

# **Aplicación de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica (PRH) para predecir la congelabilidad del semen bovino**

**Kory Nathaly Morán Ramírez  
Mauricio Díaz Lezama**

**ZAMORANO**  
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria  
Noviembre, 2006

**ZAMORANO**  
**Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria**

**Aplicación de la Prueba de Resistencia  
Hiperosmótica (PRH) para predecir la  
congelabilidad del semen bovino**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado  
Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Kory Nathaly Morán Ramírez**  
**Mauricio Díaz Lezama**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2006

Los autores conceden a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

Kory Nathaly Morán Ramírez

---

Mauricio Díaz Lezama

**Honduras**  
Noviembre, 2006

## **Aplicación de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica (PRH) para predecir la congelabilidad del semen bovino**

Presentado por:

Kory Nathaly Morán Ramírez  
Mauricio Díaz Lezama

Aprobado:

---

John J. Hincapié, Ph.D.  
Asesor Principal

---

John J. Hincapié, Ph.D.  
Coordinador Área Temática  
Zootecnia.

---

Armando Quintero, D.M.V.  
Asesor

---

Abelino Pitty, Ph.D.  
Director Interino Carrera  
Ciencia y Producción  
Agropecuaria

---

Isidro Matamoros, Ph.D.  
Asesor

---

George Pilz, Ph. D.  
Decano Académico

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A  
Rector

**DEDICATORIA**  
**K.N.M.R**

A Dios por guiar mis pasos y permitirme culminar mis estudios universitarios.

A mis padres Elisa Ramírez y Natahel Morán por el apoyo incondicional que me han brindado.

A mis hermanos Delia y Erasmo Morán por su constancia, apoyo y afecto que me han brindado.

A mis abuelos Victor Ramírez y Gladis López por confiar en mí y darme valor para seguir adelante.

A mis tíos Rossana, Freddy, Eddy y Lincolnd por su consejos y apoyo que me ayudado a superarme.

**DEDICATORIA**  
**M. D. L**

A Dios por estar siempre guiando mis pasos, por darme la posibilidad de culminar mis estudios, por darme la fortaleza para estar lejos de mi familia y seguir adelante.

A mis padres Rodimiro Díaz y Diana Lezama por apoyarme incondicionalmente a lo largo de mi carrera, por sus consejos, por sus esfuerzos y porque siempre confiaron en mí.

A mis hermanos José Rodimiro, Diana y Estefanía porque siempre estuvieron pendientes de mi progreso y porque me dieron su apoyo.

A mis abuelos que siempre estuvieron cerca de mí y me dieron sus consejos.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **K. N. M. R**

A mi madre por ser una persona ejemplar y por el gran esfuerzo que ha hecho por mi superación profesional y espiritual.

A toda mi familia por apoyarme y confiar en mí.

Al Dr. John Jairo Hincapié por su dedicación y paciencia que me ha brindado.

Al Dr. Isidro Matamoros por el apoyo que me ha brindado.

Al Dr. Armando Quintero y su familia por su cariño, amistad y consejos en todo momento.

A Decio y Jorge por su amistad y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

Al centro de recría Bull Semen<sup>®</sup> por permitir realizar este trabajo en sus instalaciones.

A la familia Díaz Lezama por su amistad y apoyo durante todos estos años.

A Mauricio Díaz por su amor, amistad sincera y su comprensión para poder realizar este trabajo con éxito.

A todas mis amigas por su carisma y apoyo.

A todo el personal Zamorano por contribuir con mi formación personal y profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **M. D. L.**

A Dios porque me iluminó, me dio serenidad y paz a lo largo de mi carrera y sobre todo porque nunca me abandonó.

A mi papá Rodimiro Díaz, por confiar en mí, por ser un ejemplo e inspiración para salir adelante.

A mi mamá Diana Lezama, por brindarme su cariño, por confiar en mí, por los consejos y por inspirarme para salir adelante.

A mis hermanos porque me dieron su apoyo, consejos y por confiar en mí.

Al Dr. Hincapié por ser un gran asesor, por su paciencia y atención.

Al Dr. Armando Quintero por su gran amistad, porque siempre nos brindó su ayuda, por su atención y consejos.

A Westalia y Jordi por su amistad, por sus consejos, porque siempre nos consideraron parte de la familia.

Al Dr. Decio y Jorge por su ayuda, por su amistad, por su confianza y por que siempre nos hicieron reír.

Al Dr. Isidro Matamoros por ayudarnos a concluir nuestra tesis, porque nos brindó su amistad.

Al Dr. Max Ventura por brindarnos su ayuda y siempre estar pendiente de nosotros.

A Kory Morán por su paciencia, por sus consejos, por su amistad inigualable y poner su confianza en mí para que pudiéramos realizar la tesis juntos.

Al centro de recría Bull Semen<sup>®</sup> por brindarnos la facilidad de realizar el experimento en sus instalaciones.

A la Universidad del Zulia por brindarnos su apoyo en la realización del experimento.

A mis amigos por confiar en mí y brindarme su apoyo.

A Zamorano por la formación académica que me ha brindado.

## RESUMEN

Morán, K.; Díaz, M. 2006. Aplicación de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica (PRH) para predecir la congelabilidad del semen bovino. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano, Honduras. 15 p.

Un grupo de pruebas de funcionalidad espermática que ha centrado un gran interés por su simplicidad y su valor predictivo son las de resistencia osmótica. El objetivo del presente estudio fue evaluar la aplicabilidad de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica (PRH) para predecir la congelabilidad del semen bovino. Este estudio se realizó en el centro de cría Bull Semen JR<sup>®</sup>, estado del Zulia, Venezuela. El semen de cada toro fue recolectado mediante una vagina artificial, del eyaculado se tomó una muestra de 200 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) para realizar la PRH y de cada eyaculado se evaluó una pajuela descongelada. Las muestras seminales fueron sometidas a una solución hiperosmótica (1169 mOsm) por 10 minutos, luego pasó a una solución isosmótica (289 mOsm) por 5 minutos. Se realizaron frotis de cada solución con eosina nigrosina para analizar la vitalidad (%) y las alteraciones acrosómicas (%). Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza y separación de medias, en los valores donde se encontraron diferencias se aplicó el procedimiento Diferencias Mínima Significativa (DMS) y se realizó un análisis de correlación entre tratamientos en el programa estadístico “Statistical Analysis System”; el nivel de significancia exigido fue  $P < 0.05$ . Se encontraron diferencias al comparar la vitalidad del semen sometido a la PRH ( $34.71\% \pm 9.95$ ) con el porcentaje de vitalidad pos-descongelado ( $60.43\% \pm 9.28$ ). Las diferencias encontradas entre las alteraciones acrosómicas del semen descongelado y el semen sometido al PRH fueron significativas, obteniendo valores de  $35\% \pm 6.37$  y  $46.28\% \pm 7.52$  respectivamente. Lo anterior indica que la PRH causó un daño adicional en el acrosoma de 32% en comparación con el proceso de congelación-descongelación. En ambas variables no se encontraron diferencias significativas en el análisis de correlación. Se concluyó que bajo las condiciones de este estudio, la PRH no predice la congelabilidad del semen bovino.

**Palabras clave:** Alteraciones acrosómicas, hiperosmótico, isosmótica, vitalidad.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	vi
Resumen.....	viii
Contenido.....	ix
Índice de cuadros.....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 LOCALIZACIÓN.....	3
2.2 ANIMALES.....	3
2.3 ALIMENTACIÓN Y MANEJO.....	4
2.4 PARÁMETROS DE INCLUSIÓN.....	4
2.5 METODOLOGÍA .....	4
2.5.1 Equipo de laboratorio.....	4
2.5.2 Reactivos, soluciones y medios .....	4
2.5.3 Recolección del semen.....	5
2.5.4 Evaluación de las características seminales.....	5
2.6 PRUEBA DE RESISTENCIA HIPEROSMÓTICA (PRH).....	6
2.7 VARIABLES A MEDIR .....	6
2.8 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	6
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>7</b>
3.1 VITALIDAD .....	7
3.2 ALTERACIONES ACROSÓMICAS .....	8
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>10</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>11</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>12</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Descripción de las características genotípicas y fenotípicas de los toros donantes del semen sometido a la Prueba de Resistencia Hiperosmótica. ....	3
2. Efecto de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica sobre la vitalidad del espermatozoide bovino. ....	7
3. Efecto de los medios hiperosmótico e isosmótico sobre la vitalidad y alteraciones acrosómicas del espermatozoide bovino.....	8
4. Efecto de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica sobre las alteraciones acrosómicas del espermatozoide bovino. ....	9

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde que Polge en 1949, descubrió fortuitamente las propiedades crioprotectoras del glicerol, la congelación seminal se ha convertido en una técnica con crecimiento exponencial a nivel mundial, acelerando el progreso genético, optimizando el uso de reproductores y reduciendo el riesgo de enfermedades de transmisión sexual a través de la Inseminación Artificial (IA). El glicerol es el agente crioprotector (ACP) más utilizado para espermatozoides y otro tipo de células o tejidos (Papayota *et al.* 1998), aunque en semen ha demostrado tener efectos adversos en la calidad y fertilización espermática al descongelar (Bower *et al.* 1973; Correa *et al.* 1997), no obstante reportes indican que el daño en las células espermáticas producidos por los procesos de adición o remoción del glicerol, son causa de estrés osmótico más que de toxicidad química (Frim y Mazur 1983).

En la IA de semen descongelado los ACPs tienen una gran importancia, ya que son cruciales para la obtención de una dosis seminal de excelente calidad. El semen criopreservado de toros ha venido usándose desde 1950 para la inseminación en hatos (Hammerstedt *et al.* 1990; Foote y Parks 1993) y desde entonces se han utilizado diferentes medios con distintas concentraciones de glicerol, tiempos de equilibración y condiciones de enfriamiento y se ha encontrado el uso de ACPs efectivo para la crioprotección de semen de toros. Sin embargo, los protocolos de criopreservación causan crioinjuria y muerte espermática en un 60 al 70% (Liu y Foote 1998; Watson 2000).

Es por esto que se debe entender y conocer las bases fundamentales de las propiedades criobiológicas que estas células necesitan, incluyendo sus límites de resistencia osmótica y la respuesta a la adición y extracción de ACPs permeables, ya que los repetidos cambios en las soluciones osmolares pueden originar una gran pérdida de la integridad funcional, tal como el movimiento espermático, o incluso la muerte de la célula sin pérdida de la integridad de la membrana plasmática. A pesar de que se han realizado muchas investigaciones basadas en la criopreservación del semen bovino, las propiedades biofísicas y osmóticas no han sido rigurosamente investigadas, sin embargo, Paquignon *et al.* (1986) y Hammit y Martin (1989) demostraron que no solo el medio de congelación influye en la calidad de la dosis seminal, puesto que de igual forma afectan el tiempo de enfriamiento y el tipo de almacenamiento.

La IA es una técnica de reproducción asistida, que consiste en la introducción de una dosis de semen fresco o descongelado en el aparato genital de una hembra fértil, siendo un punto crítico en el uso de esta biotecnología, la adecuada evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides (Anzar y Graham 1995), ya que, es esencial determinar la fertilidad potencial del macho y constituye un elemento fundamental para detectar la infertilidad o subfertilidad de los mismos, producida por diversos factores que afectan a la calidad

seminal, como pueden ser deficiencias alimenticias, condiciones sanitarias, de manejo y ambientales.

La valoración de la calidad seminal, tanto para la IA, como a nivel de investigación, están sufriendo un constante y dinámico desarrollo para intentar estimar con mayor precisión la fertilidad de los machos reproductores. Sin embargo, la evaluación seminal clásica, como se ha venido realizando, posee un factor subjetivo, hecho demostrado debido a que la correlación entre motilidad espermática estimada visualmente y la fertilidad es generalmente baja, tanto para semen fresco (Anderson *et al.* 1980) como para el congelado (Cochran *et al.* 1983; Amann *et al.* 1987), por lo que, desde hace algún tiempo se ha venido buscando la manera de eliminar esta subjetividad e introducir un análisis sencillo, pero con mayor objetividad, que pudiera valorar simultáneamente todas las cualidades fecundantes del máximo número posible de espermatozoides.

En la actualidad, un grupo de pruebas de funcionalidad espermática que ha centrado un gran interés por su simplicidad y su valor predictivo son las de resistencia osmótica. Estas pruebas se basan en los estudios de Dreivius y Erikson (1966), quienes mostraron la capacidad del semen de toro, conejo y hombre para captar agua de un medio hiposmótico. Bajo condiciones fisiológicas, el plasma seminal presenta una presión osmótica de unos 300 mOsm/Kg, y cuando se somete a los espermatozoides a un medio en el que hay una variación de dicha presión, éstos responden ante ella intentando equilibrar el desfase osmótico habido entre el interior de la célula y el medio; así, si éste presenta una presión más baja (hiposmótico), las células espermáticas incorporarán agua del medio a su interior, mientras que si la presión es mayor (hiperosmótico), liberarán agua del interior al medio externo (González 2002).

Las soluciones hipertónicas pueden afectar la integridad de la membrana plasmática y la motilidad del espermatozoide, aunque la pérdida de motilidad en el medio hipertónico no es un indicador de muerte celular pero la ruptura que se puede ocasionar en la membrana plasmática es claramente asociada con la pérdida de viabilidad celular (De Leeuw *et al.* 1993).

Esta problemática nos conduce a buscar pruebas alternativas que evalúen la capacidad de los espermatozoides de resistir el estrés osmótico al cual son sometidos durante el proceso de congelación, además de que el fenómeno del estrés osmótico puede ser usado para medir el comportamiento del espermatozoide a condiciones osmóticas (Papayota *et al.* 1998). Todo esto ha llevado a implementar una Prueba de Resistencia Hiperosmótica (PRH) que evalúa el estado en que se encuentra el acrosoma, además de la viabilidad del espermatozoide al contactar con una solución isosmótica luego de haber estado sometido por un periodo de tiempo corto a una solución hiperosmótica.

Basados en lo anterior esta investigación tuvo como objetivo general evaluar la aplicabilidad de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica (PRH) para predecir la congelabilidad en semen bovino y como objetivo específico comparar el porcentaje de vitalidad y de acrosomas anormales obtenidos en la evaluación del semen fresco y descongelado con aquellos obtenidos luego de aplicar la prueba de resistencia hiperosmótica.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 LOCALIZACIÓN

Las muestras seminales se obtuvieron entre los meses de marzo a abril del 2006, provenientes de 14 toros (Cuadro 1), pertenecientes al Centro de Recría Bull Semen JR<sup>®</sup>, que se encuentra ubicado en una zona agroecológica de bosque seco tropical, con temperatura promedio de 28°C y precipitación anual entre 1040 y 1100 mm; situado en el Distrito Perijá, Estado Zulia, Venezuela.

Los frotis fueron analizados en el laboratorio de Espermatología de la Unidad de Investigación en Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Venezuela.

### 2.2 ANIMALES

Se evaluaron 14 toros puros y mestizos (Cuadro 1), sexualmente maduros y de reconocido valor genético.

Cuadro 1. Descripción de las características genotípicas y fenotípicas de los toros donantes del semen sometido a la Prueba de Resistencia Hiperosmótica.

Identificación	Composición Racial	Edad (años)	Peso (kg)
238	5/8 Brahman 3/8 Pardo Suizo	6	990
489	1/2 Brahman 1/2 Holstein	4	900
900	5/8 Brahman 3/8 Pardo Suizo	5	950
985	Brahman rojo	7	1180
103	Brahman rojo	6	920
267	Mestizo Holstein Rojo	3	800
260	Holstein Rojo	3	620
249	Pardo Suizo	5	970
39/0	Brahman rojo	6	1030
271	1/2 Brahman 1/2 Pardo Suizo	3	960
268	5/8 Pardo Suizo 3/8 Criollo Venezolano <sup>®</sup>	3	750
198	5/8 Pardo Suizo 3/8 Criollo Venezolano	8	1035
234/2	Brahman	4	900
258	Mestizo Holstein Rojo	4	710

<sup>®</sup>Tipo Carora

## 2.3 ALIMENTACIÓN Y MANEJO

El manejo de los toros consistió en la estabulación individual durante el día y su alimentación base comprendía el pastoreo nocturno en potreros individuales con *Cynodon nlemfuensis* y el suministro durante el día de 16 kg de heno picado de pasto Guinea (*Panicum maximum*) y 6 kg de alimento concentrado. Todos los toros fueron mantenidos en las mismas condiciones de alimentación, sanidad y ambiente.

## 2.4 PARÁMETROS DE INCLUSIÓN

Toros:

- Condición corporal de 2.5 a 4, en escala de 1 a 5.
- Libres de enfermedades infectocontagiosas (Brucelosis, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina, Leptospira, Tuberculosis).

Semen:

- Motilidad masal  $\geq 3$  en escala de 1 a 5.
- Motilidad individual  $\geq 60\%$ .
- Volumen entre 4-9.5 mL
- Concentración  $\geq 500$  millones de espermatozoides/mL
- Vitalidad  $\geq 62\%$ .

## 2.5 METODOLOGÍA

### 2.5.1 Equipo de laboratorio

Microscopio (Nikon Labophot, Revelation III<sup>®</sup>)

Baño María (YCW-035<sup>®</sup>)

Microcentrífuga (Mini Spin Plus Eppendorf<sup>®</sup>)

Platina con temperatura regulable (Electrovet, Osaka OK 51<sup>®</sup>)

Medidor de concentración (IMV Micro-Reader I<sup>®</sup>)

### 2.5.2 Reactivos, soluciones y medios

Solución Isosmótica (289 mOsm)

Citrato de Sodio 1.6 g

Agua destilada 50 mL

Solución Hiperosmótica (1169 mOsm)

Fructuosa 2.70 g

Citrato de Sodio 1.47 g

Agua destilada 100 mL

Solución de eosina-nigrosina para evaluar la vitalidad y la morfología de los espermatozoides

Eosina 0.7 g

Nigrosina 10 g

Buffer tartrato/fosfato/glucosa

### 2.5.3 Recolección del semen

El semen de cada toro fue recolectado mediante una vagina artificial, de un eyaculado de cada toro se tomó una muestra de 200  $\mu\text{L}$  para realizar la PRH y de cada eyaculado se evaluó una pajuela descongelada. Las pajuelas de 0.54 mL a evaluar tenían una concentración promedio de  $30 \times 10^6$  espermatozoides.

### 2.5.4 Evaluación de las características seminales

**Concentración espermática (CONC).** Se determinó mediante el aparato electrónico IMV Micro-Reader<sup>®</sup>, que mide el número de espermatozoides que están presentes en la muestra seminal, a través del proceso de espectrofotometría.

**Motilidad individual (MI) y motilidad masal (MM).** La MI se evaluó colocando una gota de semen fresco sobre una lámina porta objetos temperado a 37°C y cubriéndola con un cubreobjetos. Se observó en el microscopio a 40x, determinando el porcentaje de movimiento progresivo, clasificándolo en escala de 0 a 100%, mientras que la MM se evaluó en el microscopio a 10x pero con semen fresco puro y fue clasificada en escala de 1 a 5.

**Vitalidad.** Se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos en frotis teñidos con eosina/nigrosina (Tamuli y Watson 1994), los cuales fueron observados en microscopio óptico de campo claro a 100x. Los frotis se extendieron, mezclando en un portaobjetos previamente temperado a 37°C, 20  $\mu\text{L}$  de semen con 10  $\mu\text{L}$  de eosina/nigrosina; los frotis se mantuvieron en la platina temperada hasta su secado. Para su análisis en laboratorio se tomó como muestra representativa 100 espermatozoides de cada lámina.

La eosina permitió visualizar los espermatozoides muertos porque se tiñen debido a la no funcionalidad de su membrana, mientras que en los espermatozoides vivos esto no ocurre y quedan incoloros sobre el fondo oscuro teñido por la nigrosina.

**Integridad del acrosoma.** El estado del acrosoma de los espermatozoides fue evaluado en los frotis teñidos con eosina-nigrosina al mismo tiempo que se analizó vitalidad en un microscopio óptico de campo claro a 100x. Se tomó como muestra representativa 100 espermatozoides de cada lámina.

## **2.6 PRUEBA DE RESISTENCIA HIPEROSMÓTICA (PRH)**

Se colocaron dos tubos eppendorff en baño maría, uno identificado con la letra A con 800  $\mu\text{L}$  de solución isosmótica y otro tubo identificado con la letra B con 1000  $\mu\text{L}$  de solución hiperosmótica. Luego de 10 minutos, se le añadió al tubo B 200  $\mu\text{L}$  de semen y se dejó en baño maría por 10 minutos, al cumplirlos, se extrajo de ese tubo 200  $\mu\text{L}$  (semen + solución) y se le añadió al tubo A y se dejó durante 5 minutos en baño maría. Luego se introdujeron los eppendorff en una microcentrífuga y se centrifugó a 2000 rpm (revoluciones por minuto) durante 3 minutos, al terminar el centrifugado se observaron los pellets, se extrajo gran parte del sobre nadante y se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de dicho pellet de cada eppendorff y se hicieron frotis con 10  $\mu\text{L}$  de eosina-nigrosina. Luego los frotis fueron evaluados y se tomó de igual manera 100 espermatozoides como muestra representativa y las características evaluadas fueron: vitalidad y acrosomas alterados.

## **2.7 VARIABLES A MEDIR**

Se analizaron las siguientes variables:

- Vitalidad (%).
- Alteraciones acrosómicas (%).

## **2.8 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza y separación de medias, en los valores donde se encontraron diferencias se aplicó el procedimiento Diferencias Mínima Significativa (DMS) y la prueba Tukey. Además se realizó un análisis de correlación para cada variable; en el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS 2000); el nivel de significancia exigido fue  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 VITALIDAD

La relación de espermatozoides vivos y muertos es un parámetro importante, sobretodo para la conservación del semen. Un espermatozoide muerto libera enzimas, entre éstas se encuentran las del acrosoma, que van a producir daños en las membranas de los vivos, lo que provocará un mayor número de espermatozoides dañados y la consiguiente pérdida de calidad en las dosis seminales (González 2002).

La media de la vitalidad en semen fresco fue de  $75.64\% \pm 8.36$ , valor que se encuentra dentro del rango reportado por Holý (1987), quien concluye que en semen fresco existe una disminución de hasta un 30% en la vitalidad (Cuadro 2) indicando que los espermias evaluados se encontraban dentro de los parámetros de calidad seminal aceptable.

Cuadro 2. Efecto de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica sobre la vitalidad del espermatozoide bovino.

Tratamiento	Vitalidad observada (%)	Vitalidad esperada (%)
Semen fresco	$75.64 \pm 8.36$ a <sup>o</sup>	70 <sup>o</sup>
Semen congelado-descongelado	$60.43 \pm 9.28$ b	dnd <sup>Φ</sup>
Semen + PRH	$34.71 \pm 9.95$ c	dnd <sup>Φ</sup>

<sup>o</sup>Valores con distinta letra en la misma columna difieren significativamente entre sí (P<0.05).

<sup>o</sup>Valor de vitalidad en semen fresco sugerido por Holý (1987).

<sup>Φ</sup>dnd: dato no disponible.

La disminución porcentual en la vitalidad del semen fresco con el semen sometido a la PRH fue 55%, mientras que la disminución observada de fresco a descongelado fue de 20%, al comparar los datos antes mencionados se encontró diferencia significativa (P<0.05). Esto indica que la PRH afectó drásticamente la vitalidad en la muestra seminal.

La pérdida en la vitalidad corresponde a que no todos los espermias son capaces de resistir el proceso de congelación-descongelación, en el cual experimentan cambios osmolares los cuales inducen la deshidratación y rehidratación de la célula. Cuando el semen fresco fue sometido al medio hiperosmótico, la vitalidad se redujo en 25% y al momento de reestablecer la osmolaridad en el medio isosmótico, la vitalidad se vió afectada drásticamente ya que se

disminuyó en 39% (Cuadro 3). El detrimento que sufre esta variable puede ser atribuida a la alta osmolaridad utilizada en el experimento. Bredderman y Foote (1969) concluyeron que el semen bovino contiene alrededor de 55% de agua, por lo que el espermatozoide se reduce un 21% en promedio, cuando es transferido de un medio isosmótico a uno de 712 mOsm.

Cuadro 3. Efecto de los medios hiperosmótico e isosmótico sobre la vitalidad y alteraciones acrosómicas del espermatozoide bovino.

Tratamiento	Vitalidad (%)	Alteraciones acrosómicas (%)
Semen fresco	75.64 ± 8.36 a <sup>o</sup>	13.50 ± 9.53 d
Semen descongelado	60.43 ± 9.28 b	35.00 ± 6.66 b
PRH		
Hiperosmótico	56.29 ± 7.13 b	23.71 ± 4.39 c
Isosmótico	34.71 ± 9.95 c	46.50 ± 7.78 a

<sup>o</sup>Valores con distinta letra en la misma columna difieren significativamente entre sí (P<0.05).

El estudio realizado en humanos por Gao *et al.* (1993) reporta que el daño ocurrido al semen sucede cuando los espermatozoides que se encuentran deshidratados (medio hiperosmótico) y son rehidratados (medio isosmótico), lo cual coincide con el estudio realizado en bovino por Guthrie *et al.* (2002), quienes concluyen que la disminución drástica en la calidad seminal sucede cuando el semen regresa a su medio isosmótico. En semen de verraco de la misma forma Caiza de la Cueva *et al.* (1997) reportaron que cuando la osmolaridad está por encima de los 1000 mOsm la vitalidad y las alteraciones acrosómicas se ven afectadas, aunque son drásticamente modificadas al regresarlos al medio isosmótico.

El análisis de correlación entre el semen descongelado y el semen sometido a la PRH no se encontró diferencias significativas. Lo expuesto anteriormente demuestra que la PRH no predice la variable vitalidad.

### 3.2 ALTERACIONES ACROSÓMICAS

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación, por lo que es importante realizar una valoración específica del mismo, tanto para semen fresco, como para descongelado. Los daños en el acrosoma provocan que se liberen las enzimas (acrosina e hialuronidasa) que alberga en su interior, impidiendo la fecundación, de forma que si el porcentaje de estas alteraciones es elevado, puede provocar un descenso de la fertilidad (Villanova y Gatica 2002).

La media de las alteraciones acrosómicas encontradas en semen fresco fue 13.50% ± 9.53, dato que coincide con el rango reportado por Holý (1987), que indica que al evaluar una eyaculado normal en semen bovino las anomalías en fresco no deberían sobrepasar un 15% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la Prueba de Resistencia Hiperosmótica sobre las alteraciones acrosómicas del espermatozoide bovino.

Tratamiento	Alteraciones acrosómicas observada (%)	Alteraciones acrosómicas esperada (%)
Semen fresco	13.50 ± 9.53 a <sup>o</sup>	15 <sup>o</sup>
Semen congelado-descongelado	35.00 ± 6.61 b	25 <sup>o</sup>
Semen + PRH	46.50 ± 7.81 c	25 <sup>o</sup>

<sup>o</sup>Valores con distinta letra en la misma columna difieren significativamente entre sí (P<0.05).

<sup>a</sup>Valor de anomalías acrosómicas en semen fresco sugerido por Holý (1987).

<sup>o</sup>Valor de anomalías acrosómicas sugerido por González (2001).

PRH: Prueba de resistencia hiperosmótica.

Las diferencias encontradas entre las alteraciones acrosómicas del semen descongelado y el semen sometido a la PRH fueron significativas (P<0.05); indicando que la PRH causó un daño adicional en el acrosoma de 32% en comparación con el proceso de congelación-descongelación. Guthrie *et al.* (2002) expresan que el semen bovino es muy sensible a los cambios en la osmolaridad extracelular, esto explica el aumento drástico en las alteraciones acrosómicas, ya que los cambios osmolares sufridos en el proceso fueron súbitos, de 280-320 mOsm en semen fresco a 1169 mOsm en el medio hiperosmótico y al momento de restablecer la isosmolaridad (289 mOsm).

El deterioro adicional causado por la PRH en el acrosoma fue mayor cuando se restableció la isosmolaridad, aumentando las alteraciones acrosómicas en 96%, mientras que el aumento observado de fresco a hiperosmótico fue de 75% (Cuadro 4). El daño al estado del acrosoma causado por la PRH, al igual que la vitalidad se atribuye especialmente al momento en que se restableció la isosmolaridad a las muestras seminales. Estos resultados coinciden con los de Guthrie *et al.* (2002) en bovino, Curry y Watson (1994) en humanos y carneros; Quintero *et al.* (2005), Caíza de la Cueva *et al.* (1997) y Bamba (1988) en cerdos, quienes concluyeron que las alteraciones acrosómicas aumentan drásticamente al retornar la isosmolaridad de la muestra seminal después de haber pasado por la solución hiperosmótica. De igual manera que en la variable vitalidad en el análisis de correlación para la variable alteraciones acrosómicas no se encontró diferencias significativas (P>0.05).

Los resultados obtenidos demuestran que la PRH no predice la variable de alteraciones acrosómicas. De igual manera Medrano (1998), en semen de cerdo concluyó que la PRH fue detrimental para la membrana del espermatozoide.

## **4. CONCLUSIONES**

Bajo las condiciones de este estudio, la PRH no predice la congelabilidad del semen bovino.

La PRH produce un efecto detrimental aún mayor en la vitalidad y las alteraciones acrosómicas que el producido normalmente por el proceso de congelación-descongelación.

## **5. RECOMENDACIONES**

Realizar investigaciones similares donde se prueben diferentes osmolaridades en el medio hiperosmótico para encontrar la presión osmótica que simule el proceso de congelación–descongelación del semen bovino.

Realizar investigaciones futuras donde involucren un mayor número de muestras seminales y mayores repeticiones por toro.

## 6. LITERATURA CITADA

Anderson, E.W.; Cranwell, J.E.; Pickett, B.W.; Voss, J. 1980. The relationship of motility to fertility of frozen stallion spermatozoa. Proc. 9th Int. Congress of Animal Reproduction. A. I. Madrid 5: 335-338.

Anzar, M.; Graham, E. 1995. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. *Theriogenology* 38: 439-449.

Amann, R.P.; Cristanelli, M.J.; Squires, E.L. 1987. Protein in stallion seminal plasma. *Journal Reproduction Fertility Suppl.* 35:113-120.

Archivos Latinoamericanos de Producción Animal (2005, México). 2005. El test de resistencia hiperosmótica: un test promisorio para medir la integridad de la membrana espermática del cerdo. Quintero, A.; Rubio, J.; Rigau, T.; Rodríguez, J. Maracaibo, Venezuela. 4 p.

Bamba, K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29(6):1245-1251.

Bower, R.E.; Crabo, B.G.; Pace, M.M.; Graham, E.F. 1973. Effect of dilution and glycerol removal on the release of glutamic-oxaloacetic-transaminase (GOT) from boar spermatozoa. *Journal of Animal Science* 36:319-24.

Bredderman, P.J.; Foote, R.H. 1969. Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets and the relationship of cell size to motility and fertility. *Journal of Animal Science* 28: 496-501.

Caiza de la Cueva, F.; Rigau, T.; Pujol, R.; Piedrafita, J.; Rodriguez-Gil, J. 1997. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 48: 301-315.

Cochran, J.D.; Amann, R.P.; Squires, E.L.; Pickett, B.W.; 1983. Fertility of frozen – thawed stallion semen extended in lactase-EDTA-egg yolk extender and packed in 1.0 mL straws. *Theriogenology* 20: 735-741.

Correa, J.R.; Heersche, J.G.; Zavos, P.M. 1997. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology* 47: 715-721.

Curry, M.R.; Watson, P.F. 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 31: 39-46.

De leeuw, F.E., De Leeuw, A.M.; Den Daas, J.H.; Colenbrander, B; Verkleij, A.J. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30:32-44.

Drevius, L.O.; Eriksson, H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research* 42: 136-156.

Foote, R.H.; Parks J.E. 1993. Factor affecting preservation and fertility of bull semen: a brief review. *Reproduction Fertility Development* 5: 665-673.

Frim, J.; Mazur, P. 1983. Interactions of cooling rate, warming rate, glycerol concentration and dilution procedure on the viability of frozen-thawed human granulocytes. *Cryobiology* 20:657-76.

Gao, D.Y.; Ashworth, E.; Watson, P.F.; Kleinhans, F.W.; Mazur, P.; Critser; J.K. 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction* 49:112-123.

González, C. 2001. *Reproducción Bovina*. Fundación Giraz. Maracaibo, Venezuela. 256p.

González, R. 2002. *Contrastación Seminal* (en línea). Consultado 12 marzo 2006. Disponible en <http://www.conejosyalgommas.com.ar/articulos023>.

Guthrie, H.D.; Liu, J.; Critser J.K. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 67: 1811-1816.

Hammerstedt, R.; Graham, J.; Nolan, J. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them of survive. *Journal of Andrology* 11:73-88.

Hammit, D.G.; Martin, P.A. 1989. Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled-rate freezing in straws. *Theriogenology* 32:359-368.

Holý, L. 1987. *Biología de la Reproducción Bovina*. 2 ed. Cuba. Editorial Científico Técnica. 344p.

Lui, Z.; Foote, R.H. 1998. Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and nonpermeable agents. *Criobiology* 37:207-218.

Medrano, J.A. 1998. *The importance of individual variation in boar semen cryopreservation*. Ph.D Thesis. Institute of Zoology, University of London. England. 203p.

Papayota, N.; Pavlos, A.; Panayiotis, M.; Correa, J.R. 1998. Occurrence of osmotic shock in human spermatozoa: its effects on the qualitative measurements of frozen-thawed spermatozoa. 3:66-72.

Paquignon, M.; Quelier, P.; Dacheux, J.L. 1986. Congélation du sperme de verrat: Comparaison de différents dilueurs, techniques de préparation de la semence, modes de conditionnement et températures de décongélation. *Animal Zootechnology*. 35:173-184.

SAS Institute. 2000. SAS user guide: statistics. Versión 8.0 Edition SAS institute Inc. Cary, NY. 530 p.

Tamuli, M.K.; Watson, P.F. 1994. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Reproduction Science* 35: 247-254.

Villanova, L.; Gatica, R. 2002. ¿Puede el análisis *per se* predecir realmente la fertilidad potencial en toros? *Revista Científica, FCV-LUZ*, Vol XII (3): 202-208.

Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61; 481-492.