

¿Puede el ORT Complementar las Pruebas Clásicas de Valoración Seminal y Predecir la Fertilidad en Toros?

Rubio-Guillén, J¹; González, D¹; González, Y¹; Madrid-Bury, N²; Quintero-Moreno, A¹

¹Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA). Universidad del Zulia (LUZ). Facultad de Ciencias Veterinarias. Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A.

²Dpto. de Zootecnia. Universidad del Zulia (LUZ). Facultad de Agronomía.

RESUMEN

La integridad de la membrana plasmática y acrosomal, ha sido utilizada para valorar la calidad seminal, por sus roles como límite celular y por ser responsables de hacer efectivas las interacciones entre células, tanto desde el punto de vista morfológico como del funcional. El test de resistencia osmótica (ORT) evalúa la sensibilidad de estas membranas a cambios súbitos en la osmolaridad del medio y por tanto su salud, pudiendo predecir la capacidad fecundante de una muestra seminal dada. Con el objetivo de determinar si el ORT puede complementar la evaluación seminal y predecir la fertilidad in vivo en toros se realizó un estudio donde fueron colectados seriadamente los eyaculados de 4 toros y posteriormente se realizó el ORT a cada muestra seminal fresca y descongelada. Los datos fueron comparados mediante el procedimiento GLM del SAS® y cuando se detectaron diferencias fue utilizado el LSMEANS para cuantificar el efecto. La vitalidad, motilidad individual y el número de acrosomas alterados mostraron diferencias significativas entre el semen fresco y descongelado ($P < 0,05$). El porcentaje de acrosomas reaccionados después de la incubación en un medio hiposmótico fue alterado ($P < 0,01$), al comparar las muestras seminales frescas y descongeladas (21,25% vs. 47,80%). No existieron diferencias entre los toros al tratar de predecir la fertilidad mediante el ORT, sin embargo, el toro con menor tasa de fertilidad mostró el peor desempeño al realizar este test en las muestras seminales frescas y descongeladas ($P > 0,05$). Los resultados demostraron que las pruebas realizadas no fueron lo suficientemente sensibles para discriminar los toros por su nivel de fertilidad, aunque se evidenció que este sencillo test por sí solo, aporta información relevante sobre la congelabilidad de una muestra seminal fresca, y complementa los resultados de las pruebas clásicas que predicen la capacidad fecundante de una muestra congelada.

Palabras clave: ORT, criopreservación, medio hiposmótico, espermatozoides, toro.

ABSTRACT

Plasmatic and acrosomal membrane integrity has been used to assess seminal quality because of their important morphological and functional roles as cellular delimitation and effective cell interactions. The Osmotic Resistance Test (ORT) evaluates the sensitivity of these membranes to changes of the environment osmolarity and therefore its health, being able to predict the fertilization ability of a given seminal sample. With the objective of determining if the ORT can complement the seminal evaluation and predict in vivo fertility in bulls, a study was conducted using four bull's ejaculates, on which the ORT was applied (on fresh and thawed seminal samples). The data were compared by GLM procedure of the SAS® and when differences were detected, LSMEANS was used to quantify the effects. Significant differences were found between fresh and thawed semen about vitality, individual motility and the altered number of acrosomes ($P < 0.05$). The percentage of reacted acrosomes after incubation in a hyposmotic medium was higher in the thawed semen (47.80%) than that in fresh semen (21.25%, $P < 0.01$). There were no differences among the bulls in the prediction of fertility through the ORT, nevertheless, the bull with the lowest fertility rate showed the worst performance when this test was carried out in fresh and thawed seminal samples ($P > 0.05$). The results demonstrated that the performed tests were not sufficiently sensitive to discriminate the bulls by their fertility level, although there was convincing evidence that this simple test provides important information about the freezing capacity of a fresh seminal sample, and complements the results from conventional tests that predict the fertilization capability of frozen samples.

Key words: ORT, cryopreservation, hyposmotic medium, spermatozoa, bull.

INTRODUCCIÓN

Son muchos los laboratorios que están buscando un método óptimo de valoración de la calidad seminal, que al utilizarlo solo o en combinación con otros, sea capaz de predecir en forma rápida, segura y repetible la capacidad fecundante de una muestra de semen (Rodríguez-Martínez, 2003). Sin embargo, un análisis con estas características es muy difícil de desarrollar, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática (Watson, 2000). Esta complejidad se evidencia al evaluar las características seminales clásicas (volumen de eyaculado, concentración, vitalidad, morfología, motilidad espermática) y relacionarlas con la fertilidad en campo; es habitual comprobar que eyaculados con valores semejantes de los parámetros anteriormente citados, presentan importantes variaciones en la fertilidad individual, pudiendo sobreestimar o subestimar así, el potencial fecundante de una muestra seminal.

En las últimas décadas, han surgido pruebas complementarias que valoran la funcionalidad espermática, como el test de resistencia osmótica (ORT) que evalúa la integridad de la membrana acrosomal luego de la incubación en un medio hiposmótico, encontrándose correlaciones altas y positivas con la tasa de fertilidad *in vivo* (Aisen y col., 2002). El objetivo de este estudio fue determinar si el Test de Resistencia Osmótica (ORT) por sí solo, puede complementar las pruebas clásicas de valoración seminal y predecir idóneamente la fertilidad en toros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 5 muestras de semen fresco recién colectado y 5 pajuelas de semen descongelado provenientes de 4 toros adultos, de comprobada calidad genética y excelentes características seminales pertenecientes al Centro de Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones (VIATECA®), ubicado en el Estado Zulia, Venezuela. Los eyaculados fueron colectados mediante vagina artificial durante 12 semanas consecutivas. Las muestras clasificadas como aptas para congelar (motilidad individual progresiva $\geq 60\%$ y morfoanomalías $< 30\%$) fueron diluidas, identificadas y envasadas en forma automática en pajuelas de 0,54 mL, con una concentración espermática mínima de 30 millones de espermatozoides por dosis. Para la valoración de la integridad estructural de la membrana plasmática y acrosomal se utilizó la tinción eosina-nigrosina, tomando una alícuota (10 μ L) de semen fresco y descongelado y, sobre una platina termorregulable a 37°C, se mezclaba suavemente, para posteriormente realizar un frotis donde se evaluó el porcentaje de vitalidad (VIT) y de acrosomas alterados (NAR).

Para la valoración de la funcionalidad de la membrana acrosomal, se utilizó el ORT, tanto para el semen fresco, como para el descongelado. Incubando el semen durante 30 minutos en un medio hiposmótico de citrato de sodio a 150 mOsm/kg en un baño maría termoestable a 37°C, luego se centrifugaban a 2000 rpm por 2,5 minutos en una micro-centrífuga (Minispin plus eppendorf 22331 Hamburg). Se tomaban 10 μ L del centrifugado y se mezclaban suavemente con 10 μ L del colorante eosina-nigrosina. En el microscopio óptico, utilizando el objetivo de inmersión (100X), se contaban 200 espermatozoides y se observaban las reacciones acrosómicas (acrosomías parciales y pérdidas totales del acrosoma), expresando el resultando final en porcentaje.

Las variables evaluadas de calidad seminal de las muestras frescas y descongeladas se analizaron en varios eyaculados de cada toro utilizando el Modelo Lineal General del Análisis de la Varianza (Proc GLM). Cuando se encontraron diferencias entre las medias se cuantificó el efecto mediante el procedimiento LSMEANS. Un análisis de correlación fue realizado para evaluar la relación entre las pruebas de valoración seminal, los resultados del ORT y la tasa de fertilidad *in vivo* de los toros.

Para determinar la fertilidad de cada uno de los toros, se realizó la palpación transrectal de las novillas inseminadas con el semen evaluado a los 60 días post servicio, se relacionó el valor porcentual de "fertilidad *in vivo*" obtenido por cada toro con las variables de valoración de la calidad espermática.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración seminal presentó una media en las muestras de $1265,30 \pm 49,36 \times 10^6$ spz/ mL y estuvo dentro de los parámetros normales para toros seleccionados descritos por la literatura.

En la Tabla 1, se muestra las características generales ($\mu \pm$ error estándar) de los parámetros de valoración de la calidad espermática en el semen fresco y descongelado de los toros. Se observó el efecto detrimental del proceso de criopreservación seminal sobre los parámetros de evaluación de la calidad espermática ($P < 0,01$), encontrándose que el porcentaje de motilidad individual progresiva disminuyó de 62,91% a 40,00%, la vitalidad de 92,95% a 72,80%. 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 que pueden causar muerte celular e infertilidad, siendo los operadores que laboran en los Centros de IA, los que deben compensar este efecto,

mediante la optimización de la concentración espermática por dosis, al colocar un mínimo de espermatozoides normales que garanticen la fertilidad de los toros (Janauskas y col., 1996). En este experimento la concentración de espermatozoides por pajuela fue similar ($P > 0,05$) en todos los toros y mostró un promedio $44,00 \pm 1,64 \times 10^6$ espermatozoides/ mL, garantizando un número idóneo de espermatozoides en el tracto genital de la hembra para asegurar la preñez (Fearon y Wegener, 2000).

El porcentaje NAR después de la criopreservación presentó un aumento considerable del 10,00 al 35,25% ($P < 0,01$), y pudiera indicar algún problema no detectado en el proceso de congelación-descongelación seminal, o estar relacionado con una concentración lipídica atípica en las membranas plasmáticas y acrosomales que incide en una mayor susceptibilidad de estas membranas al enfriamiento. En este estudio, más del 35% de NAR 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 (Quintero, 2003). Este hecho pudiera explicar, la tasa de fertilidad tan disminuida en algunos de los toros evaluados, 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 (Januskas y col., 2000).

En cuanto a la evaluación de la funcionalidad de la membrana acrosomal, los resultados del ORT mostraron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$), al comparar las muestras seminales frescas y descongeladas (88,75% vs. 52,20%), estando altamente correlacionadas con los resultados de las pruebas de valoración rutinarias del semen. Un porcentaje de resistencia acrosomal superior al 85% para las muestras seminales frescas pudiera ser indicativo de una excelente capacidad de crioconservación de los eyaculados (Schilling y Vengust, 1985); 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 (Hammerstedt y col., 1990) y que probablemente sea el responsable de las bajas tasas de fertilidad mostradas por los toros, debido a que el ORT presenta una correlación alta y positiva con la capacidad fecundante del espermatozoide (Schilling y Vengust, 1985; Schilling y col., 1986).

Los espermatozoides del bovino son especialmente sensibles al daño por frío (Hammerstedt y col., 1990), debido a que en el procesado, pasos como la adición del crioprotector, el enfriamiento propiamente dicho, la congelación, el almacenamiento en nitrógeno líquido y la descongelación causan un marcado deterioro en la membrana plasmática y acrosomal (Zhu y Liu, 2000), viéndose reflejado en una disminución de la motilidad individual, el porcentaje de acrosomas intactos y espermatozoides vivos cuando se evalúa el semen postdescongelación (Guillaume y col., 2004). En este ensayo, el porcentaje de vitalidad luego de la criopreservación superior al 70% hace pensar que la fertilidad de los toros, puede ser buena, empero, 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 (Zhu y Liu, 2000).

Tabla 1. Características generales ($\mu \pm ee$) en el semen fresco y descongelado de toros.

Características	Semen fresco	Semen descongelado
Concentración (spz/mL)	$1265,30 \pm 49,36 \times 10^6$ (1161,9-1368,6)	
Motilidad individual (%)	$62,91 \pm 1,40$ (60,0-65,8) ^a	$40,00 \pm 2,87$ (33,97-46,02) ^b
Vitalidad (%)	$92,95 \pm 0,59$ (91,72-94,18) ^a	$72,80 \pm 3,81$ (64,80-80,79) ^b
NAR (%)	$10,00 \pm 0,70$ (8,54-11,45) ^a	$35,25 \pm 2,87$ (29,22-41,27) ^b
ORT (%)	$88,75 \pm 0,81$ (87,24-90,20) ^a	$52,20 \pm 3,91$ (47,81-58,38) ^b

Valores entre paréntesis denotan intervalos de confianza de la variable estudiada

(spz/mL): número de espermatozoides por mililitro de semen.

NAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados.

ORT (%): porcentaje espermatozoides con acrosoma intacto luego de la incubación hipósotica.

(a,b): letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$)

Los parámetros de valoración de la funcionalidad espermática en el semen fresco y descongelado de los toros se muestran en la Tabla 2. Los resultados del ORT son muy relevantes, ya que el toro que resultó ser el de menor resistencia acrosomal al descongelado, también fue el de menor tasa de fertilidad 33,33% ($P < 0,05$). La evaluación del estado de los acrosomas al realizarse este test, permite comparar la resistencia

osmótica de las membranas de los distintos eyaculados, así como predecir el comportamiento de los mismos, tanto en lo referente a la fertilidad (Schilling y col., 1986), como a la capacidad para soportar la criopreservación (Schilling y Vengust, 1985). Así mismo, los toros (B y C) que presentaron la mejor tasa de fertilidad, fueron los de mejor desempeño al realizar el test en las muestras seminales frescas ($P > 0,05$). La integridad de la membrana plasmática y acrosomal reflejan la viabilidad espermática y el proceso de criopreservación afecta estas membranas ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de las mismas, 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 (Tartaglione y Ritta, 2004).

Muchas de las alteraciones celulares atribuidas al glicerol parecen estar más relacionadas con un shock osmótico, que con la toxicidad química (Gao y col., 1992). 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 (Quintero, 2003). En este caso, los resultados del ORT en las muestras descongeladas fueron muy variables y no se relacionaron adecuadamente con el porcentaje de fertilidad.

Tabla 2. Parámetros de valoración de la funcionalidad espermática en el semen fresco y descongelado de los toros

Parámetro	Toros evaluados			
	A	B	C	D
ORT fresc (%)	86,40 ^a	90,30 ^a	91,90 ^a	86,91 ^a
ORT desc (%)	52,40 ^b	50,00 ^b	66,00 ^a	44,00 ^b
Fertilidad (%)	47,05 ^b	60,00 ^{a,b}	52,08 ^b	33,33 ^c

ORT fresc (%): Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto al realizar ORT en semen fresco.

ORT desc (%): Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto al realizar ORT en semen descongelado.

Fertilidad (%): Fertilidad global en novillas, determinada a través de palpación transrectal 60 días post-IA.

(a,b): letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$)

CONCLUSIONES

Se evidenció que este sencillo test por sí solo, aporta información relevante sobre la congelabilidad de una muestra seminal fresca, y complementa los resultados de las pruebas clásicas que predicen la capacidad fecundante de una muestra congelada. Sin embargo, el test *per se* no fue lo suficientemente sensible para discriminar los toros por su nivel de fertilidad.

Así mismo, los resultados en este experimento demostraron que la mayoría de las pruebas realizadas a los eyaculados de los toros no son lo suficientemente sensibles para hacer una clasificación idónea de acuerdo a la resistencia al proceso de congelación-descongelación seminal, lo que sin duda pudiera atribuirse a que los espermatozoides evaluados se encuentran dentro de los rangos de normalidad aceptables. El semen de los toros evaluados solamente fue procesado si satisfacía los estándares establecidos para semen fresco y luego de ser congelado, volvía a ser evaluado debiendo cumplir con los requisitos mínimos establecidos por el Centro de Inseminación para su uso a nivel comercial, lo que indica que el alto grado de selección de los toros y de los eyaculados pudiera haber sido la causa de la poca variabilidad observada y la baja predicción de las pruebas realizadas.

LITERATURA CITADA

Aisen, EG., VH. Medina and A. Ventrino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.

Fearon, J. and P. Wegener. 2000. Relationship between fertility in cattle and the number of inseminated spermatozoa. *J Reprod Fert* 119: 293-308.

Gao, DY., P. Mazur, FW. Kleinhans; PF. Watson, EE. Noiles and Critser JK. 1992. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology* 29: 657-667.

Guillaume, M., O. Sabido, P. Durand and R. Levy. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 71: 28-37.

Hammerstedt, RH., JK. Graham and JP. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88.

- Januskauskas, A., L. Söderquist, MG. Håård, MCH. Håård, N. Lundeheim and H. Rodríguez-Martínez. 1996. Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of Swedish Red and White A.I. bulls. *Acta Vet Scand* 37: 461-470.
- Januskauskas, A., A. Johannisson, L. Soderquist and H. Rodríguez-Martínez. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and responde to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53: 859-875.
- Quintero-Moreno, A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. (Tesis Doctoral). 164 pp.
- Rodríguez-Martínez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Dom Anim* 38: 312-318.
- Schilling, E. and M Vengust. 1985. Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples. *Zuchthygiene* 20: 61-78.
- Schilling, E., M. Vengust, G. Bajt and M. Tomcic. 1986. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. *Proc 9th IPVS Congress, Barcelona*, pp 77.
- Tartaglione, CM., and MN. Ritta. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62(7): 1245-1252.
- Watson, PF. 2000. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Anim Reproduction Sci* 60: 481-492.
- Zhu, W. and X. Liu. 2000. Cryodamage to plasma integrity in head and tail region human sperm. *Asian J Androl* 2: 135-138.