

# Capítulo L

## Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros

Jorge Rubio-Guillén, Msc  
Armando Quintero-Moreno, DMV

---

### INTRODUCCIÓN

Para definir funcionalidad espermática, dentro de una muestra seminal fresca o criopreservada un gran número de espermatozoides debe poseer una serie de cualidades determinantes para la fertilización. No son pocas, motilidad progresiva, morfología aceptable, metabolismo para la producción de energía, capacidad para una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, integridad de la función acrosómica, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético, entre otras (Graham *et al.*, 1996). Empero, medir todos estos parámetros en una sola prueba podría sesgar los resultados, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática (Graham *et al.*, 1996; Caiza de la Cueva, 1998; Watson, 2000), subestimando o sobrestimando la capacidad fecundante de una muestra seminal. Asimismo, valorar esta funcionalidad mediante un conjunto numeroso de pruebas dentro de un análisis minucioso completo es impráctico y antieconómico para los que tienen la labor de evaluar muestras seminales en los Centros de Inseminación Artificial (IA) o en los programas reproductivos (Evaluaciones Andrológicas) de las fincas de ganadería doble propósito del país.

Toda la complejidad antes mencionada, se evidencia con claridad, 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 evaluados, presentan importantes variaciones en la fertilidad individual (Rodríguez-Martínez, 2000; Rubio *et al.*, 2007).

De lo anterior se derivan los primeros intentos de evaluar objetivamente la función espermática, habiendo surgido hace algunas décadas una serie de pruebas complementarias que valoran este parámetro de calidad seminal, como el test de endósmosis ó hiposmótico (HOST), el test de resistencia osmótica (ORT) y el test de resistencia hiperosmótica (HRT) que evalúan la integridad de la membrana plasmática y

acrosomal, habiéndose encontrado correlaciones altas y positivas con la fertilidad *in vivo* (Pérez-Llano *et al.*, 2001; Aisen *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2005).

El presente artículo hará una breve reseña del uso de las pruebas basadas en la respuesta a cambios osmóticos, y que sirven para complementar los resultados de las pruebas clásicas de contrastación seminal, con miras *a posteriori* de estudiar la factibilidad de utilizarlas en la evaluación rutinaria de la calidad del semen en toros puros y mestizos de los sistemas de producción de ganadería doble propósito, para mejorar la predicción de la fertilidad y la eficiencia en el adelanto genético, optimizando la rentabilidad, haciendo estos sistemas económicamente sostenibles en el tiempo.

## **PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA BASADAS EN LA RESPUESTA A CAMBIOS OSMÓTICOS**

Es bien conocido, que para un espermatozoide, la membrana plasmática (MP) representa una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones que permiten la adaptación del metabolismo al medio circundante, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del oocito (Hammerstedt *et al.*, 1990; Quintero, 2003). De tal manera que la valoración de la integridad y funcionalidad de la MP constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho (Jeyendran *et al.*, 1984; Quintero *et al.*, 2007).

En el pasado, al hablar de integridad de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) se hacía énfasis solo, en la valoración de la integridad estructural de las mismas, mediante tinciones supravitales (pruebas de vitalidad), o contabilizando el número de acrosomas alterados (NAR) en una muestra seminal dada. Es conocido que aún cuando algunas técnicas de evaluación morfológica informan sobre el daño que sufre la MP y acrosomal, estos resultados no siempre están correlacionados con la fertilidad del semen (Rubio, 2006), a menos que el daño que presenten los espermatozoides sea muy importante (Rodríguez-Martínez, 2000). Un aspecto muy relevante al inferir sobre la integridad es evaluar la funcionalidad espermática (capacidad funcional del espermatozoide) dirigida a determinar la integridad funcional de la MP y acrosomal y que constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho (Vera, 2001; Quintero *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2007). El valor de esta integridad no sólo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que es imprescindible en varios eventos de la fecundación como la capacitación, reacción del acrosoma o su fusión con el ovocito (Yanagimachi, 1993).

Se sabe que la tasa de fertilidad está influenciada por el efecto detrimental de la criopreservación. Este proceso ejerce sobre las membranas celulares una marcada acción deletérea, ocasionando daños como hinchamiento y disrupción, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación espermática anticipada y/o reacción acrosómica (Tartaglione y Ritta, 2004).

Un grupo de pruebas de funcionalidad espermática que ha centrado un gran interés por su simplicidad y su valor predictivo son las de resistencia osmótica (Quintero, 2003; Rubio, 2006). Estas pruebas se basan en los estudios de Drevius y Eriksson (1966), quienes demostraron la capacidad del espermatozoide de toro, conejo y hom-

bre para captar agua en un medio hiposmótico. Estos autores observaron que el enrollamiento del flagelo del espermatozoide, que se desdobra cuando la célula es devuelta a un medio isosmótico, está asociado a la hinchazón osmótica. Dichos cambios fueron confirmados por otros autores, que relacionaron este fenómeno con la capacidad funcional de la MP del espermatozoide humano, observando una alta correlación entre la capacidad de hinchamiento del espermatozoide en un medio hiposmótico y su capacidad de penetración el oocito de hámster libre de zona pelúcida (Mahi y Yanagimachi, 1973; Jeyendran *et al.*, 1984). Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno destacan las dos más utilizadas: El HOST y el ORT.

Estas pruebas que también han sido empleadas con una modalidad corta, conocidas por las siglas sHOST y ORTc, en las cuales se modifican en los tests convencionales (HOST y ORT) la osmolaridad y el tiempo de incubación de 150 mOsm/ L durante 30 min, a 75 mOsm/ L durante 5 min. Su finalidad es aumentar la aplicabilidad de estas pruebas pudiendo adicionarlas a las evaluaciones clásicas de calidad espermática en el manejo rutinario de los centros de testaje de semen (Pérez-Llano *et al.*, 1998; Pérez-Llano *et al.*, 2001).

También existen pruebas de funcionalidad espermática basadas en la resistencia a cambios bruscos de hipertonicidad en el medio externo, como el Test de Resistencia Hiperosmótica (HRT) que evalúa la función acrosómica.

#### **Test de endósmosis (HOST)**

En 1984, Jeyendran y colaboradores, demostraron en semen humano cómo una prueba sencilla y rápida, denominada HOST (Hypoosmotic Swelling Test) presentaba una alta correlación con el test de penetración del semen humano en oocito de hámster. Dos años después, Van der Ven y su equipo (1986) encontraron en semen humano, una correlación alta entre los resultados de la fecundación *in vitro* y el HOST. Esta prueba llamada también test de endósmosis fue originariamente diseñada para evaluar la integridad de la MP de los espermatozoides y consiste en observar la funcionalidad de la membrana celular al someter los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica intracelular con la del medio extracelular. Para que esta respuesta se produzca, la MP del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (bioquímicamente activos). La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo (Pérez-Llano *et al.*, 1999).

En los espermatozoides funcionalmente alterados (con MP física o funcionalmente dañada) no se produce la captación selectiva de agua de forma adecuada alcanzándose así un equilibrio pasivo entre los medios intra y extracelular que no provoca cambios morfológicos apreciables. Por otra parte, el hinchamiento de las células se puede provocar mediante otras vías distintas al descenso de la osmolaridad del medio que rodea a las células. Soluciones isosmóticas de solutos polares como el glicerol, puede provocar el hinchamiento celular debido a la capacidad de estas sustancias de arrastrar agua cuando atraviesan la membrana celular, alterando así, el equilibrio de las presiones osmóticas internas y externas (Hammerstedt *et al.*, 1990). De esta manera, las alteraciones celulares atribuidas al glicerol parecen estar más relacionadas con

un shock osmótico, que con la toxicidad química (Gao *et al.*, 1992), razón por lo cual, resulta preponderante estudiar la respuesta a cambios osmóticos de las membranas espermáticas. 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).

Esta prueba HOST se ha aplicado en el semen del hombre (Jeyendran *et al.*, 1992; Van den Saffele *et al.*, 1992), del toro (Correa y Zavos, 1994; Quintero *et al.*, 2007), del perro (Rodríguez-Gil *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 2002), del caballo (Caiza de la Cueva, 1998) y del cerdo (Gadea *et al.*, 1998). En humanos, se ha encontrado una correlación elevada entre los resultados del HOST y los obtenidos en fecundación “*in vitro*” (Van der Ven *et al.*, 1986).

En toros, como en otras especies, se han señalado correlaciones altas y positivas entre el HOST y el porcentaje de espermatozoides vivos, la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides normales y la fertilidad *in vivo* e *in vitro*, tanto del semen fresco como para el semen descongelado (Aisen *et al.*, 2002; Rubio, 2006). Así mismo, en esta especie, se ha sugerido el uso de fructosa o citrato de sodio diluido en agua destilada a 100 mOsm/L (Jeyendran *et al.*, 1984; Correa y Zavos, 1994). Aunque algunos autores prefieren trabajar a una presión osmótica de 150 mOsm/ L (Zhu y Liu, 2000; Vera, 2001; Rubio *et al.*, 2006a; Quintero *et al.*, 2007) para evitar falsos negativos producto de la disrupción de la MP a causa del estrés hipotónico severo.

El HOST en toros puede realizarse sometiendo una muestra de 10  $\mu$ L de semen fresco y/o descongelado a un medio hiposmótico (100 ó 150 mOsm/ L) durante 30 minutos y en un baño maría termoestable a 37°C. Transcurrido este tiempo, se inmovilizan los espermatozoides con glutaraldehído y sobre una lámina portaobjeto se observa la muestra fijada, utilizando un microscopio de contraste de fases con el objetivo de 40X. Se cuentan los espermatozoides hasta un total de 100 (Figura 1; tomada de: Rubio *et al.*, 2006a), observando la reacción positiva de los mismos (flagelos doblados o enrollados).

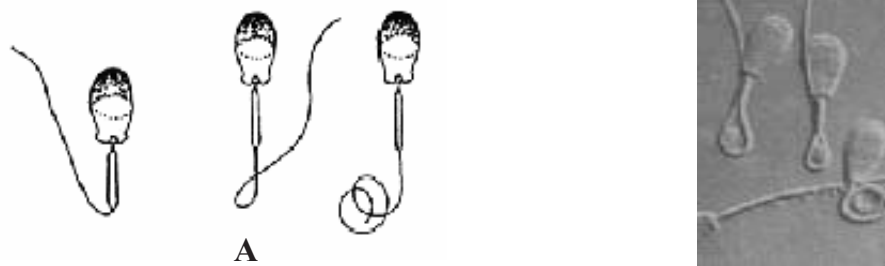


Figura 1. Representación esquemática de espermatozoides reaccionados positivamente al test. (A). Espermatozoides de toros reaccionados al test (B) (espermatozoides enrollados).

Nuestra experiencia, trabajando con semen fresco y descongelado, analizando las muestras seminales de 4 toros utilizados regularmente en un centro de IA del estado Zulia, ha permitido concluir que este test, por su sencillez, practicidad y moderado valor predictivo, puede llevarse a cabo de manera rutinaria en los centros de testaje de toros del país. Este test aporta información relevante sobre la capacidad de congela-

ción de una muestra seminal fresca, así como, la capacidad fecundante de una muestra seminal congelada.

Obsérvese en el Cuadro 1, como los toros con menor tasa de fertilidad (Toro A y D) fueron los que mostraron un peor desempeño al realizar el HOST a los eyaculados frescos y a las muestras seminales descongeladas. Mientras que los ejemplares que mostraron la mejor resistencia y adaptación a las condiciones de hiposmosis del medio externo, fueron los de mejor tasa de fertilidad en campo.

**Cuadro 1**  
**Relación entre el Test HOST y la tasa de fertilidad en campo de los toros**

Parámetros evaluados	Toros			
	A	B	C	D
HOST semen fresco (%)	55,90 <sup>a</sup>	86,00 <sup>a</sup>	80,90 <sup>a</sup>	64,60 <sup>a</sup>
HOST semen descongelado (%)	43,10 <sup>a</sup>	54,20 <sup>a</sup>	56,20 <sup>a</sup>	49,80 <sup>a</sup>
Fertilidad (%)	47,05 <sup>b</sup>	60,00 <sup>ab</sup>	52,08 <sup>b</sup>	33,33 <sup>c</sup>

HOST semen fresco y descongelado (%): espermatozoides reaccionados al test de endósomosis.

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

Fertilidad (%): fertilidad global determinada a través de palpación 60 días después de la IA.

Tomado de: Rubio, *et al.*, 2006<sup>a</sup>.

Algunos autores han realizado una modificación a la prueba original utilizada por Jeyendran y colaboradores (1984), basándose en los estudios realizados en la Universidad de Loma Linda de California por Chan y su equipo (1991), donde se introduce una modificación a la técnica ya descrita, combinando este test con una tinción supravital (Eosina Y) y conocido como test HOS-EY. Asimismo, en el país se tienen experiencias trabajando con la tinción eosina-nigrosina (HOS-EN) para hacer una evaluación más completa de la integridad estructural y funcional de la MP, debido a que se puede hacer énfasis en los espermatozoides que presentan MP intacta (negativos a la tinción eosina: no teñidos) y a su vez bioquímicamente funcionales (positivos al HOST: flagelo enrollado), combinando dos importantes parámetros en la evaluación rutinaria de los eyaculados, como son vitalidad y viabilidad, que representan características necesarias y determinantes para clasificar las muestras seminales como fecundantes (Rubio, 2006). Otra ventaja de utilidad práctica, es que las muestras al estar teñidas y montadas en portaobjetos, pueden ser almacenadas y utilizadas en posteriores re-evaluaciones.

### **Test de Resistencia Osmótica (ORT)**

Se ha desarrollado otro test basado en el porcentaje de espermatozoides que presentan una alteración estructural evidente en el acrosoma tras su incubación en un medio hiposmótico (Correa y Zavos, 1994; Gil *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2006b). Esta prueba se denomina test de resistencia osmótica (ORT) y presenta una correlación positiva con la capacidad fecundante del espermatozoide (Schilling *et al.*, 1986; Rubio, 2006). Por lo tanto, este test permite analizar el potencial reproductivo de los machos mediante el análisis de la integridad del acrosoma, al someter los espermatozoides a un medio hiposmótico, de forma que aquellos funcionales no mostrarán altera-

ciones a nivel acrosómico (Rubio *et al.*, 2007). La evaluación del estado de los acrosomas permite comparar la resistencia osmótica de las membranas de distintos eyaculados, así como predecir el comportamiento de los mismos, tanto en lo referente a la fertilidad (Schilling *et al.*, 1986; Rubio *et al.*, 2006b), como a la capacidad para soportar la criopreservación (Rubio *et al.*, 2007).

El ORT en toros, puede realizarse tomando dos alícuotas de semen fresco o descongelado de 10  $\mu\text{L}$ . Una de las muestras es colocada en un medio hiposmótico (150 mOsm/L) y la otra, en un control, en condiciones isosmóticas de 300 mOsm/L. Luego se incuban en un baño maría a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se toma una gota de semen (10  $\mu\text{L}$ ) y se mezcla suavemente con 10  $\mu\text{L}$  de un colorante específico para evaluar el acrosoma de los espermatozoides, como la tinción eosina-nigrosina. Los frotis teñidos se evalúan en un microscopio óptico utilizando el objetivo de inmersión a 1000X de aumento y directamente sobre el portaobjetos se cuentan los espermatozoides hasta un total de 100 ó 200, observando el número de acrosomas alterados (NAR: pérdidas totales o parciales del acrosoma. Figura 2; Tomada de: Rubio *et al.*, 2006b). Se suma el total de NAR del medio hiposmótico y del medio isosmótico, se divide entre dos y se obtiene el resultado final del test, expresado de forma de porcentaje.  $\%ORT = (\% \text{NAR medio hiposmótico} + \% \text{NAR medio isosmótico}) / 2$ .

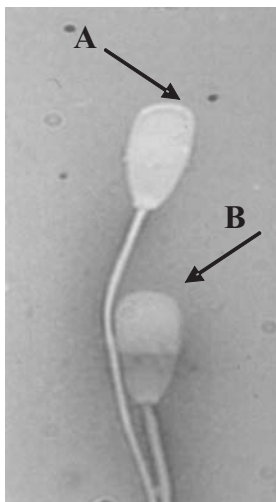


Figura 2. Espermatozoides de toros teñidos con eosina-nigrosina (A: espermatozoide con acrosoma intacto, B: espermatozoide con pérdida del acrosoma).

Nuestra experiencia, analizando muestras seminales frescas y criopreservadas de toros Brahman y sus mestizos, utilizados regularmente en un centro de IA, ha llevado a concluir que por su sencillez, practicidad y alto valor predictivo puede también llevarse a cabo de manera rutinaria en centros de testaje de toros del país.

Al realizar la prueba a 4 toros catalogados como mejoradores de parámetros reproductivos, se pudo corroborar como el toro que resultó ser el de menor resistencia acrosomal al descongelado, también fue el de menor tasa de fertilidad 33,33% (Cuadro 2;  $P < 0,05$ ). Estos resultados son muy relevantes, debido a

que este ejemplar fue un mestizo F1: Holstein-Brahman, y al compararlo con sus coetáneos Brahman puros, mostró un desempeño muy deficiente, pudiendo hipotetizar que en este toro mestizo probablemente la membrana acrosomal presentó una especial sensibilidad al proceso de criopreservación, aunque la literatura científica internacional no cita evidencia sobre este aspecto. De igual manera, el ensayo permitió comparar la resistencia osmótica de las membranas acrosomales de los distintos eya-

culados, así como predecir el comportamiento de los mismos, tanto en lo referente a la fertilidad, como a la capacidad para soportar la criopreservación, similar a lo reportado por otros autores (Schilling *et al.*, 1986).

En este mismo orden de ideas, obsérvese como 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 MP y acrosomal reflejan la viabilidad espermática y el proceso de criopreservación tiene un efecto detrimental sobre estas membranas (Tartaglione y Ritta, 2004), por lo que resulta importante evaluar la integridad estructural y funcional de ambas, más aún si se sabe, 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). Por esa razón esta prueba pudiera complementar los resultados del HOST.

**Cuadro 2**  
**Test de Resistencia Osmótica en semen fresco y descongelado de toros**

Parámetros evaluados	Toros			
	A	B	C	D
ORT semen fresco (%)	86,40 <sup>a</sup>	90,30 <sup>a</sup>	91,90 <sup>a</sup>	86,91 <sup>a</sup>
ORT semen descongelado (%)	52,40 <sup>b</sup>	50,00 <sup>b</sup>	66,00 <sup>a</sup>	44,00 <sup>b</sup>
Fertilidad (%)	47,05 <sup>b</sup>	60,00 <sup>ab</sup>	52,08 <sup>b</sup>	33,33 <sup>c</sup>

ORT (%): espermatozoides reaccionados al test de resistencia osmótica.

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

Fertilidad (%): fertilidad global determinada a través de palpación 60 días después de la IA.

Tomado de: Rubio *et al.*, 2007.

Se ha creado una variante de esta prueba en cerdos, que se denominada ORT corto (ORTc), donde se reduce el período de incubación a 5 minutos, de manera que puede ser usada dentro de la rutina diaria en los centros de IA (Pérez-Llano *et al.*, 1998). Actualmente en el país se realizan ensayos para poner a tono (estandarizar) esta prueba corta de resistencia osmótica y facilitar así, su uso en centros de testaje de toros.

### **Test de Resistencia Hiperosmótica (HRT)**

Cuando los espermatozoides son criopreservados, estos se exponen a condiciones hiperosmóticas del medio congelado afectándose la integridad de la MP y la motilidad del semen (Liu y Foote, 1998). Cualquier disrupción en las membranas del espermatozoide ha sido asociada con pérdida de la viabilidad espermática (De leeuw *et al.*, 1993). Por lo que resulta de suma importancia, evaluar la resistencia de la membrana acrosomal del espermatozoide a un cambio brusco de la osmolaridad, incubando muestras seminales desde una solución hiperosmótica hasta una isosmótica y observando el NAR al utilizar la tinción doble azul trypan-Giemsa (Rigau *et al.*, 1995) o la tinción eosina-nigrosina. En la medida que ocurran más reacciones acrosómicas o pérdidas completas del acrosoma después de incubar el semen, menor es la resistencia de la muestra seminal al cambio osmótico y por ende, podría presentar menor congelabilidad y capacidad fecundante a nivel de campo (Rigau *et al.*, 1995; Caiza de la Cueva, 1998).

El HRT se realiza tomando una muestra de 100  $\mu\text{L}$  de semen fresco y se coloca en un eppendorf con 900  $\mu\text{L}$  de una solución hiperosmótica (SH) que contiene 0,9 mol/Kg glucosa ( $1169 \pm 13$  mOsm/L); luego la muestra se incuba en baño maría termorregulable a 37°C, durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se toma 100  $\mu\text{L}$  de la SH con sus respectivos espermatozoides y se introducen en una solución isosmótica (SI) que contiene 1000  $\mu\text{L}$  de una solución Krebs-Henseleit-Ringer a 37°C ( $296 \pm 7$  mOsm/L). Posteriormente, se centrifugan ambas muestras con el objeto de concentrar y obtener suficiente cantidad de espermatozoides para realizar las tinciones de eosina-nigrosina y Azul Trypan-Giemsa modificado (Caiza de la Cueva, 1998). Previo a la tinción, las muestras se fijan con Glutaldehído al 3%. La relación entre el porcentaje de VIT y de NAR en las muestras sometidas a la SH y SI corresponden al HRT y se expresan en porcentaje (%).

Nuestras experiencias trabajando con otra especie animal (semen porcino) demuestran que el HRT, es vital para determinar la calidad espermática mediante la resistencia al cambios bruscos de la osmolaridad, sin embargo, el efecto detrimental muchas veces, solo es evidente cuando las muestras son llevadas a condiciones isosmóticas nuevamente. Estos resultados han corroborado una vez mas que el proceso de deshidratación-rehidratación del espermatozoide de cerdo es mucho mas complicado que en otras especies, lo cual explica la baja tasa congelabilidad de sus espermatozoides (Quintero-Moreno *et al.*, 2005). Es importante señalar, que los resultados de calidad seminal obtenidos con el HRT son similares a los obtenidos al descongelar pajuelas de semen de toro, lo cual motiva a diseñar estudios posteriores donde se pruebe la utilidad de este test para predecir congelabilidad en esta especie.

## CONCLUSIÓN

La integridad de la membrana plasmática y acrosomal reflejan la viabilidad espermática. La valoración de este parámetro de calidad seminal puede hacerse usando pruebas que evalúen la integridad estructural de estas membranas a través de las tinciones supravitales (VIT) y porcentaje de acrosomas alterados (NAR) y la integridad funcional, mediante las pruebas de resistencia osmótica HOST, ORT y HRT. Esta funcionalidad espermática posee un alto valor predictivo al compararlo con el mostrado por las pruebas que valoran solo la integridad estructural de estas membranas.

Las pruebas HOST, ORT o HRT aportan información relevante sobre la congelabilidad de una muestra seminal fresca y ayudan grandemente a complementar los resultados de las pruebas clásicas de valoración seminal, sobre todo en lo referente a la predicción de la fertilidad de un toro según el desempeño mostrado al realizar estos tests, mejorando así, el control de calidad del producto final (pajuelas de semen criopreservadas) en los centros de inseminación artificial del país.

Por su practicidad y sencillez se plantea que estas pruebas pueden ser utilizadas rutinariamente en los centros de testaje de toros usados para mejoramiento genético mediante inseminación artificial, especialmente las pruebas hiposmóticas (HOST y ORT) en su modalidad corta, que en apenas 5 minutos se puede efectuar un test factible, sencillo, rápido, altamente reproducible y, que sirva para mejorar la predicción de la fertilidad en campo.



## LITERATURA CITADA

- Aisen EG, Medina VH, Ventrino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
- Caiza de la Cueva FI. 1998. Estudio sobre la resistencia al estrés osmótico de espermatozoides porcinos y equinos. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona/España. 128 pp.
- Chan P, Tredway DR, S, BC, Corselle J, Ren S. 1991. Combined supravital stains and hypoosmotic swelling test. *Human Reprod* 6(8): 1115-1118.
- Correa JR, Zavos PM. 1994. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42: 351-360.
- De Ieewus A, Den Dass J, Woelders H. 1991. The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and the acrosomal status of bovine spermatozoa. *J Androl* 12: 112-118.
- Dreivius LO, Eriksson H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res* 42: 136-156.
- Gadea J, Matás C, Lucas X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci* 56: 95-108.
- Gao DY, Mazur P, Kleinhans FW, Watson PF, Noiles EE, Critser JK. 1992. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology* 29: 657-667.
- Gil J, Januskaukas A, Håård M, Johansson A, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-plus ® and Triladiyl ®. *Reprod Dom Anim* 35: 69-77.
- Graham EF, Schmehl MK, Nelson DS. 1996. Problems with laboratory assays. In: *Proc. 8th Tech. Conf. AI and Reprod NAAB*. p. 740-81.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Pérez-Peláez M, Crabo BJ, Zaneveld LJ. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219-228.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJ. 1992. The hypoosmotic swelling test: An update. *Arch Androl* 39: 1279-1289.
- Mahi CA, Yanagimachi R. 1973. The effects of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil* 35: 55-66.
- Liu Z, Foote R. 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci* 81: 1868-1873.
- Pérez-Llano B, González JL, García-Casado P. 1998. Nueva técnica de ORT corta para su evaluación. *Albítar* 21: 6-7.
- Pérez-Llano B, González JL, Clemente MG, García-Casado P. 1999. El test de endósmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albítar* 30: 16-17.
- Pérez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, García-Casado P. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56:387-398.

- 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.
- Quintero A, Rubio-Guillén J, Rigau T, Rodríguez JE. 2005. El test de resistencia hiperosmótica: un test de gran utilidad para medir la función espermática en semen de verraco. *Revista Científica BIOTAM nueva serie. II*: 409-410.
- Quintero-Moreno A, Rubio-Guillén J, González D, Palomares R, Madrid-Bury N. 2007. Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de toros. *XI Jornadas Nacionales de la Facultad experimental de Ciencias-LUZ. 12-15/10/07. Maracaibo, Venezuela*. 128.
- Rigau T, Caiza de la Cueva F, Bonet S, Briz, M, Rodríguez-Gil JE. 1995. Resistance to hypersmotic stress of boar spermatozoa: Putative role of ionic pumps. *Assis Reprod Techn/ Andrology* 8: 101-122.
- Rodríguez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T. 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 42: 815-829.
- Rodríguez-Martínez H. 2000. Evaluación de semen congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. *Internacional Veterinary Information Service (www.ivos.org), Ithaca, New Cork, USA*.
- Rubio-Guillén J. 2006. Efecto del proceso de criopreservación sobre la calidad seminal y fertilidad de toros Holstein, Brahman y sus mestizos. Universidad del Zulia. Facultad de Cs. Veterinarias. (Tesis de Maestría). Maracaibo, Venezuela. 103.
- Rubio-Guillén J, González D, Quintero A. 2006a. El test de hinchamiento osmótico: un test de gran utilidad para medir la función espermática en semen de toro. *ConTacto Veterinario FCV-LUZ*. 6 (11): 11-12.
- Rubio-Guillén J, González D, Quintero A. 2006b. ORT: Un test muy útil para evaluar la calidad seminal de toros. *ConTacto Veterinario FCV-LUZ*. 6 (12): 19-20.
- Rubio-Guillén J, González D, González Y, Madrid N, Quintero A. 2007. ¿Puede el ORT complementar las pruebas clásicas de valoración Seminal y predecir la fertilidad en toros? *Arch Latinoam Prod Anim* 15 (Supl. 1): 329.
- Sánchez A, Rubilar J, Gatica MV. 2002. Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test. *Arch Med Vet* 34 (1): 123-130.
- Schilling E, Vengust M, Bajt G, Tomcic M. 1986. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. *Proc 9th IPVS Congress, Barcelona*, pp 77 (Abstr.).
- Tartaglione CM, Ritta MN. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62(7): 1245-1252.
- Van den Saffele J, Vermeulen L, Schoojans F, Comhaire F. 1992. Evaluation of the hypoosmotic swelling test in relation advanced methods of semen analysis. *Andrología* 24: 213-217.
- Van der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Pérez-Peláez M, Diedrich K, Zaneveld LJ. 1986. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic médium (Hypoosmotic Swelling Test) and in vitro fertilization. *J Androl* 7: 190-196.
- Vera O. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: *Reproducción Bovina*. C. González- Stagnaro (Ed). Fundación Girarz. Edic. Astro Data S. A. Maracaibo-Venezuela. Cap: XII: 1 – 11.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Anim Reproduction Sci* 60: 481-492.

Yanagimachi R. 1993. Mammalian Fertilization. In: *Physiology of Reproduction*. Knobil E (Eds) Raven Press, NY. pp. 189-317.

Zhu W, Liu X. 2000. Cryodamage to plasma integrity in head and tail region human sperm. *Asian J Androl* 2: 135-138.