROS C., CAPOTE C., PEREZ C., CROSBY J. A., BECKER M. I., DE IOANNES A. Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. 1992. *Biol Res* vol: 25 n° 1. p. 31-40.
- BLEIL J. D., GREVE J. M., WASSARMAN P. M. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. 1988. *Dev Biol* vol: 128 n° 2. p. 376-385.
- BLEIL J. D., WASSARMAN P. M. Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. 1988. *Proc Natl Acad Sci U S A* vol: 85 n° 18. p. 6778-6782.
- BREITBART H., ROTMAN T., RUBINSTEIN S., ETKOVITZ N. Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction. 2010. *Mol Cell Endocrinol* vol: 314 n° 2. p. 234-238.
- CORTES C. J., CODELIA V. A., MANOSALVA I., DE LANGE J., DE LOS REYES M., MORENO R. D. Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. 2006. *Anim Reprod Sci* vol: 93 n° 1-2. p. 165-175.
- DE IOANNES A.E., BECKER M.I., PÉREZ C., CAPOTE C., BARROS C. Role of acrosin and antibodies to acrosin in gamete interactions. 1990. *Gamete Research: Prospect for Immunocontraception* vol: n° p. 185-195.

DE JONGE C. J., MACK S. R., ZANEVELD L. J. Inhibition of the human sperm acrosome reaction by proteinase inhibitors. 1989. *Gamete Res* vol: 23 n° 4. p. 387-397.

DE LAMIRANDE E., GAGNON C. Effects of protease inhibitors and substrates on motility of mammalian spermatozoa. 1986. *J Cell Biol* vol: 102 n° 4. p. 1378-1383.

DE LOS REYES M., BARROS C. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. 2000. *Anim Reprod Sci* vol: 58 n° 3-4. p. 215-228.

DEPPE M., MORALES P., SANCHEZ R. Effect of protease inhibitors on the acrosome reaction and sperm-zona pellucida binding in bovine sperm. 2008. *Reprod Domest Anim* vol: 43 n° 6. p. 713-719.

DEPPE M., RISOPATRON J., SANCHEZ R. Trypsin and chymotrypsin are involved in the progesterone-induced acrosome reaction in canine spermatozoa. 2010. *Reprod Domest Anim* vol: 45 n° 3. p. 453-457.

FICSOR G., GINSBERG L. C., OLDFORD G. M., SNOKE R. E., BECKER R. W. Gelatin-substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. 1983. *Fertil Steril* vol: 39 n° 4. p. 548-552.

GADDUM P., BLANDAU R. J. Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on gelatin membranes. 1970. *Science* vol: 170 n° 3959. p. 749-751.

GALLO J. M., ESCALIER D., GRELLIER P., PRECIGOUT E., ALBERT M., DAVID G., SCHREVEL J. Characterization of a monoclonal antibody to human proacrosin and its use in acrosomal status evaluation. 1991. *J Histochem Cytochem* vol: 39 n° 3. p. 273-282.

GREEN D. P. The activation of proteolysis in the acrosome reaction of guinea-pig sperm. 1978. *J Cell Sci* vol: 32 n° p. 153-164.

HONDA A., SIRUNTAWINETI J., BABA T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. 2002. *Hum Reprod Update* vol: 8 n° 5. p. 405-412.

ICKOWICZ D., FINKELSTEIN M., BREITBART H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. 2012. *Asian J Androl* vol: 14 n° 6. p. 816-821.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970. *Nature* vol: 227 n° 5259. p. 680-685.

LAMPIAO F., DU PLESSIS S. S. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. 2008. *Asian J Androl* vol: 10 n° 5. p. 799-807.

LEFIEVRE L., JHA K. N., DE LAMIRANDE E., VISCONTI P. E., GAGNON C. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. 2002. *J Androl* vol: 23 n° 5. p. 709-716.

LEYTON L., DE IOANNES A., CROXATTO H. B., GRAHAM E. J., ELCE J. S. Two satisfactory methods for purification of human acrosin. 1986. *Biochem Cell Biol* vol: 64 n° 10. p. 1020-1024.

LIU D. Y., BAKER H. W. Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. 1993. *Biol Reprod* vol: 48 n° 2. p. 340-348.

LIU D. Y., LIU M. L., CLARKE G. N., BAKER H. W. Hyperactivation of capacitated human sperm correlates with the zona pellucida-induced acrosome reaction of zona pellucida-bound sperm. 2007. *Hum Reprod* vol: 22 n° 10. p. 2632-2638.

LUI C. W., MEIZEL S. Further evidence in support of a role for hamster sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction. 1979. *J Exp Zool* vol: 207 n° 2. p. 173-185.

LLANOS M., VIGIL P., SALGADO A. M., MORALES P. Inhibition of the acrosome reaction by trypsin inhibitors and prevention of penetration of spermatozoa through the human zona pellucida. 1993. *J Reprod Fertil* vol: 97 n° 1. p. 173-178.

MATSUMURA K., AKETA K. Proteasome (multicatalytic proteinase) of sea urchin sperm and its possible participation in the acrosome reaction. 1991. *Mol Reprod Dev* vol: 29 n° 2. p. 189-199.

MATSUMURA K., AKETA K. Activation of Ca²⁺ channels during the acrosome reaction of sea urchin sperm is inhibited by inhibitors of chymotrypsin-like proteases. 1989. *Gamete Res* vol: 23 n° 3. p. 255-266.

MEIZEL S. The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. 1984. *Biol Rev Camb Philos Soc* vol: 59 n° 1. p. 125-157.

MEIZEL S., MUKERJI S. K. Biochemical studies of proacrosin and acrosin from hamster cauda epididymal spermatozoa. 1976. Biol Reprod vol: 14 n° 4. p. 444-450.

MORALES P., SOCIAS T., CORTEZ J., LLANOS M. N. Evidences for the presence of chymotrypsin-like activity in human spermatozoa with a role in the acrosome reaction. 1994. Mol Reprod Dev vol: 38 n° 2. p. 222-230.

OZAWA K., LASKOWSKI M., JR. The reactive site of trypsin inhibitors. 1966. J Biol Chem vol: 241 n° 17. p. 3955-3961.

PAKZAD R. The effect of trypsin inhibitors aprotinin (Trasylol) and TLCK administered locally by osmotic pumps on the gelatinolytic activity of acrosin and the transport of sperm cells in the female reproductive tract of rabbits. 1989. Z Mikrosk Anat Forsch vol: 103 n° 6. p. 957-966.

PERREAULT S. D., ZIRKIN B. R., ROGERS B. J. Effect of trypsin inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. 1982. Biol Reprod vol: 26 n° 2. p. 343-351.

PILLAI M. C., MEIZEL S. Trypsin inhibitors prevent the progesterone-initiated increase in intracellular calcium required for the human sperm acrosome reaction. 1991. J Exp Zool vol: 258 n° 3. p. 384-393.

POLAKOSKI K. L., MCRORIE R. A., WILLIAMS W. L. Boar acrosin. I. Purification and preliminary characterization of a proteinase from boar sperm acrosomes. 1973. J Biol Chem vol: 248 n° 23. p. 8178-8182.

POLAKOSKI K. L., PARRISH R. F. Boar proacrosin. Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm. 1977. J Biol Chem vol: 252 n° 6. p. 1888-1894.

POLAKOSKI K. L., PARRISH R.F. Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated in ejaculated human spermatozoa. 1989. Journal of Biological Chemistry vol: 252 n° p. 1888-1894.

RAMALHO-SANTOS J., SCHATTEN G., MORENO R. D. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. 2002. Biol Reprod vol: 67 n° 4. p. 1043-1051.

RICHARDSON R. T., NIKOLAJCZYK B. S., ABDULLAH L. H., BEAVERS J. C., O'RAND M. G. Localization of rabbit sperm acrosin during the acrosome reaction induced by immobilized zona matrix. 1991. Biol Reprod vol: 45 n° 1. p. 20-26.

RODRÍGUEZ C., ÁLVAREZ C., LAGUNA R., UIPAN P., VALDIVIA M. Identificación del tipo de actividad proteolítica en espermatozoides de alpaca *Lama pacos*. 2006. XV ICBAR.

SANCHEZ R., RISOPATRON J., SEPULVEDA G., PENA P., MISKA W. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa: effects of proteinase inhibitors. 1995. *Theriogenology* vol: 43 n° 4. p. 761-768.

SCHILL WB., WOLFF HH. Ultrastructure of human sperm acrosome and determination of acrosin activity under conditions of semen preservation. 1973. *Int J Fertil* vol: 19 n° p. 217-223.

SIEGEL M. S., BECHTOLD D. S., KOPTA C. I., POLAKOSKI K. L. Quantification and partial characterization of the hamster sperm proacrosin-acrosin system. 1986. *Biol Reprod* vol: 35 n° 2. p. 485-491.

SIEGEL M. S., POLAKOSKI K. L. Evaluation of the human sperm proacrosin-acrosin system using gelatin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. 1985. *Biol Reprod* vol: 32 n° 3. p. 713-720.

STAMBAUGH R., BRACKETT B. G., MASTROIANNI L. Inhibition of in vitro fertilization of rabbit ova by trypsin inhibitors. 1969. *Biol Reprod* vol: 1 n° 3. p. 223-227.

TOLLNER T. L., YUDIN A. I., CHERR G. N., OVERSTREET J. W. Soybean trypsin inhibitor as a probe for the acrosome reaction in motile cynomolgus macaque sperm. 2000. *Zygote* vol: 8 n° 2. p. 127-137.

TOPFER-PETERSEN E., STEINBERGER M., VON ESCHENBACH C. E., ZUCKER A. Zona pellucida-binding of boar sperm acrosin is associated with the N-terminal peptide of the acrosin B-chain (heavy chain). 1990. *FEBS Lett* vol: 265 n° 1-2. p. 51-54.

VALDIVIA M., SILLERICO T., DE IOANNES A., BARROS C. Proteolytic activity of rabbit perivitelline spermatozoa. 1999. *Zygote* vol: 7 n° 2. p. 143-149.

VALDIVIA M., SUYO M., MANOSALVA I., QUISPE J., ALVAREZ C., URIONDO H., RODRÍGUEZ C., RUIZ E., SÁNCHEZ F. Actividad proteolítica individual de los espermatozoides de alpaca. 2003. XII ICBAR.

VALDIVIA M., SUYO M.P., MANOSALVA I., RUIZ M., ROMERO S., OLAZABAL J., DAVALOS R., DE IOANNES A., BECKER M. , BARROS C. . Cryopreservation and immunoreactivity of proacrosin/acrosin system in alpaca's spermatozoas. 2000. *Biology of Reproduction* vol: 62 n° 1. p. 15C.

VALDIVIA M., YUNES R., MELENDEZ J., DE IOANNES A. E., LEYTON L., BECKER M. I., BARROS C. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in rabbit sperm during acrosome reaction and in spermatozoa recovered from the perivitelline space. 1994. *Mol Reprod Dev* vol: 37 n° 2. p. 216-222.

YAMASHITA M., YAMAGATA K., TSUMURA K., NAKANISHI T., BABA T. Acrosome reaction of mouse epididymal sperm on oocyte zona pellucida. 2007. *J Reprod Dev* vol: 53 n° 2. p. 255-262.

YANAGIMACHI R. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? 2011. *Biol Reprod* vol: 85 n° 1. p. 4-5.

YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization: in KNOBILL E. , NEIL J., eds 1994. *The Physiology of Reproduction.*, 2nd ed. Raven Press, New York, USA. p 189-318

ZAHN A., FURLONG L. I., BIANCOTTI J. C., GHIRINGHELLI P. D., MARIJN-BRIGGILER C. I., VAZQUEZ-LEVIN M. H. Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanism of activation in human sperm extracts. 2002. *J Reprod Immunol* vol: 54 n° 1-2. p. 43-63.

ZANEVELD L. J., ANDERSON R. A., MACK S. R., DE JONGE C. J. Mechanism and control of the human sperm acrosome reaction. 1993. *Hum Reprod* vol: 8 n° 12. p. 2006-2008.

11. ANEXOS

ANEXO 1

Buffer muestra 3X:

Agua destilada	3,65 ml
Tris 0,5 M pH 6,8	1,25 ml
Glicerol	2,5 ml
SDS 10 %	2 ml
Azul de bromofenol 0,5% (W/V)	0,2 ml

ANEXO 2

Soluciones usadas para la técnica de Western Blot

a) Solución de bloqueo:

SBA 4%
Gelatina IGSS 0,1%
NaN₃ en PBS 2 mM

Ajustar a pH 7,4 con NaOH

b) Buffer de lavado:

SBA 0,8%
Gelatina IGSS 0,1%
NaN₃ en PBS 2 mM

c) Buffer de incubación:

SBA 0,8%
Gelatina IGSS 0,1%
Suero normal 1%
NaN₃ 2 mM

Gelatina IGSS es proveida por el fabricante del kit AuroProbe One GAR (Amersham)