

**Efecto de la criopreservación sobre la  
integridad de la membrana plasmática en  
espermatozoides de toro**

**Nelcy Cecibel López Rodríguez  
David Esaú Rivera Durón**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2015

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

# **Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingenieros Agrónomos en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Nelcy Cecibel López Rodríguez**  
**David Esaú Rivera Durón**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2015

# **Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro**

Presentado por:

Nelcy Cecibel López Rodríguez  
David Esaú Rivera Durón

Aprobado:

---

John Jairo Hincapié, Ph.D.  
Asesor principal

---

John Jairo Hincapié, Ph.D.  
Director  
Departamento de Ciencia y  
Producción Agropecuaria

---

Isidro A. Matamoros, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

## **Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro.**

**Nelcy Cecibel Lopez Rodriguez**  
**David Esaú Rivera Durón**

**Resumen.** Es fundamental determinar el efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en los espermatozoides, para esto existen diversas pruebas que indican la calidad del semen criopreservado. Por ello se llevó a cabo un estudio en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada a 32 km de Tegucigalpa. El objetivo fue determinar el efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos utilizando las pruebas de Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST), método de Blom, prueba de Spermac<sup>®</sup> y la prueba de resistencia de Götze. Para lo cual se utilizó muestras de semen de tres toros Jersey con dos tratamientos uno en fresco y otro en descongelado. Las variables determinadas mostraron los siguientes resultados: en motilidad individual los tratamientos en fresco y descongelado con valores 95% y 61.7% ( $p \leq 0.05$ ). En Anormalidades hubo diferencia ( $p \leq 0.05$ ) con valores de 19.8% y 26.0% con un incremento de 6.2% en semen descongelado. En cuanto a porcentaje de espermatozoides vivos y muertos hubo diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) siendo mayor los espermatozoides vivos. La prueba de endósmosis celular (HOST) mostró una diferencia entre los tratamientos con Endósmosis Positiva (Host EP) siendo esta ( $p \leq 0.05$ ) con valores 79.9% y 60% en semen fresco y descongelado respectivamente. Al evaluar pH se encontró una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) siendo mayor el tratamiento en fresco. El resultado de la prueba de resistencia de Götze mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) con valores 83.7% y 58.7%, siendo superado por el tratamiento en fresco el tratamiento descongelado. Respecto a la evaluación de tiempo de resistencia de la prueba de Götze esta no mostró diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) presentando un diferencia numérica de 10% en semen fresco, y en descongelado la diferencia presentada es de 8.4 %. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede determinar que la criopreservación afecta la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides.

**Palabras clave:** Calidad biológica, congelar, fertilidad, hipoosmótico.

**Abstract:** It is essential to determine the effect of cryopreservation on the integrity of the sperm plasmatic membrane, for this there are several tests that indicate the quality of cryopreserved semen. This study was conducted at the Animal Reproduction Laboratory of the Pan-American Agricultural School, located at 32 km from Tegucigalpa. The objective was to determine the effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of the plasmatic membrane using the Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST), Blom method, Spermac<sup>®</sup> test and Götze endurance test. Semen samples from three Jersey bulls were used with two treatments one in fresh and another thawed. Individual motility treatments in fresh and thawed samples were 95% and 61.7% ( $p \leq 0.05$ ). In abnormalities there was difference ( $p \leq 0.05$ ) with values of 19.8% and 26.0% with an increase of 6.2% in thawed semen. For percentage of live and dead sperm, significant differences were presented ( $p \leq 0.05$ ) with higher results using living sperm. Endosmosis cell test (HOST) showed a difference between treatments against Positive endosmosis (Host EP) ( $p \leq 0.05$ ) with 79.9% and 60% in fresh semen and thawed, respectively. While evaluating pH a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) was found in the fresh treatment. The Götze resistance test showed significant differences ( $p \leq 0.05$ ) with 83.7% and 58.7%, with fresh over the thawing treatment. Regarding the evaluation in time, the Götze resistance test didn't show significant differences ( $p \geq 0.05$ ) presenting a numerical difference of 10% in fresh semen, even though thawed 8.4%. According to the results it can be determined that cryopreservation affects the integrity of the plasmatic membrane of sperm.

**Keywords:** Biological quality, freezing, fertility, hypo osmotic.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	v
Índice de cuadros y figuras.....	vi
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
2. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	3
3. <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	11
4. <b>CONCLUSIONES</b> .....	18
5. <b>RECOMENDACIONES</b> .....	19
6. <b>LITERATURA CITADA</b> .....	20

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Clasificación de la motilidad en masa en eyaculados bovinos.....	4
2. Escala numérica y descriptiva para determinar la motilidad espermática individual del semen bovino pos-descongelado.....	5
3. Interpretación de la prueba de resistencia de Götze.....	8
4. Número de espermias viables por dosis de semen al descongelado. Cálculo e interpretación de la calidad biológica.....	9
5. Evaluación de Porcentajes de Motilidad Individual (MI), Porcentaje de Anormalidades, Porcentaje de vivos y muertos.....	11
6. Evaluación de porcentaje de Endósmosis Positiva (EP) y Negativa (EN) de Host y pH. ....	13
7. Evaluación de la prueba de resistencia de Götze en semen de toro. ....	14
8. Evaluación de la prueba de Götze en fresco y Posdescongelado. ....	15
9. Análisis de correlación de Pearson.....	16

Figuras	Página
1. Tinción de método de Blom en fresco.....	12
2. Método de Blom en posdescongelado.....	12
3. Prueba de HOST en semen posdescongelado con endosmosis positiva y negativa. ....	13

## 1. INTRODUCCIÓN

La calidad en el semen de toros es un factor importante para determinar los niveles de fertilización adecuados siempre que la técnica de inseminación se realice correctamente (Rosas 1997). Las principales características para determinar la calidad del semen son: viabilidad y morfología espermática. La motilidad individual progresiva es la característica de viabilidad donde el espermatozoide normal presenta un movimiento lineal, progresivo (hacia adelante) y rápido mientras rota sobre su eje longitudinal (Saacke *et al.* 1988).

El espermatozoide es una célula flagelada libre, altamente especializada que no crece ni se divide, su morfología es semejante en todas las especies de animales domésticos, básicamente tiene tres partes fundamentales: cabeza, cuello y cola (Pedroso 1992). El cuello del espermatozoide, un órgano intermediario corto, une la cabeza con el sistema locomotor (cola) y funciona como centro de movimiento del espermatozoide. La cola del espermatozoide es fina y larga, siendo el órgano del movimiento y de metabolismo del mismo (Pedroso 1992). Los procesos de congelación y descongelación provocan lesiones o deterioros en el acrosoma de los espermatozoides (Baerden y Fuquay 1982).

Para un espermatozoide, la membrana plasmática representa una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas al medio circundante, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del oocito (Rubio y Quintero 2008). Por ello es fundamental determinar el efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en los espermatozoides.

Existen diferentes pruebas bioquímicas que ayudan a completar el proceso: La prueba de endósmosis celular Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) se fundamenta en que la suspensión de espermatozoides en un medio hipoosmótico ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que la célula compensa fisiológicamente difundiendo agua al compartimento intracelular y como consecuencia, el espermatozoide aumenta su volumen y se pueden observar cambios morfológicos en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos (Sánchez *et al.* 2012). Este ha demostrado ser una técnica confiable en la predicción de fertilidad (Campi *et al.* 2004).

En los espermatozoides funcionalmente alterados con una membrana plasmática física o funcionalmente dañada, no se produce la captación selectiva de agua de forma adecuada alcanzándose así un equilibrio pasivo entre los medios intra y extracelular que no provoca cambios morfológicos apreciables. Por otra parte, el aumento de volumen de las células se puede provocar mediante otras vías distintas, al descenso de la osmolaridad del medio que rodea a las células. Soluciones isosmóticas de solutos polares como el glicerol, pueden provocar

cambios en el volumen celular debido a la capacidad de estas sustancias de arrastrar agua cuando atraviesan la membrana de la célula alterando así, el equilibrio de las presiones osmóticas internas y externas (Rubio y Quintero 2008).

De esta manera, las alteraciones celulares atribuidas al glicerol parecen estar más relacionadas con un shock osmótico, que con la toxicidad química (Rubio y Quintero 2008), razón por lo cual, resulta preponderante estudiar la respuesta a cambios osmóticos de las membranas espermáticas. A pesar de todo ello, todavía existe un gran desconocimiento sobre los mecanismos moleculares específicos que el espermatozoide utiliza para reaccionar frente a un medio hiposmótico (Rubio y Quintero 2008).

La prueba de la resistencia de Götze, determina el poder que tienen los espermatozoides de resistir varios factores nocivos de carácter químico, físico o térmico (Holý 1987). La prueba de Götze consiste en colocar un volumen de 0.01mL de semen puro y se añade lentamente 100 mL de solución de Triladyl<sup>®</sup> a 37 °C manteniéndose la temperatura. Realizando la lectura cada diez minutos evaluando microscópicamente la duración del movimiento rectilíneo en la muestra; las muestras que conservan su movimiento rectilíneo por lo menos 45 minutos podrán ser utilizadas en la inseminación artificial (Holý 1987).

Con el método de BLOM se puede diferenciar concretamente los espermatozoides vivos y los muertos según la eosinofilia de la cabeza de los muertos, que se tiñe de rosado y de los moribundos, que se tiñe sólo la parte caudal (Holý 1987). En la diferenciación de los espermatozoides vivos y muertos por medio de la coloración, las cabezas de los espermatozoides muertos o en fase letal, tienen la propiedad de dejar pasar los colorante, gracias a la perturbación de la permeabilidad de la membrana cefálica, mientras que los espermatozoides vivos y activos no permiten el paso de los colorantes por lo que permanecen sin coloración (Holý 1987).

El objetivo general determinar el efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos. Los objetivos específicos fueron determinar el efecto de la criopreservación sobre la membrana plasmática a través del porcentaje de endósmosis positiva y negativa (HOST) en las muestras de semen fresco y poscongelado. Determinar los tiempos en la prueba de resistencia de Götze en las muestras de semen fresco y poscongelado; determinar el pH, concentración, porcentaje de motilidad individual progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (método de BLOM) y porcentaje de anormalidades en semen fresco y poscongelado; determinar el efecto de la criopreservación sobre la calidad biológica del semen poscongelado y su correlación con las pruebas de HOST, espermatozoides vivos y muertos y anormalidades.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló entre julio y octubre del 2015 en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada a 32 km de Tegucigalpa, Honduras. Con una altura promedio de 800 msnm, precipitación y temperatura promedio anual de 1100 mm y 25°C respectivamente.

Se utilizó semen proveniente de tres toros Jersey mayores de 30 meses de edad. Todos los reproductores fueron sometidos a chequeo veterinario y se verificó su buen estado de salud, así mismo, se les realizó la serología para brucelosis, leptospirosis, leucosis enzoótica bovina a fin de verificar que estuvieran libres de estas enfermedades. De igual manera, fueron sometidos a la prueba de la tuberculinización intradérmica y tuvieron vigentes todas las vacunas contra rinotraqueitis bovina infecciosa, diarrea viral bovina, para-influenza 3, virus sincitial bovina, y enfermedades clostridiales. Su programa de desparasitación estaba vigente.

Cada toro se sometió al proceso de recolección de semen utilizando la metodología del electroeyaculador IDEAL Instruments, USA. A cada toro se le recolectó un eyaculado, el cual fué fraccionado: 1 mL se utilizó para las pruebas en fresco y el resto fué congelado utilizando el diluyente Triladyl® (Minitube Alemania): el frasco de concentrado trae 250 mL para diluir con 750 mL de agua bidestilada y 250 mL de yema de huevo fresco. La preparación del diluyente se realizó acorde a las instrucciones del fabricante. La preparación del volumen se realizó de acuerdo a la cantidad de diluyente necesario luego del cálculo del volumen final.

Todo el semen fresco fue mantenido a 37°C durante su manipulación. Una vez recolectado y tomada la muestra de 1 mL en un tubo Eppendorf, el semen fue prediluido 1:1 con Triladyl® hasta que se completo la evaluación, luego se agregó el resto del diluyente y se procedió a empacar, sellar, equilibrar y congelar en nitrógeno líquido. El semen fue empacado en pajuelas de 0.5 mL a una concentración de  $30 \times 10^6$  espermatozoides.

Tanto el semen fresco como el poscongelado fue sometidos a la evaluación macro y microscópica, así como a las pruebas de HOST y Götze, eosina-nigrosina, Spermac®. La descripción de estas pruebas se presenta más adelante.

### **Evaluación del semen**

Motilidad en Masa (MM): (Solo para semen en fresco). Está caracterizado por la formación de remolinos (olas espermáticas) que se originan y desaparecen rápidamente. Según la intensidad de los remolinos se valoran tanto la densidad como el porcentaje de espermatozoides vivos y su grado de actividad. Cuanto más grande es la intensidad de la formación de los remolinos, tanto más grandes son la motilidad y el número de

espermatozoides móviles (Holý 1987). El procedimiento se realizó aplicando una gota directa en un extremo del portaobjeto y se observaron los movimientos de ondas y remolinos a un aumento de 10X y poca intensidad de luz (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de la motilidad en masa en eyaculados bovinos

Valor	Porcentaje	Clasificación	Descripción
4	91-100	Muy bueno	Ondas oscuras con movimientos rápidos.
3	71-90	Bueno	Ondas aparentes. Remolinos con movimiento moderado.
2	51-70	Aceptable	Ondas ligeras con movimiento apenas perceptibles.
1	10-50	Pobre	No hay ondas. Movimiento espermático vibrátil y débil.
0	0- 9	Malo	Ausencia total de movimiento

Fuente: Vera (2001); adaptado por los autores

Motilidad individual progresiva (MIP): (Para semen fresco y poscongelado). Es el movimiento recto, progresivo (hacia adelante) y rápido, mientras rota sobre su eje longitudinal. Esta rotación es producida por un movimiento tridimensional (helicoidal) de la cola, a este tipo de movimiento se le denomina progresivo (Amann 1988). Existen otros tipos de movimientos del espermatozoide, como el bidimensional o pendular, el cual hace que el esperma se desplace menos rápido y, por lo tanto, se considera un movimiento anormal, así como los movimientos circulares, vibratorios, hacia atrás o anclados. Estos movimientos anormales son derivados de alteraciones anatómicas o del medio con el que tiene contacto el espermatozoide (Rosas 1997).

Para su valoración se diluyó 10 µl de semen en 90 µl de solución salina, se agregó una gota fina sobre el portaobjetos, se cubrió y observó inicialmente a 200X y luego a 400X. Se observaron como mínimo 5 campos. En caso de estar muy concentrado se recomienda volver a diluir nuevamente en la misma proporción.

El grado de asociación entre la motilidad progresiva y la fertilidad, medida como porcentaje de no retorno, varía de 0.22 a 0.77 dependiendo de varios factores como son: la población estudiada, los volúmenes de semen utilizados y los medios de dilución. (Saacke *et al.*1984).

La motilidad progresiva al posdescongelado se expresa como porcentaje en incrementos de 5 puntos porcentuales. En términos estrictos no existe un porcentaje mínimo requerido de

motilidad progresiva al posdescongelado, aunque generalmente los centros de procesamiento de semen desechan automáticamente aquellas dosis de semen que están por debajo del 20% y a su vez, son pocas las dosis de semen bovino que presentan más de un 50% de MIP al posdescongelado. Lo más común es encontrar MIP dentro del rango de 24 a 45% siendo el semen de toros Holstein los que presentan una mayor recuperación espermática al posdescongelado, seguido de otros toros de razas lecheras y luego los de razas de carne (Pulido 1997).

La prueba se realizó con el material atemperado entre 35 y 37 °C. Se descongeló una dosis de semen del lote en estudio, para las pajuelas de 0.5 mL se diluyó en proporción de 1:4 en una solución salina fisiológica atemperada. Se homogenizó la mezcla con una pipeta y se colocó dos gotas, una en cada extremo del portaobjetos atemperado y cada gota cubierta con un cubreobjetos atemperado. Se observaron a 400X en un microscopio de contraste de fase, se observó 5 campos diferentes en cada muestra y luego se determinó el porcentaje de motilidad progresiva promedio de los 5 campos, en incrementos de 5 puntos porcentuales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Escala numérica y descriptiva para determinar la motilidad espermática individual del semen bovino pos-descongelado

Células móviles %	Valor descriptivo	Valor numérico
>60	Excelente	5
50-60	Muy Bueno	4
25-50	Bueno	3
15-25	Pobre	2
0-15	Muy Pobre	1

Fuente: Zemjanis (1981); adaptado por los autores

pH (Para semen fresco y poscongelado). Normalmente en semen fresco de toro el pH oscila entre 6.2 y 6.8, sin embargo, los diluyentes utilizados comercialmente incrementaron estos valores entre 6.8 y 7.2. Los eyaculados de mayor acidez son más fértiles (Holý 1987). Para este proceso se usó papel tornasol, el cual está graduado en la escala de 4-12.

Concentración (Para semen en fresco): La concentración espermática del semen en fresco se expresa como el contenido de espermatozoides en una unidad de volumen (milímetros o centímetros cúbicos) y su apreciación tiene gran significación, no sólo para la clasificación, sino para la dilución del semen (Zavaleta 1997). Se utilizó la metodología del espectrofotómetro Spermac<sup>®</sup> (Minitube, Alemania) el cual está calibrado de fábrica para semen bovino, basta con agregar una gota de semen fresco sin diluir en la cubeta de muestra, introducirla en el equipo y éste da la lectura en un término de 10 segundos, mostrando la concentración en millones de espermatozoides/mL.

Morfología (Para semen fresco y poscongelado): Este aspecto es de suma importancia ya que el espermatozoide solamente podrá cumplir con su función biológica de fecundar cuando se encuentra bien constituido morfológicamente, es decir, cuando tiene la estructura típica de cabeza, cuello, parte intermedia y cola.

Las células anormales del eyaculado reflejan un trastorno de la función de los testículos o del epidídimo. Este trastorno pudo haber ocurrido varias semanas antes de la toma de semen, tomando en cuenta que la espermatogénesis dura entre 60 a 75 días aproximadamente. Cuando las anomalías se originan en el testículo durante el proceso de la espermatocitogénesis, se denominan anomalías primarias y cuando las anomalías se originan por alteraciones en el proceso de maduración en el epidídimo, estados febriles prolongados, exceso de actividad sexual, reposo sexual prolongado (> 60 días) perturbaciones bioquímicas del plasma seminal, inflamaciones del testículo o de las glándulas accesorias, errores técnicos en la manipulación de la muestra, se denominan anomalías secundarias. Las anomalías primarias son:

- Cabeza: piriforme, redondeada, microcabeza, dobles, macrocabeza, diadema
- Pieza media: doble, hinchada, doblada, abaxial, incompleta
- Cola: enrollada sobre la cabeza

Anomalías secundarias: Cabeza desprendida de la cola, gota citoplasmática proximal o distal, cola doblada en cualquier dirección, colas partidas, acrosoma roto, deforme o desprendido (puntiagudo, abultado, achatado, arrugado, doblado, incompleto, hinchado).

Es importante tomar en cuenta que el semen es sometido al proceso de congelamiento y descongelamiento, la presencia de anomalías secundarias puede verse incrementada debido al choque de frío. Se ha encontrado una asociación negativa entre el porcentaje de espermatozoides anormales y la fertilidad que va de -0.21 a 0.64 dependiendo del tipo de anomalías y del porcentaje de éstas en el eyaculado (Rosas 1997).

Se utilizó la coloración Spermac<sup>®</sup> (Minitube, Alemania) la cual se describe a continuación:

- Preparación de las muestras y fijación. Se realizó un frotis delgado de semen diluido en proporción 1:1 en una solución de citrato de sodio al 3%. El frotis fue secado al aire, evitando el exceso de desecación. El tiempo entre la preparación del frotis y la fijación no debe exceder los 5 minutos. La fijación se hizo sumergiendo la preparación en la solución fijadora por al menos 5 minutos. Luego las preparaciones permanecieron verticales sobre papel filtro para dejar escurrir el exceso de solución fijadora. También se utilizó una platina térmica atemperada durante 15 minutos.

- Secuencia de tinción. El set de tinción está constituido por los siguientes componentes: frasco A (50ml de reactivo rojo), frasco B (50mL de reactivo verde claro), frasco C (20mL de reactivo verde oscuro). Se lavó después de la fijación, sumergiendo cuidadosamente 5 a 6 veces en agua destilada, retocando a continuación con papel filtro. a) sumergir 1 a 2 minutos en la solución colorante A; lavar a continuación 5 a 6 veces con agua destilada. b) sumergir 1 minuto en la solución B; lavar a continuación 5 a 6 veces con agua destilada.

c) sumergir 1 minuto en la solución colorante C; lavar a continuación 5 a 6 veces con agua destilada. Dejar secar la preparación.

- La observación de la preparación se realizó bajo aceite de inmersión. Los acrosomas aparecen teñidos de verde, la zona ecuatorial de verde claro y el resto de la cabeza de color rojo. La pieza intermedia y la cola se tiñen de verde.
- Interpretación de los resultados. Para la evaluación estadística se observaron y contaron 200 espermatozoides. Las células deben ser claramente identificables como espermatozoides.

Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (Método de BLOM: eosina 2%-nigrosina 10%). (Para semen fresco y poscongelado): Método de BLOM se pueden diferenciar los vivos de los muertos, según la eosinofilia de la cabeza de los espermatozoides muertos que se tiñen de rosado y la de los moribundos se tiñen solo la parte caudal. Los espermatozoides vivos presentarán una ligera tinción verde.

Se utilizó el siguiente procedimiento:

- Eosina 2% y Nigrosina 10% atemperadas a 37 °C.
- En un portaobjetos se colocó 1 gota de semen, 1 gota de eosina y 2 gotas de nigrosina todo por separado.
- Se mezcló el semen con la eosina y luego se añadió rápidamente la nigrosina a esta mezcla.
- De inmediato se hizo un frotis grueso en una lámina seca y se dejó secar por 1 minuto (respetar este tiempo, ya que si se deja más tiempo la prueba pierde validez, ya que se puede teñir un número mayor de espermatozoides muchos de los cuales estaban vivos al inicio).
- Se observó con 800x a 900x. se contó como mínimo 200 espermatozoides.
- Una muestra se consideró buena si presenta menos del 30% de espermatozoides muertos.

Prueba de endósmosis celular (HOST). (Para semen fresco y poscongelado): Consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo cual causa una entrada de agua al interior de la célula (cola) quedando hinchada y enroscada (Endósmosis Positiva EP). Para que esta respuesta se produzca la membrana plasmática debe estar íntegra. Los espermatozoides con daños o alteraciones físicas no experimentarán cambios en la forma del flagelo (Endósmosis Negativa EN). Se utilizó la siguiente metodología:

- Preparación de una solución hipo-osmótica conteniendo 0.735 g de citrato de sodio dihidratado y 1.351 g de fructosa en 100 mL de agua destilada.
- Se colocó 1 mL de solución hipo-osmótica en tubos de ensayo a los cuales se les agregó 100 microlitros de semen.
- Se incubó a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, durante 30 minutos
- Luego se realizó un frotis y se dejó secar al aire por 5 minutos
- Se observó al microscopio de contraste de fase a 400 X
- Se contaron 200 espermatozoides.

Prueba de resistencia de Götze. (Para semen fresco y poscongelado). Estas pruebas determinan la capacidad que tienen los espermatozoides de resistir varios factores nocivos de carácter químico, físico o térmico. Se considera que un semen es de buena calidad y puede ser usado en la inseminación artificial, cuando conservan su movimiento rectilíneo progresivo durante 45 minutos o más. La prueba consiste en:

- A un volumen de 0.01 ml de semen se añadió 100 mL de diluyente Triladyl®.
- Las lecturas se realizaron cada 10 minutos evaluando al microscopio de contraste de fase a 400X la duración del movimiento rectilíneo progresivo de la muestra.
- Se interpretó de acuerdo a la escala del Cuadro 3:

**Cuadro 3 Interpretación de la prueba de resistencia de Götze**

Resistencia (Minutos)	Conservación del % motilidad Indiv.	
	Progresiva posdescongelado	Evaluación
65-80	>50	Muy bueno
50-60	36-50	Bueno
35-45	21-35	Regular
20-30	11-20	Pobre
Menos de 20	<10	Malo

Fuente: Holý (1987); adaptado por los autores.

**Descongelamiento:** Del termo con el semen, se eligió al azar y de diferentes escalerillas, cuatro pajuelas de cada toro. Todo el material de laboratorio que entró en contacto con el semen fue atemperado a 37° C, así como previamente esterilizado. Según Rosas (1997) los principales factores de manejo que afectan la motilidad y viabilidad del semen al descongelado, son el método de descongelación, la temperatura utilizada durante la evaluación, la magnitud de los aumentos, la resolución del microscopio y la experiencia del evaluador.

Para la descongelación de las pajuelas se utilizó el protocolo descrito por Huertas y Huertas (1991): Se removió la canastilla de su posición normal en el termo, se levantó suavemente hasta el cuello del termo, sin que sobresaliera de éste. Se localizó la escalerilla de acuerdo al toro que va a evaluar. Con la pinza especial para pajuelas, se sujetó la pajuela firmemente y se sacó de la escalerilla. Se devolvió la escalerilla a la canastilla. Este procedimiento de sacar la pajuela no debe tomar más segundos, en caso de necesitar más tiempo, sumerja nuevamente la canastilla en el nitrógeno líquido, espere 15 segundos e inténtelo de nuevo.

4. Sumergir inmediatamente la pajuela en agua a 35 °C durante 40 segundos
5. Transcurridos los 40 segundos, retirar la pajuela del agua, secarla con papel toalla, siempre tomando la pajuela por uno de sus extremos no por el centro.
6. Cortar el extremo de la pajuela que se encuentra sellado con ultrasonido o con alcohol polivinil.
7. Proceder a depositar el semen en los portaobjetos y tubos eppendorf previamente atemperados a 37 °C para iniciar las evaluaciones.

**Calidad Biológica:** Indica la calidad del semen pos congelado, medida en el número de espermatozoides con movimiento individual progresivo luego del proceso de congelación. Para su valoración se utilizó la siguiente metodología: Setenta y dos horas posteriores a la congelación se descongeló 4 pajuelas de cada uno de los tratamientos a 37°C por 40 segundos en baño maría y se evaluó nuevamente, se calculó motilidad progresiva individual, para la cual se diluyó el semen de dos pajuelas de diferentes sitios del termo, en SSF en proporción de 1:4 según Rosas (1997).

Sólo se consideró muestras aptas aquellas que presentaron 35% o más de motilidad individual, y calidad biológica igual o superior a 10 x 10<sup>6</sup> y un índice de recuperación superior a 30, ya que valores entre 31 y 40 se consideran buenos, 41 a 50 muy buenos y mayores de 51 excelentes; el índice de recuperación se calculó como: motilidad progresiva individual poscongelación dividida por la motilidad individual antes de congelar por 100, y se interpreta así (Holý 1987):

- < 30 malo
- 31-40 bueno
- 41-50 muy bueno
- 51 o más excelente

Para su cálculo se utilizó la fórmula:

Calidad biológica = % MIP pos congelado x concentración espermática de la pajuela.

Cuadro 4. Número de espermias viables por dosis de semen al descongelado. Cálculo e interpretación de la calidad biológica.

Concentración	% Motilidad	# de espermias viables	Resultado
30000000	0.20	6 000 000	No adecuada
	0.25	7 500 000	No adecuada
	0.30	9 000 000	No adecuada
	0.35	10 500 000	Aprobada
	0.40	12 000 000	Aprobada
	0.45	13 500 000	Aprobada
	0.50	15 000 000	Aprobada

Fuente: Rosas (1997)

Porcentaje de motilidad individual progresiva. Se determinó observando cinco campos en el microscopio a 200X y luego a 400X estimando un promedio de los cinco campos, en incrementos de cinco puntos porcentuales. pH. Se determinó utilizando papel tornasol graduado en la escala de 4-12.

Morfología: porcentaje de anormalidades. Se observaron y contaron 200 espermatozoides entre normales y anormales. A partir de esto se determinó el porcentaje de cada uno. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos Se observó en el microscopio con 800x

a 900x, contando como mínimo 200 espermatozoides a partir de los cuales se determinó el porcentaje de vivos y muertos.

Porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva y negativa (Prueba de HOST). Se observó al microscopio de contraste de fase a 400x y se contaron 200 espermatozoides determinando los que presentaron endósmosis positiva y endósmosis negativa a partir de los cuales se determinó el porcentaje. Tiempo de resistencia: Test de resistencia de Götze. Se realizaron lecturas cada 10 minutos evaluando al microscopio de contraste de fase a 400x la duración del movimiento progresivo de la muestra.

Calidad biológica = %MIP poscongelado  $\times$  concentración espermática de la pajuela.  
Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA) con dos tratamientos (semen fresco y posdescongelado) y seis repeticiones por tratamiento. Las variables fueron analizadas utilizando el Modelo Lineal General y el análisis de varianza ANDEVA y separación de medias por la prueba de LS MEANS; los valores porcentuales fueron convertidos con la función arcoseno. Se utilizó el programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS<sup>®</sup> 2009) con un nivel de significancia exigido de  $p \leq 0.05$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Motilidad Individual (MI).** Se encontró una diferencia ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos en fresco y descongelado teniendo este último un 33.3% menos (Cuadro 5). Los tratamientos presentaron una excelente MI ya que están arriba del rango sugerido por Zenzamis (1981) quien afirma que teniendo un porcentaje de células móviles mayores de 60% se considera una MI excelente. Según Rubio y Quintero (2008) la disminución de la MI al descongelado se debe a que los espermatozoides presentan susceptibilidad a la criopreservación por los pasos como la adición de crioprotector, el proceso de enfriamiento, la congelación, el almacenamiento en nitrógeno líquido y la descongelación causando un marcado deterioro de la membrana plasmática. En otros estudios Vera (2001) indica que la congelación del semen causa deterioro en la membrana plasmática y su acrosoma. Según Pulido (1997) la MI después de la criopreservación debe estar dentro de un rango de 24-45% siendo el semen de toros Holstein los que presentan mejor recuperación espermática.

**Anormalidades.** Hubo diferencia ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos en fresco y descongelado de 6.2% más debido al aumento de anomalías después de la criopreservación dado por la manipulación de la muestra seminal desde la recolección hasta el posdescongelado (Cuadro 5). Según Holý (1987) al encontrarse valores anormales mayores al 30% comprometen seriamente la fertilidad del toro. Según Pulido (1997) el semen sometido al proceso de criopreservación incrementa las anomalías debido al choque de frío.

**Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (Método de Blom).** Hubo diferencia ( $p \leq 0.05$ ) la diferencia entre los tratamientos vivos fresco y vivos al descongelado de 23.3% (Cuadro 5). Según Rubio y Quintero (2008) el porcentaje de vivos se ve afectado durante el proceso de criopreservación, el valor mínimo aceptable es el 70% de espermatozoides vivos. Holy (1987) indica que una muestra se considera buena si presenta menos del 30% de espermatozoides muertos (Figura 1 y 2).

Cuadro 5. Evaluación de Porcentajes de Motilidad Individual (MI), Porcentaje de Anormalidades, Porcentaje de vivos y muertos.

Tratamiento	MI	Normales	Anormales	Vivos	Muertos
Fresco	95 a	80.2 a	19.8 a	82.6 a	17.4 a
Descongelado	61.7 b	74.0 b	26.0 b	59.3 b	40.7 b
Probabilidad	< 0.0001	0.043	0.043	< 0.0001	< 0.0001
Coefficiente de variación	7.0103	9.7721	21.5187	12.4025	22.545

a y b= Valores en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí ( $p < 0.05$ )



Figura 1. Tinción de método de Blom en fresco.



Figura 2. Método de Blom en posdescongelado.

**Prueba de endósmosis celular (Hypo-Osmotic Swelling Test HOST).** Hubo diferencia ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos referentes a la Endósmosis Positiva (EP) (Cuadro 6). Rubio y Quintero (2008) afirman que si presenta un HOST con EP alto este está relacionado al porcentaje de espermatozoides en la fertilidad *in vivo e in vitro* tanto del semen fresco como para el semen descongelado. La prueba de HOST demuestra información relevante sobre la capacidad de congelación de una muestra seminal fresca así como la capacidad fecundante de una muestra seminal congelada. En Endósmosis Negativa (Host EN) se presentó una diferencia ( $p \leq 0.05$ ) siendo mayor el tratamiento descongelado, esto se debe a que los espermias con daños o alteraciones físicas no experimentan cambios en la forma del flagelo (Figura 3).

**pH.** Se encontró una diferencia ( $p \leq 0.05$ ) siendo mayor el tratamiento en fresco, en ambos tratamientos presentó valores inferiores a 6.2. (Cuadro 6). Esto no coincide con lo dicho por Holy (1987) quien afirma que normalmente el semen fresco de toro el pH oscila entre 6.2 y 6.8, sin embargo, los diluyentes utilizados comercialmente incrementan estos valores entre 6.8 y 7.2.

Cuadro 6. Evaluación de porcentaje de Endósmosis Positiva (EP) y Negativa (EN) de Host y pH.

Tratamiento	Host EP	Host EN	pH
Fresco	77.9 a	20.1 a	6.13 $\pm$ 0.19 a
Descongelado	60.0 b	40.0 b	6.00 $\pm$ 0.0 b
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	0.0132
Coefficiente de variación	10.2611	17.9626	2.2749

a y b= Valores en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí ( $p < 0.05$ ).

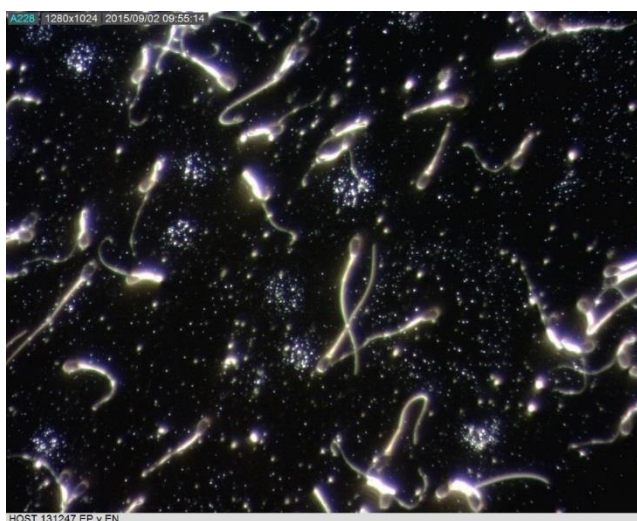


Figura 3. Prueba de HOST en semen posdescongelado con endosmosis positiva y negativa.

**Prueba de resistencia de Götze.** Se reportaron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) en el tiempo total de la prueba (Götze total), siendo mayor en el tratamiento en fresco (Cuadro 7). Esto se debe a que a medida pasa el tiempo disminuye el porcentaje de motilidad individual, sin embargo, supera lo indicado por Holy (1987) el tiempo de 65 a 80 minutos si presenta un resultado mayor al 50% de motilidad individual posdescongelado se considera una muestra muy buena.

Cuadro 7. Evaluación de la prueba de resistencia de Götze en semen de toro.

Tratamiento	Götze total	Minutos								
		0	10	20	30	40	50	60	70	80
Fresco	83.7 <sup>a</sup>	90.0a	86.7a	86.7a	85.0a	81.7a	81.7a	81.7a	80.0a	80.0a
Descongelado	58.7 <sup>b</sup>	61.7b	60.0b	60.0b	60.0b	58.3b	58.3b	58.3b	58.3b	58.3b
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Coefficiente de Variación	12.3874	10.4	11.7	11.7	3.1	12.4	12.4	12.4	11.6	13.8

a y b= Valores en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí ( $p < 0.05$ )

**Evaluación de tiempo de resistencia de la prueba de Götze.** No hubo diferencias ( $p > 0.05$ ) entre los tiempos de resistencia tanto en fresco con una diferencia de 10% entre el tiempo 0 y a los 80 minutos y en posdescongelado la diferencia presentada fue de 8.4 % (Cuadro 8). El semen evaluado se considera de buena calidad al conservar su movimiento rectilíneo después de 45 minutos ya que coincide con lo dicho por Holy (1987) quien considera que un semen es de buena calidad y puede ser usado en la inseminación artificial (IA), cuando conservan su movimiento rectilíneo progresivo durante 45 minutos o más. El MI inicial en el tratamiento de posdescongelado superó lo indicado por Holy (1987) quien dice que el semen debe presentar mínimo 35% de motilidad individual posdescongelado para ser aceptado en la IA.

Cuadro 8. Evaluación de la prueba de Götze en fresco y Posdescongelado.

Prueba Götze tiempo(minutos)	Fresco	Posdescongelado
0	90.0	61.7
10	86.7	60.0
20	86.7	60.0
30	85.0	60.0
40	81.7	58.3
50	81.7	58.3
60	81.7	58.3
70	80.0	58.3
80	80.0	53.3
Probabilidad	0.0597	0.6449
Coefficiente de variación	11.9594	12.2909

a y b= Valores en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí ( $p < 0.05$ )

**Análisis de correlación de Pearson.** Se encontró una correlación positiva entre espermatozoides normales en fresco y calidad biológica con ( $p \leq 0.0001$ ;  $Rho = 0.83768$ ) (Cuadro 9). Esto se debe que a mayor número espermatozoides normales en fresco existe una mayor cantidad de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra. Hubo correlación positiva entre espermatozoides anormales en fresco y calidad biológica con ( $p \leq 0.0040$   $Rho = 0.68544$ ) (Cuadro 9), debido a que si se encuentra una menor cantidad de espermatozoides anormales en fresco se obtendrá una mayor cantidad de espermatozoides viables en posdescongelado. Presenta una positiva correlación entre Host EN en fresco y calidad biológica, o sea que al presentar menor cantidad de Host EN se determina que existe un mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra que es reflejado al descongelarse con una mejor calidad biológica. Se obtuvo una correlación positiva entre espermatozoides vivos al posdescongelado y calidad biológica con ( $p \leq 0.0001$   $Rho = 0.90709$ ) (Cuadro 9), debido a que si se encuentran mayor número de espermatozoides vivos posdescongelados existe una mayor cantidad de espermatozoides vivos después de la criopreservación reflejando una mayor MI que se expresa con una mejor calidad biológica.

Se determinó que Host EP posdescongelado tiene correlación positiva con la calidad biológica ( $p \leq 0.01$   $Rho = 0.99940$ ) (Cuadro 9), debido a que mayor Host EP indica que existe una mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra por lo tanto con mayor viabilidad la cual se refleja en la MI que aumenta la calidad biológica.

Cuadro 9. Análisis de correlación de Pearson (EP: Endósmosis Positiva. EN: Endósmosis Negativa)

		Variables	Probabilidad	R <sup>2</sup>
a > r	Espermatozoides normales en fresco	< r Anormalidad de espermatozoides fresco	< 0.0001	0.97
		> r EP posdescongelado	< 0.0001	0.85
		< r EN posdescongelado	0.0038	0.69
		> r Espermatozoides Vivos posdescongelado	0.0422	0.52
		< r Espermatozoides Muertos posdescongelado	0.0082	0.65
		> r Calidad biológica	< 0.0001	0.83
a < r	Anormalidad de espermatozoides en fresco	> r Host EP posdescongelado	< 0.0025	-0.71
		> r Calidad biológica	0.004	0.68
a > r	Anormalidad de espermatozoides en fresco	> r Host EN posdescongelado	0.0461	0.52
a > r	Host EP fresco	Anormalidad de espermatozoides posdescongelado	< 0.0001	0.92
		Anormalidad de espermatozoides posdescongelado	0.0031	0.71
		> r Espermatozoides vivos en fresco	< 0.0001	0.85
a < r	Host EN fresco	> r Espermatozoides normales poscongelado	< 0.0001	-0.98
		> r Host EP fresco	< 0.0001	-0.85
a > r	Host EN fresco	> r Anormalidad de espermatozoides posdescongelado	< 0.0001	0.97
a < r	Host EN fresco	< r Espermatozoides muertos fresco	0.0379	0.53
		> r Calidad biológica	0.0409	0.53
a > r	Espermatozoides vivos en fresco	> r Espermatozoides normales poscongelado	0.0211	0.58
		< r Host EN posdescongelado	0.0046	0.68
		> r Espermatozoides vivos posdescongelado	< 0.0001	0.82
		< r Espermatozoides muertos posdescongelado	0.0019	-0.73
a > r	Espermatozoides vivos posdescongelado Host EP	> r Calidad biológica	< 0.0001	0.90
a > r	posdescongelado	> r Calidad biológica	< 0.0001	0.99

**Calidad Biológica.** La calidad biológica presentó para el toro 131247 una concentración de espermatozoides de  $22.5 \times 10^6$ ,  $18 \times 10^6$  para el toro 4312, y para el toro 3249 presentó  $15 \times 10^6$ . Según Rosas (1997) los resultados obtenidos se encuentran Aprobados ya que superan  $10.5 \times 10^6$  valor encontrado como aprobado (Cuadro 4).

#### **4. CONCLUSIONES**

- De acuerdo a los resultados obtenidos se puede determinar que la criopreservación afecta la integridad de la membrana plasmática de los toros.
- El mayor porcentaje de espermatozoides con endosmosis positiva se obtuvo en las muestras de semen fresco.
- En la prueba de resistencia de Götze la mayor resistencia se obtuvo en semen fresco respecto al posdescongelado, sin embargo, tanto el semen fresco como el posdescongelado alcanzaron la clasificación de muy buenos.
- Se determinó que en semen descongelado el pH, porcentaje de motilidad individual progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de anormalidades disminuyeron significativamente con respecto al semen fresco.
- La calidad biológica fue afectada por la criopreservación ya que esta daña la integridad de la membrana plasmática, encontrando una correlación positiva con las pruebas de HOST, espermatozoides vivos y anormalidades.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Bajo las condiciones de este estudio se recomienda la aplicación de la prueba de HOST y Götze como herramientas en el proceso de criopreservación para predecir la calidad biológica en el laboratorio de Reproducción de Zamorano.
- Utilizar la prueba de HOST en estudios futuros como parámetro para determinar la fertilidad en toros.

## 6. LITERATURA CITADA

Amann, R. P. 1988. Relationships between computerized evaluation of spermatozoal motion and competitive fertility index. Proceedings of the Twelfth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. s.p.

Bearden, H. y J. Fuquay. 1982. Reproducción animal aplicada. Editorial El manual moderno. México, México. p. 45

Campi S., C. Blasi, M. Fischman, C. García Y H. Cisale 2004. Comparación entre dos test de funcionalidad de membrana para valorar semen de verraco. Veterinaria Argentina 21 (206): 421-426.

Holý, L. 1987. Biología de la reproducción bovina: Exámen de laboratorio de la fertilidad del toro semental.s.ed. Cuba,"Osvaldo Sanchez". p. 367-381.

Huertas, J. y J. Huertas. 1991. Manual práctico y moderno de inseminación artificial. Bogotá, Colombia. Ed. Elen impresores. 160 p.

Pedroso, I. 1992. Reproducción zootécnica del macho. La Habana, Cuba. Ediciones ENPES. 272 p.

Pulido, J. 1997. Memorias del VI curso de Actualización en reproducción animal: Determinación de la calidad biológica del semen congelado. Tabasco, México. p. 25-31.

Rosas, J. 1997. Memorias del VI curso de Actualización en reproducción animal: Determinación de la calidad biológica del semen congelado. Pérez, P. y Villa, A. Tabasco, México, s.e. p. 25-30.

Rubio, J. y A. Quintero. 2008. Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito: Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. Eds. Gonzales, C., Madrid, N., y Soto, E. Zulia, Venezuela, Astro Data S.A. p. 618-625.

Saacke, R.; Nebel, R.; Karabinus, D.; Bame, J.; Mullins, J. 1988. Sperm transport and accesory sperm evaluation: Proceedings of the twelfth technical conference on artificial insemination and reproduction. s.f.

Saacke, R.; Nebel, R.; Karabinus, D.; Bame, J.; Mullins, J. 1984. Semen quality, importance of and influencing factors: Proceedings of the twelfth technical conference on artificial insemination and reproduction.s.f.

Sanchez, A., D. Garrido, C. Rojas. 2012. Evaluación de una prueba hipoosmótica simplificada en espermatozoides caninos frescos y refrigerados. Hospitales Veterinarios 4 (1): 1-32.

SAS. 2009. SAS User's Guide. Statistical Analysis Institute Inc. Cary N.C.

Vera M., O. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y postcongelacion en machos bovinos. En: Reproducción Bovina. C. González-Stagnaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. 15: 251-262.

Zavaleta, C. 1997, Evaluación de la capacidad reproductiva de los toros, características del eyaculado. INIFAP-SAGAR. Memorias del VI Curso de Actualización en Reproducción Animal. Tabasco, México. p. 1-24.

Zemjanis, R. 1981. Reproducción Animal: Diagnóstico y técnicas terapéuticas. Pacheco. Primera Edición. México, Limusa, S, A. p. 155-170