

# COMPARACIÓN DE TRES SOLUCIONES HIPOSMÓTICAS PARA EVALUAR LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO Y DESCONGELADO DE TORO

## Comparison of Three Hypotonic Solutions to Evaluate the Integrity of Plasmatic Sperm Membrane in Cryopreserved and Thawed Bull Semen

Armando Quintero-Moreno <sup>1\*</sup>, Jexenia Nava <sup>1</sup> y Carla Osorio-Meléndez <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Andrología, Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA). <sup>2</sup>Unidad de Investigación en Biotecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apdo. 15252. Maracaibo 4005-A, Edo. Zulia, Venezuela. [armando.quintero@fcv.luz.edu.ve](mailto:armando.quintero@fcv.luz.edu.ve)

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar la sensibilidad de tres medios hiposmóticos (HOST) para valorar la integridad funcional de la membrana plasmática (IFMP) de espermatozoides obtenidos de semen criopreservado de 12 toros. Se compararon tres soluciones con diferentes osmolaridades (0; 102 y 154 mOsm/Kg) que se incubaron a 37°C en baño María. La solución con 0 mOsm/kg (A: agua ultra pura) fue incubada durante cinco minutos (min), mientras que las dos restantes con diferentes concentraciones de cloruro de sodio se incubaron durante 30 min. La solución B y C constan de medios hiposmóticos a 102 y 154 mOsm/kg, respectivamente. Se tomaron tres muestras (100 µL) de semen descongelado por toro que se introdujeron en viales que contenían 1000 µL de cada solución hiposmótica. Sobre frotis realizados con cada medio y teñidos con Eosina-nigrosina (EN) se evaluaron 100 espermatozoides para determinar (en conjunto) el porcentaje de viabilidad y de flagelos reaccionados (FR). La asociación del HOST con la EN fue realizada para identificar los espermatozoides vivos o muertos con FR o intactos. Los resultados demuestran mejores porcentajes de espermatozoides con FR para las soluciones B (49,75 ± 4,17) y C (56,33 ± 4,17) *versus* la solución A (32,16 ± 4,17) (P<0,05). Cuando se asociaron los FR con el porcentaje de supervivencia se observó la misma tendencia (A= 8,75 ± 1,56 *versus* B: 26,33 ± 3,46 y C: 29,41 ± 2,67). Estos valores indican que las condiciones B y C son medios hiposmóticos apropiados para la valoración de los espermios, ya

que propician la torsión helicoidal del flagelo manteniendo la IFMP del espermatozoide en el 52% de los casos. Se concluye que la condición osmolar A no se recomienda debido a que causa pérdida de la IFMP y muerte celular, lo cual quedó en evidencia al apreciar que solo un 8% de espermatozoides con flagelos reaccionados sobreviven luego del un estrés osmótico tan bajo.

**Palabras clave:** HOST, toro, espermatozoide, vitalidad.

### ABSTRACT

The objective of this study was to compare the sensitivity of three hypotonic test (HOST) to evaluate the functional integrity of the plasmatic sperm membrane (IFMP) obtained from cryopreserved semen of 12 bulls. Were compared three solutions with different osmolarities (0,102 and 154 mOsm/kg) which were incubated at 37°C in a water bath. The solution with 0 mOsm/kg (A: ultra pure water) was incubated for five minutes (min), while of two remaining with different concentrations of sodium chloride were incubated for 30 min. Solution B and C comprise a hypotonic media at 102 mOsm/kg and 154 mOsm/kg, respectively. Three samples were taken (100 µL) of thawed semen per bull, that were Introduced in vials containing 1000 µL of each hypotonic solution. About smears performed with each medium hypotonic and stained with eosin and nigrosin (EN), 100 spermatozoa were evaluated to determine (together) the percentages of viability and swelling flagellas (FR). The association of the HOST with EN was performed to identify the percentage of spermatozoas live or dead with FR or intactos. The results of the HOST demonstrated higher

percentages of spermatozoos with FR for treatments B ( $49.75 \pm 4.17$ ) and C ( $56.33 \pm 4.17$ ) versus treatment A ( $32.16 \pm 4.17$ ) ( $P < 0.05$ ). These values indicate that the conditions B and C are optimal solutions, propitiating the helical twist of the flagellum, maintaining the IFMP of the sperm in 52% of cases. The osmolar condition A is not recommended because it causes loss of IFMP and cell death, thus was in evidence to appreciate that only 8% of sperm with flagella reacted survive after osmotic stress as low.

**Key words:** HOST, bull, sperm, vitality.

## INTRODUCCIÓN

El análisis seminal estándar es considerado actualmente como la aproximación más idónea para evaluar la habilidad reproductiva de los toros *Bos taurus* - *Bos indicus* [1]. Habitualmente la concentración, la motilidad masal e individual (MI) y la morfología espermática son los parámetros que verifican la calidad de una muestra seminal y se asume que estas mediciones proveen una información veraz del potencial reproductivo de un toro, no obstante, estos parámetros evaluados individualmente han demostrado limitaciones, por lo cual la valoración de la integridad funcional de la membrana plasmática (IFMP) surge como una prueba complementaria que, sumada a las anteriores aportan información relevante, sin embargo, su tiempo de ejecución restringe su aplicabilidad bajo condiciones de campo en fincas o granjas. La IFMP se puede evaluar mediante dos pruebas sencillas, económicas y de fácil acceso: la prueba de Endósmosis Celular, con su denominación en inglés "HOST test" o "Hiposmótico Swelling Test", la cual fue diseñada originalmente para evaluar la actividad bioquímica de la membrana plasmática (MP) fisiológicamente intacta del espermatozoide humano [6] y el uso de tinciones supravitales como la eosina-nigrosina (EN) [18]. Diferentes aspectos de la MP son determinados en cada una de estas pruebas. Las tinciones supravitales valoran, si la MP está físicamente rota o dañada, lo cual es evidencia de que la célula está muerta y el HOST verifica si la MP está biológicamente activa [20].

El HOST consiste en someter los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica ( $< 240$  mOsm/kg), lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica intracelular con la del medio extracelular ocasionando un aumento de volumen celular y enrollamiento del flagelo [4]. La osmolaridad de la solución debe ser la óptima para inducir la torsión helicoidal del flagelo sin que ocurra la lisis de la MP; es decir, para que esta respuesta se produzca, la MP deberá estar íntegra y sin daño alguno, por lo cual, las células espermáticas con la MP dañada no experimentarán modificación en la forma del flagelo. Esta prueba ha sido desarrollada en varios mamíferos, incluyendo el bovino [1, 7, 9, 12, 15, 16], observando una correlación positiva y consistente (0,79) con la tasa de no retorno en vacas

[12]; en contraste, Rota y col. [15] no evidenciaron una correlación positiva entre esta prueba y la fertilidad "in vitro".

Hasta ahora, el HOST ha sido diseñado con soluciones de agua destilada que contienen citrato de sodio y fructosa a diferentes osmolaridades, incubándose en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  por media o una hora (h), tanto en semen recién colectado como en semen criopreservado, concluyendo que la mejor osmolaridad se encuentra alrededor de 100 mOsm/kg, sin embargo, otros mencionan que 150 mOsm/kg es una alternativa viable y muy segura al evitar la lisis celular [16]. Por otro lado, no se han evidenciado investigaciones en semen de toro u otras especies de interés zootécnico que experimenten con otro tipo de soluciones diferentes al citrato de sodio y fructosa que, podrían generar resultados similares o inclusive superiores utilizando alternativas viables y de muy bajo costo; por lo tanto, es necesario diseñar nuevos protocolos que generen condiciones óptimas para obtener resultados de igual o de mayor precisión que aquellos obtenidos con los protocolos convencionales.

En el año 1984, un grupo de investigadores [6] valorando la IFMP mediante pruebas hiposmóticas utilizando citrato de sodio, fructosa y cloruro de sodio determinaron que, la fructosa y el citrato de sodio son la mejor alternativa para realizar el HOST, desestimando el cloruro de sodio, lo cual incidió en la pérdida de interés investigativo por parte de la comunidad científica internacional. No fue hasta poco que se retomó el interés por el uso del cloruro de sodio como herramienta óptima para la evaluación de la IFMP [9].

La utilización de soluciones hiposmóticas de cloruro de sodio de muy bajo costo (sueros de uso intravenoso) y a diferentes concentraciones hiposmóticas (102; 154 y 252 mOsm/kg) se distribuyen con facilidad en el mercado farmacológico, ya que son imprescindibles para la utilización ambulatoria u hospitalaria en pacientes con desordenes hídrico-electrolítico. Este hecho permite su fácil accesibilidad para realizar cualquier experimento o uso que se le quiera dar. En el mismo orden de ideas se hace interesante una variante óptima al HOST, que se pueda realizar en un tiempo inferior a 30 minutos (min) y que propicie resultados rápidos, repetibles y confiables. Es por ello que en este estudio se propone comparar tres condiciones hiposmóticas, dos de ellas utilizando las soluciones de cloruro de sodio (102 y 154 mOsm/kg) citadas anteriormente y una tercera, con solución de agua bidestilada ultra pura (0 mOsm/kg), en la cual se incubará el semen por 5 min. con el fin de determinar si podría ser una alternativa viable para valorar la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide de toro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento y unidades experimentales

El experimento se encuentra dividido en dos fases, la primera comprende los procedimientos de recolección, proce-

samiento y criopreservación de los eyaculados y la segunda fase corresponde a la valoración del semen descongelado. La primera fase fue realizado en la empresa: Venezolana de Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones, C.A. (VIATE-CA®), ubicada en el estado Zulia, Venezuela, entre las coordenadas 10° 15' LN y 72° 25' LO.

Las unidades experimentales correspondían a 36 pajue-las de semen descongelado (3 por cada toro) provenientes de 12 toros de las razas Holstein (4), Brahman (4) y mestizos Holstein x Brahman (4), los cuales fueron mantenidos bajo el mismo programa de manejo sanitario y alimentación.

### Colección y criopreservación del semen

Los eyaculados fueron colectados dos días a la semana mediante vagina artificial. Después de la evaluación seminal de rutina (volumen, motilidad masal e individual y concentración espermática), las muestras clasificadas como idóneas para congelar eran diluidas con un diluyente (A) que contenía yema de huevo al 20,4%, hidroximetilaminometano (TRIS), ácido cítrico, fructosa, además de antibióticos (Tilosina 0,56%, Linco-Espectina 0,56%, Gentamicina 0,74%) en una solución final con pH ajustado a 6,8 y que se agregaba al semen para ser refrigerado a 5°C durante 2 h. Posteriormente se agregó el diluyente B, solución similar a la anterior, pero que contenía un azúcar-alcohol trihidrico como crioprotector (Glicerol al 7%) y antibióticos. Tras unir el diluyente A+B, el semen diluido era identificado y envasado automáticamente en pajuelas de 0,50 mL, con una concentración espermática mínima de  $\sim 30 \times 10^6$  espermatozoides/mL, para posteriormente ser expuesto en vapores de nitrógeno líquido (NL), 4 cm sobre la superficie durante 10 min y luego se sumergieron en NL a  $-196^\circ\text{C}$ . Las pajuelas permanecieron por un período mínimo de una semana en NL antes de ser descongeladas.

### Evaluación del semen criopreservado

La descongelación seminal se realizó en baño María (modelo YCW-03S. Taipei, Taiwan) a  $37^\circ\text{C}$  por 30 segundos (seg) y se mantuvieron a esta temperatura por 5 min antes de la evaluación. Luego se vertió su contenido en un vial de microcentrífuga de 1,5 mL., ubicado en una gradilla sumergida en el mencionado baño María.

Para la evaluación de la MI de los espermatozoides se extrajo 10  $\mu\text{L}$  de semen descongelado y se vertió sobre un portaobjetos precalentado a  $37^\circ\text{C}$  sobre una platina termo-regulable (Osaka®, modelo OK51, España) y se procedió a colocar un cubreobjetos para estimar el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, al observar hasta cinco campos con un microscopio óptico de campo claro a 400X (Globe®, LEM 1600, Alemania). Su valoración está basada en la observación del movimiento individual de los espermatozoides con el fin de determinar el porcentaje de células móviles y progresivas en el eyaculado. Motilidades superiores al 60% se clasificaron como muy buenas, entre el 40 y el 60% como bue-

nas, entre el 20 y el 40% son pobres y las que mostraron una MI inferior al 20% se clasifican de mala calidad.

Para la evaluación de la Vitalidad espermática (VE) se extrajo 10  $\mu\text{L}$  del semen recién procesado y se mezcló con una gota de igual volumen del colorante EN en un portaobjeto temperado a  $37^\circ\text{C}$  ubicado sobre una platina termo-regulable (Osaka®, modelo OK51, España), inmediatamente se homogenizó suavemente y se hizo un extendido fino (frotis), dejando secar por 30 min. Los frotis se observaron en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión (1000X) y se cuantificó un total de 200 espermatozoides, con el fin de valorar el porcentaje de espermatozoides vivos en la muestra seminal. Los espermatozoides muertos con membranas plasmáticas permeables se tiñen, y sus cabezas se observaban de color rosado en sus diferentes tonalidades, que van desde el rojizo hasta el rosado pálido, en cambio, los espermatozoides vivos presentan las cabezas de color blanco y/o claros, lo cual es producto de que tienen su MP intacta, lo cual no permite el paso del colorante [18].

Para la valoración de la IFMP mediante el HOST se utilizaron tres soluciones comerciales a diferentes osmolaridades (0; 102 y 154 mOsm/kg) incubadas a  $37^\circ\text{C}$  en baño María. La solución con 0 mOsm/kg (A: agua ultra pura) se expuso durante cinco min, mientras que las dos restantes con diferentes concentraciones de cloruro de sodio se incubaron durante 30 min. La solución B constó de una solución hiposmótica con una osmolaridad de 102 mOsm/kg (51mEq/L  $\text{Na}^+$  y 51mEq/L  $\text{Cl}^-$ ), mientras la otra (C) presentó una osmolaridad de 154 mOsm/kg (77mEq/L  $\text{Na}^+$  y 77mEq/L  $\text{Cl}^-$ ). Luego se descongelaron las pajuelas por un período de 30 seg en baño María a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente se prepararon tres viales de 1,5 mL para cada una de las muestras seminales. Seguidamente se vertió en cada uno de los viales, 1000  $\mu\text{L}$  de la solución A (cero osmolar), B (102 mOsm), C (154 mOsm) y 100  $\mu\text{L}$  del semen descongelado, luego la solución A + semen descongelado se incubó en baño María por 5 min., mientras que las soluciones B y C + semen descongelado fueron expuestas por 30 min. en baño María a  $37^\circ\text{C}$ . Al término del tiempo, se obtuvieron 10  $\mu\text{L}$  de la solución (semen + medio) se mezclan suavemente con 10  $\mu\text{L}$  del colorante EN, sobre un portaobjetos a  $37^\circ\text{C}$  previamente temperado, seguidamente se realizó el extendido y se dejó secar para la observación al microscopio óptico.

Posteriormente se cuantificó la IFMP al observar la VE, conjuntamente con las modificaciones morfológicas acaecidas "o no" en el flagelo y generadas por los medios hiposmóticos utilizados en el ensayo. La asociación entre estas dos pruebas generó cuatro grupos o subpoblaciones de acuerdo a las siguientes características:

TIPO I (EM/FNR-Host-) = Espermatozoides muertos con flagelo no reaccionado

TIPO II (EV/FNR-Host-) = Espermatozoides vivos con flagelos no reaccionado.

TIPO III (EM/FR-Host+) = Espermatozoides muertos con flagelos reaccionado.

TIPO IV (EV/FR-Host+) = Espermatozoides vivos con flagelos reaccionado.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño en bloques al azar, con los tres tratamientos o condición osmolar (CO): 0; 102 y 154 ajustadas en función de tres grupos genéticos. Se muestrearon 12 toros durante tres semanas y se procesaron 36 pajuelas de semen descongelado (12 por cada toros) y a cada una de ellas fue sometida a las tres CO. Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante el *Statistical Analysis System software* 8.2 para Windows (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. USA. 2002) y el nivel de significancia se estableció en  $P < 0,05$ . Los datos obtenidos fueron analizados por muestreos de forma independiente y se realizó la comprobación de la normalidad de los datos y homocedasticidad de varianza mediante la prueba de Bartlett. Una vez comprobado que los datos carecen de heterocedasticidad y siguen una distribución normal en cada uno de los tratamientos se procedió a realizar el Procedimiento Lineal General (Proc GLM) y las diferencias encontradas se cuantificaron mediante la prueba de LSMeans.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medias generales ( $\mu$ ) y el error estándar (EE) de la MI y VE se muestran en la TABLA I. La MI fue de  $40,83 \pm 2,94$ , valor numérico muy similar al porcentaje de VE ( $43,58 \pm 3,27$ ) para las mismas muestras evaluadas. Se pudo evidenciar que, la MI y VE obtenidas se encuentran dentro de los valores óptimos recomendados para semen descongelado de toros destinados a inseminación artificial [2, 8, 19].

**TABLA I**  
**CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN MUESTRAS CRIOPRESERVADAS Y DECONGELADAS DE SEMEN DE TORO**

Parámetro	Unidad de medida	Media $\pm$ EE	Intervalo de Confianza al 95%
Motilidad Individual	%	$40,83 \pm 2,94$	34,36 – 47,3
Vitalidad	%	$43,58 \pm 3,27$	36,38 – 50,78

n= 36 muestras seminales que corresponden a 12 toros.

En la TABLA II se pudo observar el efecto que tiene el HOST sobre la VE y el porcentaje de FR en las tres condiciones osmolares (CsOs), encontrándose una diferencia estadística muy significativa ( $P < 0,01$ ) entre la osmolaridad de 0 mOsm/kg con las otras dos CsOs evaluadas (102 y 154 mOsm/kg). Sin embargo, no se encontró una diferencia estadística significativa entre las CsOs evaluadas sobre la VE espermática. En la TABLA II también se aprecia el coeficiente de variación para cada condición osmolar (CO) evaluada, diferenciada entre los resultados globales del HOST y discriminada en función la IFMP. En referencia al porcentaje de EM con FNR (TIPO I) y EM con FR (TIPO III) no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $P > 0,05$ ) entre las tres CsOs estudiadas. No obstante, en la subpoblación TIPO II (EV/FNR-Host-), si hubo una diferencia estadística significativa ( $P < 0,01$ ) entre las tres CsOs evaluadas, siendo la CO 0 mOsm/kg la que obtuvo el mayor porcentaje de EV con respuesta negativa al HOST al compararlos con las CsOs 102 y 154 mOsm/kg. Para el TIPO IV, la cual representa la subpoblación más importante se encontró una diferencia estadística significativa ( $P < 0,01$ ) entre las CO 0 mOsm/kg (8,75) con las CsOs 102 mOsm/kg (26,33%) y 154 mOsm/kg (29,41%). Estos resultados evidencian que la CO, que obtuvo mayor nú-

**TABLA II**  
**RESPUESTA DE LOS ESPERMATOZOIDES EN SEMEN DE TORO CRIOPRESERVADO Y DECONGELADO SOMETIDO AL HOST BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE OSMOLARIDAD**

Parámetro (%)	Condición Osmótica (mOsm/kg)		
	0	102	154
Vitalidad (%)	$38,41 \pm 3,20^a$	$44,91 \pm 3,20^a$	$41,25 \pm 3,20^a$
Flagelos Reaccionados (%)	$32,16 \pm 4,17^b$	$49,75 \pm 4,17^a$	$56,33 \pm 4,17^a$
Tipo I (EM/FNR-HOST-)	$37,58 \pm 3,13^a$	$31,58 \pm 3,29^a$	$31,83 \pm 2,93^a$
Tipo II (EV/FNR-HOST-)	$29,66 \pm 4,59^a$	$18,58 \pm 4,49^b$	$11,83 \pm 1,77^b$
Tipo III (EM/FR-HOST+)	$23,41 \pm 4,29^a$	$23,41 \pm 3,93^a$	$26,91 \pm 3,37^a$
Tipo IV (EV/FR-HOST+)	$8,75 \pm 1,56^b$	$26,33 \pm 3,46^a$	$29,41 \pm 2,67^a$
CV (HOST)	52,03	55,93	39,74
CV (Tipo IV)	62,04	45,63	31,47

EV: espermatozoide vivo, EM: espermatozoide muerto, FR: flagelo reaccionado, FNR: flagelo no reaccionado, CV: coeficiente de variación de la prueba.

Se evaluaron 200 espermatozoides en cada muestra seminal (n=36).

(a,b): letras distintas en la misma fila implica diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).

mero de EV y FR-Host+ fue la 154 mOsm/kg, así mismo, se pudo denotar que la CO 0 mOsm/kg es inadecuada para valorar la IFMP, al obtener el menor porcentaje de EV con FR-Host+, por lo tanto es la menos recomendada para valorar la IFMP de los espermatozoides; aunado a esto, presenta el Coeficiente de Variación (CV) más alto (62,04) en la evaluación de los EV/FR-Host+. El CV más bajo (31,47) representa la mejor osmolaridad para valorar la integridad funcional del plasmalema, y este corresponde a la CO 154 mOsm/kg.

En el presente trabajo, la MI encontrada se encuentra dentro de los valores óptimos establecidos por Chenoweth y col. [2], los cuales refirieron que para toros adultos, ésta no debe ser inferior al 30%. En trabajos anteriores se han registrado valores similares a los descritos en este ensayo (40%) para la especie en semen descongelado [17]. Es importante destacar que, existe una variabilidad entre los parámetro de MI y estas diferencias se deben a que no todos los toros responden igual ante el proceso de criopreservación [8, 10, 21]. La pérdida de la motilidad flagelar está directamente relacionada con alteraciones del axonema e indirectamente con una disminución en la producción de Adenosín trifosfato (ATP). Es sabido que la motilidad progresiva y lineal es estimulada tras la eyaculación y es modulada durante el tránsito a través del tracto reproductivo de la hembra [13], sin embargo, el estrés de la criopreservación infringe daños irreversibles que propician la pérdida de este patrón de motilidad.

El estado de la MP marca la integridad morfológica y funcional de la célula [13], siendo la VE determinada al valorar su integridad a través de la capacidad que tiene la MP de excluir ciertas sustancias extracelulares como tintas, presumiéndose que, solamente los espermatozoides viables mantienen las membranas intactas, siendo capaces de interactuar con oocito para poder transportarse, capacitarse y fecundar [5, 13]. Los resultados de VE obtenidos en el presente estudio fueron similares a los reportados por Felipe-Pérez y col. [3], pero inferiores a los reportados por Rubio-Guillen y col. [17] para muestras de semen criopreservadas. Es conocido que la adición del crioprotector, el proceso de enfriamiento en sí, la congelación, el almacenamiento en NL y la descongelación propician un marcado deterioro en la MP del espermatozoide, viéndose reflejado en una disminución VE cuando se evalúa el semen descongelado [21].

A pesar de que la valoración de la morfología espermática mediante EN provee información del daño estructural de la MP, no siempre es posible correlacionar este valor con el potencial reproductivo del toro [14]. En función de esta aseveración se consideró importante en este experimento establecer la asociación de la VE con el HOST para valorar simultáneamente la integridad estructural y funcional de la MP, para de esta manera obtener mayor información de la célula espermática.

Los resultados reportados en el presente estudio demostraron que no hubo una diferencia estadística significativa ( $P > 0,05$ ) para el parámetro de VE entre las osmolaridades implementadas (0; 102 y 154 mOsm/kg; TABLA II), pero al visua-

lizar los valores individuales obtenidos en la VE y al asociarlo con el porcentaje de FR para cada osmolaridad, se obtuvo que existe una diferencia numérica entre ambos valores, siendo la más notoria para la CO de 154 mOsm/kg, en donde la VE fue de  $41,25 \pm 3,20$  y el porcentaje de espermios positivos al HOST fue de  $56,33 \pm 4,17$ , lo cual indica que el porcentaje incluye, tanto EV como EM. En base a esto, fue modificada la prueba original utilizada por Jeyendran y col. [6] para estudiar la IFMP mediante el HOST, dicha modificación se realizó basado en los estudios realizados por Quintero-Moreno y col. [11], los cuales introdujeron una modificación a la técnica ya descrita, donde se combina este test con la EN, introduciendo la prueba HOST-EN para poder identificar cuatro tipos de espermatozoides según la IFMP. Es así como en la TABLA II se hizo una clasificación en base al porcentaje de EV y EM y a la respuesta del HOST, bien sea positiva o negativa pudiendo obtener de esta manera la información más detallada siendo de suma importancia, ya que en base al porcentaje de EV y positivos al HOST se verifica la integridad, tanto estructural como funcional de la MP del espermatozoide.

En el presente estudio, la respuesta al HOST no fue favorable para la osmolaridad de 0 mOsm/kg (32,16%), en cambio si lo fue para la de 102 mOsm/kg (49,75%) y 154 mOsm/kg (56,33%) en los toros evaluados. Dichos porcentajes se encuentran relacionados con los de VE, siendo de 38,41; 44,91 y 41,25% para las osmolaridad de 0; 102 y 154 mOsm/kg, respectivamente. Al precisar la solución 154 mOsm/kg hay que denotar que, en este estudio se describen valores de HOST más altos que los reportados en otro estudio (42,90%) [13], pero más bajos para la vitalidad (53,19%); sin embargo, con la solución 0 mOsm/kg<sup>-1</sup> se aprecian valores más altos, tanto para el HOST (54,85%) como para la VE (45,95%). El resultado de HOST obtenido en el presente estudio para la CO de 154 mOsm/kg, fue similar (50,82%) al reportado por Rubio-Guillen y col. [17]. Según los tipos de IFMP para las tres CsOs evaluadas, el porcentaje de espermios que se encontró en el TIPO I (EM/FR-HOST-) es la subpoblación de espermatozoides que representa el grupo de espermios no-viables con defectos de MP en las regiones de la cabeza y la cola del espermatozoide. La MP del espermatozoide es el sitio primario, donde las lesiones se producen durante la congelación-descongelación del semen y la interrupción de la misma en la cabeza y cola del espermatozoide afecta la función normal de los mismos [11]. En el TIPO II (EV/FNR-HOST-) se aprecian los EV con daño en la MP a nivel del flagelo. El TIPO III (EM/FR-HOST+) muestra los espermios no viables, pero que reaccionaron al HOST antes de morir. Esto puede explicarse por el hecho de que, la prolongación del estrés que sufren los espermatozoides a una CO diferente a la normal, puede conducir a efectos deletéreos irreversibles en la MP derivando en la muerte celular. Es importante destacar que, estos espermios no viables podrían haber exhibido reacción flagelar espontánea, antes de estar sometidos al HOST y por lo tanto podrían ser clasificados como positivos al HOST

cuando en realidad ya eran inviables [11]. Por último en TIPO IV (EV/FR-HOST+), es el grupo de EV con MP intacta. El uso de la prueba HOST-EN en este ensayo se apoya en las investigaciones previas realizadas en los toros [1, 11], donde se observó una correlación significativa entre la prueba HOST y la viabilidad mediante el uso de la tinción supravital EN.

Al comparar las respuestas de los espermatozoides criopreservados de toro sometidos al HOST-EN bajo la CO de 154 mOsm/kg con los resultados reportados por Quintero-Moreno y col. [11] para la misma osmolaridad, se tuvo una gran diferencia porcentual. Este experimento mostró resultados más favorables para el TIPO II, teniendo un menor porcentaje de EV con FNR (11,83%) a diferencia del otro trabajo que obtuvo un 28,5%. Del mismo modo, los valores numéricos para las subpoblaciones TIPO I (31,83%) y TIPO III (26,91%) en este ensayo no fueron similares, ya que, el referido experimento obtuvo menos cantidad de EM con FNR (20,65%) y EM con FR (2,25%). Al comparar los resultados obtenidos para el TIPO IV (29,41%) se detectó que en aquel estudio fue mayor la cantidad de EV con FR (48,60%).

En base al CV obtenido en cada una de las osmolaridades implementadas, tanto para el porcentaje de HOST global como para el porcentaje de HOST en el TIPO IV (TABLA II), se concluye “de nuevo” que la mejor CO es la de 154 mOsm/kg, ya que fue donde se obtuvo el CV más bajo para ambos parámetros, siendo de 39,74 para el HOST y de 31,47 para el TIPO IV, así como también, fue donde se obtuvo mayor número de EV con FR (HOST+: 29,41%), lo que demuestra la mayor concentración de células espermáticas bioquímicamente activas con MP estructural y funcionalmente intacta. La CO 0 mOsm/kg es la menos indicada para valorar la IFMP, ya que, para el grupo de EV con FR (TIPO IV) obtuvo el coeficiente de variación más alto (62,04), y a su vez, fue más bajo el porcentaje de EV con FR (HOST+: 8,75%), difiriendo significativamente ( $P < 0,05$ ) de las CsOs 102 y 154 mOsm/kg. Esto puede deberse a que, al ser sometido los espermatozoides a la CO 0 mOsm/kg, éstos no resisten por mucho tiempo el estrés osmótico, conllevando a su muerte antes de que pueda ocurrir una respuesta positiva al HOST, pudiéndose corroborar al ver los porcentajes de EM (sumatoria del TIPO I y TIPO III), los cuales fueron mayores (60,99%) para esta CO. La prueba HOST-EN tiene la ventaja de diferenciar si el daño del espermatozoide es en la cabeza, cola o ambas, en cambio utilizando sólo la prueba de HOST, los espermatozoides se agrupan en dos categorías jerárquicas: FR y FNR. Con la tinción EN solo se puede valorar espermios vivos y muertos. Con la prueba HOST-EN, se pueden diferenciar los EV con FR, EM con FR, EV con FNR y EM con FNR [11].

## CONCLUSIONES

La CO 0 mOsm/kg fue la opción más perjudicial para valorar la IFMP, ya que obtuvo el menor porcentaje de EV con FR, lo cual es producto de la lisis y/o muerte de las células es-

permáticas, por lo tanto es la CO menos recomendada para la evaluación de semen de toro.

La CsOs 102 y 154 mOsm/kg arrojaron resultados estadísticamente similares, sin embargo, la comparación del CV entre ambas soluciones demostró que la CO 154 mOsm/kg presenta mayor homogeneidad en su respuesta, por lo tanto, es la CO más apropiada para evaluar la IFMP.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hipoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenol.** 42:351-360. 1994.
- [2] CHENOWETH, P.F.; HOPKING, J.; SPITER, R.; LARSEN, R. Guidelines for using the bull breeding Soundness Evaluation form. In: **Theriogenology Handbook B-10.** Hasting NE. 5 pp. 1993.
- [3] FELIPE-PÉREZ, Y.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E.; VALENCIA, J. Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. **Acta Vet. Brasilica.** 2(4):123-130. 2008.
- [4] HOSSAIN A.M.; RIZK, B.; BARIK, S., HUFR, C.; THORNEYCROFT, I.H. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. **Hum. Reprod.** 13(6):1578-1583. 1998.
- [5] JANUSKAUSKAS, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. **Acta Vet. Scand.** 36:571-574. 1995.
- [6] JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PÉREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L. J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.** 70:219-228. 1984.
- [7] KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; JOHN-EDWIN, M.; VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Anim. Reprod. Sci.** 104:9-17. 2008.
- [8] MADRID-BURY, N. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Capítulo XVI. En: **Reproducción Bovina.** C. Gonzalez-Stagnaro (Ed). Edics. Astro Data SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Pp 263-278. 2003.
- [9] NAVA-TRUJILLO, H.; QUINTERO-MORENO, A.; OSORIO-MELÉNDEZ, C.; RUBIO-GUILLÉN, J.; CARRILLO-FERNÁNDEZ, F.; FINOL-PARRA, G. Use of water test to assess the sperm membrane functional in-

- tegrity in cryopreserved bull semen. **Rev. Cientif. FCV-LUZ**. XXI (3): 211-214. 2011.
- [10] PRATHALINGAM, N.; HOLT, W.; REVELL, S.; JONES, S.; WATSON, P. Dilution of spermatozoa results in improved viability following a 24h storage period but decreased acrosome integrity following cryopreservation. **Anim. Reprod. Sci.** 91(1-2):11-22. 2005.
- [11] QUINTERO-MORENO, A.; RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ-VILLALOBOS, D.; GUTIÉRREZ, J.C.; MADRID-BURY, N.; GARDE, J.J. Identification of cryo-damage on plasma membrane integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. **Rev. Cientif. FCV-LUZ**. XXI (5):403-407. 2011.
- [12] REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Anim. Reprod. Sci.** 36(1-2):77-86. 1994.
- [13] RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reprod. Fertil. Dev.** 9: 297-308. 1997.
- [14] RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still Utopia? **Reprod. Dom. Anim.** 38:312-318. 2003.
- [15] ROTA, A.; PENZO, N.; VICENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenol.** 53:1415-1420. 2000.
- [16] RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ, D.; GARDE, J.J.; ESTESO, M.; FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; MADRID, N.; QUINTERO-MORENO, A. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. **Reprod. Dom. Ani.** 42:354-357. 2007.
- [17] RUBIO-GUILLÉN, J.; QUINTERO-MORENO, A.; GONZÁLEZ-VILLALOBOS, D. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. **Rev. Cientif. FCV-LUZ**. XIX (4):382-389. 2009.
- [18] SWANSON, E.W.; BEARDEN, H.J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **J. Anim. Sci.** 10:981-987. 1951.
- [19] VERA, O. Evaluación seminal comparativa pre y post-congelación en machos bovinos. En: **Reproducción Bovina**. C. González- Stagnaro (Ed). Edics. Astro Data S. A. Fundación GIRARZ. Maracaibo-Venezuela. Cap: XII. Pp 1-11. 2001.
- [20] ZANEVELD, L.J.D.; JEYENDRAN, R.S.; KAMINSKI, J.M.; PLEBAN, P. Biochemistry: acrosin. In: **Human Spermatozoa in Assisted Reproduction**. Acosta, A.A.; Swanson, R.J.; Ackerman, S.B.; Kruger T.F.; Van Zyl, J.A.; Menkveld, R. (Eds) Williams and Wilkins, Baltimore, Pp 223-229. 1990.
- [21] ZHU, W.; LIU, X. Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail region human sperm. **J. Androl.** 2:135-138. 2000.