

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES – CUAUTITLÁN

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA OSMÓTICA PARA EVALUAR
LA RESISTENCIA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS
ESPERMATOZOIDES OVINOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

TATIANA PÉREZ CASTILLO PÉREZ

ASESOR: DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, MÉXICO. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Le doy de manera especial las gracias a mi asesor el Dr. José Alfredo Medrano Hernández, que estuvo en todo momento apoyándome para la realización de mi Tesis, el cual dedico su tiempo para ayudarme.

Gracias a todas esas personas que dentro de la institución, me impulsaron a terminar mi meta.

Doy las gracias al Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA. FES-Cuautitlán) especialmente al Módulo de Ovinos.

Doy las gracias a la Cátedra de Investigación: Comportamiento Reproductivo de los Animales Domésticos (IN2-07 FES-Cuautitlán).

Agradezco las facilidades prestadas en el presente trabajo, a todo el personal que labora en el Laboratorio de Reproducción Animal, FES-Cuautitlan.

DEDICATORIA

Doy gracias a mi esposo Filiberto, el cual esta siempre conmigo en los momentos buenos y malos de mi vida, especialmente hoy que logro una meta la cual nos propusimos desde el día que decidimos estar juntos.

Agradezco a mis hijos, que son la parte esencial de mi vida, por los cuales deseo realizar muchas cosas más.

Le doy gracias a mi familia Padres y Hermanos, ya que a pesar de los duros comentarios de mi vida personal, de los cuales tome muchas enseñanzas buenas, siempre estuvieron al pendiente de mí.

Me siento muy agradecida con mis Suegros quienes me apoyaron en todo momento durante y después de terminada mi carrera, de los cuales aprendí que la vida es dura pero que si uno se propone metas es posible alcanzarlas con esfuerzo y empeño.

A mis cuñados y concuñas que dentro de este circulo familiar tienen un gran papel dentro de mi vida.

A toda mi familia agradezco su apoyo, tías, tíos, sobrinos, primos, abuelos, que cada uno me impulso en este logro.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. HIPÓTESIS	10
IV. OBJETIVOS	11
V. MATERIAL Y MÉTODOS	12
VI. RESULTADOS	17
VII. DISCUSIÓN	21
VIII. CONCLUSIONES	23
IX. RECOMENDACIONES	24
X. BIBLIOGRAFÍA	25

I. RESUMEN

Con la finalidad de determinar la supervivencia de los espermatozoides cuando se les somete a estrés osmótico, similar al que ocurre durante el proceso de crioconservación, se colectó y procesó el semen de 4 machos ovinos de la raza Columbia, de 4 años de edad (entre 4 y 5 eyaculados por macho) por el método de la vagina artificial. El presente trabajo se realizó en el Módulo de Ovinos y Caprinos de la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán. Los eyaculados se trabajaron por separado, uno por día de trabajo, la evaluación inicial consistió en las siguientes pruebas: 1) macroscópicas, el volumen, color y consistencia, y 2) microscópicas, la motilidad masal, motilidad progresiva, la concentración, el porcentaje de vivos y muertos (tinción eosina-nigrosina) y la integridad del acrosoma (microscopia de contraste de fases). La concentración se ajustó a 200×10^6 células por ml, utilizando un diluyente especial para la congelación de semen. Enseguida, se procedió a la disminución lenta de la temperatura hasta 5°C en un periodo de 3 horas aproximadamente. Después, se expuso el semen diluido (alícuotas) a cuatro soluciones con diferente valor de osmolaridad: 300 (testigo), 900, 1500 y 2100 mOsm/Kg por 15 minutos, en este momento se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y la integridad del acrosoma. Inmediatamente después, se regresó a la temperatura inicial (37°C) y se restableció la isosmolaridad con la correspondiente solución hiposmolar (300, 200, 160, 90 mOsm/kg), en este momento también se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y la integridad del acrosoma. El análisis estadístico se realizó utilizando un análisis de medidas repetidas y la prueba de pares de Wilcoxon.

Los resultados nos muestran que a medida que aumenta el valor de osmolaridad disminuye el porcentaje de células con membrana intacta y de células con acrosoma intacto; esta misma tendencia ocurrió al restablecer la isosmolaridad, pero en mayor grado que durante la exposición a soluciones hiperosmóticas. Estas observaciones son similares a los fenómenos que ocurren durante el proceso de congelación – descongelación.

La utilidad de este tipo de pruebas, que asemejan la congelación del semen, radica en que potencialmente podrían predecir la criosupervivencia de los espermatozoides sin necesidad de hacer todo el proceso de crioconservación. Sin embargo, aún hace falta realizar la siguiente etapa de esta línea de investigación para alcanzar ese objetivo.

II. INTRODUCCION

En la antigüedad, la cría ovina se desarrolló pobremente a causa de la ignorancia que se tenía sobre esta especie animal. La ganadería se basaba en su mayor parte, en los bovinos, los ovinos se utilizaban como animales de desecho en los ranchos ganaderos y como animales de traspatio (Speedy, 1987).

Al pasar del tiempo, se fue explotando a los borregos al conocer que eran de más fácil manejo, mejor adaptabilidad a los medios productivos así como la facilidad con la que se reproducían en medios adversos (Ensminger, 1976).

La explotación de los ovinos en México, aumenta cada año por la utilidad del borrego en el comercio, es decir, que de esta especie animal en particular, se puede aprovechar tanto la carne como la lana, así como los productos derivados de éstos y básicamente se aprovecha toda la pieza para la obtención de ganancias al productor (De Lucas y Arbiza, 2000).

Al hablar de esto, se debe considerar como un objetivo primordial aumentar la producción por medio de diferentes métodos, entre ellos los reproductivos. Es decir, obtener la mayor cantidad de ganado con los recursos que cuenta el productor, esto nos lleva a pensar en la inseminación artificial (Derivaux, 1982).

La inseminación artificial (IA), es una de las técnicas más importantes creadas para el mejoramiento genético de animales; consiste en la obtención del semen del macho y su aplicación a la hembra por medio de instrumentos. Esta técnica tiene múltiples ventajas (Ax *et al.*, 2000):

- El mejoramiento genético
- El control de enfermedades de transmisión sexual
- La disponibilidad de registros de apareamientos adecuados
- Seguridad a través de la eliminación de machos no deseados

- Mejora del potencial y el rendimiento del hato nacional
- Hace posible el uso de semen congelado aún después de que ha muerto el donador, contribuyendo a la preservación de líneas seleccionadas
- Permite el uso de machos como marcadores genéticos deseables en apareamientos genéticos específicos
- Constituye una herramienta de investigación útil para evaluar machos en relación a aspectos de la fisiología reproductiva en el macho y la hembra.

Cuando la inseminación artificial se realiza de manera apropiada, sus desventajas son pocas, sin embargo es necesario contar con el personal adiestrado para proporcionar una técnica adecuada, e instalaciones idóneas para manejar a las hembras y machos en instalaciones extensivas (Ax *et al.*, 2000).

En la especie ovina, se puede obtener eyaculados muchas veces al día durante varias semanas antes de que se agoten sus reservas de espermatozoides en el epidídimo. La técnica de la vagina artificial para la recolección del semen es muy similar a la que se emplea en el toro (Sorensen, 1982). La electroeyaculación, es otro método para la obtención del semen; esta técnica consiste en la introducción de un electrodo eléctrico bipolar en el recto del animal administrando una estimulación eléctrica de alto voltaje durante 2 a 4 segundos (Berg y Bonadonna, 1980). La diferencia básica entre los eyaculados obtenidos por los dos métodos es el volumen, mayor en el semen obtenido por electroeyaculación (Evans y Maxwell, 1987). Estos autores agregan, que para los trabajos de congelación de semen se deben utilizar eyaculados obtenidos mediante vagina artificial.

La congelación del semen ha marcado un progreso considerable debido a sus numerosas ventajas (Fayez y Marai, 1994), como por ejemplo:

- Elección más fácil del semen que hay que emplear para las diferentes hembras
- Facilidad en el intercambio de esperma entre centros
- Constitución de bancos de semen.

La fertilidad del semen congelado de carnero se ha estudiado, por un gran número de investigadores, y en la mayoría de los casos se han obtenido índices de parición del 25 al 45%. Los mejores índices en condiciones experimentales, fueron del 50-55%, índice lejano al que se obtiene con semen fresco diluido y sin diluir (Evans y Maxwell, 1987; Salamon y Maxwell, 2000).

Esta baja fertilidad es el resultado de una serie de factores entre los que se cuenta la variación entre machos donadores respecto a la susceptibilidad de su semen al congelado (Holt, 2000). Por esta razón, es necesario tratar de predecir la capacidad del semen de cada macho al proceso de congelación y descongelación para que los eyaculados conserven su capacidad de fertilización cuando se les emplea en programas de inseminación artificial.

En la especie ovina, la baja fertilidad del semen crioconservado se atribuye a cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales que sufre una proporción significativa de las células espermáticas y que conducen a un transporte ineficiente y pérdida de viabilidad de los espermatozoides en el tracto genital femenino (Salamon y Maxwell, 1995). Los cambios ultraestructurales afectan principalmente las membranas, debido a la reordenación de los lípidos de la membrana durante la congelación-descongelación, alterando las asociaciones lípido-lípido y lípido-proteínas, necesarias para una función normal de las membranas (Parks y Graham, 1992). Se ha constatado que el daño por la congelación es más severo en espermatozoides ovinos que en espermatozoides bovinos, particularmente sobre la integridad de su borde apical, área que es más sensible que el segmento postacrosomal y la pieza intermedia. Por ello, la motilidad espermática de los espermatozoides ovinos crioconservados es habitualmente mayor que la integridad morfológica de sus acrosomas (Salamon y Maxwell, 1995).

Cuando se somete el semen al proceso de congelación, los espermatozoides se enfrentan al estrés osmótico (hiperosmolaridad) causado por la formación de hielo, al descongelado se recupera la osmolaridad original del medio pero el espermatozoide sufre otro cambio de volumen (Watson, 1995). Algunas pruebas de resistencia osmótica, se basan en este

fenómeno y se han propuesto como un método para predecir la supervivencia de los espermatozoides a la conservación por frío (Medrano, 1998).

La optimización empírica durante años de los protocolos de congelamiento, mientras se mejoraban las tasas de parición con algunos diluyentes, han hecho poco para explicar las causas actuales del daño durante el ciclo de congelación y descongelación. Uno de los factores más importantes durante la crioconservación es el estrés osmótico de las células. Durante la congelación, las células están expuestas al incremento de las condiciones hiperosmóticas por el congelamiento del agua fuera de la solución y por el contrario, durante la descongelación disminuyen las condiciones hiperosmóticas con el derretimiento del hielo. Además, el estrés osmótico está asociado con la adición y remoción de crioprotectores como el glicerol (Hammerstedt *et al.*, 1990). Estos cambios osmóticos pueden ocurrir gradual o rápidamente, dependiendo de la tasa de enfriamiento, si es o no inducida la nucleación de hielo y del método de adición de crioprotectores, e involucra dos factores de estrés confundidos (i) la osmolaridad final alcanzada por las células y (ii) la diferencia osmótica entre osmolaridades intra y extracelular, las cuales, junto con la conductibilidad hidráulica, gobiernan la tasa a la cual el agua se mueve dentro o fuera de la célula. Es posible separar los efectos de estos dos factores mediante la exposición de las células a diferentes osmolaridades en un simple paso o una serie de pasos tal que diferentes osmolaridades finales puedan ser alcanzadas mientras las células sólo experimentan una pequeña y controlada diferencia osmótica a través de sus membranas (Curry y Watson, 1994).

El estrés osmótico es un mecanismo importante involucrado en la resistencia espermática a la congelación y descongelación. El criodaño celular está a menudo relacionado con los cambios mayores de la presión osmótica (π) producida durante el proceso de congelación y descongelación. Estos cambios inducirán alteraciones en el volumen de agua intracelular y en el estado físico de esta agua (Mazur, 1984; Caiza de la Cueva *et al.*, 1997).

Cuando una suspensión celular es enfriada, los solutos extracelulares: solutos iónicos, no

iónicos y los agentes crioprotectores (CPA's) se concentran progresivamente conforme avanza el enfriamiento y el agua se precipita como hielo. Esto crea un ambiente hiperosmótico para las células, el cual puede causar: 1) cambios en el pH conforme las sales alcanzan sus solubilidades (Fishbein y Winkert, 1978), 2) aumentando la deshidratación celular provocando una interposición de estructuras intracelulares (Levitt, 1962), y 3) debilitando los complejos proteína-lípidos en la membrana celular incrementando la pérdida de fosfolípidos.

Todos estos son mecanismos potenciales que pueden afectar la viabilidad celular. Estos posibles efectos resultado de la concentración de los solutos se han caracterizado colectivamente como "efectos de solución" (Watson, 1995) quien sugiere que los efectos de solución en las células son en gran medida intensificados por un proceso de enfriamiento lento, durante el cual el tiempo de exposición de las células a una solución concentrada es prolongado. En adición a los efectos de solución en las células durante el enfriado y descongelado, se ha notado que el cambio en el ambiente osmótico de las células que puede causar daño es inducido por adición de CPA's a las células antes del enfriamiento y la subsiguiente remoción de CPA's de las células después de la descongelación (Critser *et al.*, 1988).

Para prevenir el daño osmótico a las células durante la crioconservación, se necesita conocer la tolerancia osmótica de las células en una función de los siguientes factores: 1) tiempo, 2) temperatura, 3) tipo de solutos y 4) concentración de solutos. La tolerancia osmótica varía entre tipos celulares y entre el tipo celular entre especies (Gao *et al.*, 1995).

Un prerrequisito esencial en el diseño de protocolos de crioconservación exitosos, son los conocimientos fundamentales de los procesos biofísicos y bioquímicos que acompañan a la congelación y a la descongelación espermática. Se han propuesto hipótesis para explicar el criodaño celular y la actividad de los crioprotectores, mismas que pueden ser resumidas como sigue: cuando las células son congeladas, la cristalización del agua induce la generación de zonas hiperosmóticas no congeladas, de alta concentración de solutos. A

tasas de congelación moderadas, se forman regiones hiperosmóticas en el ambiente extracelular; esto induce la remoción de agua intracelular con la consecuentemente crenación celular y exposición de la superficie celular a condiciones anisomóticas. Un congelamiento rápido puede causar nucleación letal de hielo intracelular si la suficiente agua congelable permanece en el citoplasma cuando la temperatura de nucleación se alcanza. La descongelación involucra la reversión de estos efectos, con una disminución en la concentración de solutos del medio externo y la restauración del contenido de agua intracelular y volumen celular (Holt y North, 1994).

El choque frío puede estar relacionado a la composición de la membrana, afectando su fluidez. Conforme la temperatura descende, el movimiento lateral de fosfolípidos es restringido, lo que provocaría una transición de fase líquida-cristalina a fase de gel. Debido a las diferentes temperaturas de transición para los diferentes lípidos de membrana, la separación de fase puede presentarse, por lo que las proteínas se agruparían irreversiblemente (De Leeuw *et al.*, 1990).

Debido a que la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos determina el comportamiento de fase, las diferencias más notables en fosfolípidos entre el espermatozoide de verraco y el de toro, son el porcentaje más bajo de fosfatidilcolina y más alto de fosfatidiletanolamina y esfingomiélin en el espermatozoide porcino, dificultando la medición de la estabilidad de las membranas espermáticas porcinas en la base de diferencias en la composición fosfolipídica (Johnson *et al.*, 2000).

Otro factor que tiene influencia sobre el comportamiento térmico de las membranas, es el porcentaje de colesterol. La proporción de colesterol/fosfolípidos en el espermatozoide porcino es muy bajo y como se encuentra distribuido asimétricamente, se encuentra en mayores cantidades en la monocapa externa de la membrana. Esta combinación podría hacer a la monocapa interna especialmente vulnerable al choque frío. La reorganización de las partículas de la membrana inducida por el frío, aunque parcialmente reversible, podría influenciar la función de la membrana en varias formas, incluyendo un incremento de la

permeabilidad (pérdida de cationes y enzimas), la reducción en la actividad enzimática, la difusión controlada de membrana y cambios en el movimiento lateral de canales (De Leeuw *et al.*, 1990).

En todos los tipos celulares de mamíferos estudiados, incluyendo al espermatozoide, las dos monocapas de la membrana plasmática difieren en la composición fosfolípídica. La fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina están concentradas en la monocapa interna; mientras que, la esfingomielinina y fosfatidilcolina están concentradas en la monocapa externa (Gadella *et al.*, 2000).

Cuando la membrana celular se daña, el fosfolípido fosfatidilserina (PS) se transloca de la monocapa interna a la monocapa externa de la membrana plasmática; este fenómeno se considera un indicio temprano de muerte celular (Desagher y Martinou, 2000).

Recientemente, se ha demostrado que los procesos de congelación y descongelación de espermatozoides humanos (Kemal Duru *et al.*, 2001) y de toro (Anzor *et al.*, 2002), inducen translocación membranar de fosfatidilserina.

Se ha demostrado que en fases tempranas de capacitación hay una translocación de fosfatidilserina de la monocapa interna a la monocapa externa de la membrana plasmática (Gadella y Harrison, 2002).

El porcentaje de agua inactiva osmóticamente en el esperma porcino es aproximadamente el doble de la encontrada en las células humanas, de toro o de ratón (Du *et al.*, 1994). Esto implica que el proceso de deshidratación del espermatozoide a niveles no letales durante el proceso de congelación es más difícil que en las células humanas. Ambos factores pueden ser incluidos entre las posibles explicaciones de una tasa baja de criosupervivencia del espermatozoide porcino (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997).

El espermatozoide humano mostró tolerancias de aumento de volumen celular 1.1 veces su

volumen isosmótico y de crenación 0.75 veces su volumen isosmótico, manteniendo el 90% de motilidad (Gao *et al.*, 1995). Estudios del espermatozoide de ratón, indicaron que son similares al espermatozoide humano en cuanto a sensibilidad, pero más tolerantes que el espermatozoide de verraco a los cambios osmóticos, pueden crenar y aumentar su volumen celular 0.76 y 1.24 veces su volumen celular isosmótico respectivamente, manteniendo un 80% de motilidad (Willoughby *et al.*, 1996).

La relevancia de la hipótesis de la interacción osmótica ha sido apoyada por trabajos en los cuales los espermatozoides fueron expuestos a soluciones de cloruro de sodio hipertónicas. La extensión del daño al espermatozoide inducido por soluciones hipertónicas no congeladas se correlacionó con los efectos de daño observados a temperaturas por debajo de 0° C (Watson y Duncan, 1988). En otro trabajo similar, se observó que la exposición de semen de cerdo a condiciones hiperosmóticas a 5°C y el restablecimiento de la isosmolaridad a 37°C produjo una disminución de la integridad de la membrana a medida que se incrementó el valor de osmolaridad en ambas condiciones, pero el efecto más drástico se observó al restablecer la osmolaridad (Medrano, 1998). El objetivo de este tipo de trabajos, además de explicar el daño producido por el estrés osmótico, es diseñar pruebas precongelación para intentar predecir la criosupervivencia de los espermatozoides sometidos a los protocolos convencionales de congelación y descongelación. El primer paso de esta aproximación experimental es identificar un valor de osmolaridad crítico que produzca un daño medible en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal; así, el presente trabajo está enfocado a este propósito.

III. HIPÓTESIS

La exposición de espermatozoides de ovino a soluciones hipertónicas y el posterior restablecimiento de la isosmolaridad, aunado a cambios de temperatura, puede simular el estrés osmótico que enfrentan las células durante el proceso de crioconservación: condiciones hiperosmóticas cuando se forma y consolida el hielo, y restablecimiento de la isosmolaridad al descongelado.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Disponer de una prueba de laboratorio sencilla y rápida que permita evaluar la resistencia de las membranas espermáticas al estrés osmótico.

Dicha prueba se utilizará en trabajos posteriores de crioconservación de semen con la finalidad de predecir la supervivencia de los espermatozoides de ovino.

Objetivos específicos

Determinar la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides de borrego, sometidos a distintas soluciones hiperosmóticas a 5°C.

Determinar la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides de borrego, sometidos a distintas soluciones hiposmóticas (para restablecer la isosmolaridad) a 37°C.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

- Animales

Se utilizaron 4 machos ovinos de la raza Columbia de fertilidad probada, alojados en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlan, con una alimentación a base de ensilado de maíz, paja de avena, forraje verde y bebederos con agua libre acceso, el peso aproximado de estos machos es de 120 Kg. y su edad promedio es de 4 años.

- Periodo de Estudio

Los eyaculados se obtuvieron y procesaron entre los meses de diciembre del 2005 y junio del 2006.

- Obtención y procesamiento del semen

Se obtuvo el semen de los 4 machos ovinos por el método de la vagina artificial, cada eyaculado se manejó por separado. Inmediatamente después, el semen se transportó al laboratorio para su evaluación y procesamiento. En el laboratorio, se colocó la muestra en baño maría a 37°C y se procedió a su evaluación macroscópica:

- 1) volumen,
- 2) color,
- 3) consistencia.

Enseguida, se realizó la evaluación microscópica:

- 1) motilidad masal (semen sin diluir),
- 2) motilidad progresiva (semen diluido 1:100 (v/v) en solución salina 0.9%),
- 3) integridad de la membrana plasmática (tinción de eosina-nigrosina),
- 4) integridad de la membrana acrosomal (microscopia de contraste de fases),
- 5) concentración (hemocitómetro).

Posteriormente, se realizó la dilución del semen con una solución isosmótica de 300mOsm/kg (solución testigo); la concentración de espermatozoides se ajustó a 200×10^6 /ml. Después, se prosiguió a enfriar la dilución resultante hasta llegar a 5°C, el

enfriado se llevó a cabo en aproximadamente 2 a 3 horas, en un refrigerador adaptado para estos experimentos; los tubos con la dilución testigo y la dilución con el semen fueron puestos en un recipiente con agua (1 L), al tubo testigo se le colocó un termómetro para ir registrando las temperaturas que oscilaron de un promedio de 21 grados (temperatura de cuarto) hasta llegar a los 5°C.

Las soluciones hiperosmóticas (Cuadro 1) se prepararon tomando como base el medio de congelación para semen de ovino de Evans y Maxwell (1987), adicionándole la cantidad de glucosa necesaria para obtener cada uno de los valores deseados (Cuadro 2), según las fórmulas reportadas por Medrano (1998). Las soluciones hiposmóticas (Cuadro 3) se prepararon tomando como base el medio de congelación ya mencionado sin yema de huevo, de acuerdo a la metodología de Medrano (1998).

Cuadro 1. Diluyente para congelación

Componente	cantidad
Tris (Hidroximetil aminometano) g	5.814
Glucosa (g)	0.800
Ácido cítrico (g)	3.184
Yema de huevo (ml)	24
Glicerol (ml)	8
Penicilina (UI)	100,000
Estreptomicina (mg)	100
Agua destilada (ml)	100

Tomado de: Evans y Maxwell, 1987

Cuadro 2. Preparación de las soluciones hiperosmóticas

Solución	Diluyente base (ml)	Glucosa (g)
300 mOsm/kg (Testigo)	10	---
900 mOsm/kg	10	1.814
1500 mOsm/kg	10	3.501
2100 mOsm/kg	10	5.579

Cuadro 3. Preparación de las soluciones hiposmóticas

Solución a preparar	Agua destilada estéril (ml)	Tris (g)	Glucosa (g)
300 mOsm/kg (Testigo)	10	0.44	0.38

200 mOsm/kg	10	0.44	0.253
160 mOsm/kg	10	0.44	0.17
90 mOsm/kg	10	0.44	0.051

La motilidad masal se evaluó tomando una gota del semen fresco sin diluir, se colocó sobre un portaobjetos y se observó al microscopio con el objetivo 10x prestando atención al contorno de la gota, donde se observa el movimiento de oleaje del semen. La evaluación se hizo con una escala de 0-3, en donde el valor de 3 es de una motilidad de oleaje excelente (rápido y denso), 2 buena (rápido pero no muy denso), 1 mala (densidad variable, lento) y 0 nula.

La motilidad progresiva se evaluó en una muestra de semen diluido (1:100 v/v, en solución salina fisiológica 0.9%); se tomó una gota de esta dilución y se colocó sobre un portaobjetos con su respectivo cubreobjetos y se observó al microscopio el movimiento de los espermatozoides en el campo con el objetivo 10x. El valor de motilidad se expresó como el porcentaje de células con motilidad progresiva; solamente se utilizaron eyaculados con un valor mínimo de 60% de motilidad.

Los frotis para conocer el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se hicieron con la tinción eosina-nigrosina. Se colocó en un portaobjetos una gota del semen con las diluciones respectivas y una gota de la tinción, se mezcló con la punta de otro portaobjetos y se procedió a realizar el frotis, se secaron inmediatamente con aire en aproximadamente 15 segundos para su posterior observación. Los espermatozoides vivos son aquellos que no permitieron el paso del colorante a través de su membrana plasmática y se ven traslucidos, los muertos se notan con un color rosado. Se contaron 100 espermatozoides para estimar las proporciones de cada categoría, se utilizó el objetivo de 100x.

Para conocer el estado del acrosoma, se hicieron frotis húmedos colocando dos partes de glutaraldehído por una parte de la dilución correspondiente (es decir 200 μ L de glutaraldehído por 100 μ L de la dilución), esto se fue colocando en tubos de ensayo con

tapa para evitar contaminaciones o cambios no deseados. Posteriormente, se colocó una gota de este preparado en un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos sobre la gota, se colocó en el microscopio de contraste de fases aplicando una gota de aceite de inmersión para observar el contorno de los acrosomas y revisar si se encontraba intacto o dañado; se revisaron 100 espermatozoides para sacar el porcentaje de cada categoría, se utilizó el objetivo de 100x.

La concentración se estimó de una dilución de semen 1:200 (v/v, en solución de Hancock), se tomó una gota de esa dilución y se llenó con ella las cámaras del hemocitómetro (Cámara de Neubauer) por capilaridad. Se colocó la cámara al microscopio con el objetivo de 40x y se contó los espermatozoides contenidos en cinco cuadros de la cuadrícula central de 25, el valor obtenido se multiplicó por 10^7 y así se obtuvo la concentración por mililitro de semen.

- Tratamientos

Una vez que el semen se enfrió a 5°C, se tomaron 4 alícuotas (0.2 ml cada una) que se sometieron a los siguientes tratamientos (1:1 v/v) durante 15 minutos a una temperatura de 5 grados centígrados:

- 1) Solución isotónica 300 mOsm/Kg (grupo testigo)
- 2) Solución hipertónica 1500 mOsm/ kg para alcanzar 900 mOsm/Kg
- 3) Solución hipertónica 2700 mOsm/ kg para alcanzar 1500 mOsm/Kg
- 4) Solución hipertónica 3900 mOsm/ kg para alcanzar 2100 mOsm/Kg

Al finalizar el periodo de exposición a las soluciones hiperosmóticas y testigo, se sometió cada tratamiento a su correspondiente solución hiposmótica a 37°C en baño maría, durante 15 minutos, con la finalidad de restablecer la isosmolaridad:

- 1) Solución isotónica 300 mOsm/Kg (grupo testigo),

2) Solución hiposmótica, aproximadamente 200 mOsm/Kg

3) Solución hiposmótica, aproximadamente 160 mOsm/Kg

4) Solución hiposmótica, aproximadamente 90 mOsm/Kg

Después de los 15 minutos de exposición a las soluciones hiposmóticas, se evaluó la integridad de las membranas plasmática y acrosomal mediante las técnicas ya mencionadas.

-

Análisis estadístico

La información obtenida se analizó para detectar posibles diferencias entre tratamientos mediante la prueba llamada Wilcoxon Matched Pairs Test, y dentro de tratamientos mediante un análisis de medidas repetidas - Friedman ANOVA (Siegel, 1990), y las posibles diferencias entre machos, utilizando el paquete estadístico Stats Soft 2000 (Reino Unido).

VI. RESULTADOS

A continuación se expresan los resultados de la exposición del semen a las soluciones hiper e hipo-osmóticas. En el Cuadro 4, se muestran las características iniciales de los eyaculados que se tomaron de cada macho; el volumen promedio del eyaculado así como los rangos de motilidad progresiva y masal se encuentran dentro de los parámetros normales; asimismo, la concentración, espermatozoides vivos y acrosoma intacto se consideran dentro de las características de un buen eyaculado. Es decir que los cuatro machos en estudio presentaban poca variabilidad en estos parámetros seminales.

Cuadro 4. Características generales de los eyaculados de cada macho
(Los valores son Medias \pm DE)

Macho	Número de eyaculados	Volumen (ml)	Motilidad Progresiva (%)	Motilidad Masal	Concentración (millones/ml)	Espermatozoides Vivos (%)	Espermatozoides con acrosoma intacto (%)
1	4	1.6 \pm 0.33	68.8 \pm 6.29	2.4 \pm 0.25	3210 \pm 103.92	78.8 \pm 6.45	77.5 \pm 4.80
2	5	1.4 \pm 0.33	72.0 \pm 2.74	2.5 \pm 0.0	3100 \pm 573.37	81.2 \pm 7.26	81.6 \pm 7.57
3	5	1.3 \pm 0.31	69.0 \pm 2.23	2.4 \pm 0.22	3160 \pm 481.51	76.8 \pm 10.28	75.4 \pm 8.91
4	4	1.6 \pm 0.35	70.0 \pm 0.0	2.4 \pm 0.25	3440 \pm 1007.2	76.8 \pm 6.80	76.8 \pm 5.90

En las siguientes figuras (Figura 1 y 2) se muestra el comportamiento de los espermatozoides durante la prueba de hiper- e iso-osmolaridad; se observó un descenso en el porcentaje de membranas y acrosomas intactos que se ve afectado en mayor grado por las soluciones de 1500 mOsm y 2100 mOsm.

Figura 1. Porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta (vivos) durante condiciones hiperosmóticas y al restablecer la isosmolaridad. Las barras en cada punto indican la desviación estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre pares de puntos.

Figura 2. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto durante condiciones hiperosmóticas y al restablecer la isosmolaridad. Las barras en cada punto indican la desviación estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre pares de puntos.

Las pruebas realizadas con las soluciones hiper- e iso-osmolares nos indican que los daños sufridos durante el proceso del semen, son similares al daño que puede sufrir el semen durante un proceso de congelación normal; es decir, que si sometiéramos el semen de un macho que deseamos para congelar su esperma, a estas pruebas podríamos ver como se comporta este semen en una congelación y si nos es útil para el fin que requerimos.

En el Cuadro 5, se presentan los valores de espermatozoides vivos y de acrosomas intactos de cada macho durante el momento de hiperosmolaridad; se puede observar que hay diferencias entre machos en ambas variables evaluadas.

Cuadro 5. Valores de espermatozoides vivos y de acrosomas intactos de cada macho. durante el momento de hiperosmolaridad

Macho	Espermatozoides vivos (%)	Espermatozoides con acrosoma intacto (%)
1	70.9ab	75.1a
2	75.4a	74.0ac
3	65.7b	64.0b
4	68.3b	66.6cb
	(p<0.01)	(p<0.03)

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas.

En el Cuadro 6, se presentan los valores de espermatozoides vivos y de acrosomas intactos de cada macho durante el momento de retorno a la isosmolaridad; como en caso anterior, hay diferencias entre machos en ambas variables evaluadas.

Cuadro 6. Valores de espermatozoides vivos y de acrosomas intactos de cada macho durante el momento de retorno a la isosmolaridad

Macho	Espermatozoides vivos (%)	Espermatozoides con acrosoma intacto (%)
1	64.9ab	69.6a
2	70.8a	68.2ac
3	58.4b	58.1b
4	60.5b	60.6cb
	(p<0.003)	(p<0.02)

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas

VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar una prueba de laboratorio sencilla y rápida para la evaluación de la resistencia de las membranas plasmática y acrosomal, al estrés osmótico, para utilizarla en trabajos posteriores de crioconservación de semen con la finalidad de predecir la supervivencia de los espermatozoides de ovino.

Los cambios sufridos por los espermatozoides durante las diferentes pruebas a las que fueron sometidos, se encuentran dentro de los parámetros que se consideran normales cuando se congela el semen. Es decir, que se podría considerar una prueba para saber, previo a la congelación, si los machos de los cuales se desea congelar el esperma se pueden utilizar o no.

En trabajos similares al presente, realizados con otras especies, se ha observado que las pruebas rápidas son de gran utilidad para determinar la calidad de los espermatozoides así como para saber si los machos se pueden considerar para congelar su esperma; por ejemplo, la prueba de la resistencia osmótica tradicional (ORT) en cerdos, descrita por Schilling y Vengust (1984), propone la incubación de muestras de semen en una solución de 150mOsm por dos horas, que es un periodo de tiempo considerable. Pérez Llano *et al.* (1998) realizaron un estudio con el fin de reducir este periodo de incubación a tan solo 5 minutos usando soluciones hipo e isosmóticas (75mOsm y 300mOsm) incubadas a 37°C. A esta técnica, se le conoce como prueba osmótica breve de resistencia. Esta prueba no representa dificultad en la cuenta de las células en la dilución deseada del semen fresco, sin embargo, la cuenta de las células es difícil en el semen diluido y refrigerado.

Otros trabajos (Caiza De La Cueva *et al.* 1997), nos hablan de los cambios que sufren los espermatozoides de verraco en soluciones con diferente osmolaridad (600 a 4000 mOsm/Kg) a diferentes temperaturas (4, 16 y 37°C) y empleando un medio base isotónico al que se agregó glicerol, NaCl o glucosa para modificar la osmolaridad. El porcentaje de células viables así como el porcentaje de acrosomas intactos disminuyó a medida que la

osmolaridad del medio se incrementó, independientemente de la temperatura; estos resultados coinciden con nuestro trabajo.

En un estudio con bovinos, Liu y Foote (1998) utilizaron el medio denominado Tyrode que variaba en la osmolaridad de 100 a 1537 mOsm/Kg; no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de la integridad de la membrana espermática, sin embargo, se vio un porcentaje más bajo en las soluciones de entre 100 y 150 mOsm/Kg. En contraste, hubo diferencias en los porcentajes de motilidad en las soluciones hiperosmóticas, por arriba de 1000 a 1600 mOsm/Kg.

Otras pruebas, indican que la motilidad de los espermatozoides de Koala expuestos a diluyentes con distinta osmolaridad en el rango de 95 a 884 mOsm/Kg, disminuyó de manera lineal a medida que aumentó el valor de hiperosmolaridad (Johnston *et al.*, 2000). Asimismo, espermatozoides de rata expuestos a soluciones anisomóticas en un rango de 75 a 1200 mOsm/Kg y retornados a la isosmolaridad, mostraron una reducción significativa en el porcentaje de membranas plasmática y acrosomal intactas a medida que el valor de osmolaridad se aparta del valor isosmótico (Si *et al.*, 2006).

Agca *et al.* (2005) expusieron espermatozoides de chimpancé a diferentes soluciones anisomóticas en el rango de 80 a 880 mOsm/Kg a 37°C y posteriormente las retornaron a la isosmolaridad. La motilidad disminuyó de manera significativa con los valores de hiperosmolaridad de 600 y 880 mOsm/Kg y se recuperó ligeramente al regresar a la isosmolaridad. Por otro lado, se sometió espermatozoides de humano a estrés osmótico en un rango relativamente pequeño (276 a 450mOsm) y se observó que la motilidad e integridad de la membrana plasmática presentaron poco cambio al restablecerse la isosmolaridad (Chantler y Abraham-Peskir, 2004). Estos autores, explican que la presencia de la vesícula en la pieza media, que en esos casos es la responsable de sufrir los cambios de volumen, está relacionada a problemas de infertilidad inespecífica en humanos.

Los trabajos mencionados anteriormente, apoyan el enfoque empleado en el presente trabajo, nos permiten medir la resistencia de la membrana espermática dado el estrés

osmótico, sin involucrar los cambios de temperatura drásticos asociados al proceso de crioconservación.

VIII. CONCLUSIONES

El presente trabajo ha mostrado que es posible realizar pruebas relativamente rápidas y sencillas de laboratorio para determinar si el semen de los machos ovinos es útil para la congelación. Este trabajo, representa la primera etapa de este proceso; es decir, la prueba precongelación ya está desarrollada. Enseguida, la segunda etapa será la congelación del semen y la realización de la prueba de manera simultánea para ver si dicha prueba nos permite predecir la “congelabilidad” del semen. El valor hiperosmótico que se recomienda utilizar para la siguiente etapa es 2100 mOsm/kg porque produjo la mayor diferencia en las variables estudiadas entre el momento hiperosmótico y al restablecer la isosmolaridad.

Este tipo de pruebas, nos permite hacer una semejanza del proceso de congelación y descongelación con las soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas y conocer aproximadamente la proporción de espermatozoides con membrana espermática y acrosoma intacto. Al hacer el cambio de osmolaridad en el espermatozoide con las soluciones utilizadas, se determinó el daño que puede sufrir la membrana espermática y el acrosoma, esto se asemeja a lo que sería la congelación. Es decir, que estas pruebas se podrían realizar en los machos que los productores quisieran destinar para la congelación de su semen, y así congelar solo el semen útil para su uso posterior en inseminación artificial.

Estas pruebas se requieren complementar con la investigación de la supervivencia del espermatozoide ovino con la congelación del mismo, y así determinar los porcentajes definitivos de supervivencia espermática.

IX. RECOMENDACIONES

En este tipo de investigaciones, es importante que se pudieran complementar los resultados con un mayor número de machos y eyaculados para obtener mayor variabilidad.

También, se podrían manejar otros niveles de osmolaridad para observar el comportamiento del espermatozoide en los mismos y así ampliar el resultado.

Se recomienda continuar esta línea de investigación y pasar a la siguiente fase, la congelación del semen.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Agca Y, Liu J, Mullen S, Johnson-Ward J, Gould K. (2005). Chimpanzee Spermatozoa Osmotic Tolerance and Cryoprotectant Permeability Characteristic *Journal of Andrology* 26, 470-477.
2. Anzor M, He L, Bubr MM, Kroetsch TG, Pauls P. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction* 66, 354-60.
3. Ax RL, Dally MR, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000. Inseminación artificial. En *Reproducción e Inseminación Artificial*. Hafez ESE y Hafez B (eds.). 7ª Ed. Mc Graw México. pp 387-400.
4. Berg E y Bonadonna G. (1980). Fisiopatología de la Reproducción y la Fecundación Artificial de los Animales Domésticos. Ed. Salvat Tomo I. España. pp 511-513.
5. Caiza De La Cueva FI, Rigau T, Pujol R, Piedrafita J, Rodríguez-Gil J. (1997). Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ion pumps and the relationship with cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 48, 301-315.
6. Chantler E y Abraham-Peskir JV. (2004) Significance of Midpiece Vesicles and functional Integrity of the Membranes of Human Spermatozoa After Osmotic Stress. *Andrologia*, 36, 87-93.
7. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. (1988). Cryopreservation of human spermatozoa III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertility and Sterility* 50, 314-320.
8. Curry MR y Watson PF. (1994). Osmotic Effects on Ram and Human Sperm Membranes in Relation to Thawing Injury. *Cryobiology* 31, 39-46.
9. De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkeij AJ. (1990). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals (Suppl. 1)*, 95-104.
10. De Lucas J y Arbiza S. (2000). Producción Ovina en el Mundo y México. FES-C UNAM, México, 142 pp.
11. Derivaux J. (1982). Reproducción de los Animales Domésticos. Acribia. Zaragoza España, pp 92-212.
12. Desagher S y Martinou JC. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10, 369-377

13. Du J, Tao J, Kleinhans FW, Peter AT, Critse JK. (1994). Determination of boar spermatozoa water volume and osmotic response. *Theriogenology* 42, 1183-1191
14. Evans G y Maxwell WMC. (1987). *Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths, Sidney, Australia. 194 pp.
15. Ensminger M. E. (1976). *Producción ovina*. El Ateneo. Argentina, pp 20-23.
16. Fayez I y Marai M. (1994). *Nuevas Técnicas de Producción Ovina*. Acribia, España. pp 101-115.
17. Fishbein WM y Winkert JW. (1978). Parameters of biological freezing damage in simple solutions: Catalase II demonstration of an optimal recovery cooling rate curve in a membraneless system. *Cryobiology* 15: 168-179.
18. Gadella BM y Harrison RAP. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3' 5' monophosphate dependent but apoptosis unrelated exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction* 67, 340-350
19. Gadella BM, Miller NGA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Harrison RAP. (2000). Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipids analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Molecular Reproduction and Development* 53, 108-25.
20. Gao DY, Liu J, Liu C, McGann E, Watson P, Keinhans FW, Mazur P, Critser JK. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction* 10, 1109-1112
21. Hammerstedt RH, Graham JK, y Nolan JP. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Journal of Andrology* 11, 73-88.
22. Holt WV. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
23. Holt WV, y North RD. (1994). Effects of Temperature and Restoration of Osmotic Equilibrium during Thawing on the Induction of Plasma Membrane Damage in Cryopreserved Ram Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 51, 414-424.
24. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. (2000). Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Science* 62, 143-172.

25. Johnston SD, McGowan MR, Phillips NJ, O'Callaghan PO. (2000). Optimal Physicochemical conditions for the manipulation and Short-term Preservation of Koala Spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 118, 273-281.
26. Kemal Duru N, Morshendi M, Schuffer A, Oehinger S. (2001). Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertility and Sterility* 75, 263-8
27. Levitt JA. (1962). Sulfhydryl Disulphide Hypothesis of Frost Injury and Resistance in Plants. *J. Theor Biol* 3, 355-368.
28. Liu Z y Foote RH. (1998). Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *Journal of Dairy Science* 81.
29. Mazur P. (1984). Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. *American Journal of Physiology* 247, C125-C142.
30. Medrano JA. 1998. The importance of individual variation in boar semen cryopreservation. Tesis doctoral, Universidad de Londres, Reino Unido. 203 pp.
31. Parks JE, Graham. (1992). Effects of Cryopreservation Procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222.
32. Pérez Llano B, Sanchez Sanchez R, Gonzalez L, García P. (1998). A Short Version of the osmotic resistance test for Boar Semen. *Congress of the International Pigs Veterinary Society* 15, 61.
33. Salamon S y Maxwell WMC. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62, 77-111.
34. Salamon S y Maxwell WMC. (1995). Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 37, 185-249.
35. Schilling E y Vengust M. (1984). A New Test to Predict the Freezability and Storage of Boar Spermatozoa. *Congress of the International Pigs Veterinary Society*. 8, 296.
36. Si W, Benson JD, Men H, Critser JK. (2006). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology* 53, 336-348.
37. Siegel S. 1990. Estadística no paramétrica. Aplicada a las ciencias de la conducta. 3ª Edición en español. Trillas, México. 344 pp.

38. Sorensen AM. (1982). Reproducción Animal. Ed. Mc Graw Hill. México. pp 178-180.
39. Speedy A. (1987). Producción ovina. Ed. Continental. México, pp 11-15.
40. Watson PF y Duncan AE. (1988). Effect of Salt Concentration and Unfrozen Water Fraction on the Viability of Slowly Frozen Ram Spermatozoa. *Cryobiology* 25, 131-142.
41. Watson PF. (1995). Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of spermatozoa and the Assessment of their Post-Thawing Function. *Reproduction Fertility and Development* 871-891.
42. Willoughby CE, Mazur P, Peter AT, Critser JK. (1996) Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 55, 715-727