

EFFECTO DE LA LISOFOSFATIDILCOLINA EN LA REACCIÓN DEL ACROSOMA DE ESPERMATOZOIDES CANINOS

Effect of Lysophosphatidylcholine on Acrosome Reaction in Canine Spermatozoa

Alexei Santiani¹, Jennie Risopatrón^{1,2}, Néstor Sepúlveda^{1,3} y Raúl Sánchez^{1,4}

¹Centro de Biotecnología en Reproducción - Facultad de Medicina. ²Departamento de Ciencias Básicas - Facultad de Medicina.

³Departamento de Producción Agropecuaria - Facultad de Cs. Agropecuarias y Forestales. ⁴Departamento de Ciencias Preclínicas. Universidad de la Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile. E-mail: jennie@ufro.cl.

RESUMEN

Los lisofosfolípidos desestabilizan la membrana plasmática del espermatozoide y promueven su fusión con la membrana acrosómica externa, acelerando la reacción del acrosoma (RA). La lisofosfatidilcolina (LC) ha sido utilizada para inducir la RA en espermatozoides capacitados de diferentes mamíferos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la LC en la inducción de la RA en espermatozoides caninos. Se utilizaron diferentes concentraciones de LC (0, 100, 200 y 300 µg/mL) por 15 minutos para inducir la RA en espermatozoides incubados por 0, 3 y 4 horas en un medio capacitante (mCCM). La vitalidad y el estado acrosomal se determinó por la técnica de doble fluorescencia Aglutinina de *Pisum sativum* con Isotiocianato de Fluoresceína (PSA-FITC) y Hoechst 33258. La prueba de análisis de varianza (ANOVA) fue utilizada para el análisis estadístico. Concentraciones de 200 y 300 µg/mL de LC reducen significativamente ($P < 0,05$) la vitalidad espermática. Los porcentajes de espermatozoides vivos con RA entre los grupos tratados con 0 y 100 µg/mL de LC a las 0 horas ($21,0 \pm 4,2\%$ vs. $21,0 \pm 6,6\%$), a las 3 horas ($43,8 \pm 4,7\%$ vs. $49,1 \pm 5,2\%$) y a las 4 horas de incubación ($51,3 \pm 14,8\%$ vs. $57,6 \pm 9,9\%$) no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). Sin embargo, se observó un incremento significativo ($P < 0,05$) en los porcentajes espermatozoides vivos reaccionados a las 3 y 4 horas de incubación con respecto a los incubados 0 horas. Se concluye que la LC (100 µg/mL) no ejerce un efecto significativo en la inducción de la RA en espermatozoides caninos incubados en medio mCCM sin glucosa.

Palabras clave: Reacción de acrosoma, capacitación espermática, lisofosfatidilcolina, espermatozoides de canino.

ABSTRACT

Lysophospholipids desestabilize the sperm plasma membrane and promote its fusion with outer acrosomal membranes, by accelerating acrosome reaction (RA). Lysophosphatidylcholine (LC) has been used to induce the RA on capacitated sperms from different mammals. The aim of this work was to evaluate the effect of LC on RA in canine spermatozoa. Different concentrations of LC (0, 100, 200 and 300 µg/mL) were utilized during 15 minutes to induce RA in spermatozoa incubated during 0, 3 and 4 hours in capacitation medium (mCCM). Sperm viability and acrosomal status were determined using double fluorescence *Pisum sativum* agglutinin with fluorescein isothiocyanate (PSA-FITC) and Hoechst 33258. The analysis of variance (ANOVA) test was utilized for statistical analysis. The sperm viability was significantly reduced with 200 and 300 µg/mL of LC ($P < 0.05$). The live spermatozoa with RA show no statistically significant differences ($P > 0.05$) between groups with 0 and 100 µg/ml of LC incubated to 0 hour ($21.0 \pm 4.2\%$ vs. $21.0 \pm 6.6\%$), 3 hours ($43.8 \pm 4.7\%$ vs. $49.1 \pm 5.2\%$) and 4 hours ($51.3 \pm 14.8\%$ vs. $57.6 \pm 9.9\%$). Nevertheless the percentage of live spermatozoa with RA increased ($P < 0.05$) with incubation at 3 and 4 hours. In conclusion, LC (100 µg/mL) shows no significant effect for inducing the acrosome reaction in canine spermatozoa incubated in mCCM medium free of glucose.

Key words: Acrosome reaction, sperm capacitation, lysophosphatidylcholine, canine spermatozoa.

INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, los espermatozoides recién eyaculados son incapaces de fecundar al ovocito. Ellos adquieren esta capacidad durante su tránsito a través del tracto reproductor de la hembra, proceso denominado capacitación [5, 23]. El

proceso de capacitación involucra cambios bioquímicos tales como: (i) la reorganización de los antígenos de la superficie de la membrana que aumentan la fluidez de la membrana; (ii) un cambio en la relación colesterol/fosfolípidos, debido a la pérdida de colesterol y (iii) fosforilación de proteínas [24]. Después del proceso de capacitación, el espermatozoide experimenta la reacción acrosomal (RA) la que consiste en la fusión y vesiculación de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa del espermatozoide, resultando en la exocitosis de las enzimas hidrolíticas, que permitirán que el espermatozoide rompa y atraviese la zona pelúcida [24].

In vivo, la RA ocurre cuando el espermatozoide interactúa con la zona pelúcida [24]. *In vitro*, la RA puede ser inducida por incubación de los espermatozoides en un medio [6, 17] o por la exposición a inductores. Se han utilizado numerosos inductores fisiológicos y no fisiológicos de la RA. Estos incluyen progesterona, fluido folicular y las secreciones de las células del *cumulus oophorus* que contienen prostaglandinas, sulfato de esterol, glicosaminoglicanos y neoglicoproteínas [1].

El potencial de fecundación de una muestra de espermatozoides puede estar deteriorado debido a defectos de estructura o de función del acrosoma [18]. Por lo tanto se han desarrollado varios métodos para evaluar la capacidad de los espermatozoides de realizar RA [4, 24]. La inducción de la RA puede correlacionarse con la capacidad del espermatozoide de penetrar la zona pelúcida [11]. De acuerdo con esto, puede proporcionar información útil para el manejo de la infertilidad [21, 24]. Además permite evaluar la capacitación espermática en forma indirecta [12, 15]. En base a lo anteriormente expuesto es importante disponer de un ensayo de RA rutinario en los laboratorios de andrología que permita evaluar la función del espermatozoide [7].

En caninos la inducción de la RA de espermatozoides capacitados ha sido realizada con diversas sustancias como proteínas de la zona pelúcida [9] ó ionóforo de calcio [20]. Entre estos, el ionóforo de calcio es el inductor más usado, sin embargo, en humanos, este inductor actuaría facilitando la reacción acrosómica tanto en espermatozoides capacitados como en los no capacitados [2].

La lisofosfatidilcolina, un lisofosfolípido ha sido muy utilizada como inductor de la RA en diversas especies como el hamster [12] y humanos [3]. En bovinos, también ha sido utilizada como un inductor de la RA en espermatozoides capacitados con heparina [15].

El efecto de la LC en la RA se debe a la acción de la fosfolipasa A₂, la cual retira ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana plasmática, produciendo lisofosfolípidos, lo cual desestabiliza la estructura de la membrana y promueven su fusión con la membrana acrosómica externa [22]. En espermatozoides no capacitados de caninos se ha observado que concentraciones elevadas de LC inducen la muerte celular y la RA [16]. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la LC en la inducción de la RA *in vitro* en espermatozoides capacitados de caninos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de los espermatozoides

Semen fresco de eyaculados de caninos adultos de razas Rottweiler (2) y Ovejero alemán (2) con edades entre 2-4 años, fue utilizado en este estudio. Los animales permanecieron en el Bioterio de la Universidad de la Frontera, Temuco, Chile, y fueron controlados periódicamente por un Médico Veterinario y mantenidos con una dieta balanceada y libre acceso al agua. Los eyaculados (n = 4) fueron obtenidos por procedimiento manual después de un periodo de abstinencia mínimo de tres días. Se utilizó la segunda fracción de los eyaculados, rica en espermatozoides [10]. El semen fue colectado en vasos estériles manteniendo una temperatura de 37°C y transportados inmediatamente al laboratorio para evaluar la concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática [17]. Solo se utilizaron muestras que presentaron una morfología normal $\geq 80\%$, una motilidad $\geq 80\%$ y una concentración $\geq 8 \times 10^7$ espermatozoides/mL.

Capacitación espermática

El medio de capacitación utilizado fue el modified canine capacitation médium (mCCM) [8] libre de glucosa. La composición del medio fue la siguiente: NaCl (83,49 mM), KCl (4,78mM), CaCl₂·2H₂O (1,71 mM), KH₂PO₄ (1,19 mM), TRIS (66 mM), Na-Piruvato (0,25 mM), Na-Lactato (21,55 mM), albúmina sérica bovina (10 mg/mL - BSA), penicilina G (100 UI/mL), estreptomycin (50 µg/mL) y rojo fenol (20 µg/mL). El pH se ajustó a 7,8 y la osmolaridad a 300 mOsm.

Con el propósito de obtener espermatozoides libres de plasma seminal, las muestras de semen fueron lavadas en mCCM sin albúmina y centrifugadas a 1,800 rpm por 3 min. Posteriormente el pellet fue diluido en mCCM suplementado con 1% BSA y la concentración espermática fue ajustada a 5×10^6 espermatozoides/mL. La suspensión espermática fue incubada a 38°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad hasta 4 horas.

Inducción de la reacción acrosómica

La RA fue inducida con lisofosfatidilcolina (LC) [15]. Se preparó una solución stock de LC (Sigma L-4129) a una concentración de 5 mg/mL, la cual se guardó en alícuotas y almacenada en congelación hasta su uso.

Diseño experimental

En el experimento preliminar (Experimento I) los espermatozoides no capacitados (sin incubación en mCCM) y los espermatozoides capacitados (incubados por 3 horas en medio mCCM), fueron incubados por 15 minutos con LC en concentraciones de 0; 100; 200 y 300 µg/mL. Terminado el período de incubación, en las alícuotas (100 µL) de la suspensión espermática con cada una de las diferentes concentraciones de LC se evaluó la vitalidad espermática mediante la tinción de doble fluorescencia FITC- PSA con Hoechst- 33258 (TABLA I).

En el Experimento II se utilizaron espermatozoides no capacitados y capacitados durante 3 y 4 horas de incubación en medio mCCM con LC, en concentraciones de 0 (control) y 100 µg/mL por 15 minutos. Terminado el período de incubación se determinó la RA y la vitalidad mediante la tinción de doble fluorescencia FITC- PSA con Hoechst- 33258.

Evaluación de la vitalidad espermática y RA

Se utilizó la técnica de doble fluorescencia Aglutinina de *Pisum sativum* con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC-PSA; Sigma USA) y Hoechst 33258 (Sigma, USA) [14]. La suspensión espermática (100 µL) fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos con la tinción Hoechst 33258 a una concentración final de 1µg/mL. Luego los espermatozoides fueron lavados mediante centrifugación (400g) por 5 minutos con una solución de polivinilpirrolidona al 2% (PVP-40; Sigma USA) en fosfato buffer salino (PBS). El pellet fue resuspendido y la suspensión espermática fue colocada sobre una lámina porta objeto. Posteriormente los espermatozoides fueron sumergidos en metanol por 2 minutos para su fijación y permeabilización de la membrana plasmática, seguida por una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda con FITC-PSA a una concentración final de 0,05 mg/mL. Luego, fueron lavados con agua destilada, secados a temperatura ambiente, cubiertos con medio de montaje (Glicerol 80%) y evaluados los espermatozoides en un microscopio de epi-fluorescencia.

Los criterios utilizados para evaluar el estado acrosomal y vitalidad de los espermatozoides fueron los siguientes: a) Espermatozoide con la región del núcleo marcado con Hoechst 33258 (azul) fueron considerados muertos, b) Espermatozoides vivos con la región acrosomal total o parcialmente marcada con FITC-PSA (verde) fueron considerados con acrosoma intacto y c) Espermatozoides vivos sin fluorescencia en más de 2/3 de la región acrosomal fueron considerados con reacción acrosomal. Para la determinación de la reacción acrosómica y la vitalidad se cuantificaron 100 espermatozoides al azar.

Análisis estadístico

La prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) unidireccional se utilizó para analizar el efecto de las concentraciones de LC y tiempos de incubación, en la vitalidad e integridad del acrosoma de los espermatozoides. El nivel de significancia fue de $P < 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico Prisma® versión 3,1 GraphPad Software Incorporated. (San Diego, California USA, 1996).

RESULTADOS

Efecto de la LC en la vitalidad espermática

En la TABLA I se observa el efecto de la concentración de LC en la vitalidad espermática. Los porcentajes de espermatozoides vivos no capacitados incubados con concentraciones de 0 ($91,3 \pm 3,5 \%$) y 100 µg/mL ($88,0 \pm 5,3\%$) de LC fue-

TABLA I
EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LC SOBRE LA VITALIDAD ESPERMÁTICA EN ESPERMATOZOIDES NO CAPACITADOS Y CAPACITADOS (% ESPERMATOZOIDES VIVOS)

Concentración LC (µg/mL)	Grupo no capacitado (0 hr en mCCM)	Grupo capacitado (3 hr en mCCM)
0	$91,3 \pm 3,5^a$	$88,3 \pm 4,2^a$
100	$88,0 \pm 5,3^a$	$86,6 \pm 5,6^a$
200	$72,5 \pm 3,5^b$	$69,8 \pm 6,3^b$
300	$64,0 \pm 1,5^b$	$5,0 \pm 1,4^c$

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Valores son promedios $\pm$ D.E.

ron similares entre sí. Del mismo modo, los porcentajes de espermatozoides vivos capacitados fueron similares al incubarlos con 0 ($88,3 \pm 4,2\%$) y 100 µg/mL ($86,6 \pm 5,6\%$) de LC. Sin embargo mayores concentraciones de LC (200 y 300 µg/mL) produjeron una disminución significativa ($P < 0,05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos, tanto en el grupo de espermatozoides no capacitados ($72,5 \pm 3,5\%$ y $64 \pm 1,5\%$, respectivamente) como en los capacitados ($69,8 \pm 6,3\%$ y $5 \pm 1,4\%$, respectivamente). La marcada disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos sugiere que concentraciones mayores de 100 µg/mL producen un daño en las membranas de los espermatozoides, por lo cual estas concentraciones no fueron utilizadas para el Experimento II.

En el Experimento II, los porcentajes de espermatozoides vivos no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos tratados con 0 y 100 µg/mL de LC en los espermatozoides no capacitados ($83,3 \pm 10,2\%$ vs. $79,7 \pm 11,6\%$) ni en los espermatozoides capacitados por 3 horas ($83,0 \pm 11,6\%$ vs. $86,3 \pm 3,5\%$) y 4 horas ($89,5 \pm 6,7\%$ vs. $78,8 \pm 17,4\%$). Tampoco se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la vitalidad de los espermatozoides por efecto del tiempo de incubación (FIG. 1). Estos resultados sugieren que la concentración de 100 µg/mL de LC, no tiene efecto en la vitalidad de los espermatozoides incubados entre 0 a 4 horas.

Efecto de la LC en la reacción acrosomal (RA)

La FIG. 2 muestra el porcentaje de espermatozoides vivos con RA. Los porcentajes de espermatozoides vivos con RA en los grupos tratados con LC (100 µg/mL), no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) al compararlos con sus controles (0 µg/mL de LC) a las 0 horas ($21,0 \pm 6,6\%$ vs. $21,0 \pm 4,2\%$), a las 3 horas ($49,1 \pm 5,2\%$ vs. $43,8 \pm 4,7\%$) ni a las 4 horas ($57,6 \pm 9,0\%$ vs. $51,3 \pm 14,0\%$). Por otro lado, se observó un efecto significativo en el porcentaje de espermatozoides vivos con RA ($P < 0,01$), entre los espermatozoides no capacitados (0 horas) y los capacitados (3 y 4 horas de incubación).

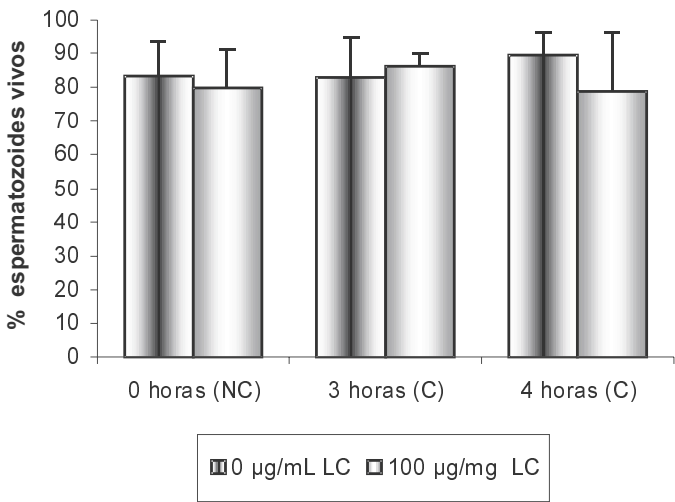


FIGURA 1. EFECTO DE LA LC (100 µg/mL) SOBRE LA VITALIDAD ESPERMÁTICA EN ESPERMATOZOIDES NO CAPACITADOS (0 hr en mCCM) Y CAPACITADOS EN mCCM POR 3 Y 4 HORAS. (NC)= NO CAPACITADOS; (C)= CAPACITADOS.

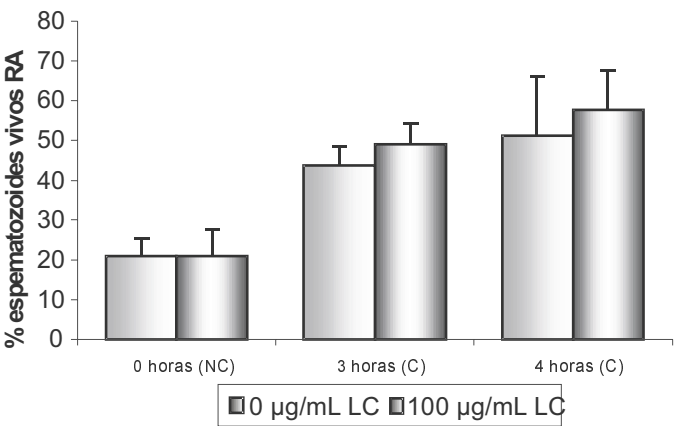


FIGURA 2. EFECTO DE LA LC (100 µg/mL) SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN DE ACROSOMA (RA) EN ESPERMATOZOIDES NO CAPACITADOS (0 hr en mCCM) Y CAPACITADOS EN mCCM POR 3 Y 4 HORAS. (NC)= NO CAPACITADOS; (C)= CAPACITADOS.

DISCUSIÓN

La lisofosfatidilcolina (LC), producto del metabolismo de la fosfolipasa A₂ presente en el espermatozoide, está implicada en la reacción del acrosoma debido a sus propiedades fusogénicas [13]. En ese sentido, la fosfolipasa A₂ retira ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana plasmática, produciendo lisofosfolípidos, los cuales desestabilizan la membrana y promueven su fusión con la membrana acrosomal externa

[22], produciendo la vesiculación de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal externa [15].

En el presente estudio no se observó un efecto significativo ($P>0,05$) de la LC en la inducción de la reacción del acrosoma en espermatozoides capacitados y no capacitados. Estos resultados contrastan con lo reportado por Byrd y Wolf [3] en espermatozoides humanos, quienes mencionan que la LC induce la reacción acrosomal en espermatozoides no capacitados y capacitados. Sin embargo, la LC induce reacción de acrosoma solo en espermatozoides capacitados de bovinos [15] y hámsters [12].

En este estudio, los espermatozoides de caninos fueron capacitados hasta 4 horas. A partir de las 3 horas de incubación, se observó un aumento significativo de la reacción del acrosoma. En los espermatozoides no capacitados (0 horas de incubación en medio mCCM) el porcentaje de reacción del acrosoma fue alrededor de 20%, a las 3 horas de incubación este porcentaje aumentó de 40 a 50% mientras que a las 4 horas se incrementó hasta 50 - 60%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sirivaidyapong y col. [20], quienes indican que los porcentajes de espermatozoides viables reaccionados a las 4 horas de incubación son de alrededor del 40%.

A pesar de haber observado un incremento significativo de la reacción del acrosoma por efecto del tiempo de incubación, no se observó ningún efecto atribuible a la LC, en las condiciones utilizadas en este estudio. En ese sentido, dosis de 100 µg/mL de LC produjeron un ligero aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados en comparación con los controles a las 3 horas ($49,1 \pm 5,2\%$ vs. $43,8 \pm 4,7\%$) y 4 horas de incubación ($57,6 \pm 9,9\%$ vs. $51,3 \pm 14,8\%$). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($P>0,05$). En bovinos, Parrish y col. [15] refieren que la LC induce la reacción del acrosoma sólo en espermatozoides incubados con heparina. Dichos autores no encontraron diferencias en el porcentaje de espermatozoides reaccionados cuando los espermatozoides bovinos fueron incubados sin heparina y expuestos a 0 ó 100 µg/mL de LC y que en ausencia de heparina, los espermatozoides de bovinos no sufren cambios en sus membranas luego de la adición de LC. En humanos Byrd y Wolf [3] indican que 100 µg/mL de LC induce la reacción del acrosoma, pero en forma independiente de la capacitación.

Cuando fueron utilizadas concentraciones mayores a 100 µg/mL de LC, se detectó que 200 y 300 µg/mL de LC redujeron significativamente la vitalidad espermática. En esos grupos se observó que un alto porcentaje de células muertas presentaban reacción del acrosoma. Esto concuerda con lo reportado por Peña y col. [16], quienes indican que conforme se incrementa la concentración de LC, la población total de espermatozoides reaccionados aumenta, pero disminuye significativamente la proporción de células vivas con reacción del acrosoma. En forma similar, en bovinos dosis de 200 y 400 µg/mL de LC reducen significativamente la motilidad espermática [15]. Estos resultados sugieren que en caninos, dosis ma-

yores de 200 µg/mL de LC tendrían un efecto tóxico para los espermatozoides, mientras que concentraciones de 100 µg/mL de LC inducen muy levemente la reacción del acrosoma.

En caninos, se han utilizado otras sustancias para inducir la reacción del acrosoma, como proteínas de la zona pelúcida [9] o ionóforo de calcio [20]. En dichos trabajos se encontró un alto porcentaje de espermatozoides reaccionados en los grupos tratados, mientras que en los grupos controles el porcentaje de espermatozoides reaccionados se mantuvo reducido. Por otro lado, Sirivaidyapong, y col. [19] sin lograr inducir la RA, encontraron un mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados cuando los espermatozoides fueron incubados en medios libres de glucosa. En ese sentido, Parrish y col. [15] mencionan que la glucosa bloquea la capacitación y la reacción acrosómica en espermatozoides de bovinos. Esto podría explicar en parte porqué en el presente trabajo, en donde se utilizó un medio libre de glucosa, se observó un alto porcentaje de reacción del acrosoma en los grupos controles y por lo tanto no se encontraron diferencias significativas con respecto a los grupos tratados con LC. Adicionalmente, Llanos y Meizel [12] encontraron un efecto significativo de la LC en la inducción de la RA en espermatozoides de hámsters, sin embargo utilizaron un medio con glucosa, en el cual los grupos tratados sin LC tuvieron porcentajes menores a 10% de reacción del acrosoma, probablemente por el efecto de la glucosa en el bloqueo de la capacitación.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede inferir que la adición de lisofosfatidilcolina en concentraciones de 200 y 300 µg/mL afecta la viabilidad de los espermatozoides de caninos.

Por otra parte la lisofosfatidilcolina en concentraciones de 100 µg/mL, en las condiciones utilizadas en este estudio no ejerce un efecto significativo en la inducción de la reacción del acrosoma en espermatozoides de caninos capacitados con el medio capacitante mCCM libre de glucosa. Se sugiere realizar estudios posteriores en medio mCCM adicionado con glucosa.

AGRADECIMIENTO

El presente estudio fue financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad de La Frontera de Temuco – Chile. Proyecto N° 130204.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D. Minireview. Mammalian sperm acrosome: Formation, contents and function. **Arch. Biochem. Biophys.** 379(2):173-182. 2000.
- [2] BIELFELD, P.; ANDERSON, R.; MACK, S.; DE JOHGE, C.J.; ZANEVELD, L. Are capacitation or calcium ion influx required for the human sperm acrosome reaction. **Fertil. Steril.** 62:1255-1261. 1994.
- [3] BYRD, W.; WOLF, D.P. Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. **Biol. Reprod.** 34 : 859-869. 1986.
- [4] CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biol. Reprod.** 41:635 641. 1989.
- [5] CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. **Nature.** 168:997-998. 1951
- [6] FÉNICHEL, P.; DONZEAU, M.; FARAHIFAR, D.; BASTERIS, B.; AYRAUD, N.; HIS, B. Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.** 55:994-999. 1996.
- [7] FRANCAVILLA, F.; ROMANO, R.; MARRONE, V.; VALENTI, M.; SANTUCCI, R. Relationship between acrosome reaction and hamster egg penetration after ionophore challenge in absence of teratozoospermia. **Fertil. Steril.** 63:1301-1305. 1995
- [8] GUÉRIN, P.; FERRER, M.; FONTBONNE, A.; BÉNIGNI, L.; JACQUET, M.; MÉNÉZO, Y. *In vitro* capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. **Theriogenol.** 52:617-628. 1999.
- [9] KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. **Biol. Reprod.** 48:841-845. 1993.
- [10] KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenol.** 39:1279-1289. 1993.
- [11] LIU, D.Y.; BAKER, G.H.W. Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and their ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. **Fertil. Steril.** 66:312-315. 1996.
- [12] LLANOS, M.N.; MEIZEL, S. Phospholipid methylation increases during capacitation of golden hamster sperm *in vitro*. **Biol. Reprod.** 28:1043-1051. 1983.
- [13] MEIZEL, S. The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. **Biol. Reprod.** 59:125-157. 1984.
- [14] MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. **J. Reprod. Fertil.** 95:755-763. 1992

- [15] PARRISH, J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.** 38 : 1171-1180. 1988.
- [16] PEÑA, A.I.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. **Reprod. Dom. Anim.** 34:495-502. 1999.
- [17] RISOPATRÓN, J.; CATALÁN, S.; MISKA, W.; SCHILL, W.B.; SANCHEZ, R. Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro. **Reprod. Dom. Anim.** 37:347-351. 2002.
- [18] SCHILL, W.B. Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. **Hum. Reprod.** 6:969-978. 1991.
- [19] SIRIVAIDYAPONG, S.; CHENG, F.; MARK, A.; VOO-HOU, W.; BEVERS, M.; COLEBRANDER, B. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenol.** 53: 789-802. 2000.
- [20] SZÁSZ, F.; CHENG, F.P.; MARKS, A.; COLEBRANDER, B.; SOLT, L. Induction of acrosome reaction in dog sperm by calcium ionophore. **Acta Vet. Hung.** 45:177-187. 1997.
- [21] TASDEMIR, M.; TASDEMIR, I.; KODAMA, H.; TANAKA, T. Pentoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization in vitro. **Hum. Reprod.** 8:2102-2107. 1993.
- [22] TULSIANI, D.; ABOU-HAITA, A.; LOESER, C.; PERREIRA, B. Review: The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. **Exp. Cell. Res.** 240:151-164. 1998.
- [23] YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: **The Physiology of Reproduction**. Knobil, E.; Neill, J. (eds). 2nd edition. Raven Press, 189-317 pp. 1994.
- [24] ZEGINIADOU, T.; PAPADIMAS, J.; MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. **Andrologia.** 32:335-343. 2000.