

EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS MEDIANTE EL TEST HIPOOSMÓTICO (HOST)

Natalia Andrea Bedoya Echeverry¹; Neil Vásquez Araque²; Magda Rivera Rey³;

Guillermo Correa Londoño⁴ y Luis Emilio Trujillo Aramburo⁵

RESUMEN

Con el objetivo de implementar el test hipoosmótico como prueba complementaria en la evaluación del semen bovino pre y postdescongelación, se evaluaron dos soluciones hipoosmóticas en concentraciones de 100 y 150 mOsmol/L., en el semen de dos toros Blanco Orejinegro del Centro de Inseminación Artificial San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Los resultados mostraron que la proporción de espermatozoides vivos (73,5%) fue superior a la de espermatozoides que reaccionaron al test hipoosmótico (53,4%), evidenciando que no todos los espermatozoides vivos poseen una membrana bioquímicamente activa y capacitada para soportar un hinchamiento osmosis. El análisis de varianza mostró que la etapa de procesamiento (pre y postdescongelación), la osmolaridad de la solución (100 y 150 mOsmol/L), el toro, el control y la interacción entre la etapa de procesamiento y la osmolaridad de la solución explicaron 81,5% y 89,8% de las variaciones en el porcentaje de espermatozoides reaccionados y vitales, respectivamente ($p \leq 0,001$). De estos factores la etapa de procesamiento, la solución hipoosmótica y el toro tuvieron efecto altamente significativo sobre el porcentaje de espermatozoides reaccionados ($p \leq 0,001$). La etapa de procesamiento y el toro influenciaron de manera altamente significativa los cambios en la vitalidad

¹ Bióloga. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. A.A. 1226, Medellín, Colombia. <nataliabedoya@hotmail.com>

² Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <nvasquez@unalmed.edu.co>

³ Médica Veterinaria, Zootecnista. BIOVET, Medellín, Colombia. <biovet@sis.net.co>

⁴ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <gcorrea@unalmed.edu.co>

⁵ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <letrujil@unalmed.edu.co>

($p \leq 0,001$). Las variaciones en la morfología espermática normal se explicaron en un 91,1% ($p \leq 0,001$) por la etapa de procesamiento, el toro y la interacción entre estos dos factores. Se encontraron correlaciones positivas y significativas entre los porcentajes de espermias reaccionados y la vitalidad (0,80; $P \leq 0,0001$) y entre los espermias reaccionados y los espermias normales (0,71; $P \leq 0,001$), respectivamente. Estos resultados evidenciaron una asociación positiva entre los espermias con integridad funcional de la membrana plasmática (reaccionados al test hipoosmótico) y el porcentaje de espermias vivos y morfológicamente normales. En concordancia con este hallazgo se presentaron correlaciones negativas entre el porcentaje de espermias reaccionados y el porcentaje de espermias anormales. Se concluye que los espermias bovinos frescos y postdescongelados presentaron un máximo de reacción a la solución hipoosmótica a 100 mOsmol/L y que el porcentaje de espermias que respondieron al test con hinchamiento fue 20% menos que el porcentaje de espermias teñidos con el colorante supravital, siendo el test hipoosmótico una prueba complementaria de utilidad en la evaluación del semen bovino pre y postdescongelación.

Palabras clave: Blanco orejinegro, BON, semen de toros, espermatología, morfología espermática, vitalidad espermática, evaluación del semen.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE FUNCTIONAL INTEGRITY OF THE PLASMATIC MEMBRANE OF BOVINE SPERM VIA THE HYPOOSMOTIC TEST (HOST)

In order to implement the hypoosmotic test as a complementary assay for the evaluation of pre- and post-freezing and thawing bovine semen, two hypoosmotic solutions at 100 and 150 mOsmol/L were evaluated, using semen from two bulls of the San Pablo Artificial Insemination Center of the National University of Colombia, Medellín campus. The percentage of live sperm (73,5%) was greater than the percentage of sperm that reacted to the hypoosmotic test (53,4%), showing that not all the viable sperm have a biochemically active membrane capable of supporting an osmotic swelling. An analysis of variance indicated that Processing stage (pre and post freezing and thawing), Solution osmolarity (100 and 150 mOsmol/L), Bull, Control test and the interaction between Processing stage and Solution osmolarity explained 81,5% and 89,8% of the variance in percentage of sperm reacting and sperm viability, respectively ($p \leq 0,001$). Processing stage, Solution osmolarity and Bull were highly significant factors ($p \leq 0,001$) with respect to the percentage of sperm reacting, and Processing stage and Bull influenced sperm viability in a highly significant manner ($p \leq 0,001$). Variation in normal sperm morphology was explained (91,1%, $p \leq 0,001$) by Processing stage, Bull and the interaction between them. Positive correlations were documented between percentage of sperm reacting and viability (0,80; $p \leq 0,0001$), and between percentage of sperm reacting and normal morphology (0,71; $p \leq 0,001$), respectively. These results show a

positive association between sperm with a functional integrity of their plasmatic membrane (sperm reacting to the hypoosmotic test) and the percentage of live sperm with a normal morphology. Consistent with this result, a negative correlation between sperm reacting and percentage of abnormal sperm was found. In conclusion, fresh and post-tawed bovine sperm showed maximal reactions to 100 mOsmol/l of osmolarity and the percentage of sperm reacting that responded to the test by swelling was 20% less than the percentage of sperm colored with supravital stain. These results makes of the hypoosmotic test a complementary assay useful to assess bovine semen before and after freezing.

Key words: Blanco Orejinegro, BON, bovine semen, spermatology, sperm morphology, sperm viability.

INTRODUCCIÓN

La evaluación estándar de semen incluye varios parámetros: volumen, concentración, movilidad, vitalidad y morfología. Se ha asumido que estas medidas proveen información de la cantidad del eyaculado y de la calidad de la espermatogénesis (Correa y Zavos, 1994); sin embargo, estos parámetros tienen limitaciones y no pueden ser usados como pronóstico confiable de la capacidad fertilizante del espermatozoide *in vivo* ó *in vitro* (Glass y Ericsson, 1979; Hoing, Devroey y Van Steirtghem, 1986; Berger y Parker, 1989; Zavos y Centola, 1990; Correa y Zavos, 1994).

Además de la evaluación estándar, se han desarrollado otras pruebas para medir la funcionalidad espermática (penetración del moco cervical, prueba de unión a la hemizona, penetración de oocitos de hámster libres de zona pelúcida, tinción triple, cuantificación del ATP espermático y actividad de la acrosina), las cuales han presentado desventajas porque consumen tiempo y no son aplicables en condiciones

clínicas o de campo (Toda *et al.*, 1992; Correa y Zavos, 1994).

Debido a que la estructura y funcionalidad de la membrana espermática son esenciales para mantener la viabilidad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides, es necesario evaluar la integridad de la membrana a través de pruebas de laboratorio. Los eventos que ocurren durante la fertilización como son la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión espermática al oocito, requieren de una membrana activa. La fertilización no ocurre si la membrana esta estructural ó físicamente intacta, pero bioquímica y funcionalmente inactiva (Correa y Zavos, 1994).

El método tradicional para examinar la integridad de la membrana espermática involucra la evaluación del porcentaje de espermatozoides viables por los métodos de exclusión por tinción (Azul de tripano o Eosina-nigrosina), los cuales hacen parte de los análisis estándar usados por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1998). El inconveniente de este método

En que medida la integridad estructural del membrano plasmática del espermatozoide y no haber en cuenta su integridad funcional (Scarabel *et al.*, 1995).

La congelación y la descongelación del semen producen con frecuencia alteraciones funcionales y estructurales tales como: cambios en la fase dependiente de hidratación, separación de componentes de membrana de la fase lateral, agregación de partículas intramembranas, pérdida de la permeabilidad de la membrana y fusión de sus partes, las cuales pueden traer como resultado quiebres en la membrana (Watson, Kunze, Cramery y Hammerstorff, 1992; Correa y Zavanos, 1994). Estos cambios en la fase de la membrana plasmática durante el proceso de descongelación la hacen susceptible a fracturas tempranas en los puntos estresantes (Alvarez y Storey, 1993; Correa y Zavanos, 1994), razón por la cual se hace necesario implementar una técnica que permita evaluar la integridad funcional de la membrana espermática antes y después de someter a muestras seminales a criopreservación.

La prueba hiposmótica desarrollada por Jeyendran *et al.* (1984) fue diseñada para evaluar la funcionalidad de la membrana espermática y ha sido recomendada por ser económica, fácil e involucradora al animal de fertilidad, cuyos datos sí no pueden ser obtenidos de los parámetros de evaluación estándar (Van Der Venn *et al.*, 1985; Zaneveld *et al.*, 1990; Correa y Zavanos, 1994).

El objetivo de este trabajo fue el de estandarizar y evaluar el test hiposmótico como prueba complementaria al método tradicional de evaluación del semen bovino por el método de hiposmótico.

REVISIÓN DE LITERATURA

El papel de la membrana plasmática es esencial para la comunicación intracelular, espermática y al medio externo (Carroll y Kagi, 1980; Calvete *et al.*, 1990) porque involucra el transporte de varias moléculas (Ishibashi *et al.*, 1997; Caiza de la Cueva *et al.*, 1997; Dibas, Mia y Yorio, 1998; Pérez-Llano *et al.*, 2001), la unión de diferentes factores a receptores específicos y el mantenimiento del potencial de membrana (Zeng, Clark y Florman, 1995; Pérez-Llano *et al.*, 2001).

La membrana plasmática de los espermatozoides de los mamíferos tiene dominios en el acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y pieza principal de la cola de diferente composición, ultra estructura y función; cada uno de ellos contribuye por separado con la función espermática (Friend, 1982; Holt, 1984; Bearery y Friend, 1990).

La mayoría de eventos que ocurren durante la fertilización, tales como la capacitación, la reacción acrosómica y la unión del espermatozoide a la superficie del óvulo requieren una membrana estructuralmente intacta y bioquímicamente funcional (Jeyendran *et al.*, 1984; Correa y Zavanos, 1994); por esta razón, la fertilización no puede ocurrir si la membrana espermática está físicamente intacta pero bioquímicamente inactiva.

Los eventos que ocurren durante la fertilización son importantes para resolver casos de infertilidad y elegir condiciones experimentales óptimas para la fertilización in vitro (FIV) (Langley y Paulsen, 1999).

Por consiguiente, la evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática parece ser un indicador de la capacidad fertilizante del espermatozoide (Zaneveld *et al.*, 1990; Correa y Zavos, 1994; Vazquez *et al.*, 1997).

Existen dos pruebas para evaluar la integridad de la membrana de los espermatozoides: la prueba supravital (vitalidad o tinción vivo-muerto) y la de hinchamiento hipoosmótico (HOST). Cada una de estas evalúa características diferentes de la membrana espermática. La primera mide si existen quiebres de la membrana (células muertas que incorporan el colorante) mientras que la HOST evalúa si la membrana intacta está físicamente activa y bioquímicamente funcional (Zaneveld *et al.*, 1990 y Correa y Zavos, 1994).

La prueba HOST fue diseñada por Jeyendran *et al.* (1984) para evaluar la funcionalidad de la membrana espermática. Su principio se basa en la observación del aumento del tamaño de los espermatozoides expuestos a condiciones hipoosmóticas (Bredderman y Foote, 1969; Drevius, 1971 y Correa y Zavos, 1994). Los primeros en demostrar el aumento del tamaño celular de los espermatozoides colocados en una solución hipoosmótica fueron Drevius y Erikson (1966), quienes lo asociaron con la expansión esférica de la membrana celular que cubre la cola, la cual produce una presión, forzando el enrollamiento del flagelo dentro de la membrana. El enrollamiento de la cola comienza en la parte distal y continúa hacia la pieza intermedia y cabeza a medida que es más baja la presión osmótica del medio (Drevius y Erikson, 1966; Jeyendran *et al.*, 1984 y Correa y Zavos, 1994;).

Durante la prueba HOST los espermatozoides bioquímicamente activos, permitirán la entrada de agua como consecuencia de la dinámica de equilibrio entre los fluidos del entorno extracelular y el compartimento interno de los espermatozoides, causándoles un hinchamiento, el cual es señal de la integridad de la membrana y de la actividad funcional de la misma (transporte normal de agua a través de la membrana espermática) (Drevius y Erikson, 1966; Jeyendran *et al.*, 1984; Correa y Zavos, 1994). Este efecto puede ser observado con un microscopio de contraste de fase.

El medio hipoosmótico óptimo es aquel que ejerce un estrés osmótico grande, capaz de causar un incremento observable del volumen celular, pero pequeño para prevenir la lisis de la membrana espermática (Jeyendran *et al.*, 1984; Zavos, 1990; Kumi-Diaka, 1993; Correa y Zavos, 1994; Vazquez *et al.*, 1997). La solución hipoosmótica a 100mOsm/L ha resultado ser la de mayor producción de espermatozoides bovinos hinchados claramente identificables y la que mejor conserva la integridad de la membrana durante la prueba HOST (Correa y Zavos, 1994).

Se ha reportado una correlación de 0,90 ($p < 0,001$) entre el porcentaje de espermatozoides capaces de sufrir hinchamiento en el HOST y el porcentaje de oocitos de hamster desnudos penetrados por espermatozoides (ZFHO) (Jeyendran *et al.*, 1984). De igual forma se ha encontrado relación estrecha ($r = 0,90$; $p < 0,001$) entre el porcentaje de espermatozoides reaccionados y los resultados de fertilización *in vitro* (FIV) en humanos (Jeyendran *et al.*, 1984; Van Der Venn *et al.*, 1986).

La prueba HOST es recomendada como una prueba adicional a la evaluación estándar del semen como medida de la integridad funcional de la membrana. También puede ser utilizado para evaluar el incremento cuantitativo de espermatozoides capacitados que sufren la reacción acrosómica y para observar alteraciones en la permeabilidad de la membrana espermática bajo condiciones que suponen capacitación (Correa y Zavos, 1994) o debidas al proceso de criopreservación (Correa, Heersche y Zavos, 1997).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El estudio se realizó en el Laboratorio de Procesamiento de Semen San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ubicado en la vereda Tablacito del municipio de Rionegro (Antioquia) a 2100 msnm, precipitación promedio anual de 2000 mm y temperatura promedio de 18°C, condiciones bioclimáticas correspondientes a la zona de vida de bosque húmedo montano bajo (bh-MB) (Espinal y Montenegro, 1963).

Población de estudio. Se utilizó semen fresco y congelado procedente de dos toros, uno de raza Holstein y otro de la raza Blanco Orejinegro (BON) de 24 y 36 meses de edad y 622 y 851 kg. de peso vivo, respectivamente. Los toros del estudio se diagnosticaron negativos para enfermedades específicas de la reproducción y permanecieron en el Centro San Pablo bajo un plan de alimentación de pastoreo de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), con pasto de corte King Grass (*P. purpureum* x *P. typhoides*), concentrado comercial, agua y sal mineral a libre disposición.

Recolección, evaluación, dilución y congelación del semen. La recolección del semen se realizó con una vagina artificial. Las pruebas macroscópicas del semen incluyeron: volumen eyaculado, densidad, color, presencia de sustancias extrañas y pH. Las pruebas microscópicas consideraron: movilidad masal, movilidad individual y concentración. Posteriormente se llevó a cabo el HOST y el test de tinción supravital para semen fresco. El semen recolectado fue diluido en tris-yema, usando como crioprotector glicerol al 7%. Este material fue congelado en pajillas francesas de 0,5 ml.

Preparación de la solución hipoosmótica. Se prepararon dos soluciones hipoosmóticas compuestas por fructosa y citrato de sodio en agua grado reactivo a 100 y 150 mOsmol/L (Correa y Zavos, 1994).

Descongelación del semen y preparación de muestras descongeladas para el HOST. La descongelación del semen se realizó en agua a 37°C por 30 segundos. Para el HOST se diluyó el contenido de dos pajillas en dos ml de citrato de sodio al 2,9%. La mezcla fue centrifugada a 400xg a 37°C durante 8 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado espermático fue resuspendido en 0.5 ml de citrato de sodio al 2,9%. La muestra fue mantenida en baño maría a 37°C hasta la realización del HOST.

Test hipoosmótico (HOST). Para el test hipoosmótico se mezclaron 0,1 ml de semen fresco o criopreservado con 1 ml de cada una de las soluciones hipoosmóticas (100 y 150 mOsmol/L); la mezcla fue in-

cubada a 37°C durante una hora. Se colocó una gota en un portaobjeto con lamini-lla y se observó al microscopio de contraste de fase a 40x contando 200 espermatozoides por placa. Se determinó el porcentaje de espermatozoides que mostraron hinchamiento típico de la cola en respuesta al estrés hipoosmótico como lo describieron Jeyendran *et al.* (1984); Vázquez *et al.* (1997) y Neild *et al.* (1999).

Test de tinción supravital y morfología espermática. Para la prueba de vitalidad y morfología espermática se utilizó el colorante eosina-nigrosina modificado. Se contaron 200 espermatozoides para vitalidad y morfología espermáticas por placa preparada según criterios definidos por Barth y Oko (1989).

Prueba control. Con el fin de comprobar la funcionalidad del test hipoosmótico, se realizó un control consistente en la incubación de semen fresco y descongelado a 56°C durante una hora, con el fin de causar daño físico a la membrana espermática. Este daño se evaluó por medio del porcentaje de espermias reacciona-

dos, el porcentaje de vitalidad y el de espermias anormales.

Análisis estadístico. Se aplicó estadística descriptiva y análisis de varianza (ANAVA) a las variables porcentaje de espermias reaccionados, vitalidad y morfología. Los factores etapa de procesamiento (pre y postdescongelación), osmolaridad de la solución hipoosmótica (100 y 150mOsmol/L), toro, control e interacción etapa de procesamiento con solución hipoosmótica se consideraron como fuentes de variación. Los promedios de las variables que presentaron efecto estadístico significativo en el ANAVA fueron comparados mediante el test de Duncan. Las asociaciones entre las características espermáticas se estimaron a través de las correlaciones de Pearson. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa SAS (1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características espermáticas generales. En la Tabla 1 se presentan los valores para el porcentaje de espermatozoides reaccionados al HOST, vitalidad y espermatozoides morfológicamente normales.

Tabla 1. Valores porcentuales de los espermatozoides reaccionados al HOST, vitalidad y morfología normal.

Variable	N	Valor Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Intervalos de confianza	
					Mínimo	Máximo
Espermatozoides reaccionados	64	53,4	15,0	28,0	24	90
Vitalidad	64	73,5	13,1	17,8	50	95
Espermatozoides morfológicamente normales	17	77,3	12,6	16,3	53	96

La proporción de espermatozoides vivos (73,5%) fue superior a la proporción de espermatozoides que reaccionaron al HOST (53,4%), evidenciando que no todos los espermatozoides vivos poseen una membrana bioquímicamente activa y capacitada para soportar un hinchamiento osmótico. Esta diferencia puede ser debida a que el test hipoosmótico evalúa aspectos de la membrana espermática que el de tinción supravital no puede evaluar tales como la inactividad previa de la membrana de algunos espermatozoides. Este resultado concuerda con el trabajo de Correa y Zavos (1994) quienes encontraron 20% menos de espermatozoides reaccionados en comparación con el porcentaje de vitalidad.

El HOST evalúa la integridad funcional de la membrana plasmática basado en la propiedad de permeabilidad mientras que el test de exclusión (tinción supravital) evalúa la integridad estructural mediante el ingreso de moléculas de colorante a través de una ruptura en la membrana. De esta forma un espermatozoide vivo puede tener una membrana no funcional e incapaz de hincharse, pero estructuralmente intacta. Según Vázquez *et al.* (1997), el HOST puede ser más sensible y estar más relacionado con la habilidad fertilizante que el test de exclusión.

Factores que afectan el HOST. Mediante un ANAVA se evaluó el efecto de la etapa de procesamiento (pre y postdescongelación), osmolaridad de la solución hipoosmótica (100 y 150 mOsmol/L), toro, prueba control e interacción etapa de procesamiento con osmolaridad de la solución, sobre el porcentaje de espermatozoides que reaccio-

narón al HOST. De estos factores, la etapa de procesamiento, osmolaridad de la solución y toro explicaron en un 81,5% ($p \leq 0,0001$) el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

El porcentaje promedio de espermatozoides reaccionados antes de la congelación fue significativamente superior (62,84%) de espermatozoides reaccionados después de la congelación (44,03%). ($p \leq 0,05$).

El proceso de congelación y descongelación daña la membrana espermática produciendo pérdida de la permeabilidad e impidiendo que los espermatozoides puedan sufrir el proceso de hinchamiento característico de las células sometidas a una solución hipoosmótica (Kumi-Diaka, 1993; Jeyendran *et al.*, 1984 y Correa y Zavos, 1994). Estos espermatozoides probablemente tienen limitaciones en el potencial de fertilización. De acuerdo con Watson, Kunze, Cramer y Hammerstedt (1992) puede haber un efecto directo de la descongelación sobre la membrana espermática causando pérdida de componentes intracelulares como nucleótidos y dinucleótidos.

El porcentaje de espermatozoides reaccionados también varió significativamente según la osmolaridad de la solución. La solución a 100 mOsmol/L produjo mayor número de espermatozoides reaccionados (58,34%) que la solución a 150 mOsmol/L (48,53%). Este hallazgo coincide con los reportes de Correa y Zavos (1994) en cuanto a que la solución hipoosmótica a 100 mOsmol/L produce el mayor índice de espermatozoides hinchados claramente identificables, conservando la integridad de la célula durante el HOST. Vázquez *et al.* (1997) reportaron que una preparación

espermática incubada entre 50 y 150 mOsmol/L por 30 minutos conserva las membranas espermáticas intactas y continuas alrededor del axonema.

El toro también contribuyó significativamente ($p \leq 0,001$) a la variación en el porcentaje de espermias reaccionados. El toro de la raza Blanco Orejinegro (BON) presentó un número significativamente mayor ($p \leq 0,05$) de espermatozoides reaccionados (61,46%) que el toro de la raza Holstein (45,40%).

Vázquez *et al.* (1997) reportaron diferencias físicas y bioquímicas en la membrana plasmática de los espermatozoides de diferentes especies (caballo, toro y carnero) que pueden causar penetración diferencial de sustancias a través de la membrana. Sin embargo, en la revisión de literatura consultada no se encontraron reportes de efectos individuales o de la raza sobre la respuesta de los espermatozoides al HOST. La raza Blanco Orejinegro ha sido considerada por algunos autores (Arboieda, 1980 y Martínez, 1983) como una raza criolla de alta fertilidad y es posible que la resistencia al HOST sea un indicador de fertilidad con mérito en futuras investigaciones.

Factores que afectan la vitalidad. Mediante un ANAVA se evaluó la etapa de procesamiento (pre y postdescongelación), la osmolaridad de la solución hipoosmótica (100 y 150 mOsmol/L), el toro, la prueba control y la interacción etapa de procesamiento con osmolaridad de la solución sobre el porcentaje de vitalidad. De estos factores, la etapa de procesamiento y el toro explicaron 89,8% de las variaciones en el porcentaje de espermias vivos ($p \leq 0,0001$).

El porcentaje promedio de espermias vivos antes de la congelación fue significativamente superior (81,53%) al porcentaje de espermias vivos después de la congelación (65,53%). ($p \leq 0,05$).

Se ha reportado que el proceso de criopreservación produce una pérdida considerable de la vitalidad espermática causando daños severos o muerte de aproximadamente el 60% de las células (Zeng y Terada, 2001). La reducción de la vitalidad está relacionada con cambios en la presión osmótica durante el proceso de congelación y descongelación, la formación de hielo intracelular (aparentemente el factor responsable del daño celular) y el movimiento de agua a través de la membrana plasmática, lo cual produce daños en ella durante la criopreservación (Zeng y Terada, 2001) y conduce a la pérdida de las barreras de permeabilidad y por consiguiente de los componentes intracelulares vitales para la función espermática (Watson, Kunze, Cramer y Hammerstedt, 1992).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el daño por congelamiento. Según Mazur, Leibo y Chu (1972), cuando la tasa de congelación es más alta que la óptima, no hay tiempo suficiente para que el agua intracelular salga de la célula, lo cual conlleva al congelamiento e incremento de la formación de hielo intracelular que normalmente es letal. Por el contrario, Litvan (1972) propuso que el daño por congelamiento es debido a la ruptura de la membrana y a la formación de hielo intracelular como consecuencia de la pérdida de la integridad de la membrana. Más recientemente Muldrew y McGann (1994) propusieron una hipótesis de ruptura osmótica en la cual el flujo de agua impul-

sada osmóticamente dentro de la célula durante la congelación ejerce una fuerza de fricción sobre la membrana plasmática, suficientemente grande para causar su ruptura permitiendo que el hielo extracelular se propague dentro del citoplasma (Zeng y Terada, 2001).

Al comparar los toros se encontró que el de la raza BON presentó mayor porcentaje de vitalidad espermática (82,78%) que el Holstein (64,28%) ($p \leq 0,05$). Según Correa y Zavos (1994) la vitalidad se ha asumido como una de las características que proveen información sobre la calidad de la espermatogénesis. Este resultado incentiva a la realización de otras investigaciones para estudiar los factores de origen de estas diferencias en vitalidad.

Factores que afectan la morfología espermática. Mediante un ANAVA se evaluó el efecto de la etapa de procesamiento (pre y postdescongelación), el toro, la prueba control y la interacción etapa de procesamiento toro sobre el porcentaje de espermias normales. De estos factores la etapa de procesamiento, el toro y la interacción etapa de procesamiento y toro explicaron el 91,17% de las variaciones en el porcentaje de espermias normales ($p \leq 0,0004$).

El porcentaje promedio de espermias normales antes de la congelación fue significativamente superior (84,44%) al porcentaje de espermias normales después de la congelación (69,27%) ($p \leq 0,05$).

Algunos autores citados por Correa y Zavos (1994) han reportado que la alteración de los espermatozoides durante el proceso de congelación está asociada a daños estruc-

turales que involucran el plasmalema como sitio primario del daño y a las mitocondrias y acrosomas como sitios secundarios.

El toro de la raza BON presentó mayor porcentaje de espermias normales (82,91%) que el de la raza Holstein (71,00%) ($p \leq 0,05$).

Según Barth y Oko (1989) existen muchas causas que originan las anomalías de las células espermáticas; entre ellas se encuentran: causas genéticas y ambientales, diferencias en las espermatogénesis de los individuos y predisposición genética para desarrollar anomalías cuando los individuos son expuestos a ambientes adversos. Algunas anomalías están asociadas con gran cantidad de factores estresantes que incluyen la perturbación de la termoregulación testicular, agentes tóxicos y deficiencias nutricionales.

Antes de la congelación el porcentaje de espermatozoides normales del toro BON fue similar al del toro Holstein (84,40% y 86,40%, respectivamente; $p \geq 0,05$). Sin embargo, después de la congelación se evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre los toros.

En la interacción etapa de procesamiento y toro se encontró que el toro de la raza BON mostró una mejor congelabilidad del semen medida como porcentaje de espermias normales (82,95%) que el toro de la raza Holstein (59,40%). Esta respuesta a la congelabilidad puede ser explicada por diferencias en la composición bioquímica de la membrana plasmática de los espermatozoides del toro BON, haciéndola más fluida y tolerante a los cambios drásticos durante el descenso de la temperatura en el proceso de congelación.

Asociaciones entre las características espermáticas. En la Tabla 2 se registran los resultados de los valores de correlación en-

contrados entre algunas variables espermáticas.

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson entre variables espermáticas.

Característica	Anormalidades				
	Vitalidad	Normales	Cabeza	Pieza intermedia	Cola
Reaccionados	0,80	0,71	-0,65	-0,47	-0,57
Probabilidad	<0,001	0,001	0,005	0,05	0,01
n.	64	17	17	17	17
Vitalidad	-	0,75	-0,67	-0,54	-0,59
Probabilidad		0,001	0,005	0,05	0,012
n.		17	17	17	17
Normales	-	-	-0,87	-0,73	-0,81
Probabilidad			<0,001	0,001	<0,001
n.			17	17	17
Cabeza	-	-	-	-0,47	0,50
Probabilidad				0,05	0,04
n.				17	17
P. intermedia	-	-	-	-	0,53
Probabilidad					0,02
n.					17

Se evidenció una asociación positiva y altamente significativa ($p \leq 0,001$) entre los espermias con integridad funcional de la membrana plasmática (reaccionados al HOST) y el porcentaje de espermias vivos y morfológicamente normales. En concordancia con este hallazgo, se presentaron correlaciones negativas entre el porcentaje de espermias reaccionados y el porcentaje de anomalidades con valores para anomalidades de la cabeza de $-0,65$ ($p \leq 0,005$), de la pieza intermedia $-0,47$ ($p \leq 0,05$) y de la cola $-0,57$ ($p \leq 0,01$). Por esta razón, algunos autores enfatizan en la importancia que tiene analizar la integridad funcional y estructural de la membrana espermática como medida de la vi-

talidad y capacidad fertilizante (Vázquez *et al.*, 1997).

La asociación entre el porcentaje de vitalidad y el porcentaje de espermias normales fue de $0,75$ ($p \leq 0,001$) con la correspondiente asociación negativa entre la vitalidad y las anomalidades espermáticas de cabeza $-0,67$ ($p \leq 0,005$), de pieza intermedia $-0,54$ ($p \leq 0,05$) y de cola $-0,59$ ($p \leq 0,02$) (Tabla 10).

Las anomalidades de la cabeza explicaron en un $44,9\%$ los resultados observados en la vitalidad; no obstante, no se descartan los efectos que tienen los daños en la membrana de la pieza intermedia y de la cola sobre la vitalidad.

Prueba control. En la Tabla 3 se presentan los valores promedios para las características porcentaje de espermatozoides reaccio-

nados al HOST, vitalidad y morfología espermática anormal en la prueba control.

Tabla 3. Porcentaje de espermatozoides reaccionados al HOST, vitalidad y morfología espermática anormal en la prueba de control.

Variable	N	Valor Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Intervalos de confianza	
					Mínimo	Máximo
Espermatozoides Reaccionados	32	7,8	9,8	125,0	0,5	33,0
Vitalidad	32	7,1	10,3	145,0	0,0	33,0
Espermatozoides morfológicamente anormales	16	92,2	19,2	20,8	50,0	90,0

El daño físico de la membrana en la prueba control se evidenció por el bajo porcentaje de espermatozoides reaccionados (7,8%), el bajo porcentaje de vitalidad (7,1%) y el alto porcentaje de espermatozoides con anomalías (92,2%). Se presentaron altos coeficientes de variación debido a que el estrés físico afectó con mayor rigurosidad a los espermatozoides postdescongelación que a los espermatozoides precongelación.

CONCLUSIONES

Los espermatozoides bovinos frescos y descongelados reaccionaron al hinchamiento hipoosmótico y presentaron el máximo nivel de reacción con la solución a 100 mOsmoles/L.

Aunque la integridad funcional y estructural de las membranas espermáticas están estrechamente relacionadas, el porcentaje de espermatozoides que respondieron al HOST con hinchamiento fue 20% menos que el porcentaje de no teñidos (vivos). Esta diferencia puede ser debida a que el

HOST evalúa aspectos de la membrana espermática que el test de tinción supravital no puede evaluar o que las membranas de algunos espermatozoides están inactivas cuando entran en contacto con la solución hipoosmótica.

El porcentaje promedio de espermatozoides reaccionados antes de la congelación fue significativamente superior (62,84%) al porcentaje de espermatozoides reaccionados después de la congelación (44,03%). El proceso de congelación y descongelación daña la membrana espermática produciendo pérdida de la permeabilidad e impidiendo que los espermatozoides puedan sufrir el proceso de hinchamiento característico de las células sometidas al HOST.

El toro de la raza Blanco Orejinegro (BON) presentó un número significativamente mayor de espermatozoides reaccionados que el toro de la raza Holstein y es posible que la resistencia al HOST sea un indicador de fertilidad para esta raza; con mérito en futuras investigaciones.

El HOST es una técnica simple, de bajo costo y de fácil aplicación que puede ser implementada como complemento del análisis estándar del semen.

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, J. and STOREY, B.T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage human sperm. *En: Journal of Androl.* Vol. 14 (1993); p. 199-209.

ARBOLEDA, O. El ganado Blanco Orejinegro. *En: Suplemento Ganadero.* Medellín: Banco Ganadero, Vol. 1 (1980); p. 1-40.

BARTH, A and OKO, R. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University, 1989. 285 p.

BEARER, E and FRIEND, D.S. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation and capacitation. *En: Journal of Electron Microscopy Technique.* Vol. 16 (1990); p. 281-297.

BERGER, T. and PARKER, K. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correction with in vivo fertility. *En: Gamete Research.* Vol. 22 (1989); p. 385-397.

BREDDERMAN, P. and FOOTE, R. Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. *En: Journal of Animal Science.* Vol.28 (1969); p. 496-501.

CAIZA DE LA CUEVA, C. *et al.* Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *En: Animal Reproduction Science.* Vol. 48 (1997); p. 301-315.

CALVETE, J. *et al.* Sperm surface proteins. *En: Reproduction Domestic Animal.* Vol. 31 (1996); p. 101-105.

CORREA, J. and ZAVOS, P. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *En: Theriogenology.* Vol. 42 (1994); p. 361-370.

_____. HEERSCHKE, G. and ZAVOS, P. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *En: Theriogenology.* Vol. 47 (1997); p. 715-721.

DIBAS, A; MIA, A. and YORIO, T. Aquaporins (water channels): Role in vassopressin-activated water transport. *En: Aquaporins and Water Transport.* Society Experimental Biology and Medicine. Vol. 219 (1998); p. 183-199.

DREVIUS, L. Permeability coefficients of bull spermatozoa for water and polyhydric alcohols. *En: Experimental Cell Research.* Vol. 69 (1971); p. 212-216.

_____ and ERIKSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *En: Experimental Cell Research.* Vol. 42 (1966); p. 136-156.

- ESPINAL, S. y MONTENEGRO, E. Formaciones Vegetales de Colombia. Bogotá D.E.: Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1963. 210 p.
- FRIEND, D. Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. *En: Journal of Cell Biology.* Vol. 93 (1982); p. 243-249.
- GARBERS, D and KOPF, G. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *En: Advances in Cyclic Nucleotide Research.* Vol. 13 (1980); p. 251-306.
- GLASS, R and ERICSSON, R. Spontaneous cure of male infertility. *En: Fertilitate Sterilization.* Vol. 31 (1979); p. 305-308.
- HOING, L; DEVROEY, P. and VAN STEIRTGHEM, A. Treatment of infertility because of oligoasthenoteratospermia by transcervical intrauterine insemination of motile spermatozoa. *En: Fertilitate Sterilization.* Vol. 45 (1986); p. 388-391.
- HOLT, W. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *En: International Review of Cytology.* Vol. 87 (1984); p. 159-193.
- ISHIBASHI, K. *et al.* Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *En: Journal of Biological Chemistry.* Vol. 273, No. 33 (1997); p. 20782-20786.
- JEYENDRAN, R. *et al.* Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *En: Journal of Reproduction and Fertilitate.* Vol. 70 (1984); p. 219-225.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypoosmotic test. *En: Theriogenology* Vol. 39 (1993); p. 279-1289.
- LANGLAIS, J and ROBERTS, K. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *En: Gam Research.* Vol. 12 (1985); p. 183-224.
- LITVAN, G. Mechanism of cryoinjury in biological systems. *En: Cryobiology.* Vol. 9 (1972); p. 182-191.
- MARTINEZ, G. El criollo Blanco Orejinegro. *En: Carta Ganadera.* Vol. 20, No.3 (1983); p. 31-34.
- MAZUR, P.; LEIBO, S and CHU, E. A two-factor hypothesis of freezing injury: *En: Experimental Cell Research.* Vol. 71 (1972); p. 345-355.
- MULDREW, K. and MCGANN, L. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *En: Biophysic Journal.* Vol. 66 (1994); p. 532-541.
- NEILD, D. *et al.* Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *En: Theriogenology.* Vol. 51 (1999); p. 721-727.
- PEREZ-LLANO, B. *et al.* Short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *En: Theriogenology.* Vol. 56 (2001); p. 387-398.
- SAS. Institute Inc, SAS User's Guide: Statistics, Cary, NC: Statistical Analysis System Institute Inc. 1985. 28 p.

SCHRADER, S.; *et al.* Sperm viability: A comparison of analytical methods. *En:* Andrologia. Vol. 18 (1986); p. 530-538.

TODA, T. *et al.* Hypoosmotic swelling test/acrosin assay: Identifying subpopulations of idiopathic infertile men. *En:* Mol Andrology. Vol. 4 (1992); p. 147-148.

VAN DER VENN, H. *et al.* Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *En:* Journal of Andrology. Vol. 7 (1986); p. 190-196.

VAZQUEZ, J. *et al.* Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *En:* Theriogenology. Vol. 47 (1997); p. 913-922.

WATSON, P; KUNZE, E; CRAMER, P. and HAMMERSTEDT, R. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. *En:* Journal of Andrology. Vol. 13 (1992); p. 131-138.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3ed. Reino Unido: Cambridge University, 1998.

ZANEVELD, L. *et al.* Hypoosmotic swelling test. *En:* ACOSTA, A.; *et al.*, ed. Human spermatozoa in assisted reproduction. Baltimore: Williams and Wilkins, 1990. p. 223-227.

ZAVOS, P. Hypoosmotic swelling test (HOS)/functional integrity of sperm membrane. *En:* Journal of Ass Reproduction Technology Andrology. Vol. 2 (1990); p. 215-216.

and CENTOLA, G. Qualitative and quantitative improvements in human spermatozoa recovered via the swim-up and a new semen filtration column method. *En:* Infertility. Vol. 13 (1990); p. 25-34.

ZENG, W. and TERADA, T. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *En:* Theriogenology. Vol. 55 (2001); p. 615-627.

; CLARK, E. and FLORMAN, H. Sperm membrane potential: Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal reaction. *En:* Development Biology. Vol. 171 (1995); p. 554-563.