

Universidad Católica de Santa María
Escuela de Postgrado
Maestría en Producción y Salud Animal



“COMPARACION ENTRE EL TEST DE ENDOSMOSIS Y EL DE RESISTENCIA OSMOTICA PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMATICAS DE ESPERMATOZOIDES DURANTE EL PROCESO DE REFRIGERACION EN MUESTRAS DE SEMEN PORCINO COMERCIAL CONSERVADOS CON DILUTORES DE LARGA DURACION. AREQUIPA – 2021”

Tesis presentada por el Bachiller:
Recabarren Begazo, Luis Oscar

Para optar el Grado Académico de:
Maestro en Producción y Salud y Animal

Asesor:
Dr. Fernandez Fernandez Fernando

Arequipa – Perú
2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRIA CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 21 de Enero del 2022

Dictamen: 006070-B-EPG-2022

Visto el borrador de tesis del expediente 006070, presentado por:

2010006971 - RECABARREN BEGAZO LUIS OSCAR

Titulado:

**COMPARACION ENTRE EL TESTS DE ENDOSMOSIS Y EL DE RESISTENCIA OSMOTICA PARA
DETERMINAR LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA
PLASMATICAS DE ESPERMATOZOIDES DURANTE EL PROCESAMIENTO EN
MUESTRAS DE SEMEN PORCINO COMERCIAL
CONSERVADOS CON DILUTORES DE LARGA DURACION. AREQUIPA ? 2021**

El dictamen es:

APROBADO

**1884 - FERNANDEZ FERNANDEZ FERNANDO
DICTAMINADOR**



DEDICATORIA

A mis padres por estar siempre presentes en cada logro que ido dando en el transcurso de mi crecimiento profesional y por todo su apoyo incondicional por siempre creer en mi persona.

A mis familiares que siempre me dieron ánimos a seguir adelante a pesar de las dificultades.

A Dios, por brindarme salud y permitirme poder seguir adelante con todos mis proyectos.

A todos los amigos que en el transcurso de la ejecución del proyecto me brindaron su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Víctor Pacheco Sánchez, por brindarme su apoyo y aportes en la elaboración del presente proyecto de investigación.

Me gustaría tener un agradecimiento especial a mi asesor el Dr. Fernando Fernández, por sus consejos y enseñanzas durante mi formación académica.

Estoy también particularmente agradecido por la ayuda brinda por el personal de las granjas y empresas comercializadoras, por la recolección de las muestras ya que sin ellos no hubiese sido factible este trabajo.

INDICE

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	2
OBJETIVOS	3
CAPITULO I: MARCO TEORICO Y CONCEPTUAL	4
1. Inseminación artificial porcina.....	4
1.1. Integridad de la membrana espermática.....	6
1.1.1. Test de endosmosis o hiposmótica (HOST) (Hypoosmotic Swelling Test)	8
1.1.2. Test de resistencia osmótica (Osmotic Resistance Test).....	10
1.2. Dilutores para semen porcino (Manual Kubus, 2020)	12
1.3. Tipos de dilutores para semen de porcino.....	13
CAPITULO II: METODOLOGIA	19
1. Muestras de semen porcino, recolección y envío a análisis.....	19
2. Evaluación de algunos parámetros microscópicos del semen porcino	20
2.1. Motilidad.....	20
2.2. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides del semen porcino.....	20
2.2.1. Test de endósmosis o HOST o HOS (Hypo Osmotic Swelling Test) (Kubus, 2010) Descrita por Jeyendran y col. (1984).....	20
2.2.2. Test de resistencia osmótica (O.R.T) (Kubus, 2010)	22
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION	24

1. Motilidad espermática masal en muestras de semen porcino comercial conservados con dilutores de larga duración.	24
2. Integridad y funcionabilidad de la membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA) de los espermatozoides del semen porcino comercial conservados con dilutores de larga duración.....	26
2.1. Test de endósmosis o HOST o HOS (Hypo Osmotic Swelling Test) (Kubus, 2010), descrita por Jeyendran y col. (1984).....	26
2.2. Test de resistencia osmótica (O.R.T) (Kubus, 2010), (Schilling, 1986).....	29
2.3. Comparación entre el Test de HOST y el ORT	30
CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS:	1

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Marcas de diluyentes agrupados por la duración	14
Tabla 2	Composición (en g/L) de los diluyentes de inseminación artificial porcina más utilizados	15
Tabla 3	Resultados del Test de HOST	21
Tabla 4	Categorías de ORT para semen porcino.....	22
Tabla 5	Correspondencia entre categorías y clases.....	23
Tabla 6	Resumen de evaluación de la motilidad masal de espermatozoides porcinos desde las 0 hrs hasta las 144 hrs.....	24
Tabla 7	Resumen del efecto del tiempo de evaluación en el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Endosmosis o Hiposmotico (HOST+).....	26
Tabla 8	Resumen del efecto del tiempo de evaluación en el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Resistencia Osmótica (ORT).....	29
Tabla 9	Comparación entre el efecto del tiempo de evaluación y el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Endosmosis o Hiposmotico (HOST+) versus los espermatozoides porcinos positivos al Test de Resistencia Osmótica (ORT).....	31

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1	Reacción de la estructura espermática frente al test de HOST	23
Gráfico 2	Determinación de la motilidad espermática en muestras de semen comercial con dilutores de larga duración.....	25
Gráfico 3	Efecto del tiempo en el porcentaje de espermatozoides reactivos al test de HOST	28
Gráfico 4	Efecto del tiempo en el porcentaje de espermatozoides reactivos al test de ORT	30
Gráfico 5	Comparacion de los Test de HOST/ROS	32
Gráfico 6	Funcion de densidad para los Test de HOST/ROS.....	33
Gráfico 7	Comparación del tiempo en el porcentaje de espermatozoides reactivos al test HOST /ORT.....	35

RESUMEN

La calidad de las dosis seminales es muy importante en la inseminación de porcinos, uno de los factores más importantes es mantener la funcionabilidad espermática durante el proceso de refrigeración; sin embargo, la mayoría de los estudios realizados en nuestro medio orientado al manejo y conservación de espermatozoides en animales domésticos incluyen limitados parámetros de referencia; no obstante, existen técnicas especializadas diseñadas con la finalidad de estimar la potencial capacidad fecundante de una muestra de espermatozoides. En ese sentido, la evaluación de la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática, así como de la integridad acrosoma y su comparación pueden representar indicadores de la funcionalidad de los espermatozoides porcinos. Es por ello que el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo al comparar el test de endosmosis (HOST), con el test de resistencia osmótica (ORT), para determinar la integridad de la membrana plasmática y acrosoma de espermatozoides durante el proceso de refrigeración en muestras de semen porcino comercial conservados con dilutores de larga duración. Las muestras de semen comercial fueron recolectadas de 5 verracos de diferentes empresas comercializadores de semen refrigerado porcino de la ciudad de Arequipa, las cuales se adquirieron tan pronto fueron recolectadas y diluidas, para lo cual se coordinó previamente con los proveedores para garantizar este requerimiento. Esta evaluación se realizó durante los meses de enero a marzo del 2021, se conservaron a 15-17 °C, cada muestra de semen se separó en tres fracciones de 5 cc, una fracción se utilizó para la evaluación espermática de la motilidad inicialmente, la segunda fue sometida a una prueba de hinchazón hipo osmótica (HOST), la tercera se evaluó mediante el test de resistencia osmótica (ORT), se empleó para el primer test una solución de 150 mOsm/Kg y para el segundo una solución de 100 mOsm/kg. De las 35 muestras analizadas en los 7 días de refrigeración obtuvimos una motilidad masa inicial de 91,6% la cual se redujo hasta 56,4%. Los espermatozoides que presentaron una respuesta HOST+ fueron un 87,8% en la hora 0 y 67,8% a las 144 horas, con un CV inferior al 3%; en el Test ORT se obtuvo que a las 0 horas era de 93,4% y se redujo a 72,6 % a las 144 horas, con un CV inferior a 3% en 5 de los 7 días evaluados. Al comparar ambos test mediante una inferencia basada en dos muestras mediante la prueba de T Student para muestras pareadas pudimos determinar que no existía diferencia significativa entre ellos ($p > 0,05$).

Palabras clave: Semen, refrigeración, endosmosis, HOST, ORT

ABSTRACT

The quality of semen doses is very important in pig insemination, one of the most important factors is to maintain sperm functionality during the cooling process. However, most of the studies carried out in our environment oriented to the management and conservation of sperm in domestic animals include limited reference parameters. However, there are specialized techniques designed for the purpose of estimating the potential fertilizing capacity of a sperm sample. In this sense, the evaluation of the functional and structural integrity of the plasmatic membrane, as well as of the acrosomal integrity and their comparison can represent indicators of the functionality of the boar spermatozoa. That is why the present research work aimed to compare the endosmosis test (HOST), with the osmotic resistance test (ORT), to determine the integrity of the plasmatic and acrosomal membrane of sperm during the refrigeration process in commercial boar semen samples preserved with long-term diluents. The commercial semen samples were collected from 5 boars from different companies that sell refrigerated pork semen in the city of Arequipa, which were acquired as soon as they were collected and diluted, for which prior coordination was made with the suppliers to guarantee this requirement. The evaluation was carried out during the months of January to March 2021, they were kept at 15-17 °C, each semen sample was separated into three 5 cc fractions, one fraction was used for the sperm motility evaluation initially, the second was subjected to a hypoosmotic swelling test (HOST), the third was evaluated by the osmotic resistance test (ORT), a solution of 150 mOsm/Kg was used for the first test and a solution of 100 mOsm/Kg for the second kg. Of the 35 samples analyzed in the 7 days of refrigeration, we obtained an initial mass motility of 91.6%, which was reduced to 56.4%. The spermatozoa that presented a HOST+ response were 87.8% at hour 0 and 67.8% at 144 hours, with a CV of less than 3%; in the ORT Test, it was obtained that at 0 hours it was 93.4% and it was reduced to 72.6% at 144 hours, with a CV of less than 3% in 5 of the 7 days evaluated. When comparing both tests through an inference based on two samples using the T Student test for paired samples, we were able to determine that there was no significant difference between them ($p > 0.05$).

Keywords: Sperm, refrigeration, endosmosis, HOST, ORT

INTRODUCCION

La inseminación artificial (IA) es actualmente el método más utilizado para la cría de cerdos, representando más del 90% de los casos en los países occidentales (1), (2). El semen de jabalí almacenado en líquido se utiliza con mayor frecuencia para la inseminación artificial debido a su alto rendimiento reproductivo, con tasas de parto superiores al 90% y tamaños de camada que alcanzan ≥ 12 lechones nacidos vivos (2).

La amplia aplicación de la IA en la década de 1980 promovió el desarrollo de extensores a corto y largo plazo para el almacenamiento de líquidos a 15-17 ° C, así como la estandarización y comercialización de catéteres y procedimientos de inseminación convencionales (3); (2).

Sin embargo, del semen crio preservado de cerdo, apenas se utiliza para la IA debido a su calidad, que se reduce en gran medida por la peroxidación lipídica de membrana durante el proceso de almacenamiento (4).

En situaciones donde una generación excesiva de especies reactivas de oxígeno abruma la capacidad antioxidante, se ejerce un efecto nocivo sobre la función de los espermatozoides (5).

Por este motivo es necesario evaluar la calidad espermática de las dosis seminales de cerdo, para garantizar la fertilidad, por ello el presente trabajo de investigación evaluó mediante dos pruebas funcionales como son el HOST y el ORT, la membrana espermática y comparo cual de ambos era mejor para poder realizar esta evaluación.

El presente trabajo de investigación despliega, la revisión y análisis exhaustivos de los fundamentos teóricos y problema de estudio, descripción de las estrategias metodológicas utilizadas en la ejecución de la investigación, los resultados y discusión del análisis de la comparación entre el test de endosmosis (HOST) y el de resistencia osmótica (ORT) para determinar la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides durante el proceso de refrigeración en muestras de semen porcino comercial conservados con dilutores de larga duración, conclusiones y recomendaciones considerando una serie de actividades que involucran factores de colección y refrigeración seminal. A manera de anexos se despliega el proyecto completo de investigación, las matrices de datos y sistematización, matrices de conteo, cálculos estadísticos, secuencia fotográfica y resultados obtenidos.

HIPOTESIS

Dado que los test de endósmosis (HOST) y resistencia osmótica (ORT) nos permiten estudiar la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides, es probable comparar la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante estos Test durante el proceso de refrigeración, en las muestras de semen porcino conservado con dilutor de larga duración en muestras de semen porcino comercial.



OBJETIVOS

1. Comparar el test de endosmosis con el test de resistencia osmótica para determinar la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides durante el proceso de refrigeración en muestras de semen porcino comercial conservados con dilutores de larga duración.
2. Determinar la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides durante el proceso de refrigeración (1 – 7 días) en muestras de semen porcino comercial conservados con dilutores de larga duración, sometidos al test de HOST.
3. Determinar la integridad de la membrana acrosomal de espermatozoides durante el proceso de refrigeración (1 – 7 días) en muestras de semen porcino comercial conservados con dilutores de larga duración, sometidos al test de ORT.

CAPITULO**I:****MARCO TEORICO Y CONCEPTUAL****1. Inseminación artificial porcina.**

De acuerdo con Becerril (6), la técnica y la aplicación de la IA en todo el mundo ha cambiado considerablemente desde que fue propuesta como una herramienta práctica por investigadores rusos y japoneses hace más de sesenta años.

La producción de una gran cantidad de semen de alta calidad es importante para los productores de carne de cerdo, ya que la mayoría de las cerdas son inseminadas artificialmente. La IA ha tenido un impacto significativo en la estructura de la industria de la genética porcina. Se ha informado que la IA ahora representa más del 60% del apareamiento total de cerdos en los Estados Unidos (7).

Durante los 80, el crecimiento de la IA es paulatino y paralelo al desarrollo de nuevos y específicos diluyentes para la especie porcina, así como de adecuadas técnicas para el procesamiento y manejo del semen. Durante este período en Europa se difunde mucho el uso de los servicios de inseminadores en las regiones con mayor progreso porcícola, quienes dependen en la mayoría de los casos de Centros de IA y/o Centros de Transferencia Genética (C.T.G). También se difunde el servicio de entrega de semen diluido por parte de los C.T.G a través de eficientes sistemas del correo oficial o de la mensajería privada. Durante este período, ocurre el uso del semen congelado, principalmente con el fin de la introducción de material genético, pero con bajos riesgos sanitarios (8).

En la década de los 90 es cuando el uso de la IA., tiene un crecimiento explosivo en el resto del mundo, con sus respectivas variaciones de un país a otro. Además de su implementación en granjas porcícolas tecnificadas de diversos tamaños, es luego incorporada en las megas empresas donde se tienen que modificar instalaciones y sus procesos en las áreas de servicios para la adopción de esta. Se pueden utilizar verracos grandes en hembras pequeñas, se ahorra tiempo cuando hay un grupo numeroso de hembras sincronizadas para servicio. En las piaras comerciales, la IA. Permite crear programas de cruzamientos de fácil ejecución, sin necesidad de una gran inversión en las razas requeridas de verracos (8).

El mejor conocimiento del estatus reproductivo del rebaño de cría resultará en la más efectiva selección de los animales reproductores. La inseminación artificial necesita establecer un nivel más elevado de manejo y puede consumir gran cantidad de tiempo si no se organiza correctamente. El productor debe desear verdaderamente que la IA tenga éxito, detallando concienzudamente todas las fases del programa (8).

El aumento del rendimiento de la fertilidad en las cerdas es uno de los mayores logros en la producción porcina en los últimos 30 años; sin embargo, las granjas de cerdos que utilizan IA experimentaron repetidamente en los últimos años problemas de fertilidad (9).

Becerril (2000) (10), afirma que la IA requiere que el servicio se haga correctamente y en el momento apropiado durante el celo para obtener una alta tasa de partos y buen tamaño de camadas; la detección de celo debe hacerse por lo menos dos veces al día si se quieren obtener los mejores resultados. Para introducir nuevo material genético en el rebaño con un mínimo riesgo de enfermedades y aumentar el uso de un macho en particular, los productores deberían considerar la introducción de un programa de IA.

Estos programas, al proporcionar una posibilidad viable de mejorar el rebaño, requieren mayores esfuerzos de la administración, pero producirán una más clara conciencia de cuáles son los problemas reproductivos que se presentan en el rebaño. Se requieren muy pocos equipos especiales para establecer un programa que funcione bien. Uno de los mejores usos de un programa de IA es la introducción de nueva genética en el rebaño usando semen comercial. El semen colectado en la misma granja es ideal para extender el uso de unos cuantos verracos superiores. Si se siguen unas cuantas sugerencias sencillas, la IA, usando semen fresco, producirá tasas de concepción y carnadas de un tamaño igual o superior a las que se logran con servicios naturales. El uso de semen congelado podría generar resultados menos favorables (10).

Estudios espermatológicos detallados mostraron que los predictores significativos de los efectos sobre los espermatozoides fueron diferentes niveles de motilidad y datos cinemáticos después de un tiempo de almacenamiento prolongado, prueba de termosistencia (tiempo de incubación prolongado), actividad mitocondrial, integridad y fluidez de la membrana (7).

La preservación líquida del semen de cerdo es un método preferido en la cría de cerdos, y los antioxidantes para proteger contra el estrés oxidativo de los espermatozoides durante los períodos de almacenamiento se han convertido en el foco de investigaciones recientes (11).

Las crioinjurias afectan la integridad de la membrana plasmática, el acrosoma y el núcleo de los espermatozoides, así como la función mitocondrial y la motilidad de los espermatozoides (12). El efecto neto de estos cambios es una disminución en la salud de los espermatozoides.

1.1. Integridad de la membrana espermática

La membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas. Estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionando así un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (13).

Específicamente, el estrés oxidativo induce la peroxidación lipídica de la membrana espermática, lo que implica una disminución de la motilidad de los espermatozoides, una reducción de la integridad de la membrana plasmática y un aumento del daño en el ADN, lo que resulta en disfunción espermática y pérdida de la capacidad de fertilización (14).

En la industria porcina, la IA sigue siendo la herramienta reproductiva más útil y aplicada para la cría de cerdos, reuniendo más del 90% de los casos en países occidentales y en desarrollo. Antes de que se lleve a cabo la IA, el semen de cerdo puede almacenarse en estado congelado a largo plazo o en estado líquido (17 °C) a corto plazo (15), siendo este último el método de conservación preferible. (15)

En el almacenamiento de líquidos a 17 °C, se ha informado ampliamente que la conservación prolongada de las muestras de semen implica un aumento de los niveles de ROS, lo que lleva a una disminución de la calidad del esperma y un posterior deterioro de la fertilidad (16); (15).

La evaluación de la integridad de membrana constituye una información

importante en la evaluación de la fertilidad del macho (17).

La integridad de la membrana espermática ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su papel clave en la función espermática; de hecho, el estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula (18).

Además, esta integridad no sólo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción acrosómica, y por ende para la fertilidad del macho (19)

La evaluación morfológica se realiza usando la óptica de contraste diferencial de interferencia o de Nomarski, la óptica de contraste de fase o las tinciones supravitales como el verde rápido/eosina, la eosina/azul de anilina, el azul tripán/Giemsa o el amarillo de naftol/eritrosina. También el examen a través de la microscopía electrónica de transmisión o de barrido ha sido valiosa para determinar aspectos de integridad espermática (20).

Sin embargo, la mayor parte de estas técnicas aportan solo información estructural parcial, y suelen ser tediosas y costosas; además, aun cuando alguna técnica morfológica informa de los daños de la membrana plasmática, estos resultados no siempre están correlacionados con la fertilidad del semen, a menos que el daño que presenten los espermatozoides sea muy importante (20).

De hecho, posiblemente la tinción más utilizada es la eosina-nigrosina, la cual es muy económica, asequible y fácil de realizar. Esta técnica tiñe de color rosado aquellos espermatozoides que presentan una membrana alterada, mientras que los espermatozoides vivos se observan de color blanco sobre un fondo púrpura. Uno de los primeros autores que utilizó la eosina como colorante vital fue Murosoff, en 1930 (16).

Si bien existen técnicas muy avanzadas como la citometría de flujo, se puede utilizar para evaluar muchos atributos de los espermatozoides, escapan al uso rutinario y práctico (21).

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 que se basan en la capacidad del espermatozóide para captar agua en un medio hiposmótico ocurriendo un enrollamiento del flagelo del espermatozoide que se desdobra cuando la célula es devuelta a un medio iso-osmótico, al evaluar la membrana plasmática; mientras que para la evaluación del acrósona, éste no muestra cambios en su estructura cuando no está alterado al ser sometido de igual manera a medios hiperosmóticos. Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno destacan las dos más utilizadas: el HOST y el ORT (17).

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. Estas pruebas se basan en los estudios de Drevius y Eriksson (1966), quienes demostraron la capacidad del espermatozóide de toro, conejo y hombre para captar agua en un medio hiposmótico. Estos autores observaron que la hinchazón osmótica está asociada con el enrollamiento de la cola del espermatozoide, que se desdobra cuando la célula era devuelta a un medio isoosmótico. Estos cambios fueron confirmados por otros autores que relacionaron este fenómeno con la capacidad funcional de la membrana del espermatozoide humano observando una alta correlación entre la capacidad de hinchamiento del espermatozoide humano en un medio hiposmótico y su capacidad de penetración en ovocito de hámster libre de zona pelúcida (22); (23); (24).

Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno destacan dos: El test de endósmosis y el test de resistencia osmótica.

1.1.1. Test de endosmosis o hiposmótica (HOST) (Hypoosmotic Swelling Test)

Este test o prueba fue descrito por (25), consiste en incubar espermatozoides en un medio hiposmótico, incubar y luego extender una pequeña fracción y evaluar aquellos espermatozoides que presentan la cola hinchada en respuesta a la gradiente osmótica. La prueba de hinchazón hiposmótica es una prueba de laboratorio simple que se utiliza para la evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática. Cuando los espermatozoides se colocan en una

solución hiposmótica, el agua se mueve dentro de la membrana celular y se producirá hinchazón de la membrana. Si la membrana ya está dañada, entonces no habrá hinchazón de la membrana.

La base del HOST es la semipermeabilidad de la membrana celular intacta, que induce la cola del espermatozoide a 'hincharse' en condiciones hipoosmótica debido a una afluencia de agua que conduce a un volumen celular ampliado (26)

El test de endosmosis consiste en someter al espermatozoide 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 interna con la del medio externo dando lugar a un aumento de volumen celular (27).

La entrada de agua provoca en esta célula un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Esta prueba estima la integridad de la membrana espermática, células espermáticas con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma del flagelo; en cerdos, si la presión osmótica es demasiado baja, la membrana plasmática se rompe y el flagelo aparece de nuevo recto, se confundiría con un espermatozoide que aún no ha reaccionado; sin embargo cuando aumenta el volumen del espermatozoide se debe a una expansión esférica de la membrana que cubre la cola originando que el flagelo se enrolle (28). Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo (29).

Los valores obtenidos en esta prueba se correlacionan con otros parámetros de calidad seminal, como la motilidad, la viabilidad o la morfología.

Esta prueba se ha aplicado en el semen del hombre; (30); (31), del toro (32) (33), del perro (34); (35); (36); (37), del caballo (38); (39)a y (40)b y del cerdo (41); (42)a y (43)b.

Por otra parte, presenta una elevada correlación con el test de penetración en ovocito de hámster en semen humano (44).

En humanos se ha encontrado una correlación elevada entre los resultados de HOST y los obtenidos en fecundación “in vitro” (45). En cerdos, si la presión osmótica es demasiado baja, la membrana plasmática se rompe y el flagelo aparece de nuevo recto, por lo que se confundiría con un espermatozoide que aún no ha reaccionado (42).

En la misma especie, el HOST detecta una subpoblación de espermatozoides viables que no reacciona al test, siendo así una prueba más sencilla a la hora de evaluar la viabilidad que la tinción de eosina-nigrosina o las tinciones fluorescentes (46). En la especie humana, el test HOST parece ser un buen método predictivo de la capacidad fecundante “in vitro” e “in vivo” del semen (47); (48), sin embargo, no todos los autores avalan estos resultados (49).

En los espermatozoides funcionalmente alterados no se produce la captación selectiva de agua de forma adecuada alcanzándose así un equilibrio pasivo entre los medios intra y extracelular que no provoca cambios morfológicos apreciables. 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 (50).

De esta manera, las alteraciones celulares atribuidas al glicerol parecen estar más relacionadas con un shock osmótico que con la toxicidad química (51); (52); (53); (54). 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.

1.1.2. Test de resistencia osmótica (Osmotic Resistance Test)

El Test de Resistencia Osmótica (ORT) fue descrito por Schilling y colaboradores (55) como una prueba de la calidad seminal que ha demostrado tener relación con la capacidad fertilizante del semen. Se basa en una incubación

prolongada del semen en un medio hiposmótico con la posterior valoración de los fenómenos osmóticos que ocurren en el acrosoma (56).

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 (57) y (58); (59), (60); (61).

Esta prueba se denomina test de resistencia osmótica (ORT) y presenta una correlación negativa con la capacidad fecundante del espermatozoide (62);. Por lo tanto, este test permite analizar el potencial reproductivo de los machos mediante el análisis de la calidad espermática. Se fundamenta en someter los espermatozoides a un medio hiposmótico, de forma que aquellos funcionales no mostrarán alteraciones a nivel acrosómico (63) b, c.

La prueba en sí consiste en diluir 100 a 200 microlitros de semen en 1 ml de una solución fisiológica ajustada a 300 mOsm/Kg incubándose durante 30 minutos. La evaluación del estado de los acrosomas tras esta incubación permite comparar la resistencia osmótica de las membranas de distintos eyaculados, así como predecir el comportamiento de estos tanto en lo referente a la fertilidad (58) como a la capacidad de conservación (55); (64).

Se ha creado una variante de esta prueba que se denominada ORT corto (ORTC) en el que el período de incubación se reduce a 5 minutos, de manera que puede ser usada dentro de la rutina diaria en los centros de inseminación artificial (65).

El test se ha desarrollado basado en el porcentaje de espermatozoides que presentan una alteración estructural evidente en el acrosoma tras su incubación en un medio hiposmótico, mediante esta técnica nos permite determinar la calidad espermática, determinándose la alta correlación que existe entre la motilidad y el número de acrosomas normales.

La reacción de los espermatozoides ante una solución hipoosmótica es un indicador de la funcionalidad bioquímica de la membrana que se necesita durante la fertilización, la capacitación, la reacción acrosómica y la unión del espermatozoide al óvulo (66).

La evaluación de la integridad del acrosoma junto con la morfología espermática y la resistencia osmótica constituyen las principales pruebas para evaluar la habilidad fecundante de los espermatozoides (67).

La evaluación de test de resistencia osmótica de la célula espermática cuando son expuestas a un medio hiposmótico tras una incubación de 30 minutos y luego se evalúa el estado de los acrosomas.

1.2. Dilutores para semen porcino (Manual Kubus, 2020)

El semen de cerdo se ha recogido y extendido en forma líquida (fresca) para la IA comercial durante más de 40 años. Los primeros extensores eran simples y servían para extender el volumen, mantener el pH, proporcionar equilibrio osmótico y servir como estabilizador de membrana. Hasta 1990, los extensores pudieron mantener la fertilidad *in vitro* durante 3 días antes de que se observaran disminuciones significativas. La extensión de la vida fértil más allá de 3 días fue un obstáculo importante hasta que se informó la adición de BSA al extensor (68).

Los dilutores deben cumplir dos objetivos principalmente:

- Permitir el grado máximo de extensión o aumentar el volumen del eyaculado sin afectar la calidad seminal.
- Conservar la capacidad fecundante de los espermatozoides durante el mayor tiempo posible.
- Los diluyentes de semen de verraco que se emplean en la inseminación artificial de las cerdas son una mezcla de productos químicos que han de asegurar la vida y la funcionalidad de los espermatozoides, es decir, su capacidad fecundante, desde el momento de su extracción hasta la inseminación y fecundación (69).

La composición del diluyente y la del agua en la cual será reconstituido han de asegurar la corrección en los siguientes parámetros:

- Presión osmótica del medio de suspensión de los espermatozoides.
- pH, pK y fuerza iónica de interacción entre los espermatozoides y su medio.

- Control de la precipitación de las proteínas y las aglutinaciones.
- Control de la acción enzimática sobre el semen, en particular de la que influye en el metabolismo y apoptosis de los espermatozoides.
- Preservación de la membrana celular de los espermatozoides.
- Capacidad de amortiguación de los cambios de los valores químicos, llamado efecto “tampón”.
- De los diluyentes se espera que también ejerzan un control sobre la contaminación microbiana.

Los diluyentes, aparte de su función como medio de conservación, han de servir de medio de transporte de los espermatozoides por las vías reproductivas de la cerda, asegurándoles la fuente de energía necesaria para tal esfuerzo. Las nuevas técnicas y herramientas de colocación de los espermatozoides en uno u otro punto del aparato reproductor, inclusive en la cercanía del ovario, así como el volumen cada vez menor de la dosis seminal, reducen la importancia de los componentes de los diluyentes que influyen sobre el estado de las mucosas del útero y de los cuernos uterinos (69).

Los diluyentes se presentan en forma de polvo para reconstituir en agua purificada o ya reconstituídos, en forma de líquido listo para su empleo, previa elevación de la temperatura del medio a la temperatura de los eyaculados. Según la capacidad de los diluyentes para ralentizar el metabolismo de los espermatozoides, las dosis seminales se clasifican en corta, media y larga conservación, por el tiempo en que éstos se conservan sin mermar sus facultades fecundantes a la hora de su empleo. Para permitir la acción correcta de los componentes del diluyente sobre los espermatozoides, está indicada la utilización de agua purificada, como mínimo bidestilada, no recomendándose el uso de cualquier otro tipo de agua que con- tenga minerales en su composición (69).

1.3. Tipos de dilutores para semen de porcino.

A nivel práctico en las condiciones actuales de producción los diluyentes se han clasificado en dos grandes grupos, los que tienen como objetivo la conservación

a corto plazo (menos de 1 a 3 días), o aquellos que tienen por objetivo la conservación a largo plazo (más de 4 días) (Ver Tabla 1).

Los diluyentes de corta duración se utilizan principalmente en estructuras de distribución de las dosis seminales a corta distancia (propias de los sistemas europeos, donde la producción de dosis seminales en la misma granja es frecuente) mientras que los diluyentes de largo plazo son propios de estructuras como las presentes en USA o Noruega donde la distancia entre el lugar de producción seminal y el lugar donde va a ser utilizado es grande.

Tabla **1**
Marcas de diluyentes agrupados por la duración

Corta duración (1 – 3 días)	Larga duración (más de 4 días)
Beltsville Liquid (BL-1)	Acromax®
Beltsville Thawing Solution (BTS)	Androhep®
Illinois Variable Temperature (IVT)	Modena
Kiev	MULBERRY III®
	Reading
	X-Cell®
	Zorlesco
	ZORPVA

Razas porcinas ¿Cómo se usan los diluyentes de semen para inseminación artificial porcina?
www.razaporcinas.com

Las ventajas que aportan los diluyentes de larga duración son la posibilidad de transporte a largas distancias, permiten realizar pruebas diagnósticas sobre el semen antes de ser utilizados, como pruebas mediante técnicas para detectar la presencia de diversos virus o análisis completos de la calidad seminal, permitiendo una mejor organización de las tareas en los centros de recogida seminal y facilitando en gran medida la distribución de las muestras a las granjas de reproducción. Los primeros diluyentes rusos estaban basados en soluciones

de glucosa con tartrato de sodio o potasio o sulfato sódico y peptonas, manteniendo en cualquier caso bajos niveles de electrolitos (70).

Posteriormente en la década de los 50, se produjo el desarrollo de los diluyentes para el ganado bovino, basados en yema de huevo con fosfato o citrato y leche, y se hicieron algunas adaptaciones para conservar semen porcino (70).

De entre todos, cabe destacar la adaptación del diluyente Illinois Variable Temperatura que se utilizaba para la conservación de semen en el ganado vacuno a temperatura ambiente (71).

Este IVT medio está basado en una solución de glucosa, citrato, bicarbonato y yema de huevo, pero necesitaba ser gaseado con CO₂ para reducir la actividad metabólica (Ver Tabla 2).

Tabla 2
Composición (en g/L) de los diluyentes de inseminación artificial porcina más utilizados

	IVT	Kiev	BTS	Zorlesco	MRA	ZORPVA	Reading	Modena	Androhep
Glucosa	3	60	37	11.5	+	11.5	11.5	25 ^a	26
Citrato sódico	24.3	3.7	6.0	11.7	+	11.65	11.65	6.90	8.0
EDTA		3.7	1.25	2.3	+	2.35	2.35	2.25	2.4
Bicarbonato sódico	2.4	1.2	1.25	1.25	+	1.75	1.75	1.00	1.2
Cloruro potásico	0.4		0.75		-				
Acetilcisteína	0.05								
HEPES									9.0
BSA				5.0	+			3.00	2.5
TRIS				6.5	-	5.5	5.5	5.65	
Ácido cítrico				4.1	-	4.1	4.1	2.00	
Cisteína				0.1	+	0.7	0.7	0.05	

Trehalosa											1	
PVA											1	1
Acetato potásico												+
MOPS												+
MOsm	290	380	330	240	290	275	300	282	309			
pH		7.2	7.2		6.9			6.9	6.8			

Nota: Razas porcinas (¿Cómo se usan los diluyentes de semen para inseminación artificial porcina? www.razaporcinas.com)

En la década de los 60, se produce una gran innovación consistente en la adición de un agente quelante (EDTA), que permitiría bloquear la acción del calcio como mediador de los procesos de capacitación y reacción acrosómica. Es cuando aparece el diluyente Kiev (72) que posteriormente ha sido modificado y recibido otras denominaciones (EDTA, Merck I, Plisko, Guelph). Este medio Kiev permitió una amplia difusión de la inseminación artificial porcina y todavía sigue utilizándose con éxito en nuestros días. En la década de los 70s, destaca la ingente labor que se realiza en el centro Beltsville (USA) acerca del estudio de las posibilidades de conservación de los espermatozoides porcinos. Bajo la dirección de Pursel y Johnson se realizan un gran número de ensayos para poner a punto diluyentes para refrigeración (BL-1, (73) y congelación (BF-5, Pursel y Johnson, 1975), pero sin duda la mayor difusión la alcanzan con el medio BTS (Betsville Thawing Solution, Pursel y Johnson, 1975) diseñado en un principio como medio de descongelación y que fue adaptado al semen refrigerado (74). Probablemente el BTS sea el más usado en la actualidad en todo el mundo. Este medio se caracteriza por añadir una pequeña cantidad de potasio, que permite mantener la actividad de la bomba sodio potasio y evita la reducción de potasio intracelular que estaría asociada con la disminución de la motilidad (25).

El primero de los diluyentes de los denominados de larga duración fue el Zorlesco (75), que se caracteriza por ser un medio bastante más complejo, con la adición de TRIS como regulador del pH, albúmina sérica bovina (BSA) y cisteína en su composición. Esta cisteína (como otros compuestos con grupos

sulfhidrilo) permitiría estabilizar las membranas e inhibir el proceso de capacitación (3)

La utilización de este diluyente en condiciones de campo no produjo unos resultados satisfactorios, en parte debido a desequilibrios en su composición que suponen una presión osmótica final reducida (240 mOsm, tabla 1). Posteriormente, Moretti (1981) crea el diluyente Modena, incrementando la proporción de glucosa y eliminando la BSA del medio Zorlesco, pero los resultados de fertilidad obtenidos tampoco son satisfactorios (74); (76).

Por otra parte, en España, Santiago Martín Rillo y Eulogio Alias desarrollan el medio MR-A (77) y aunque no se ha hecho pública su composición cuantitativa (protegida por razones comerciales) si la cualitativa. Este medio ha dado muy buenos resultados como diluyente de larga duración.

En esta misma época se diseñaron dos diluyentes de larga duración en el Reino Unido, ZORPVA y Reading. Estos son medios complejos basados en el medio Zorlesco ligeramente modificado y al que se le añade alcohol de polivinilo como macromolécula (PVA) con lo que mejora el porcentaje de acrosomas intactos. Estos diluyentes suponen un coste superior (149 – 163%, (78) a los diluyentes de corta duración y con unos resultados no superiores a los obtenidos con otros diluyentes (78), por lo que realmente no se ha extendido su uso.

Wietze (68) , presenta el diluyente Androhep, que se caracteriza por contener HEPES como regulador del pH, la adición de BSA, para compensar el efecto dilución de las proteínas del plasma seminal y por presentar una presión ligeramente hipertónica (309 mOsm). Este diluyente ha tenido una importante aceptación en el sector como diluyente de larga conservación.

En los últimos años han aparecido nuevos diluyentes (Acromax, X-Cell, Androhep Plus, Vital, SpermAid, Mulberry III, etc.) que se encuadran dentro del grupo de larga duración. Lamentablemente, la composición cuantitativa de estos medios no es conocida, ya que está protegida por razones comerciales y, aunque no dudamos de las bondades de estos diluyentes, hasta el momento se dispone de escasa información de los resultados de fertilidad en estudios comparativos realizados por centros independientes, por tanto, deberemos esperar hasta que esta información se haga pública. En cuanto a los diluyentes empleados en los procesos de congelación del semen porcino hemos de decir que están basado es

en la utilización de la yema de huevo y glicerol como agentes crioprotectores, una concentración elevada de azúcares y la adición de un agente detergente (Orvus et paste). De los diluyentes utilizados destacamos el medio lactosa-yema de huevo que es el más frecuentemente empleado y el descrito por Pursel y Johnson (1975) denominado BF-5, en cuya composición se incluye glucosa, yema de huevo y Tris como agente regulador del pH, que se utiliza en los procesos de congelación en píldoras (pellets) sobre nieve carbónica.



CAPITULO METODOLOGIA

II:

1. Muestras de semen porcino, recolección y envío a análisis.

La evaluación convencional del semen en las diferentes especies incluye diversos parámetros macroscópicos (volumen, color, olor) y microscópicos (concentración, motilidad, morfología y viabilidad). Pero los valores obtenidos a partir de un espermograma básico no son indicadores de fertilidad, sino que son indicadores de la funcionalidad del macho, así como de su ciclo hormonal y espermatogénico. (25)

- Las muestras de semen comercial serán obtenidas de 5 verracos de 5 diferentes empresas comercializadoras de semen refrigerado porcino de la ciudad de Arequipa.
- Se adquirieron apenas fueron recolectadas y diluidas, para lo cual se coordinó previamente con los proveedores para garantizar este requerimiento.
- Se conservaron a refrigeración a una temperatura alrededor de los 15-17 °C.
- Las evaluaciones de laboratorio se realizarán en las Instalaciones del Laboratorio de Diagnóstico Clínico Diagnovet SAC, ubicado en Mariscal Benavides Nro. 301 Urb. Selva Alegre. Arequipa.
- El presente estudio de investigación se realizó durante los meses de enero a marzo del 2021.
- El grupo de estudio estuvo conformado por el total de 5 muestras comerciales evaluadas.
- Se considerará como unidad de estudio una dosis de semen porcino refrigerado, recién diluido.
- Cada muestra de semen se separó en tres partes.
- Una fracción se utilizó para la evaluación del semen por método habitual de motilidad.

- La segunda fue sometida a una prueba de endosmosis o de hinchazón hipoosmótica (HOST) mediante el uso de una solución de 150 mOsm / L citrato de sodio y soluciones de fructosa (0.375 g de citrato de sodio dihidratado y 1.351 g de D-fructosa en 100 ml de agua destilada), (OMS, 2010).
- La tercera se evaluó mediante el Test de resistencia osmótica (O.R.T) mediante el uso de una solución de 100 mOsm / L.
- Los datos obtenidos de las evaluaciones microscópicas y principalmente funcionales, con los test de endosmosis HOST y de resistencia osmótica ORT, serán registrado en sus respectivas POE (Anexo 6).
- Los resultados se interpretarán registrando % de espermatozoides que responden en ambos test y categorizando, así mismo se usarán mediadas de tendencia central y dispersión. Se comparará ambos test mediante la prueba de T Student para muestras para determinar que exista o no, diferencia significativa

2. Evaluación de algunos parámetros microscópicos del semen porcino.

2.1. Motilidad.

La motilidad fue evaluada en forma subjetiva.

- Se diluyó el semen en solución fisiológica temperada a 37 °C y se observaron los espermatozoides a 400x (Ax y col., 2000), calculando el porcentaje (%) de espermatozoides con movimiento hacia adelante.

2.2. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides del semen porcino.

Se realizo mediante la aplicación de dos pruebas:

2.2.1. Test de endósmosis o HOST o HOS (Hypo Osmotic Swelling Test) (Kubus, 2010) Descrita por Jeyendran y col. (1984).

Se valora el porcentaje (%) de espermatozoides con membrana sin alteración estructural que sufren de enrollamiento de cualquier grado de la cola tras la incubación en un medio hiposmótico.

- Para ello se incubaron en un baño maría 37 °C, una solución hiposmótica por 10 minutos.
- Adicionamos 100 µl de semen en 1 ml de una solución hipoosmótica (150 mOsm/Kg).
- Incubamos la mezcla de semen con la solución hipos motica por 30 minutos a 37 °C en la incubadora.
- Tras la incubación se extrae una pequeña fracción de 10 uL de la solución
- Se extiende al portaobjetos limpio.
- Se fija una muestra en una solución al 0.2% de formaldehído o glutaraldehído.
- En relación 1: 1
- Se cubre con un cubreobjetos.
- Se observa al microscopio.
- La evaluación de la lámina portaobjetos fue realizada utilizando un microscopio óptico a 400x.
- Aquellos espermatozoides que presentaron la cola hinchada en respuesta a la gradiente osmótica fueron considerados espermatozoides con membrana plasmática íntegra y funcional.
- Para tal efecto, se contaron un mínimo de 200 espermatozoides por lámina
- Los resultados se expresan en porcentaje de espermatozoides con reacción positiva a la prueba (% HOST+).

Tabla

3

Resultados del Test de HOST.

Sample ID	Result (% swollen)	Interpretación		
		Normal	Equivocal	Abnormal
		≥60%	50-59%	<50%

Nota: Carrell y col, 2013.

2.2.2. Test de resistencia osmótica (O.R.T) (Kubus, 2010).

Este test permite hacer una valoración de la resistencia de las membranas del espermatozoide a través de unas pruebas de resistencia frente a la temperatura durante un período prolongado de incubación y frente a un choque osmótico, con lo que queda de manifiesto la resistencia de la membrana espermática, especialmente la acrosómica.

- Se colocaron 3 ml de diluyente isoosmótico en un tubo de ensayo y en otro 3 ml de diluyente hipotónico a 37 °C (100 mOsm/Kg) que era una mezcla de una parte de dilutor comercial y dos partes de agua destilada.
- Se añadió 0,2 ml de la fracción espermática del eyaculado a cada tubo con los diluyentes preparados anteriormente y se incubaron en baño de María a 37 °C.
- A los 15 minutos de incubación, se tomó una muestra de la dilución con diluyente isoosmótico, y se fijó con la solución de formaldehído o glutaraldehído y se calcula el porcentaje de acrosomas normales (a).
- A las 2 horas de incubación, se tomó una muestra de la dilución con diluyente hipotónico, se fijó de la misma manera y se calculó el porcentaje de acrosomas normales (b).

El cálculo del valor O.R.T. se realizó calculando la media de los dos recuentos

$$O.R.T. = \frac{\% \text{ Acrosomas } a + \% \text{ Acrosomas } b}{2}$$

La categoría de O.R.T se obtiene con la tabla siguiente:

Tabla

4

Categorías de ORT para semen porcino.

Categorías	Valores de O.R.T.
Categoría 1	69-100
Categoría 2	59-68
Categoría 3	0-58

Nota: Kubus, 2010.

La categoría 1 corresponde a las clases 4 y 5, la categoría 2 corresponde a la clase 3 y la categoría 3 a los grupos 1 y 2 de la clasificación de Schilling (1986):

Tabla

5

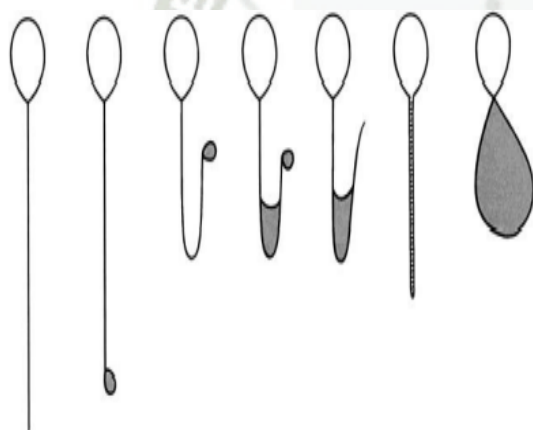
Correspondencia entre categorías y clases

Categorías	Valores de O.R.T.
Clase 1	36-46
Clase 2	47-57
Clase 3	58-68
Clase 4	69-79

Nota: Kubus, 2010

Gráfico 1

Reacción de la estructura espermática frente al test de HOST



The left most cell: no change

Other cells: various types of tail changes due to swelling

(Source: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2010)

Nota: Hypo-osmotic Swelling Test [HOS.pdf \(fertiapro.com\)](http://fertiapro.com)

CAPITULO

III:

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Motilidad espermática masal en muestras de semen porcino comercial conservados con dilutores de larga duración.

Se realizó la determinación de la motilidad espermática de las 5 muestras comerciales de semen refrigerado porcino, con 7 evaluaciones por muestra de cada verraco, desde las 0 a las 144 horas, haciendo un total de 35 evaluaciones, obteniéndose los siguientes resultados debatibles en las posteriores discusiones:

Tabla

6

Resumen de evaluación de la motilidad masal de espermatozoides porcinos desde las 0 hrs hasta las 144 hrs.

Tiempo de Evaluación (Hrs)	MOTILIDAD MASAL					
	M1	M2	M3	M4	M5	PRO +-DS
0	91	88	90	94	95	91.6 +-2.57
24	89	87	85	90	91	88.4 +-2.15
48	76	79	81	83	88	81.4 +-4.02
72	64	72	76	79	80	74.2 +-5.81
96	60	69	65	71	77	68.4 +-5.71
120	53	60	62	62	71	61.6 +-5.74
144	50	53	58	53	68	56.4 +-6.34

Elaboración propia, 2021.

Indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En la tabla No. 6, se puede observar el porcentaje promedio de la motilidad masal obtenido subjetivamente al inicio del trabajo de investigación al evaluar las muestras, los cuales son de 91,6 % de motilidad masal al momento de adquirir las dosis seminales, nuestros resultados se comportan dentro de los valores encontrados por diferentes autores (65); (79), superiores a los parámetros reportados por (80) quienes encontraron un 83.40 %; (81) con 85 %; Suarez (1996), quien también obtuvo un 85 % de motilidad en el primer día; (82) con 84,76 %; (83), los cuales evaluaron eyaculados de cerdos de la raza Hampshire, Duroc y Landrace obteniendo valores de motilidad de 80 % +-2%. Por otra parte, son inferiores a los obtenidos por Henao y col, (84) que establecieron valores de motilidad de 94,1 %; y a los de Fuentes (2017),

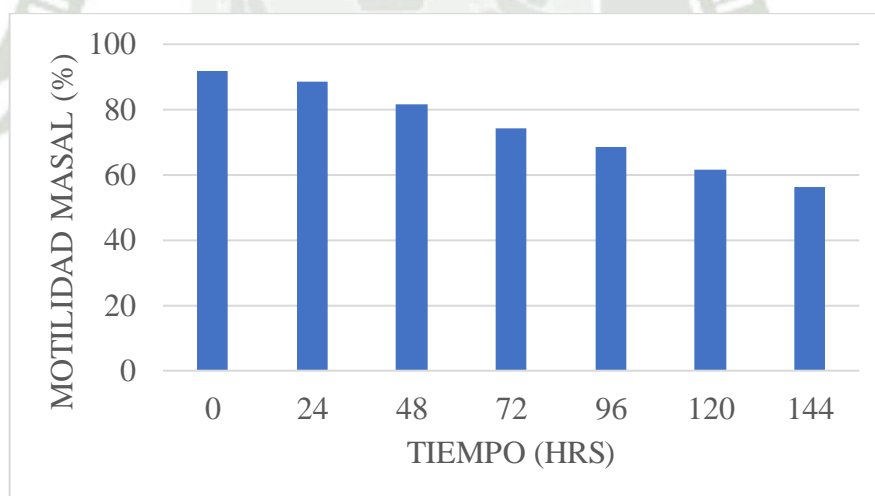
(36) el cual obtuvo valores de motilidad de 96,05% con dilutores en base a agua de coco, pero superiores a los obtenidos por este mismo autor con dilutor MRA con 88,35%.

El hecho de que se haya presentado diferencias en los porcentajes de motilidad masal espermática de las muestras en la presente investigación podría deberse a las diferencias entre las raza de sementales, así como las edades y condiciones ambientales y de mantenimiento del semen refrigerado, lo que podemos corroborar estadísticamente al ver que durante las primeras 24 horas la variabilidad es mínima, la cual conforme pasa el tiempo de refrigeración y conservación espermática aumentan progresivamente la variabilidad y dispersión de los datos.

Según la valoración de la motilidad de todas las muestras, nuestros resultados son superiores al 50%, lo cual nos indica que no hemos rechazado ninguna muestra.

Gráfico 2

Determinación de la motilidad espermática en muestras de semen comercial con dilutores de larga duración.



En el gráfico No. 02, se puede observar claramente el detrimento de la motilidad en cuanto al tiempo de conservación en refrigeración del semen comercial de porcino, el cual decrece de 91,6 % a 56,4%. Esto probablemente se debería una alcalinización del medio, pérdida de la integridad de la membrana, estrés oxidativo y la sedimentación espermática, lo que provocaría un microambiente no beneficioso para los espermatozoides.

De los tres parámetros evaluados en esta investigación, el parámetro que más se modificó en el tiempo fue la motilidad, los valores de motilidad entre las 24 - 48 hrs y 48 -72 hrs. de conservación.

Este resultado es consistente con lo expresado por algunos autores quienes señalan el día uno como el de mayor disminución de la motilidad, si bien otros (85) han encontrado el mayor descenso de movilidad a las 72 hrs

2. Integridad y funcionabilidad de la membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA) de los espermatozoides del semen porcino comercial conservados con dilutores de larga duración.

Se realizaron para su evaluación de los test o pruebas, cuyos resultados pasamos a detallar y explicar, según el procedimiento:

2.1. Test de endósmosis o HOST o HOS (Hypo Osmotic Swelling Test) (Kubus, 2010), descrita por Jeyendran y col. (1984).

Se realizó la determinación de la integridad y funcionabilidad de la membrana plasmática (MP) espermática de las 5 muestras comerciales de semen refrigerado porcino, con 35 evaluaciones, donde se valoró el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática sin alteración estructural que sufren enrollamiento de la cola de cualquier grado, tras la incubación en un medio hiposmótico, obteniéndose los espermatozoides positivos al test de endosmosis (HOST+) con los siguientes resultados debatibles en las posteriores discusiones:

Tabla 7

Resumen del efecto del tiempo de evaluación en el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Endosmosis o Hiposmótico (HOST+)

Tiempo de Evaluación (Hrs)	ESPERMATOZOIDES REACTIVOS AL TEST HOST+ (%)						
	M1	M2	M3	M4	M5	PRO +-DS	CV %
0	87	84	88	91	89	87,8+-2,32	2,64
24	83	83	84	88	86	84,8+-1,94	2,29
48	80	80	79	83	81	80,6 +- 1,36	1,69
72	79	78	77	80	78	78,4+-1,02	1,30
96	76	76	73	75	76	75,2 +- 1,17	1,56
120	75	72	70	71	72	72,0 +-1,67	2,32
144	69	71	70	60	69	67,8+-3,97	5,86
							2,52

Elaboración propia, 2021.

Indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Los espermatozoides porcinos mostraron los típicos cambios morfológicos observados a nivel de la cola en espermatozoides humanos, con diferentes grados de hinchazón de la cola y rizado, como respuesta al estrés hiposmótico.

En la Tabla 7, podemos interpretar que casi la totalidad de los espermatozoides (87,8 %) que al final del experimento reaccionaron al test o prueba de HOST+, mostraron los cambios a partir de 1 hora de incubación en la solución hiposmótica. Estos cambios observados a partir de la primera hora de incubación son similares a los observados al final del experimento.

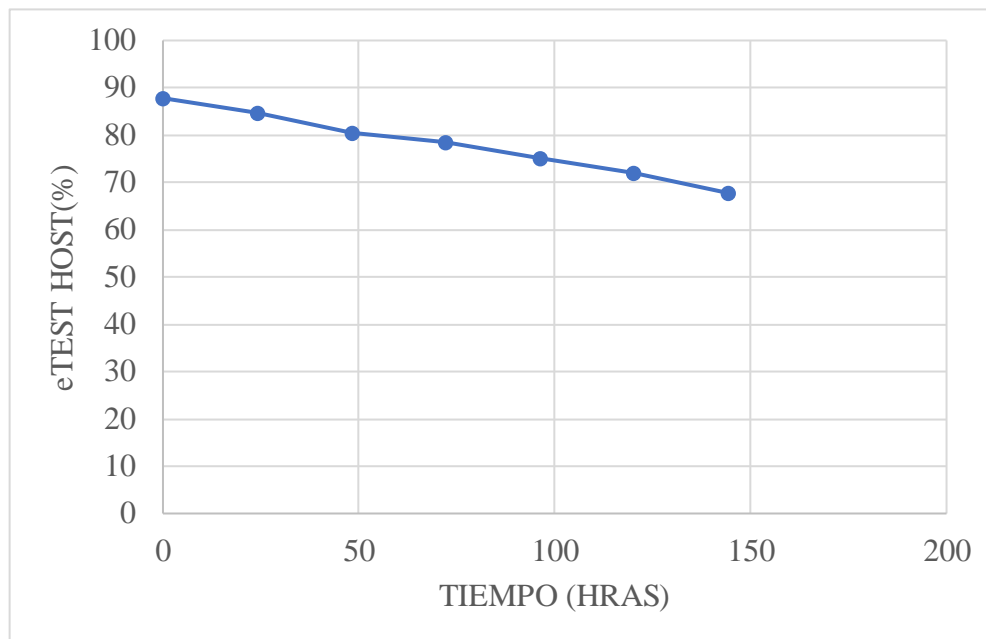
El porcentaje de disminución en el tiempo (% día 0 - % día 7) de los espermatozoides reactivos al test de HOST+ evaluados fue similar para los 5 verracos ($p < 0,05$).

En todos los casos se obtuvo un coeficiente de variación (CV) que presentó una diferencia menor al 3% entre las lecturas de los distintos días (de 0 - 144 horas), lo que da cuenta, a priori, de la similar y baja variabilidad de las muestras comparadas respecto de la media de cada lectura.

La integridad y actividad funcional de la membrana espermática es de gran importancia en el proceso de fecundación, siendo este parámetro un indicador de la capacidad fertilizante del espermatozoide de incubación no serían necesarios, pues los porcentajes de espermatozoides reaccionados no aumentan significativamente. Los cambios se explican por el ingreso de agua al medio intracelular espermático como respuesta a un bajo gradiente osmótico extracelular. De esta manera, sólo aquellas células que mantengan funcional sus membranas fueron las que pudieron responder al HOST.

Gráfico**3**

Efecto del tiempo en el porcentaje de espermatozoides reactivos al test de HOST.



Debido a que la estructura y funcionalidad de la membrana espermática son esenciales para mantener la viabilidad y la capacidad fertilizante de espermatozoides, es necesario evaluar la integridad de la membrana a través de pruebas de laboratorio. Los eventos que ocurren durante la fertilización como son la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión espermática al ovocito, requieren de una membrana activa. La fertilización no ocurre si la membrana esta estructural o físicamente intacta, pero bioquímica y funcionalmente inactiva (81).

Se ha reportado una correlación de 0,90 ($p < 0,001$) entre el porcentaje de espermatozoides capaces de sufrir hinchamiento en el HOST y el porcentaje de ovocitos de hámster desnudos penetrados por espermatozoides (IFHO) (75). De igual forma se ha encontrado relación estrecha ($r \sim 0,90$; $p < 0,001$) entre el porcentaje de espermatozoides reaccionados y los resultados de fertilización in vitro (FIV) en humanos, (47).

2.2. Test de resistencia osmótica (O.R.T) (Kubus, 2010), (Schilling, 1986).

Se realizó la evaluación de la integridad y funcionabilidad de la membrana plasmática y la acrosómica, de las 5 muestras comerciales de semen refrigerado porcino, con 4 repeticiones, valorando la resistencia de las membranas del espermatozoide a través de pruebas de resistencia frente a temperatura durante un periodo prolongado de incubación y frente al choque osmótico, obteniéndose los siguientes resultados debatibles en las posteriores discusiones:

Tabla 8
Resumen del efecto del tiempo de evaluación en el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Resistencia Osmótica (ORT).

Tiempo de Evaluación (Hrs)	ESPERMATOZOIDES REACTIVOS AL TEST ORT (%)						
	M1	M2	M3	M4	M5	PRO +-DS	CV %
0	94	90	91	95	97	93,4+-2,58	2,76
24	91	86	89	92	95	90,6+-3,01	3.32
48	88	82	83	89	90	86.4 +- 3,26	3.77
72	85	81	81	85	87	83,8 +-2,4	2,86
96	80	79	78	82	83	80,4 +- 1.85	2,30
120	78	75	74	77	80	76,8 +-2,14	2,79
144	72	70	71	74	76	72,6+-2,15	2.96

Elaboración propia, 2021.

Indican diferencias significativas ($p < 0,01$)

Como podemos observar en la Tabla 8, los valores obtenidos para el test de ORT, varían desde 72,6% a 93,4 % durante los 7 días de la refrigeración espermática de las dosis seminales. Se señala que 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 (86)

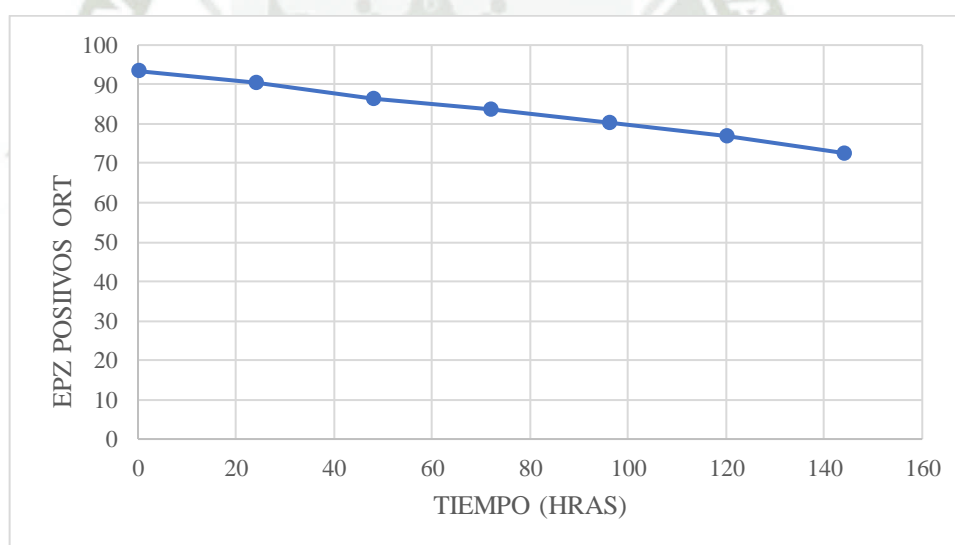
La integridad y actividad funcional de la membrana espermática es de gran importancia en el proceso de fecundación, siendo este parámetro un indicador de la capacidad fertilizante (87) de los espermatozoides humanos, permite diferenciar entre individuos fértiles e infértiles, además de los espermatozoides vivos sin motilidad

En nuestro estudio, sólo se ha trabajado con semen refrigerado, y por lo tanto todos los valores obtenidos en cuanto a motilidad, e integridad de la membrana plasmática (MP) y membrana acrosomal (MA) son altos. Sin embargo, sería de gran importancia el empleo del test de HOS en la evaluación de espermatozoides luego de haber experimentado diversos procesos que puedan alterar la fisiología de la membrana plasmática como son la congelación.

Gráfico

4

Efecto del tiempo en el porcentaje de espermatozoides reactivos al test de ORT



2.3. Comparación entre el Test de HOST y el ORT

Se realizó la comparación entre el test de HOST y ORT, mediante una inferencia estadística para dos muestras y mediante la prueba estadística de T Student, para muestras independientes, para así comparar sus medias y su homogeneidad de varianzas, así como su valor y nivel de significancia de la integridad estructural de la membrana celular plasmática (MP) y la membrana acrosomal (MA) de los espermatozoides y su funcionabilidad en las 35 muestras comerciales de semen

refrigerado porcino, obteniéndose los siguientes resultados debatibles en las posteriores discusiones:

Tabla**9**

Comparación entre el efecto del tiempo de evaluación y el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Endosmosis o Hiposmótico (HOST+) versus los espermatozoides porcinos positivos al Test de Resistencia Osmótica (ORT)

Tiempo de Evaluación (Hrs)	TEST HOST (%)	TEST ORT (%)
0	87,8	93,4
24	84,8	90,6
48	80,6	86,4
72	78,4	83,8
96	75,2	80,4
120	72,0	76,8
144	67,8	72,6
Media	78,9	83,43
Varianza	49,50	55,03
EE	2,66	2,80
CV	9,01	8,89
Mediana	78,40	83,80
Q1	72,00	84,80
Q3	84,80	90,60
Asimetría	- 0,07	-0,12
Kurtosis	-1,13	-1,18

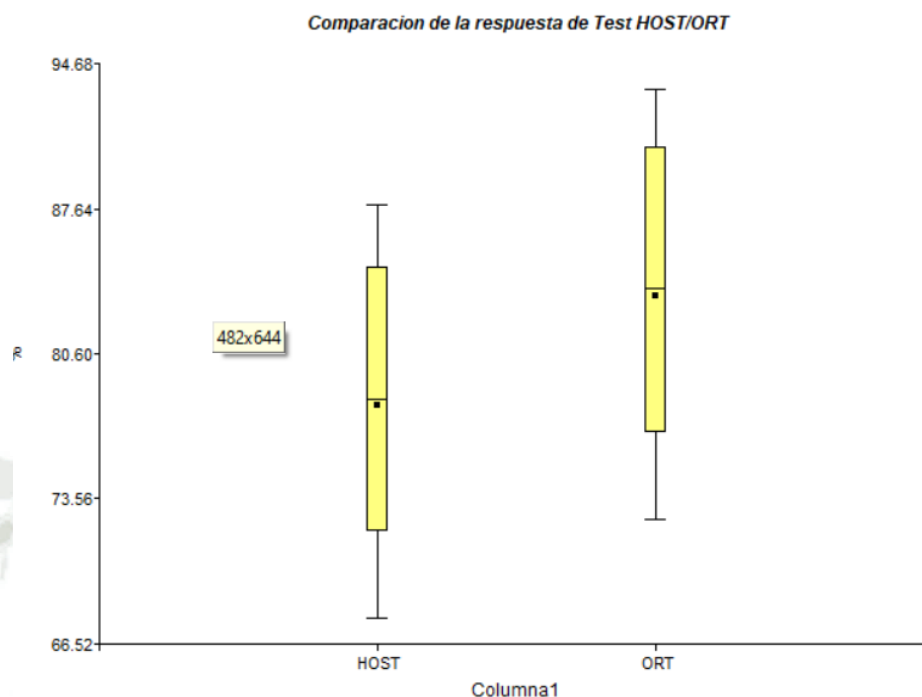
Elaboración propia, 2021.

Indican que no existe diferencias significativas ($p > 0,05$)

Gráfico

5

Comparación de los Test de HOST/ROS

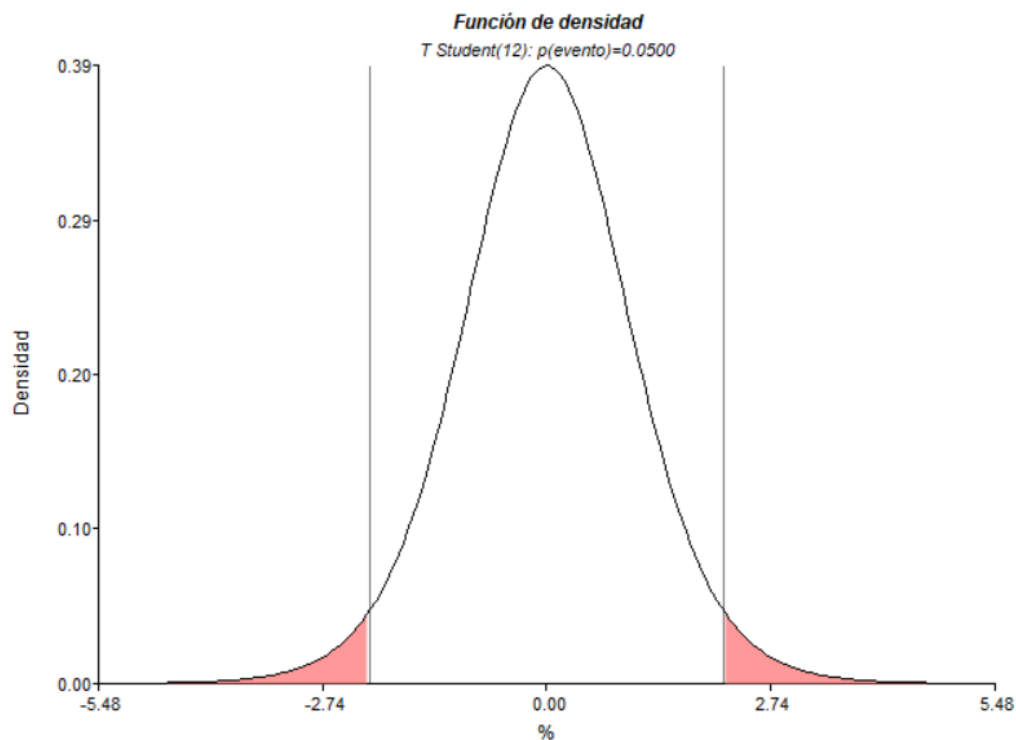


En el grafico Bloxplot, podemos comparar los resultados de ambos Test, en el cual podemos observar que las medianas están muy cerca de los valores de la media y por debajo, lo que nos indica que existe una muy leve asimetría hacia la izquierda en a la distribución de los datos. Así también nos indica que el 25% de los porcentajes en el Test de HOST están por debajo de 72% y el 25% están por encima de 84.80%, mientras que en el Test de ORT el 25% están por debajo de 84.80% y el 25% por encima de 90,60%. Ambos presentan CV pequeños, EE bajos, por ello la poca dispersión de los datos. Así mismo ambos test en la distribución presentarían curvas platicurticas.

Gráfico

6

Función de densidad para los Test de HOST/ROS



Al realizarse la inferencia estadística para dos muestras con la prueba de t para muestras independientes y al aplicarse un contraste bilateral, obtenemos un p valor de 0,1920 lo que nos indica que es no significativo, con lo que aceptamos la hipótesis nula. Es decir, no existe diferencia estadística entre la media del Test de HOSt y la media del Test de ORT.

En el Grafico No.6, el % de la función de densidad nos señala las zonas de rechazo en un contraste bilateral, con un 95% de confianza de que los valores de las medias de ambos test son estadísticamente iguales.

A pesar de que no existe significancia para ver la diferencia entre ambos test, debemos de considerar que existe correlación entre sus valores y los valores medios de motilidad, viabilidad, morfología de tipo significativa.

Trabajos recientes sobre cambios en la membrana provocados por el enfriamiento han indicado similitudes con los cambios capacitivos. Por lo

tanto, el efecto del enfriamiento puede ser inducir capacitación prematura (y desestabilización). Tal efecto comprometería en gran medida el potencial de fertilización de los espermatozoides.

La membrana plasmática de los espermatozoides de mamíferos, sin excluir los porcinos, es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas. Estructuralmente es heterogénea y presenta cinco dominios diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola. Cada una de estas regiones presenta diferentes funciones fisiológicas y contribuye separadamente al estado del espermatozoide. (88); (89).

Antes y después de la eyaculación, la membrana espermática sufre cambios que están asociados a la capacidad fecundante de los espermatozoides. Diversos eventos ocurren durante el proceso de fertilización: capacitación, reacción acrosomal y fusión del espermatozoide a la superficie del ovocito.

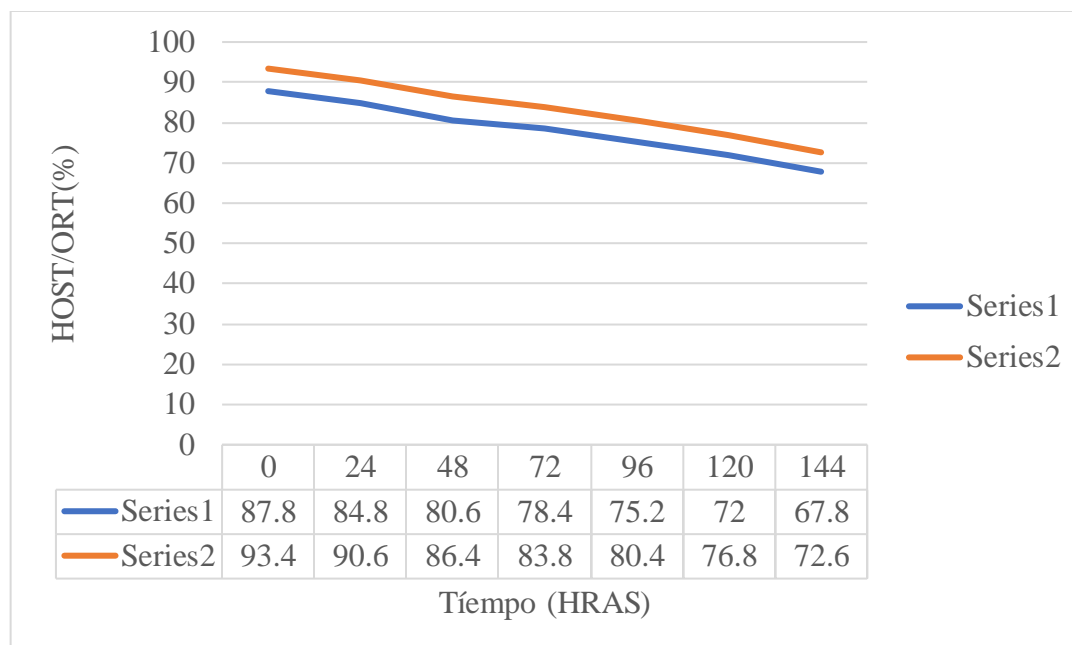
Todos ellos requieren de la actividad bioquímica de la membrana (90) y, por lo tanto, es muy importante evaluar la estructura e integridad funcional de la misma. (91); (92).

Al comparar ambos Test, podemos decir que existen diferencias significativas entre ambos. Si bien, el ORT, como una prueba de la calidad seminal que ha demostrado tener relación con la capacidad fertilizante del semen. Se basa en una incubación prolongada del semen en un medio hiposmótico con la posterior valoración de los fenómenos osmóticos que ocurren en el acrosoma (93), mientras en el HOST, el fenómeno osmótico observado necesita de la integridad estructural y funcional de la membrana (94).

Gráfico

7

Comparación del tiempo en el porcentaje de espermatozoides reactivos al test HOST /ORT.



Si podemos comparar el test de HOST y el ORT, podemos indicar que el primero es una prueba más rápida, sencilla y de fácil lectura.

A partir de 60 minutos, la mayoría de los espermatozoides (97.7 %) experimentaron los cambios morfológicos que han sido descritos en espermatozoides de humanos (95).

Por lo tanto, mayores tiempos de incubación no serían necesarios, como es el caso del test ORT tradicional, pues los porcentajes de espermatozoides reaccionados no aumentan significativamente. Los cambios se explican por el ingreso de agua al medio intracelular espermático como respuesta a un bajo gradiente osmótico extracelular. De esta manera, sólo aquellas células que mantengan funcional sus membranas fueron las que pudieron responder al HOST. La variante del test ORT corto sería una mejor alternativa.

Según la evidencia proporcionada en el presente trabajo de investigación, la cual concuerda con Baiee (2020) (96), en que la prueba HOST proporciona claramente información fisiológica sobre la función de los espermatozoides,

mucho más allá de la mera determinación de si un espermatozoide es vivo o muerto. Es un indicador de fertilidad en algunas especies como es el caso de los porcinos. Por esa razón, la prueba HOST debería definitivamente clasificarse como una prueba de viabilidad de los espermatozoides, no como una prueba de vitalidad.

La función de membrana contribuye con un papel clave en varias competencias de la función de los espermatozoides, es decir, la capacitación, la reacción acrosomal y fecundación. La desintegración de membrana, se sugiere que está asociado con el fracaso de la implantación y aborto espontáneo (97) HOST es una prueba de vitalidad utilizada para revelar la integridad de la membrana espermática y no sólo es útil en el aumento de las tasas de fertilización en casos de completa astenospermia, pero también se puede utilizar para evaluar la fragmentación del ADN de los espermatozoides (98); (99).

La prueba HOST o de resistencia hipotónica distingue los espermatozoides con diferentes capacidades en la función de Na^+/K^+ y Na^+/H^+ en el intercambio de la membrana del espermatozoide y que existen los patrones mínimos de hinchazón, se supone que contienen una mayor competencia de membrana.

Sin embargo, un alto nivel de hinchazón significa alteración de Na^+/K^+ función ATPasa. Se sugiere que la función de membrana sensible a HOST sea vinculada con menos o ningún daño en el ADN (99).

Por lo tanto, este hallazgo sugiere que HOST es clínicamente aplicable para seleccionar espermatozoides de mejor calidad en porcinos.

El espermatozoide porcino es extremadamente sensible a la peroxidación lipídica, debido a la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de membrana y a la baja capacidad antioxidante del plasma seminal, generando una excesiva formación de radicales libres, perjudicando aún más la integridad y funcionalidad de las membranas (100).

En el presente trabajo se ha encontrado que la prueba HOST y ROS, permitirían evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática y que estos valores pueden ser relacionados con los espermatozoides viables que presentan intacto su

acrosoma. Escasos datos de literatura han demostrado una relación positiva entre la ORT y la fertilidad de los verracos como lo comunicado por Shilling (101); y algunas características del semen.

Sin embargo, la correlación con la motilidad espermática es muy débil. Esto indicaría que, la evaluación tradicional de la motilidad espermática en los diferentes trabajos con espermatozoides no representa un parámetro confiable para poder estimar la capacidad fecundante de la muestra.



CONCLUSIONES

- Primera:** No existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores de porcentajes resultantes de las medias del Test de HOST y el de ORT, para muestras relacionadas evaluadas desde las 0 hasta las 144 horas del proceso de refrigeración del semen porcino, con poca variabilidad a pesar del tamaño pequeño de la muestra.
- Segunda:** La integridad de la membrana plasmática, evaluada mediante el Test de HOST, vario desde 87,8 % a 67,8 %, con muy poca variabilidad al final del proceso de refrigeración del semen porcino comercial.
- Tercera:** La integridad de la membrana acrosomal, evaluada por el Test de ORT, vario de 93,4 % a 72,6% con una pequeña variabilidad al final del proceso de refrigeración del semen porcino comercial.

RECOMENDACIONES

Primera: Sería conveniente seguir realizando estudios que orienten al descubrimiento de mejores técnicas de laboratorio para asegurar la capacidad fertilizante del semen criopreservado de porcino.



Bibliografía

1. **Knox, R. V.** *Artificial insemination in pigs today*. 83-93, 2016, *Theriogenology*, Vol. 85.
2. Bonet, S. I. Casas, W. V. Holt, & M. Yeste (Eds.). **Gil, Rodriguez , J, E and E., Estrada.** *Inseminación artificial en la reproducción de jabalíes*. En 589-608, 2013, *Boar reproduction*.
3. **Johnson, L. A. et al.** *Storage of boar semen. 2000. Anim. Reprod. Sci.* 143-172.2, 2000, Vol. 63.
4. **Theerapat, Ratsiri, et al.** *Evaluación del semen de jabalí criopreservado después de la suplementación con sericina en forma de gusano de seda (Bombyx mori) en el extensor de semen* <https://doi.org/10.1111/asj.13428>, 06 2020, Doi.org.
5. **Maynou, Ribas, et al.** *Papel de los antioxidantes exógenos en el rendimiento y la función del espermatozoide de cerdo después de la preservación en estados líquidos y congelados: una revisión sistemática*. 279-29, 10 2021, *Teriogenología*, Vol. 173.
6. **Becerril, J. M.** *Manejo del semen y desarrollo de la inseminación artificial*. México : s.n., 2000.
7. **Singleton L. W.** *Estado del arte en inseminación artificial de cerdos en los Estados Unidos* Número 8, EE.UU. : s.n., 2001, Vol. Volumen 56. 1305-1310.
8. **Veterinaria., Portal.** [Online] 2020. <https://www.portalveterinaria.com/porcino/articulos/2730/manejo-del-semen-desarrollo-de-los-programas-de-inseminacion-artificial.html>.
9. **Waberski D, Riesenbeck A, Schulze M, Weitze KF, Johnson L.** Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges. [Online] 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>.
10. **Becerril, J. M.** *Manejo del semen y desarrollo de la inseminación artificial* México : s.n., 2000.
11. **Reed and Col.** *Current use of frozen boar semen. Future need of frozen boar semen. Deep freezing of boar semen*. Current use of frozen boar semen. Future need of frozen boar semen. Deep freezing of boar semen, Ed Johnson LA, Larsson K. Swedish University of Agricultural Sciences. 225-237. 2019. 255-237.
12. **johnson, et al.** *Storage of boar semen. 2000. Anim. Reprod. Sci.* . 2000. pp. 143-172. 62.
13. **Hammerstedt, RH JK, Graham and JP, Nolan.** *Cryopreservation of mammalian*

- sperm: what we ask them to survive.* 1990. pp. 73-88.
14. **Lamirande,E P, Leclerc and C, Gagnon.** Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.3.175>. [Online] 1997. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.3.175..>
 15. **Yeste.M** *State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state.* [Online] 2017. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR895>.
 16. **Aitken,RJ and, Baker,MA.** *Oxidative stress, sperm survival and fertility control.* [Online] 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>.
 17. **Jevendran,RS et al.** *Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.* [Online] 1984. *Reprod Fertil.*
 18. **Vasquez,JM et al.** *Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane.* [Online] 1997. *Theriogenology.*
 19. **Yanagimachi,R.** *Mammalian Fertilization.* In. [Online] 1993.
 20. **Vazquez,JM et al.** *Hypoosmotic swelling test as predictor of the membrane integrity in boar spermatozoa.* 21, 1999, *Proc IV Int. Conf. On Boar Semen Preservation, Beltsville Washington .*
 21. **Purdy,F.H K. Graham, Santiago and C. Azevedo, Hymerson.** Evaluación de la capacitación de jabalíes y espermatozoides de toro y la reacción del acrosoma mediante citometría de flujo. *Evaluación de la capacitación de jabalíes y espermatozoides de toro y la reacción del acrosoma mediante citometría de flujo.* [Online] 2021. [Cited: 09 11, 2021.] <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106846..>
 22. **Foote,RH and , Bredderman,PJ** *Sizing of aging bull spermatozoa with an electronic counter* 117-120, 1969, *J Dairy Sci*, Vol. 52.
 23. **Mahi,CA and Yanagimachi,R.** *The effects of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa.*55-66, 1973, *J. Reprod Fertil*, Vol. 35.
 24. **Van der Ven,HH et al.** *Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic médium (Hypoosmotic Swelling Test) and in vitro fertilization.*190-196, 1986, *J. Androl*, Vol. 7.
 25. **Alvarez, J.G and Storey, B.T.** *Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility.*1102-1108, 1982, *Biol. Reprod.*, Vol. 27.

26. **Drevius,LO and Eiksson,H.** *Osmotic swelling of mammalian spermatozoa.*136-156, 1996, Experimental Cell Research, Vol. 42.
27. **Drevius,LO and Eiksson,H.** 136-156, 1996, Experimental Cell Research, Vol. 42.
28. **Chan,Y et al.** *The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay.* 668-672, 1985, In: fertile. Steril.
29. **Pérez,B-Llano, et al.** *El test de endósmosis (HOST) en semen de ganado porcino.*16-17, 1999, Albéitar, Vol. 30.
30. **Jeyendran,RS and Van der Ven,HH.Zaneveld LJ.** *The hypoosmotic swelling test.*1279-1289, 1992, Arch Androl;, Vol. 39.
31. **Saffele J., Van den, Vermeulen,L and , Schoojans,F. Comhaire FH.** *Evaluation of the hypoosmotic swelling test in relation to advanced methods of semen analysis* 213-217, 1992, Andrologia, Vol. 24.
32. **Correa,JR and Zavos,PM.** *The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane.*351-360, 1994, Theriogenology, Vol. 42.
33. **Correa,JR, Heersche,G and Zavos,PM .** *Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures* 715-721, 1997, Theriogenology, Vol. 47.
34. **Kumi,J-Diaka.** *Subjecting the canine spermatozoa to the hypoosmotic swelling test.*1279-1289, 1993, Theriogenology, Vol. 39.
35. **Kumi,J-Diaka and Badtram,G.** *Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen.*1355-1366, 1994, Theriogenology, Vol. 41.
36. **Rodríguez-Gil,JE, Montserrat,A and T, Rigau.** *Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa.* 815-829, 1994, Theriogenology, Vol. 42.
37. **Sánchez,A, Rubilar,J and Gatica,MV** *Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test.*123-130, 2002, Arch Med Vet, Vol. 34.
38. **Von Buiten,A , Zhang,J and Boule,MS** *Integrity of plasma membrane of stallion spermatozoa before and after freezing* 11-18, 1989, J Reprod Fertil, Vol. 4.
39. **De la Cueva FI, Caiza, et al.** *Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success* 947-968, 1997,

- Theriogenology, Vol. 48.
40. **De la Cueva FI, Caiza, et al.** *Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation.* 765-784, 1997, Theriogenology, Vol. 47.
 41. **Vázquez, JM, et al.** *Lectin histochemistry during "in vitro" capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa* 93-100, 1996, Acta Histochem (Jena), Vol. 98.
 42. **Pérez, B-Llano, et al.** *Response to the boar sperm to the Host test and relationship between HOST and ORT results* 69, JULIO 1998, 15th IPVS Congress, Birmingham, Engl, Vols. 5-9.
 43. **Pérez, B-Llano, et al.** *short version of the osmotic resistance test for boar semen* 61, JULIO 1998, 15th IPVS Congress, Birmingham, England, Vols. 5-9.
 44. **Jeyendran, RS et al.** *Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.* 219+228, 1984, J Reprod Fertil, Vol. 70.
 45. **Van der Ven, HH et al.** *Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic médium (Hypoosmotic Swelling Test) and in vitro fertilization* 190-196, 1986, J. Androl, Vol. 7.
 46. **Perez-Llano, P Yenes-Garcia, P and Garcia-Casado.** *Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37 °C.* 1401-1407, 2003, Theriogenology, Vol. 60.
 47. **Check, JH et al.** *The HOS test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential* 159-161, 1989, Fertil Steril, Vol. 52.
 48. **Verheyen, G et al.** *Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable inmotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection.* 195-203, 1997, Human Reprod (Update), Vol. 3.
 49. **Roger, BJ and Parker, RA** *Relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test and sperm penetration assay* 152-158, 1991, J Androl, Vol. 12.
 50. **Hammerstedt, RH Graham, JK and , Nolan, JP** 73-88, 1990, J Androl, Vol. 11.
 51. **Watson, PF.** *The preservation of semen in mammals.* 283-350, 1979, Oxford Reviews of Reproductive Biology. FinnCA.
 52. **Critser, JK, et al.** *Cryopreservation of human spermatozoa. The effect of holding procedure and seeding on motility, fertilizability and acrosome reaction* 314-320, 1988,

- Fertil Steril*, Vol. 50.
53. **Frim, J and Mazur, P.** Interactions of cooling rate, glycerol concentration, and dilution procedure on the viability of frozen-thawed human granulocytes. 657-676, 1983, *Cryobiology*, Vol. 20.
 54. **Gao, DY, et al.** Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. 657-667, *Cryobiology*, 1992, Vol. 29.
 55. **Schilling, E, Vengust, M and Smidt, D.** Un nuevo sistema para predecir la congelabilidad y la capacidad de almacenamiento de los espermatozoides de verraco 346, 1984, *Proc 8th IPVS Congress, Belgica*.
 56. **Bonet, S, et al.** *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcina*. 2006.2006, *Biocnología de la Reproducción Porcina*. Universitat de Girona.
 57. **Schilling, E, Vengust, M and Smidt, D.** Un nuevo sistema para predecir la congelabilidad y la capacidad de almacenamiento de los espermatozoides de verraco. 346, 1984, *Proc 8th IPVS Congress, Belgica*.
 58. **Schilling, E, et al.** The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. 77, 1986, *Proc 9th IPVS Congress, Barcelona*.
 59. **Tamuli, MK and Watso, PFI.** Effects of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress and hypoosmotic stress in boar spermatozoa incubated for up 24 hours. 69-77, 1992, *Proc. 12th ICAR Congress. The Hague*, Vol. 35.
 60. **Correa, JR and Zavos, PM.** The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. 351-360, 1994, *Theriogenology*, Vol. 42.
 61. **Gil, J, et al.** 69-77, 2000, *Reprod Dom Anim*, Vol. 35.
 62. **Schilling, E, et al.** The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. 77, 1986, *Proc 9th IPVS Congress, Barcelona*.
 63. **Pérez-Llano, B, et al.** A short version of the osmotic resistance test for boar semen 5-9, 7 1988, *15th IPVS Congress, Birmingham, England*.
 64. **Schilling, E and Vengust, MI.** Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples. 61-78, 1985, *Zuchthygiene*, Vol. 20.
 65. **Perez, M.** *Aportación al comportamiento de la conducta sexual y de la conservación del semen refrigerado en verracos de razas ibéricas*. 108, 1988, *Tesis Doctoral*. Instituto de Investigaciones Agrarias. Madrid.

66. **Correa, JR and Zavos, PM.** *The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane* 351-360, *Theriogenology*, Vol. 42.
67. **Yeste, M, et al.** *The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter.* 2010, *Animal Reproduction*.
68. **Weitze, KF and Petzoldt, R.** *Preservation of semen.* *Anim Reprod* 229, 1992, *Sci*, Vol. 28.
69. **Kubus.** *Manual de Inseminacion Artificial en porcinos 2020, Manual de Inseminación – KUBUS.*
70. **Foote R.H.** *The history of artificial insemination: Selected notes and notables.1-10,* 2002, *J. Anim. Sci. Biography and History Series.*
71. **Du Mesnil Du Buisson,F and L., Dautzier.** *Improvement of practical use of preservation techniques for boar semen by saturation of the diluent with carbondioxide* 8-96, 1959, *Ann. Zootech. Suppl*, Vol. 8.
72. **Plisko, N.T.** *Method of prolonging the viability and fertilizing capacity of boar spermatozoa.* 37-41, 1965, *Svinovodstvo*, Vol. 9.
73. **Pursel, V.G, Johnson, L.A and Schulman, L.L.** *Fertilizing capacity of boar semen stored at 15°C.*532-535, 1973, *Anim. Sci*, Vol. 37.
74. **Johnson, L.A, Aalbers, J.G and Groote, H.J.G.** *Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville Thawing Solution (BTS), modified modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection* 49-55, 1988, *Zuchthyg*, Vol. 23.
75. **Gottardi, L., Brunel, L. and Zanelli, L.** *New dilution media for artificial insemination in the pig.* 1980.49-53, 1980, *9th ICAR*, Vol. 5.
76. **Laforest, J.P. and Allard, D.** *Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen* 275-276, 1996, *Reprod. Domest. Anim*, Vol. 31.
77. **Martin, Rillo S.** *How AI is progresing in Spain.* 24-28, 1984, *Pig Intern*, Vol. 5.
78. **Reed, H.C.B.** *Commercial requirements for an effective fresh semen diluent.* *Reprod.*255-270, 1990, *Dom. Anim. Suppl.*, Vol. 1.
79. **Martin Rillo, S, et al.** *Control de parámetros de un centro de Inseminacion Artificial Porcina* 23-26, 1996, *AAnalecta Veterinaria* 2, Vol. 16.
80. **Bellido Huaman, Edilberto, Blanco, Yaringaño and Helder, Stewart.** *Efecto de dos dilutores sobre la criopreservación de semen de verraco.* 2013, *Tesis para MVZ.*

Universidad nacional de Huancavelica. Perú.

81. **Guzman, A.L.E.** *Evaluación de una técnica para la crioconservación del semen de porcino.* 73-88, 1990, *Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nayarit* Hammerstedt RH; Graham JK; Nolan JP, Vol. 11.
82. **Cordova, IA, Perez, GJ and Martin, RS.** *Fases previas y postcongelación del semen de verraco en pajillas de 5 ml y capacidad de fecundación de los espermatozoides* 61-68, 2004, *Universidad y Ciencia.* 20, Vol. 40.
83. **Carpio, C, et al.** *Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco.* 15-19, 2008, *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.*, Vol. 19.
84. **Henao, G, et al.** *Efecto del clima sobre las características seminales de porcinos en una zona de bosque húmedo tropical.* 235-237, 2004, *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, Vol. 57.
85. **De Ambrogi, M, et al.** *Effect of storage in short and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa.* 543-552, 2006, *Int J Androl*, Vol. 29.
86. **Schilling, E and Vengust, MI.** *Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples.* 61-78, 1985, *Zuchthygiene*, Vol. 20.
87. **Santiani, A., Sandoval, R., Ruiz, L., y Coronado.** *Estudio de la integridad de membrana en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hipoosmótico.* XXVII Reunión APPA. 2004, Vol. *Asociación Peruana de Producción Animal.*
88. **Aurich, Chistine.** *Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa.* 65-75, 2005, *Animal Reproduction Science*, Vol. 89.
89. **Vazquez, JM, et al.** *Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane* 913-922, 1997, *Theriogenology*, Vol. 47.
90. **Correa, JR and Zavos, PM.** *The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane.* 351-360, 1994, *Theriogenology*, Vol. 42.
91. **Jeyendran, RS, et al.** *Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.* 219-228, 1984, *Reprod Fertil*, Vol. 70.
92. **Vázquez, JM, et al.** *Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la*

- motilidad de los espermatozoides de verraco 89-90, 1997, IV Simposium Internacional de Reproducción e IA porcina. Madrid,.*
93. **Bonet, S, et al.** *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcina.*2006, *Biotechnología de la Reproducción Porcina. Universitat de Girona.*
94. **Perez-Llano, P, Yenes-Garcia, P and Garcia-Casado.** *Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37 °C. 1401-1407, 2003, Theriogenology 60.*
95. **Jeyendran, RS, et al.** *Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.*219-228, 1984, *J Reprod Fertil, Vol. 70.*
96. **Fernández, V. P. (2016).** *La evolución de los trabajos empíricos sobre conducta verbal.*42, 2016, Vol. 42, pp. 36-56.
97. **Bhattacharya, SM.** *Hypo-osmotic swelling test and unexplained repeat early pregnancy loss.*119-22, 2010, *Obstet Gynaecol Res, Vol. 36.*
98. **Cincik, M, et al.** *Combination of hypoosmotic swelling/eosin Y test for sperm membrane integrity evaluation:.*25-8, 2007, *Arch Andrology, Vol. 53.*
99. **Stanger, JD, et al.** *Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation. 474-84, 2010, Reprod Biomed Online, Vol. 21.*
100. **Kumaresan, A, et al.** *Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis line changes in spermatozoa 162-171, 2009, Anim Reprod Sci, Vol. 110.*
101. **Russell, R. J., & Schilling, P. W.** *Temas Seleccionados sobre medicina de Animales de laboratorio.* 1976.



ANEXO 1:
SOLUCIONES EMPLEADAS PARA LA EVALUACION SEMINAL

SOLUCION DE GLUTARALDEHIDO	
Glucosa	2,9 gr
Citrato sódico	1,0 gr
Bicarbonato Sódico	0,2 gr
Glutaraldehído (25% de pureza)	8,0 ml
Agua destilada	Hasta 100 ml

SOLUCION TEST HOST (150 mOsm/Kg)	
Citrato de sodio dihidratado	0,375 gr
D-fructosa	1,351 gr
Agua destilada	Hasta 100 ml

SOLUCION TEST ORT (100 mOsm/kg)	
Diluyente	1 parte
Agua destilada	2 partes

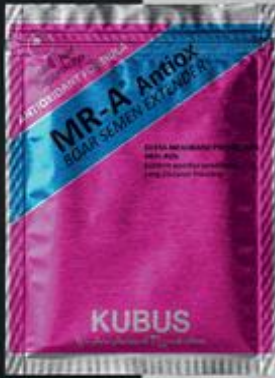
ANEXO 2: DILUTORES EMPLEADOS

KUBUS

MR-A Antiox

NUESTRO DILUYENTE DE SEMEN DE VERRACO CON LA MAYOR PROTECCION

REF: 0050



¿Qué es?
MR-A Antiox es un diluyente de larga duración especialmente diseñado para proteger a los espermatozoides de los procesos oxidativos. MR-A Antiox amortigua el efecto de factores externos como las variaciones de pH y temperatura, protegiendo al semen durante su procesado, transporte y almacenamiento.

¿Qué contiene?
MR-A Antiox contiene una cuidada selección de antioxidantes de alta calidad que neutralizan los radicales libres generados de manera natural por los espermatozoides.

¿Cómo actúa?
MR-A Antiox actúa protegiendo:
- La funcionalidad y estructura de las membranas, lo que minimiza los problemas de aglutinación.
- Las características funcionales de las mitocondrias, asegurando una correcta producción de energía.
- La estabilidad del material genético espermático, previniendo la fragmentación del ADN.

¿Cuándo usarlo?
El uso de MR-A Antiox está indicado siempre que se desee un extra de protección y está especialmente recomendado en transportes de media y larga distancia y, cuando no se puede asegurar una conservación a temperatura óptima.


MR-A Antiox, para los que quieren la máxima seguridad

MODO DE EMPLEO
Diluir el producto en agua purificada siguiendo las instrucciones del envase. Puede ser usado inmediatamente tras la dilución, no es necesario un periodo de **estabilización**.

ALMACENAMIENTO
Almacenar en un lugar fresco (5-25°C), seco (humedad relativa < 75%) protegido de la luz solar.

PRESENTACIÓN
Envases para preparar 1, 5, 25, 50 or 100 L de diluyente.

CALIDAD KUBUS
A todos los lotes de diluyentes fabricados en Kubus se les realiza un completo control de calidad, que incluye parámetros químicos, controles biológicos y **microbiológicos**.

CONTACTANOS
 www.kubus-sa.com
 kubus@kubus-sa.com
 +34 91 636 02 68

ANEXO 3:
VERRACOS DONADORES DE SEMEN

RAZA	EDAD (años)
Pietrain Belga	3
York	3
Pietrain Duroc	3.5
Landrasse	2



ANEXO 4:
SECUENCIA FOTOGRAFICA



IMAGEN 1 VERRACO PIETRAIN BELGA 3 AÑOS



IMAGEN 2 VERRACO LANDRACE 3 AÑOS



IMAGEN 3 VERRACO YORKSHIRE



IMAGEN 4 VERRACO DUROC PIETRAIN

ANEXO 5

RESULTADOS EN IMAGENES DEL TEST DE HOST

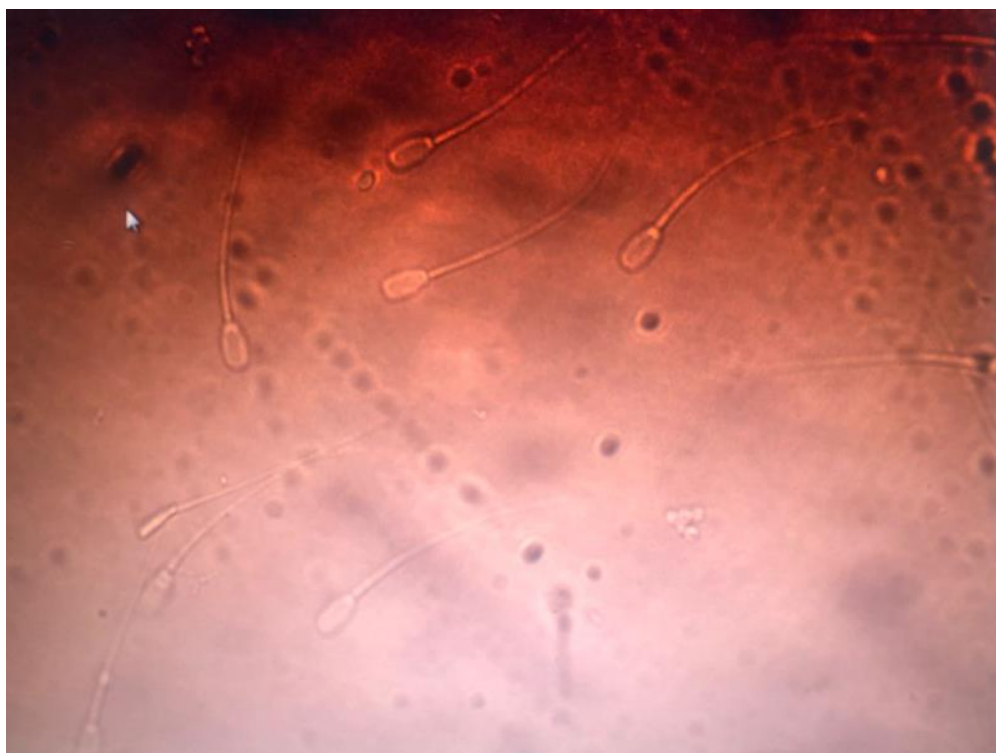


IMAGEN 5 Morfología normal se espermatozoides porcinos



IMAGEN 6 HOST positivo en espermatozoide porcino

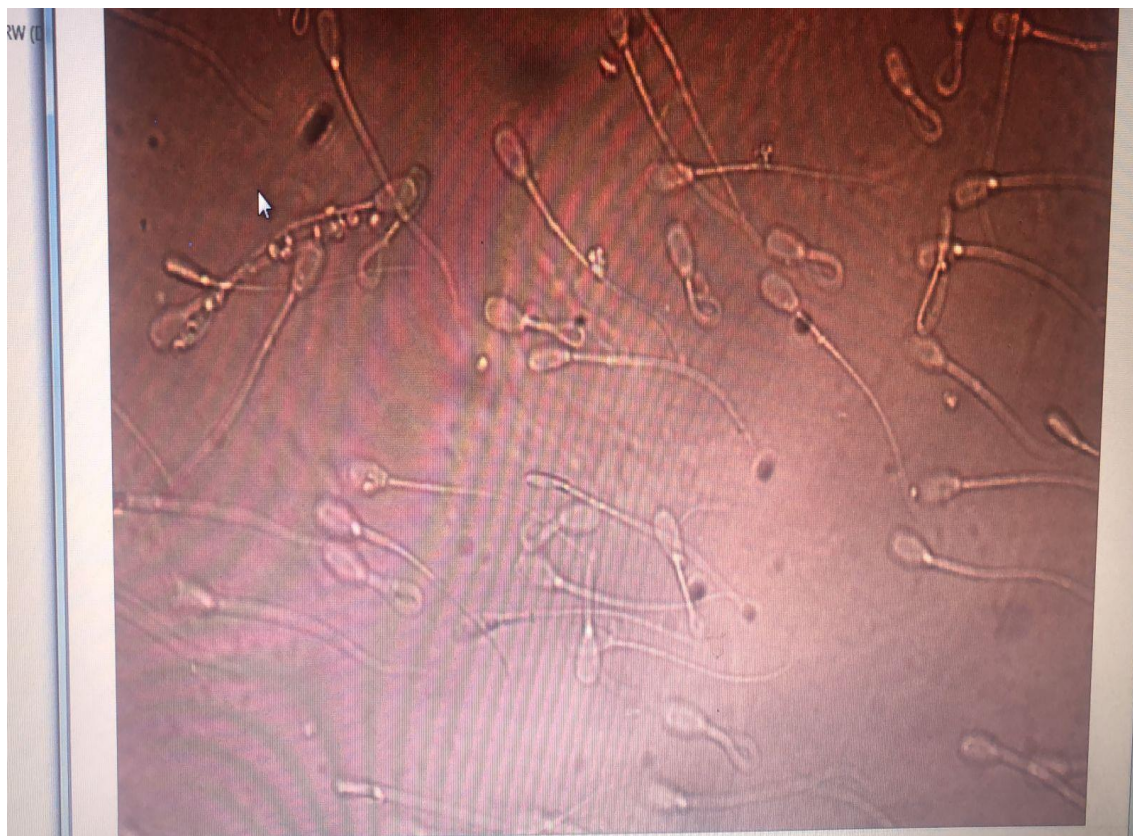


IMAGEN 7 HOST positivo en espermatozoides porcino tiempo 10 minutos.



IMAGEN 8 ORT positivo en espermatozoide porcino.

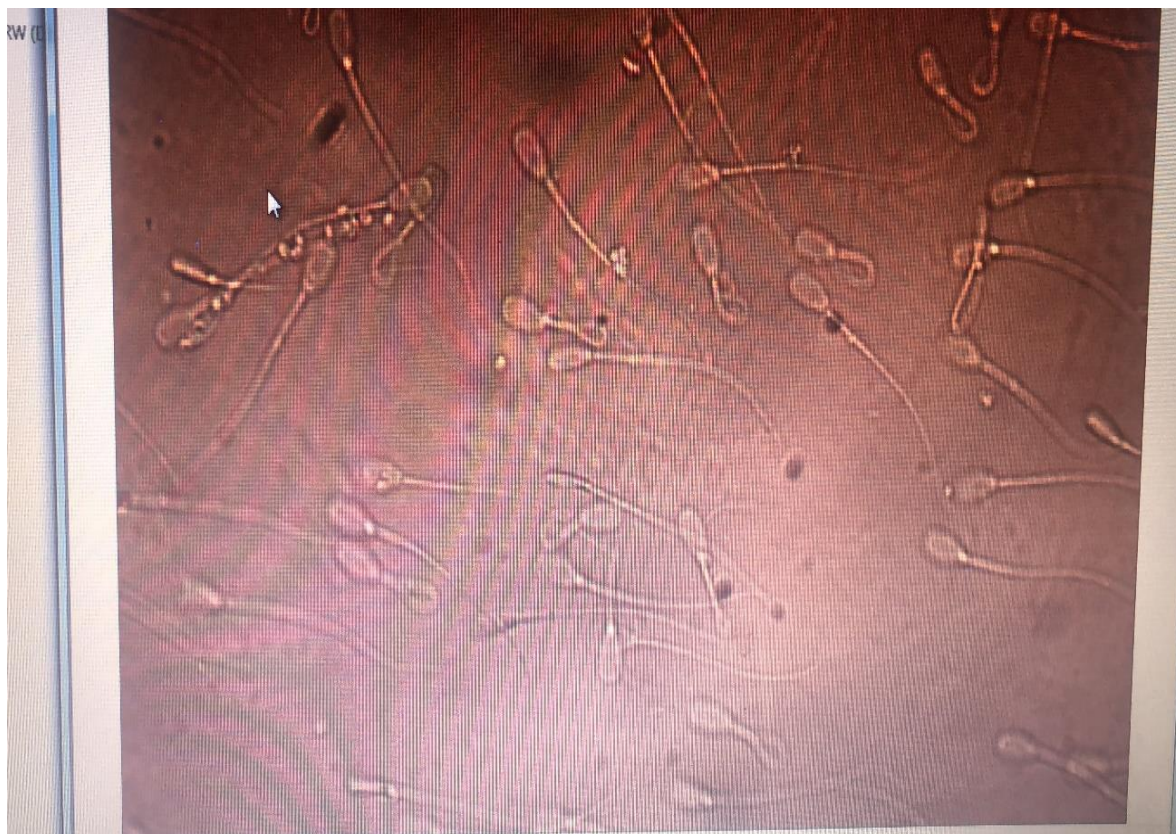


IMAGEN 9 HOST positivo en espermatozoides porcino tiempo 20 minutos.

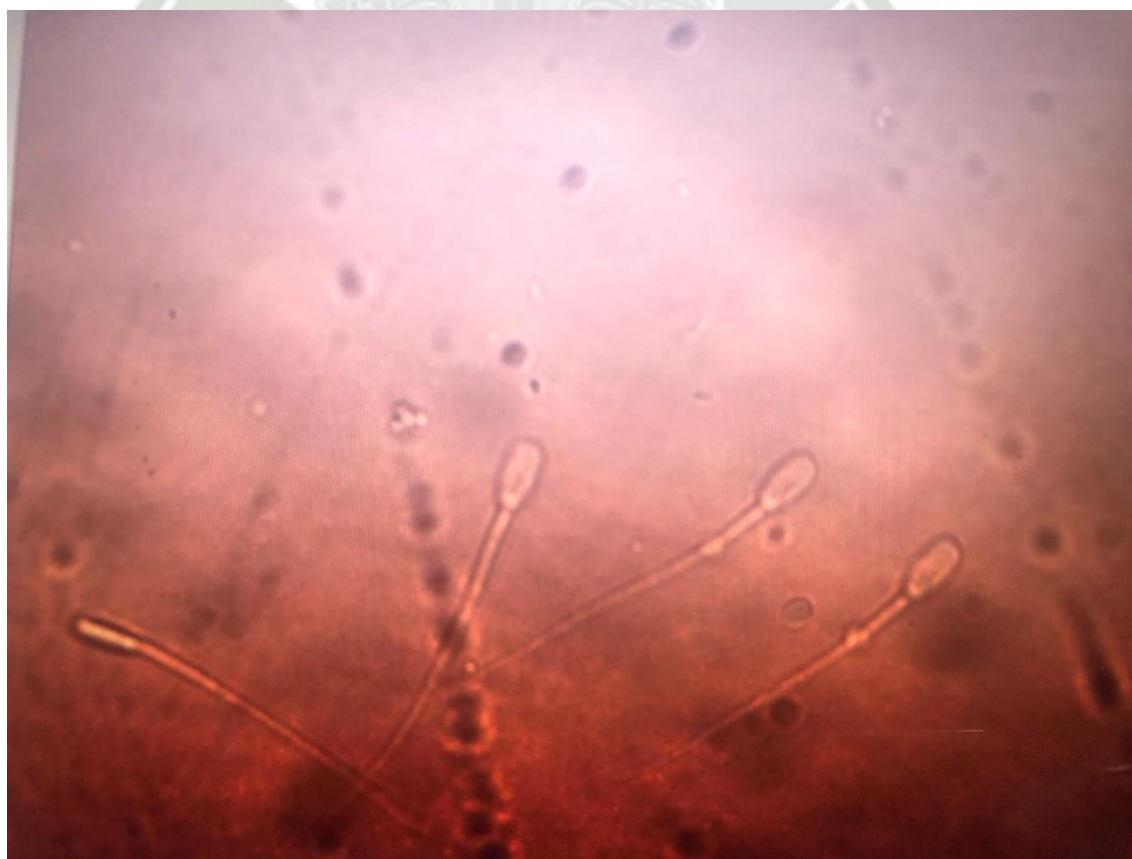


IMAGEN 10 presencia de gotas proximales.



IMAGEN 11 HOST positivo en espermatozoides porcino tiempo 30 minutos.



IMAGEN 62 ORT positivo en semen de verraco porcino.



IMAGEN 13 ORT positivo en espermatozoides de porcino.

ANEXO 6

PATRON DEL TEST HOST PARA EVALUAR LA MEMBRANA PLASMÁTICA
(Sivakumar Ramu y Rajasingam S. Jeyendran, 2013).

22 S. Ramu and R.S. Jeyendran

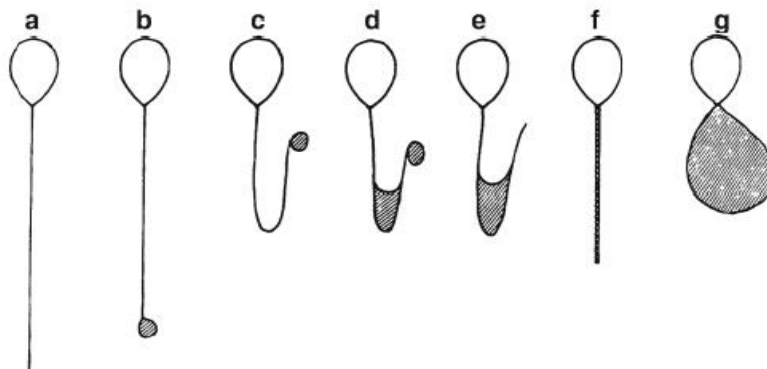


Fig. 1. Schematic representation of various morphological changes of human spermatozoa exposed to hypo-osmotic stress. (a) Sperm with unaltered morphology. (b–g) Sperm with different types of tail swelling indicated by hatched area. Figure originally published in ref. 1 reproduced with permission.

3.2. Sperm Swelling Pattern

Hypo-osmotic stress will induce several distinct categories of swelling in the sperm tail region as described below (Figs. 1 and 2):

1. *Tip*: Very tip of the tail is swollen; rest of the tail is normal.
2. *Hairpin swelling*: Tail swells at mid piece and main piece junction with tip swelling or without tip swelling.

3. *Shortened and thickened tail*: Tail swells, constricting surface, causing shortening.
4. *Partly or completely enveloped sperm tail*: Tail “balloons” from swelling.
5. Count a total of 200 sperm (at least 100) per sample, including both swollen and non-swollen sperm.
6. Calculate swollen sperm as a percentage of total sperm number counted.
7. Report as percentage of swollen sperm.

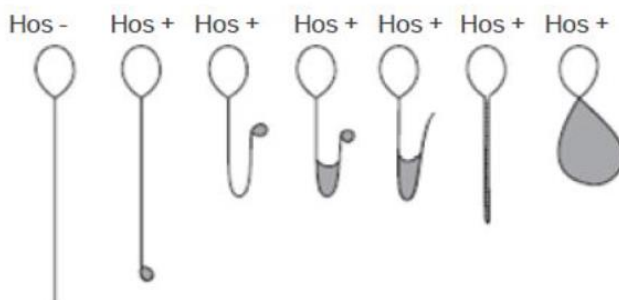
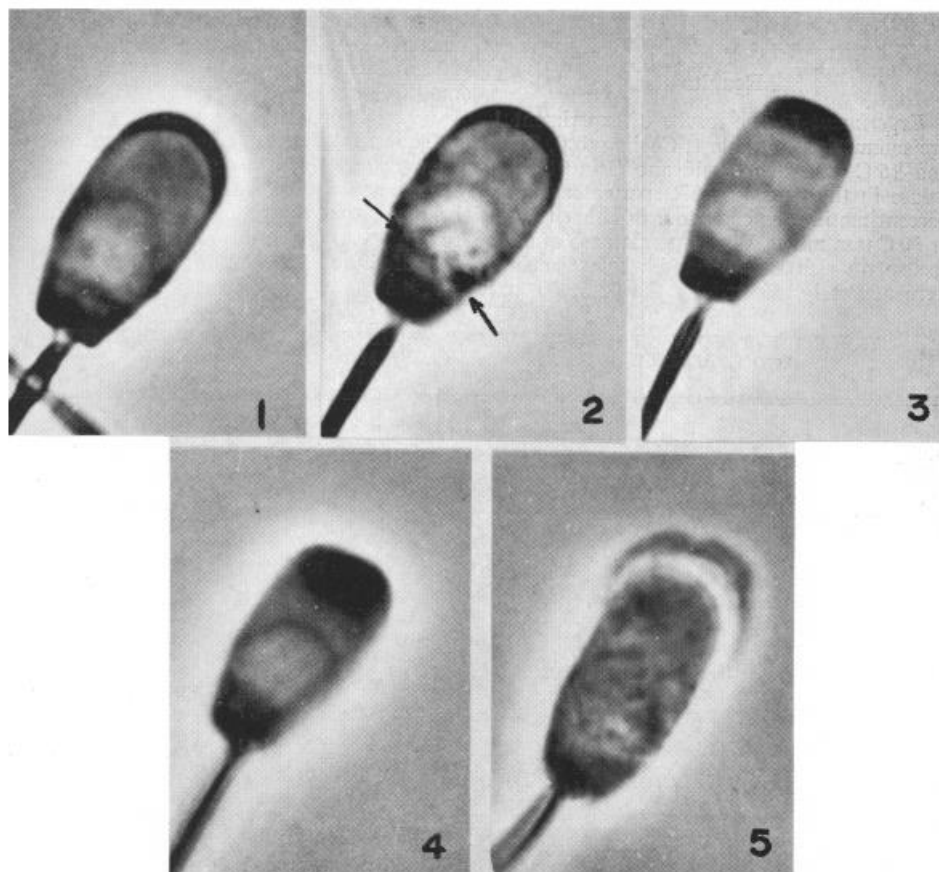


Ilustración 11. Ejemplo del test de vitalidad con Sol. Hiposmótica. El Hos(-) está intacto, muerto; los Hos (+) que tienen el flagelo encogido en distinto grado por hinchamiento, están vivos

ANEXO 7

PATRÓN DEL TEST ORT PARA EVALUAR MEMBRANA ACROSOMAL

(Pursell y col, 1972).



Figures 1 to 5. Phase-contrast micrographs of unfixed, cold shocked boar spermatozoa classified according to acrosome morphology. All figures x4000.

- Figure 1. Normal apical ridge (NAR).
- Figure 2. Normal apical ridge with particles (arrows) (NAR').
- Figure 3. Damaged apical ridge (DAR).
- Figure 4. Missing apical ridge (MAR).
- Figure 5. Loose acrosomal cap (LAC).

ANEXO 8

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Medidas de Resumen e Inferencia por prueba de T de evaluación de la motilidad masal de espermatozoides porcinos desde las 0 hrs hasta las 144 hrs.

Medidas resumen

Resumen	Columnal
n	7.00
Media	74.57
D.E.	13.32
Var (n-1)	177.42
E.E.	5.03
CV	17.86
Mín	56.40
Máx	91.60
Mediana	74.20
Q1	61.60
Q3	88.40
Asimetría	-0.05
Kurtosis	-1.38

Prueba t para una media

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

Variable	n	Media	DE	LI(95)	LS(95)	T	p(Bilateral)
Columnal	7	74.57	13.32	62.25	86.89	14.81	<0.0001

Medidas de Resumen e Inferencia por prueba de T del efecto del tiempo de evaluación en el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Endosmosis o Hiposmótico (HOST+)

Medidas resumen

<u>Resumen</u>	<u>Columnal</u>
n	7.00
Media	78.09
D.E.	7.04
Var (n-1)	49.50
E.E.	2.66
CV	9.01
Mín	67.80
Máx	87.80
Mediana	78.40
Q1	72.00
Q3	84.80
Asimetría	-0.07
Kurtosis	-1.13

Prueba t para una media

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

<u>Variable</u>	<u>n</u>	<u>Media</u>	<u>DE</u>	<u>LI(95)</u>	<u>LS(95)</u>	<u>T</u>	<u>p(Bilateral)</u>
Columnal	7	78.09	7.04	71.58	84.59	29.36	<0.0001

Medidas de Resumen e Inferencia por prueba de T para una media del efecto del tiempo de evaluación en el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Resistencia Osmótica (ORT).

Medidas resumen

<u>Resumen</u>	<u>Columnal</u>
n	7.00
Media	83.43
D.E.	7.42
Var (n-1)	55.03
E.E.	2.80
CV	8.89
Mín	72.60
Máx	93.40
Mediana	83.80
Q1	76.80
Q3	90.60
Asimetría	-0.12
Kurtosis	-1.18

Prueba t para una media

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

Variable	n	Media	DE	LI(95)	LS(95)	T	p(Bilateral)
Columnal	7	83.43	7.42	76.57	90.29	29.75	<0.0001

Medidas de Resumen e Inferencia por prueba de T para dos medias del efecto del tiempo de evaluación y su comparación entre el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Endosmosis o Hiposmótico (HOST+) y el porcentaje de espermatozoides porcinos positivos al Test de Resistencia Osmótica (ORT).

Nueva tabla_1 : 12/05/2022 - 03:11:50 - [Versión : 30/04/2020]

Medidas resumen

Columnal	Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	Asimetria	Kurtosis
HOST	%	7	78.09	7.04	49.50	2.66	9.01	67.80	87.80	78.40	72.00	84.80	-0.07	-1.13
ORT	%	7	83.43	7.42	55.03	2.80	8.89	72.60	93.40	83.80	76.80	90.60	-0.12	-1.18

Nueva tabla_1 : 12/05/2022 - 03:32:32 - [Versión : 30/04/2020]

Prueba T para muestras Independientes

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	Media(1)-Media(2)	LI(95)	LS(95)	pHomVar	T	gl	p-valor	prueba
Columnal	%	{HOST}	{ORT}	7	7	78.09	83.43	-5.34	-13.76	3.08	0.9010	-1.38	12	0.1920	Bilateral

