

# EFFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES DE TOROS

## Effect of Cryopreservation on Integrity of Plasmatic and Acrosomal Membrane of Bulls Sperm

Jorge L. Rubio-Guillén, Armando A. Quintero-Moreno\* y Decio M. González Villalobos

Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA), Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia (LUZ). FCV-LUZ. Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A. \* E-mail: arturo93@cantv.net. Telf.: 02617596111.

### RESUMEN

La integridad de la membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA) han sido dos de los parámetros de valoración seminal más estudiados por su rol preponderante como límite celular y por ser responsable de hacer efectivas las interacciones entre células, tanto en términos de integridad morfológica, como funcional. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la criopreservación sobre el porcentaje de espermatozoides vivos (VIT), acrosomas dañados (DAR), y la integridad estructural y funcional de la MP y MA de espermatozoides provenientes de 5 eyaculados frescos y 5 pajuelas descongeladas de 4 toros mediante frotis teñidos con eosina-nigrosina. La integridad funcional de estas membranas fue evaluada mediante los tests osmóticos (HOST y ORT). Los datos obtenidos fueron analizados con el procedimiento GLM (SAS®) y cuando se observaron diferencias se cuantificaron los efectos mediante el LSMEANS. Todos los valores de calidad espermática estudiados fueron afectados significativamente por la criopreservación (VIT, DAR, ORT y HOST). El proceso de congelación-descongelación causó un marcado efecto detrimental sobre la integridad estructural y funcional de la MP y MA de los espermatozoides evaluados ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, se pudo demostrar como los espermatozoides resisten de manera diferente los efectos detrimentales de la criopreservación. Así mismo, el estudio confirma que el daño criogénico puede ocurrir indistintamente sobre la integridad estructural y funcional MP y MA, lo que afectaría la capacidad fecundante de las muestras seminales destinadas a Inseminación Artificial.

**Palabras clave:** Criopreservación, membrana plasmática, acrosoma, toro.

### ASSTRACT

Plasmatic and acrosomal membrane integrity has been used as valuable information for determining sperm quality, because is important to know the morphological and functional role as cellular delimitation and in effective cell interactions. The aim of this study was to determine cryopreservation effects on sperm percentage of vitality, number of damaged acrosomes (DAR), the structural and functional sperm plasma membrane integrity in 5 fresh ejaculates and 5 thawed straws of 5 bulls by using the eosin-nigrosin stain. The functional integrity of these membranes were evaluated by osmotic tests (HOST and ORT). The data was analysed by GLM procedure, and when differences were detected, LSMEANS was used to quantify the effects. Significant differences were found on seminal quality parameters (VIT, DAR, ORT and HOST) between fresh and thawed sperm. Freezing-thawing procedure had detrimental effect on the integrity structural and functional of MP and MA in the spermatozoa evaluated ( $P < 0.05$ ). However, it was possible to demonstrate that the spermatozoa have different pattern of resistance to the detrimental effects of cryopreservation. Then, this study confirms that cryodamage could happen indistinctly on the structural and functional MP and MA integrity, which would affect the fertilizing capacity of the seminal samples destined for Artificial Insemination.

**Key words:** Cryopreservation, plasma membrane, acrosome, bull.

### INTRODUCCIÓN

La membrana espermática (ME) es una estructura heterogénea y dinámica que presenta 5 dominios diferentes: acro-

soma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola, además; participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones específicas que permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionándole un sistema molecular para el reconocimiento del oocito [12]. De aquí deriva que, la evaluación morfológica o estructural del espermatozoide hace énfasis en la valoración de la integridad de su membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA), pudiendo en algunas casos evaluarlas juntas o por separado realizando tinciones sencillas y observando con un microscopio óptico, observando mediante el uso de óptica de contraste diferencial de interferencia o Nomarski, o utilizando microscopía electrónica de transmisión o de barrido. Sin embargo, aún cuando algunas técnicas morfológicas proveen información veraz sobre los daños ocurridos a la MP y MA, no siempre se asocia a la fertilidad del toro (*Bos taurus indicus*), a menos que la injuria presente en los espermatozoides de una muestra seminal sea muy notable [18, 25]. La integridad de la ME es fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible en varios eventos involucrados en la fecundación, como lo son la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión con el oocito [18, 26, 38], lo cual, garantiza la fertilidad del macho reproductor.

El proceso de congelación-descongelación seminal afecta considerablemente la integridad estructural y funcional de los dominios de estas membranas, produciéndose un efecto deletéreo que menoscaba los resultados de la valoración de motilidad, vitalidad y viabilidad espermática postdescongelación [18, 21, 24, 27, 36]. Para la valoración de la integridad funcional de la MP y MA puede ser fácilmente determinada usando pruebas muy sencillas y prácticas que valoran la capacidad funcional de estas membranas a los cambios osmóticos, las cuales se basan en la reacción de estas membranas cuando se exponen a soluciones hipo-osmóticas [21, 36], observando una alta correlación entre la respuesta del espermatozoide a un medio hiposmótico y su capacidad de penetración en oocito de hámster libre de zona pelúcida [15]. Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno destacan dos: el test de endósmosis o hiposmótico (HOST) y el test de resistencia osmótica (ORT), los cuales valoran dos distintas regiones del espermatozoide. El primer caso, es una prueba sencilla y rápida denominada test HOST "*Hypoosmotic Swelling Test*" y se basa en el concepto fisiológico de la semi-permeabilidad de las membranas plasmáticas intactas y bioquímicamente activas de los espermatozoides vivos, las cuales absorben agua cuando son expuestas a una solución hiposmótica [26, 36]. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. En los espermatozoides funcionalmente alterados 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 [18, 36].

Esta prueba se ha aplicado en el semen del hombre (*Homo sapiens sapiens*) [15, 35], del toro [6, 26], del perro

(*Canis familiares*) [29], del caballo (*Equus caballus*) [3] y del cerdo (*Sus scrofa domesticus*) [8, 20], utilizando varias fórmulas. En bovinos, se ha sugerido el uso de fructosa o citrato de sodio diluido en agua destilada a 100 mOsm/L para realizar el test [6, 26]. Otros autores [27, 34, 36] utilizan medios con concentraciones un poco más elevadas (150 mOsm/L) para evitar la aparición de falsos negativos, producto de la ruptura de la membrana plasmática que fisiológicamente debería estar en condiciones isosmóticas a 300-320 mOsm/L.

En el segundo caso, el test de valoración de la funcionalidad acrosomal, es una prueba denominada *Osmotic Resistance Test* (ORT) que permite valorar la integridad del acrosoma al someter los espermatozoides a un medio hiposmótico, de forma que aquellos funcionales no mostrarán alteraciones estructurales evidentes a nivel acrosómico [6, 10, 20]. La evaluación del estado de los acrosomas permite comparar la resistencia osmótica de las membranas de distintos eyaculados, así como medir de manera indirecta la capacidad para soportar la criopreservación [22, 30] y predecir el potencial reproductivo del toro [30, 31]. Al realizar esta prueba se evalúan dos grupos de muestras sometidas a dos diferentes condiciones, una en hiposmosis (150 mOsm/L) y otra en condiciones isosmóticas a 320 mOsm/L que sirve como grupo control al test [6]. Los resultados se reflejan de manera porcentual, luego de sumar los porcentajes de acrosomas intactos en las muestras evaluadas de ambos grupos y dividirlos entre dos, para obtener así un cociente que representa el porcentaje de resistencia acrosomal al medio hiposmótico (%ORT) [10, 20].

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del proceso de criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la MP y MA de espermatozoides bovinos, valorando para tal fin el porcentaje de vitalidad (VIT), el porcentaje de acrosomas dañados "reaccionados o perdidos" (Damaged Acrosoma Ridge - DAR), y la respuesta de los espermatozoides a cambios osmóticos derivados del uso de los tests HOST y ORT.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del ensayo

El experimento fue realizado en el Centro de Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones (VIATECA®), ubicado en el km 104 de la carretera que conduce a Perijá, Villa del Rosario, estado Zulia, Venezuela. Esta zona se clasifica agroecológicamente como bosque seco tropical y posee una temperatura anual entre 28 y 29,5°C.

### Colección y procesado del semen

Se estudiaron los eyaculados de 4 toros adultos, evaluando 5 diferentes muestras de semen fresco recién colectado y sus respectivas 5 muestras criopreservadas de los mismos lotes de congelación. Cada muestra seminal (fresca o criopreservada) pertenecía a un día distinto de colecta, evaluando en total 5 muestras frescas y 5 pajuelas por toro. Estos

ejemplares fueron de comprobada calidad genética y excelentes características seminales, con edades comprendidas entre los 3 y 10 años y pesos corporales que oscilan entre los 800 y 1000 kg.

Los eyaculados fueron colectados los días viernes (la frecuencia de colección seminal fue dos veces por semana, evaluando solo una vez por semana, durante cinco semanas continuas) entre las 5:00 y 7:00 de la mañana mediante vagina artificial. Después de la evaluación seminal de rutina, las muestras clasificadas como idóneas para congelar fueron diluidas, identificadas y envasadas en forma automática en pajuelas de 0,54 mL, a una concentración espermática mínima de 30 millones de espermatozoides por dosis. Luego las pajuelas fueron congeladas en tanques (Millenium 2000, YC 20, Minnesota, EUA) que contenían nitrógeno líquido en un proceso que constaba de dos pasos (estabilización y congelación final a -196°C). Una semana después de la congelación, las muestras fueron evaluadas nuevamente para obtener los resultados del semen criopreservado.

#### Análisis de laboratorio del semen fresco y descongelado

Solo fueron congeladas las muestras seminales con volumen, color, olor y aspecto de acuerdo a los patrones establecidos por el centro para las razas utilizadas, además de esto, el eyaculado debía obtener una concentración espermática superior a 850 millones de espermatozoides por mL, motilidad individual progresiva igual o superior al 60% y con menos del 30% de las anomalías primarias y secundarias.

Para la valoración de la integridad estructural de la membrana plasmática y acrosomal se utilizó la tinción eosina-nigrosina [1] tomando una alícuota (10µL) de semen fresco y descongelado y sobre una platina termostable (Osaka, OK 51, España) a 37°C se mezclaba suavemente con la misma cantidad del colorante para realizar un frotis donde se evaluó el porcentaje VIT y DAR.

Para la valoración de la funcionalidad de la membrana espermática y acrosomal (integridad funcional), se utilizó el test HOST y ORT, tanto para el semen fresco, como para el descongelado. En ambas pruebas se incubó el semen durante 30 minutos en un medio hiposmótico de citrato de sodio (2,7 g/100 mL) a 150 mOsm/L en un baño María termoestable (Water Bath YCW-035, Taiwán) a 37°C, después se centrifugaban a 0,3 RCF (Relative Centrifuge Force) por 2,5 minutos en una micro-centrífuga (Minispin plus eppendorf 22331 Hamburg, Alemania). De la centrifugación se obtuvo un sedimento (espermatozoides) y un sobrenadante, el cual se desechó en un 80%. El sedimento se resuspendió con el sedimento sobrante y se extrajo un alícuota de 10 µL para realizar la tinción de eosina-nigrosina [1], luego se observaron 200 espermatozoides por muestra analizada en un microscopio óptico (Globe, modelo 1600, Alemania) utilizando el objetivo de inmersión a 1000X de aumento. En el primer caso (HOST) se observaron las reacciones positivas al test, las cuales fueron medidas al verifi-

car los flagelos de los espermatozoides enrollados totalmente, enrollados parcialmente, acodados o acodados tenues. El resultado final se expresaba porcentualmente. Para el segundo caso (ORT) las muestras fueron divididas en dos alícuotas e incubadas en dos medios distintos, uno hiposmótico (150 mOsm/L) y otro isosmótico (300 mOsm/L) y se cuantificaron las reacciones acrosómicas (acrosomias parciales y perdidas totales del acrosoma) en cada uno de los dos medios. El resultado final se expresaba en porcentaje, luego de aplicar una fórmula y obtener un cociente simple (%ORT= % de acrosomias contadas en las muestras teñidas provenientes del medio hiposmótico + % de acrosomias cuantificadas en el medio isosmótico [Control], el resultado de la suma directa de estas dos variables se dividía en dos "2").

#### Análisis estadístico

Todos los datos grabados fueron analizados por SAS/Statistical Analysis System software 8,2, para Windows (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. EUA). Las variables evaluadas (Vitalidad, DAR, ORT, HOST) de 5 muestras de semen fresco recién colectado y 5 pajuelas de semen descongelado proveniente de 4 toros adultos distintos, se analizaron en varios eyaculados de cada toro utilizando el Modelo Lineal General (Proc GLM). Cuando se encontraron diferencias entre las medias se cuantificó el efecto mediante el procedimiento LSMEANS.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A(T)_{j(i)} + \xi_{ijk}$$

donde:

$Y_{ijk}$  = Respuesta traducida en: Parámetros de valoración de la calidad seminal, que incluyeron Pruebas de valoración de la integridad estructural de la MP y MA (Vitalidad y DAR), y pruebas de valoración de la integridad funcional de la MP y MA (ORT y HOST).

$\mu$  = Media general.

$T_i$  = Efecto del i-ésimo tratamiento (i = semen fresco/descongelado).

$A(T)_{j(i)}$  = Efecto del j-ésimo animal anidado dentro del i-ésimo tratamiento.

$\xi_{ijk}$  = Error experimental, asumido normal e independientemente distribuido con media cero y varianza  $\sigma^2$  DNI~(0,  $\sigma^2$  DNI).

Este modelo estadístico evalúa el efecto de la congelación-descongelación seminal (anidando la variable animal) sobre los parámetros de integridad de la MP y MA, como ha sido documentado por otros autores al cuantificar el daño que produce este proceso sobre los diferentes dominios de membrana, principalmente, en lo que respecta a su integridad estructural y funcional [24, 27, 34, 39].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medias generales ( $\mu$ ) y el error estándar (EE) de las características evaluadas en semen fresco y descongelado de los toros, así como el efecto detrimental de la criopreservación, se muestran en la TABLA I. Al evaluar el semen fresco se evidenció que el volumen ( $8,35 \pm 0,60$  mL), la concentración espermática ( $1265,30 \pm 49,36 \times 10^6$  spz/ mL), la motilidad masal ( $3,25 \pm 0,13$ ) e individual ( $62,91 \pm 1,4$ ) de los eyaculados estaban dentro de los rangos normales descritos para toros utilizados en centros de IA [17, 36], por lo tanto, se procedió a criopreservar los eyaculados.

Se pudo evidenciar el efecto detrimental del proceso de criopreservación seminal sobre los parámetros que valoran la calidad espermática en semen descongelado. El porcentaje de motilidad individual progresiva y la vitalidad se afectaron durante el proceso de criopreservación, disminuyendo su valor de 62,91 a 40,00% y de 92,95 a 72,80%, respectivamente ( $P < 0,01$ ), y ubicándose en el límite inferior recomendado para los toros destinados a IA [17, 36], sin embargo, este hallazgo es similar a un reporte previo hecho en Venezuela [37]. Es conocido que los espermatozoides de mamífero son sensibles al proceso de criopreservación [12], debido a que pasos como la adición del crioprotector, el proceso de enfriamiento, la congelación, el almacenamiento en nitrógeno líquido y la descongelación causan un marcado deterioro en la MP y MA [22, 39], viéndose reflejado en una disminución de la motilidad individual y viabilidad cuando se evalúa el semen descongelado [11, 38].

La integridad morfológica de MA fue evaluada con la tinción de eosina-nigrosina, el cual no es un colorante de elección para la valoración del acrosoma, como lo son la tinción de Giemsa, Naphtol amarillo o eritrosina B, sin embargo, ha sido usado satisfactoriamente al utilizar el objetivo de de 1000X (inmersión), como lo corroboran trabajos previos en diferentes especies [1, 24]. El DAR después de la criopreservación presentó

un aumento considerable del 10,00% al 35,25% ( $P < 0,01$ ), lo cual concuerda con los resultados de otros experimentos [22, 37] y pudiera estar relacionado con una concentración lipídica atípica en la MP y MA, que predispone a un incremento de la susceptibilidad de estas membranas al enfriamiento [12], los espermatozoides de ciertas especies animales (como el toro, verraco y morueco), en cuyas membranas la relación ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados es muy alta, son más sensibles al frío [36]. Más del 35% de DAR en las muestras seminales descongeladas, resulta ser alto para conseguir una tasa de fertilidad idónea, ya que ha sido indicado que una alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suele relacionarse con una fertilidad baja [7, 22, 23, 27, 28]. Este hecho pudiera afectar notablemente la tasa de fertilidad, debido a que, la reactividad de la membrana acrosomal representa un requisito absoluto para la fertilización *in vivo* y sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del oocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con este, para formar un embrión [13].

En cuanto a la evaluación de la funcionalidad de la MP y MA, los resultados del ORT mostraron diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ), al comparar las muestras frescas y descongeladas (88,75% vs. 52,20%). Un porcentaje de resistencia acrosomal superior al 85% para las muestras frescas pudiera ser indicativo de una excelente capacidad de conservación de los eyaculados [22, 30]; sin embargo, el 52,20% luego de la descongelación, junto con, el alto porcentaje de acrosomas alterados (35,25%) hace presumir que el acrosoma es una de las estructuras mayormente afectadas luego de la criopreservación [12, 22, 27], lo cual es muy relevante motivado a que el ORT ha demostrado tener una correlación alta y positiva con la capacidad fecundante del espermatozoide [22, 23].

En la prueba de funcionalidad de la MP luego de la incubación en un medio hiposmótico (HOST), es imperante recalcar que se realizó una pequeña modificación a la prueba

TABLA I  
**EFFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN (Media  $\pm$  EE) SOBRE LOS PARÁMETROS QUE VALORAN LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE TOROS/ CRYOPRESERVATION EFFECT (Media  $\pm$  EE) ON SEMINAL QUALITY PARAMETERS IN BULL SEMEN**

Características	Semen Fresco	Semen descongelado
Volumen (mL)	$8,35 \pm 0,60$ (7,10-9,59)	-
Concentración (spz/ mL)	$1265,30 \pm 49,36 \times 10^6$ (1161,9-1368,6)	-
Motilidad masal (0-4)	$3,25 \pm 0,13$ (2,96-3,53)	-
Motilidad individual (%)	$62,91 \pm 1,40$ (60,0-65,8) <sup>a</sup>	$40,00 \pm 2,87$ (33,97-46,02) <sup>b</sup>
Vitalidad (%)	$92,95 \pm 0,59$ (91,72-94,18) <sup>a</sup>	$72,80 \pm 3,81$ (64,80-80,79) <sup>b</sup>
DAR (%)	$10,00 \pm 0,70$ (8,54-11,45) <sup>a</sup>	$35,25 \pm 2,87$ (29,22-41,27) <sup>b</sup>
ORT (%)	$88,75 \pm 0,81$ (87,24-90,20) <sup>a</sup>	$52,20 \pm 3,91$ (47,81-58,38) <sup>b</sup>
HOST (%)	$71,85 \pm 3,51$ (64,50-79,19) <sup>a</sup>	$50,82 \pm 3,90$ (42,65-58,99) <sup>b</sup>

Valores entre paréntesis denotan intervalos de confianza de la variable estudiada. (spz/ mL): número de espermatozoides por mililitro de semen. DAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o perdidos. ORT (%): espermatozoides reaccionados al test de resistencia osmótica. HOST (%): espermatozoides positivos al test de endósmosis. (a, b): letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ ).

original usada en 1984 [15] basando en los estudios realizados en 1991 en la Universidad de Loma Linda, California por Chan y col. [4] quienes introdujeron una modificación a la técnica ya descrita, donde se combina este test con una tinción supravital. Es así como en este experimento, los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas (71,85% vs. 50,82%) entre los eyaculados frescos y las muestras descongeladas, lo que lleva a pensar, que el proceso criopreservación bajo las condiciones en que se realizó este estudio, afecta tanto la funcionalidad de la MA como de la MP, mostrada en el DAR y en la capacidad de reacción de los espermatozoides a producir una torsión helicoidal del flagelo, en las muestras incubadas en hiposmosis. La funcionalidad espermática puede verse afectada por la crió injuria, causando un efecto deletéreo sobre la función del acrosoma [7, 16, 22], de la membrana plasmática [21], potencial de membrana mitocondrial e integridad del ADN [2].

Es importante acotar que, el hinchamiento 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 el hinchamiento celular debido a la capacidad de estas sustancias de arrastrar agua cuando atraviesan la membrana celular, alterando así el equilibrio de las presiones osmóticas internas y externas [12]. De esta manera, las alteraciones celulares atribuidas al glicerol parecen estar más relacionadas con un shock osmótico que con la toxicidad química [9]. 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 [23]

La integridad estructural de la MP y MA se vieron notablemente afectadas por la criopreservación al comparar las muestras frescas y descongeladas de cada uno de los toros muestreados en este ensayo (TABLA II). Se mostró como estas estructuras son marcadamente afectadas por la acción deletérea del proceso criogénico, evidenciando un deterioro de la vitalidad y viabilidad de todas las muestras seminales evaluadas, sin embargo, se sabe que, los resultados de estos dos parámetros de evaluación de calidad seminal no siempre están correlacionados con la fertilidad del semen [33], a menos

que el daño que presenten los espermatozoides sea muy importante [25, 27].

Las variables que valoran la integridad estructural de la MP y MA (vitalidad y DAR) en las muestras de semen fresco, no mostraron diferencias ( $P>0,05$ ) entre los toros evaluados. Sin embargo, las muestras seminales descongeladas si mostraron distintos patrones de resistencia a la incubación hiposmótica luego de haber sido sometidos a la criopreservación, lo que corrobora la información aportada por otros investigadores [14, 32]. Se pudo evidenciar que las muestras seminales de los toros resisten de manera distinta el proceso de congelación-descongelación seminal, de allí que muchas veces se puede encontrar toros destinados a IA, con excelentes parámetros de calidad seminal en las muestras frescas y que sean catalogados posteriormente como malos congeladores, obteniendo diferentes fertilidades a nivel de campo [18, 27].

El toro C mantuvo una excelente integridad de MP y MA y mostró el mejor desempeño al realizar las pruebas antes y después de la criopreservación ( $P>0,05$ ), evidenciando solo diferencias estadísticas significativas a su favor, al evaluar la integridad del acrosoma en las muestras criopreservadas y al compararlas con el toro A. Resultado que es lógico si se toma en cuenta que este ejemplar (A) fue el de peor respuesta de todos. Los toros B y D mostraron resultados intermedios. El toro A fue el que tuvo peor desempeño al evaluar la integridad morfológica de la MP y MA en las muestras seminales frescas y descongeladas ( $P<0,05$ ). Así mismo, fue el que obtuvo la menor motilidad individual progresiva ( $P<0,05$ ) al evaluar las muestras 7 días postcongelación. Todos estos parámetros de valoración de la calidad seminal resultan determinantes para alcanzar una fertilidad óptima en toros [16, 37]. La integridad de la MP, integridad de la MA y la motilidad individual progresiva postcongelación, reflejan la viabilidad espermática y el proceso de criopreservación tiene un efecto directo sobre estas variables al afectar las membranas celulares ocasionando daños como hinchamiento y disrupción, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación espermática anticipada y/o reacción acrosómica, viéndose afectada la fertilidad de los toros destinados a IA [14, 34, 37].

TABLA II

**PARÁMETROS DE VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y ACROSOMAL (MEDIAS  $\pm$  EE) EN EL SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO DE LOS TOROS/ EVALUATION PARAMETERS OF STRUCTURAL INTEGRITY OF PLASMATIC AND ACROSOMAL MEMBRANE (MEANS  $\pm$  EE) IN FRESH AND THAWED BULL SEMEN**

Parámetro	Tratamiento	Toros			
		A	B	C	D
VIT (%)	Fresco	92,50 $\pm$ 2,81 <sup>a</sup>	92,50 $\pm$ 2,81 <sup>a</sup>	95,16 $\pm$ 2,81 <sup>a</sup>	91,66 $\pm$ 2,81 <sup>a</sup>
	Descongelado	48,40 $\pm$ 3,08 <sup>b</sup>	81,40 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>	81,40 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>	80,00 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>
DAR (%)	Fresco	12,50 $\pm$ 3,01 <sup>a</sup>	9,83 $\pm$ 3,01 <sup>a</sup>	8,50 $\pm$ 3,01 <sup>a</sup>	9,16 $\pm$ 3,01 <sup>a</sup>
	Descongelado	49,60 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>	31,40 $\pm$ 3,29 <sup>b</sup>	28,40 $\pm$ 3,29 <sup>bc</sup>	31,60 $\pm$ 3,29 <sup>b</sup>

(a, b): letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas ( $P<0,05$ ). VIT (%): porcentaje de espermatozoides vivos (negativos a la tinción eosina). DAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o perdidos.

Los resultados de las pruebas que evalúan la funcionalidad espermática de cada uno de los toros evaluados se muestran en la TABLA III. Se pudo evidenciar como la funcionalidad de la MA de los espermatozoides de cada toro se afectó notablemente debido al proceso de criopreservación. Sin embargo, en semen fresco, no se evidenció diferencias estadísticas significativas entre toros, al realizar el ORT. Empero, el toro C presentó un porcentaje de resistencia acrosomal de 91,90 y 66%, que estuvo por encima de los demás toros evaluados en los eyaculados frescos ( $P>0,05$ ) y en los criopreservados, respectivamente ( $P<0,05$ ). Lo que llevaría a aseverar que presentará un fertilidad óptima, debido a que el ORT ha sido altamente correlacionado con la fertilidad *in vitro* e *in vivo* [31]. Se ha referido que el proceso de congelación-descongelación seminal puede afectar, tanto la integridad estructural [19, 22], como la función de las enzimas del acrosoma (proteasas y acrosina) [16]. La relación entre la funcionalidad acrosomal y la fertilidad del semen bovino parece ser suficientemente estrecha para sugerirla como prueba de predicción de la capacidad fecundante del semen de toros reproductores [5, 22] o en su defecto, complementar los parámetros rutinarios de valoración seminal [28]. Los toros B y D luego de la criopreservación tuvieron un incremento en el porcentaje de acrosomas reaccionados por encima del 40% ( $P>0,05$ ), lo que hace pensar que estos dos toros perdieron viabilidad acrosomal al ser sometidos al proceso de congelación-descongelación seminal. La determinación de la presencia del acrosoma en semen descongelado se considera como un buen indicador de calidad seminal óptima [37] [TABLA III].

En otro orden de ideas, se ha descrito que el daño criogénico sobre la cabeza y el flagelo espermático pueden ocurrir independientemente uno del otro, y la presencia de la membrana flagelar intacta, no indica necesariamente membrana acrosomal íntegra [39]. Razón por la cual en este experimento, se realizaron dos pruebas evaluación de funcionalidad espermática de dos distintas partes (MP y MA) del espermatozoide, para la mejorar la fiabilidad y predictividad de los resultados, como lo sugirieron en otros trabajos [7, 21]. Para el caso del HOST, no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre toros, en los eyaculados frescos y en las muestras criopreservadas. Sin embargo, los resultados contribuyeron a complementar las pruebas de valoración

de la integridad morfológica de la MP y MA (VIT y DAR), debido a que el toro A también mostró con el HOST una propensión numérica desfavorable al evidenciar el peor desempeño en las muestras frescas y criopreservadas ( $P>0,05$ ). Este toro junto con el ejemplar D, al realizar las pruebas de integridad estructural y funcional mostraron pobres desempeños, al compararlos con sus coetáneos; sin embargo, fueron los menos afectados en lo que respecta al efecto de la criopreservación sobre funcionalidad de la MP (menor al 15% ambos), esto pudiera deberse a que fueron mayormente afectados en la integridad de la MA y que su MP no fue marcadamente afectada por el procesado. También pudiera ser que la presión osmótica (150 mOsm/L) utilizada en el test no fue lo suficientemente baja para inducir que los espermatozoides reaccionaran adecuadamente, debido a que algunos investigadores han sugerido para el semen bovino el uso de fructosa o citrato de sodio a una presión osmótica de 100 mOsm/L [6, 15, 26].

### CONCLUSIONES

Se sabe que la criopreservación, tiene como propósito garantizar la supervivencia de los espermatozoides, sin embargo, en una elevada y variable proporción de ellos suele ocasionar daños irreversibles a la membrana plasmática y acrosomal que pueden causar muerte celular e infertilidad. Los resultados de este experimento demuestran que el proceso de congelación-descongelación afecta la integridad de estas membranas, tanto a lo referente a morfología como funcionalidad. Sin embargo, se pudo demostrar como los espermatozoides de los diferentes toros evaluados, resisten de manera distinta los efectos detrimentales de la criopreservación. Así mismo, el estudio confirma que el daño criogénico puede ocurrir indistintamente sobre la integridad estructural y funcional MP y MA, lo que pudiera afectar la capacidad fecundante de las muestras seminales destinadas a IA.

### AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, por el aporte económico brindado me-

**TABLA III**  
**PARÁMETROS DE VALORACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA (MEDIAS ± EE) EN EL SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO DE LOS TOROS/ EVALUATION PARAMETERS OF SPERM FUNCTIONALITY (MEANS ± EE) IN FRESH AND THAWED BULL SEMEN**

Parámetro	Tratamiento	Toros			
		A	B	C	D
ORT (%)	Fresco	86,40 ± 2,74 <sup>a</sup>	90,30 ± 2,74 <sup>a</sup>	91,90 ± 2,74 <sup>a</sup>	86,91 ± 2,74 <sup>a</sup>
	Descongelado	52,40 ± 2,74 <sup>b</sup>	50,00 ± 2,74 <sup>b</sup>	66,00 ± 2,74 <sup>a</sup>	44,00 ± 2,74 <sup>b</sup>
HOST (%)	Fresco	55,90 ± 6,62 <sup>a</sup>	86,00 ± 6,62 <sup>a</sup>	80,90 ± 6,62 <sup>a</sup>	64,60 ± 6,62 <sup>a</sup>
	Descongelado	43,10 ± 6,62 <sup>a</sup>	54,20 ± 6,62 <sup>a</sup>	56,20 ± 6,62 <sup>a</sup>	49,80 ± 6,62 <sup>a</sup>

(a, b): letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas ( $P<0,05$ ). ORT (%): espermatozoides reaccionados al test de resistencia osmótica. HOST (%): espermatozoides positivos al test de endósmosis.

dante el proyecto N°: CC-0006-07, para realizar esta investigación. A la empresa privada VIATECA por el apoyo en el desarrollo de esta investigación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAMBA, K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. **Theriogenol.** 29: 1245-1251. 1988.
- [2] BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship Between Plasma Membrane Integrity, Mitochondrial Membrane Potential and DNA Fragmentation in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. **Reprod. Dom. Anim.** 43 (2): 189-195. 2008.
- [3] CAIZA DE LA C., F.; PUJOL, M.; RIGAU, T.; BONET, S.; MIRÓ, J.; BRIZ, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J. Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: The role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. **Theriogenol.** 48: 947-968. 1997.
- [4] CHAN, P.; TREDWAY, D.; SU, B.; CORSELLE, J.; REN, R. Combined supravital stains and hypoosmotic swelling test. **Human. Reprod.** 6(8): 1115-1118. 1991.
- [5] CHRISTENSEN, P.; WHITFIELD, C.; PARKINSON, T. The use of bright field microscopy in evaluating bovine acrosome reaction. **Theriogenol.** 42: 655-662. 1994.
- [6] 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.
- [7] ESTEVEZ, S.; SHARMA, R.; THOMAS, A.; AGARWAL, A. Improvement in motion characteristic and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. **Human. Reprod.** 15 (10): 2173-2179. 2000.
- [8] GADEA, J.; MATÁS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. **Anim. Reprod. Sci.** 56: 95-108. 1998.
- [9] GAO, D.Y.; MAZUR, P.; KLEINHANS, F.W.; WATSON, P.F.; NOILES, E.E.; CRITSER J.K. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. **Cryobiol.** 29: 657-667. 1992.
- [10] GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HÅRD, M.; JOHANISSON, A.; SÖDERQUIST L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-plus ® and Triladyl ®. **Reprod. Dom. Anim.** 35: 69-77. 2000.
- [11] GUILLAUME, M.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY, R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biol. Reprod.** 71: 28-37. 2004.
- [12] HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.** 11: 73-88. 1990.
- [13] JANUSKAUSKAS, A.; JOHANISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenol.** 53: 859-875. 2000.
- [14] JANUSKAUSKAS, A.; JOHANISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenol.** 60: 743-58. 2003.
- [15] JEYENDRAN, R.S.; VAN DER, H.H.; PÉREZ-PELÁEZ, M.; CRABO, B.J.; 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.
- [16] MACK, S.; ZANEVELD, M. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. **Gamete Res.** 18: 375-383. 1987.
- [17] MADRID-BURY, N. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Capítulo XVI. In: C. Gonzalez-Stagnaro (Ed) **Reproducción Bovina.** Ediciones Astro Data SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Pp 263-278. 2003.
- [18] MADRID-BURY, N. Relación entre los métodos de valoración seminal *in vitro* y la fertilidad *in vivo* del semen descongelado de toros frisonos. Universidad Complutense de Madrid, España. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral. 1-164 pp. 2004.
- [19] McLAUGHLIN, E.; FORD, W.; HULL, M. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** 95: 527-534. 1992.
- [20] PÉREZ-LLANO, B.; GARCÍA-CASADO, P.; LORENZO, J.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R. Response to the boar sperm to the Host test and relationship between HOST and ORT results. **Proc 15<sup>th</sup> IPVS Congress.** Birmingham 07/05-09, England, 69 pp. 1998.
- [21] PÉREZ-LLANO, B.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R.; YENES, P.; GARCÍA-CASADO, P. Estudio de la evolución de poblaciones de espermatozoides de verraco según su respuesta al HOST corto y el estado del acrosoma durante la conservación a 15°C. **6<sup>th</sup> International Conference on Pig Reproduction.** Missouri 06/03-06, EEUU. 50 pp. 2001.
- [22] PRATHALINGAM, N.; HOLT, W.; REVELL, S.; JONES, S.; WATSON, P. Dilution of spermatozoa results in improved viability following a 24h storage period but de-

- creased acrosome integrity following cryopreservation . **Anim. Reprod. Sci.** 91 (1-2): 11-22. 2005.
- [23] QUINTERO-MORENO, A. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona, España. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral. 1-164 pp. 2003.
- [24] QUINTERO-MORENO, A.; RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ, D.; PALOMARES, R.; MADRID-BURY, N. Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de toros. **XI Jornadas Nacionales de la Facultad experimental de Ciencias-LUZ**. Maracaibo 12-15/10, Venezuela. 1-128 pp. 2007.
- [25] RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen and prediction of fertility: still utopia? **Reprod Dom Anim.** 38: 312-318. 2003.
- [26] 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.
- [27] RUBIO, J. Efecto de la criopreservación sobre la calidad seminal y la fertilidad de toros Holstein, Brahman y sus mestizos. Universidad del Zulia (LUZ). Facultad de Agronomía. Tesis de Maestría. 1-103 pp. 2006.
- [28] RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ, D.; GONZÁLEZ, Y.; MADRID, N.; QUINTERO, A. ¿Puede el ORT complementar las pruebas clásicas de valoración seminal y predecir la fertilidad en toros? **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** 15 (1): 329. 2007.
- [29] SÁNCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, M.V. Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test. **Arch. Med. Vet.** 34 (1): 123-130. 2002.
- [30] SCHILLING, E.; VENGUST, M. Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples. **Zuchthygiene.** 20: 61-78. 1985.
- [31] SCHILLING, E.; VENGUST, M.; BAJT, G.; TOMCIC, M. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. **Proc 9<sup>th</sup> IPVS Congress**, Barcelona 12-15/07, España. 77 pp. 1986.
- [32] SHANNON, M.; VISHWANATH, R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. **Anim. Reprod. Sci.** 39: 1-10. 1995.
- [33] STALHAMMAR, E.; JANSON, L.; PHILIPSSON, J. The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls. **Reprod. Nutri Dev.** 34:37-45. 1994.
- [34] TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenol.** 62: 1245-1252. 2004.
- [35] VAN DER VEN, H.H.; JEYENDRAN, R.S.; AL-HASANI, S.; PÉREZ-PELÁEZ, M.; DIEDRICH, K.; ZANEVELD, L.J. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic médium (Hypoosmotic Swelling Test) and *in vitro* fertilization. **J. Androl.** 7: 190-196. 1986.
- [36] VERA, O. Evaluación seminal comparativa pre y post-congelación en machos bovinos. Capítulo XII. In: C. González-Stagnaro (Ed) **Reproducción Bovina**. Ediciones Astro data SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Pp 1-11. 2003.
- [37] VILLANOVA, L.; GATICA, R. ¿Puede el análisis *per se* predecir realmente la fertilidad potencial en toros? **Rev. Cientif. FCV-LUZ**. XII (3): 202-208. 2002.
- [38] WATSON, PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.** 60: 481-492. 2000.
- [39] ZHU, W.; LIU, X. Cryodamage to plasma integrity in head and tail region human sperm. **Asian J. Androl.** 2: 135-138. 2000.