

## Efecto de diferentes tiempos de centrifugación utilizando el gradiente de Percoll 45-90% sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos

Camargo, K.D.; Pagoada, A.A.; Hincapié, J.J.<sup>®</sup> y Castillo, R.

Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana. Tegucigalpa. Honduras.

### RESUMEN

La centrifugación de espermatozoides bovinos en el gradiente de Percoll 45-90%, es una técnica utilizada en la fertilización *in vitro*. Los objetivos del estudio fueron: determinar los porcentajes de espermatozoides con endósmosis positiva (EP) y negativa (EN), motilidad individual (MI), viabilidad (vivos y muertos) y morfología normal de cabeza y cola a diferentes tiempos de centrifugación. Para la endósmosis celular se utilizó la prueba HOST, en viabilidad, la coloración de eosina-nigrosina y en morfología, la coloración Spermac<sup>®</sup> de Minitube. Se evaluaron cuatro tratamientos con seis repeticiones: semen descongelado y centrifugado en gradiente de Percoll 45-90% durante 5, 10 y 15 minutos y semen descongelado únicamente (control). Para la prueba HOST, los porcentajes de EP para los tiempos de 15, 10 y 5 minutos de centrifugación fueron similares con valores de 73.92%, 75.19% y 73.63% respectivamente, sin embargo, estos difieren del control con 65.11% ( $P \leq 0.05$ ); los porcentajes de MI para los tiempos de 15, 10 y 5 minutos de centrifugación fueron 92.00%, 93.00% y 91.50% siendo similares entre sí, pero estos difieren del control con 69.5% ( $P \leq 0.05$ ). La viabilidad fue de 71.32%, 71.42% y 73.56% para los tiempos de 15, 10 y 5 minutos respectivamente y difieren del control con 56.63% ( $P \leq 0.05$ ). En la morfología de cabeza y cola normales, no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) con valores superiores al 92% y 82% respectivamente. Se concluye que la centrifugación durante 5, 10 o 15 minutos cuando se realiza el gradiente de Percoll 45-90% no afectan la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos.

### Effect of different centrifugation times using the 45-90% Percoll gradient on bovine sperm plasma membrane integrity

### SUMMARY

The centrifugation of bovine sperm in the 45-90% Percoll gradient is a technique used in *in vitro* fertilization. The objectives of the study were: to determine the percentages of sperm with positive endosmosis (PE) and negative (NE), individual motility (IM), viability (alive and dead) and normal head and tail morphology at different centrifugation times. The HOST test was used for cell endosmosis, the eosin-nigrosin staining for viability and the Minitube Spermac staining for the morphology. Four treatments were evaluated with six repetitions: thawed and centrifuged semen in 45-90% Percoll gradient for 5, 10 and 15 minutes and thawed semen only (control). For the HOST test, the percentages of PE for the 15, 10 and 5 minute centrifugation times were similar with values of 73.92%, 75.19% and 73.63% respectively, however, these differ from the control with 65.11% ( $P \leq 0.05$ ); the IM percentages for the 15, 10 and 5 minute centrifugation times were 92.00%, 93.00% and 91.50%, being similar to each other, but these differ from the control with 69.5% ( $P \leq 0.05$ ). The viability was 71.32%, 71.42% and 73.56% for the times of 15, 10 and 5 minutes respectively and they differed from the control with 56.63% ( $P \leq 0.05$ ). In normal head and tail morphology, there were no significant differences ( $P > 0.05$ ) with values higher than 92% and 82% respectively. It is concluded that centrifugation during 5, 10 or 15 minutes when performing the 45-90% Percoll gradient, does not affect the integrity of the plasma membrane of bovine sperm.

### PALABRAS CLAVE

Endósmosis.  
HOST.  
Motilidad individual.  
Morfología.  
Viabilidad.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Endosmosis.  
HOST.  
Individual motility.  
Morphology.  
Viability.

### INFORMATION

Cronología del artículo.  
Recibido/Received: 11.12.2020  
Aceptado/Accepted: 10.04.2023  
On-line: 15.04.2023  
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:  
[jhincapie@zamorano.edu](mailto:jhincapie@zamorano.edu)

### INTRODUCCIÓN

La fertilización *in vitro* (FIV) es una biotecnología, la cual consiste en la fecundación de ovocitos provenientes de ovarios por medio de una aspiración folicular, con el espermatozoide de un macho donador, bajo condiciones controladas de laboratorio, usando un procedimiento estandarizado para

cada especie animal; no obstante, para lograr buenos resultados es necesario cerciorarse que se cumplan con todas las normativas que se encuentran en dicho procedimiento, logrando así una fecundación exitosa.

Según Hincapié (2019, p. 1) la FIV en bovinos se desarrolla en tres etapas fundamentales: maduración

de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros y cultivo de embriones, donde la maduración de ovocitos conlleva una de las partes más importantes ya que es aquí donde el óvulo adquiere la competencia para que posteriormente sea apto para una fecundación, cabe señalar que de esta etapa dependerá que se logre un buen cultivo de embriones y una excelente producción de embriones de calidad.

Dentro de la etapa de fecundación *in vitro*, los espermatozoides son sometidos a diferentes manejos, dentro de los cuales cabe destacar el proceso de centrifugación, por lo tanto, es muy importante analizar cómo influyen los tiempos de centrifugación sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos y por ende en su viabilidad. Urrego *et al.* (2008, p. 20) concluyen que durante la fertilización *in vitro* bovina generalmente se utiliza semen de alta calidad que ha sido previamente congelado, lo que implica someter a los espermatozoides a un procedimiento de lavado y selección en los que los de mejor movilidad son separados del plasma seminal, de los muertos e inmóviles, de los diluyentes y crioprotectores y de otras estructuras por medio de técnicas como el Swim-up y el gradiente de Percoll.

Por otro lado, la prueba hipoosmótica, reconocida como HOST por su denominación en inglés (Hypo-Osmotic Swelling Test), es una prueba seminal simple y de bajo costo, que permite evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide. Este ensayo de carácter seminal tiene su fundamento central en que la suspensión de espermatozoides en un medio hipoosmótico ocasiona un desequilibrio entre los medios intracelular y extracelular, situación que la célula trata de compensar difundiendo agua al compartimento intracelular, considerando un aumento del volumen del espermatozoide. Esta situación se evidencia por cambios morfológicos característicos, tales como dilatación y enrollamiento de la cola.

La prueba de HOST es uno de los principales requisitos para determinar el funcionamiento general de los espermatozoides valorando la integridad funcional de la membrana plasmática para verificar la función de capacitación, reacción acrosómica y fecundación. Coetzee *et al.* (1989, p. 137) concluyeron que no se produjo penetración de ovocitos cuando la prueba HOST fue negativa (<50% de espermatozoides positivos para HOST). Tales datos claramente prueban la importancia y utilidad que tiene la realización de esta prueba para tener claridad en el funcionamiento general de los espermatozoides.

Entre las bondades de esta prueba es importante destacar que proporciona información adicional que no es obtenida por ensayos más estándar realizados en laboratorios. Así mismo, una anomalía en el resultado en dicha prueba se asocia con bajos resultados en la FIV, por lo tanto, la prueba HOST es un complemento útil para las pruebas seminales y se recomienda incluirla como prueba de rutina en los laboratorios de FIV para controlar la calidad del semen utilizado, además de brindar información en otros aspectos como la crio-supervivencia (Jeyendran *et al.* 1992, p. 226).

Lopez *et al.* (2014, p. 103) definen los criterios de evaluación para la prueba de HOST (desde muy malo hasta muy bueno) estimado según el porcentaje de colas hinchadas vistas en la evaluación como: Muy bueno >71%, Bueno 64-71%, Regular 54-63%, Malo 46-53% y Muy malo < 45%.

Con base en lo anterior, se desarrolló la presente investigación, la cual tuvo como objetivos específicos determinar los porcentajes de espermatozoides con endósmosis positiva y negativa en los diferentes tiempos de centrifugación y determinar el porcentaje de motilidad individual, viabilidad (vivos y muertos) y morfología normal de cabeza y cola, al realizar el gradiente de Percoll 45-90%.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, localizado a 32 km de Tegucigalpa, la capital de Honduras; se encuentra a 800 msnm, y presenta una precipitación anual y temperatura promedio de 1100 mm y 24 °C respectivamente. El estudio se desarrolló entre septiembre de 2019 y agosto de 2020.

### PREPARACIÓN DEL SEMEN

Se utilizó semen congelado en pajuelas de 0.5 mL a -196°C en nitrógeno líquido, provenientes de dos toros Holstein. Todo el material utilizado y que entró en contacto con el semen fue previamente desinfectado y esterilizado con alcohol clínico al 70% y atemperado a 37°C.

### PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE PERCOLL 45% Y 90%

Para la preparación de los gradientes de Percoll 45% y 90% se utilizó el procedimiento recomendado por Hansen (2013, p. 38). Se utilizaron los medios Minitube: Solución stock Capacitación y Acondicionamiento Minitube 19990/0020®, Solución stock Fertilización Minitube 19990/0030®, y utilizando el manual de preparación y procedimientos "Medios de IVP para embriones bovinos" (Minitube n.d., p. 1-4).

Para el desarrollo de los gradientes de Percoll se utilizó la siguiente metodología el día de la maniobra: Colocar 3 mL de Percoll 90% en un tubo de 15 mL, y en otro tubo (ambos tubos con la tapa suelta) depositar 3 mL de Percoll 45%, llevar a equilibrar a 38°C, 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa a saturación (95%) dos horas antes de iniciar el procedimiento. Al cabo de este tiempo se tomó el Percoll 90% y se depositó muy lentamente en el fondo del tubo que contiene el Percoll 45% (proceso de sotoposición), debiéndose formar un menisco entre los dos gradientes de densidad (en el fondo el Percoll 90% y encima el 45%), retornar nuevamente a la incubadora. Se preparó los gradientes necesarios acorde con el número de muestras a investigar.

### DESCONGELACIÓN DEL SEMEN

El semen se descongeló en agua a 35°C durante 45 segundos, se secó con papel toalla, se armó la pistola de inseminación y se depositó el semen muy despacio sobre el gradiente de Percoll 45%. Se descongeló una pajuela de cada toro por cada tratamiento. Luego se procedió a la centrifugación.

## CENTRIFUGACIÓN

Se realizaron tres centrifugaciones a diferentes tiempos, tomando como patrón lo establecido en el protocolo FIV de Hansen (2013, p. 20) en la Universidad de la Florida de 1000 g; los tiempos fueron de: 0, 5, 10 y 15 minutos. En el tiempo cero (0) no se realizaron ni centrifugación ni gradiente de Percoll ya que este fue el grupo control, por tanto, el contenido de la pajuela fue resuspendido en un eppendorf con 500  $\mu$ l de medio FIV equilibrado previamente y luego sometido a las pruebas de HOST y tinciones. Una vez se realizó la centrifugación (de acuerdo a los tratamientos), se retiró el pellet del fondo con pipeta Pasteur y se resuspendió en un tubo de policarbonato de 15 mL que contenía 10 mL de medio de acondicionamiento y se llevó a la centrifuga atemperada por 10 minutos a 200 g. Transcurrido este tiempo, se tomó el pellet del fondo con una pipeta Pasteur y se resuspendió en tubo eppendorf conteniendo 500  $\mu$ l medio FIV.

## PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN HIPO-OSMÓTICA (SOLUCIÓN HOST)

Se utilizó la metodología propuesta por Campi *et al.* (2007, p. 2): 490 mg de citrato de sodio tribásico dihidratado + 900 mg de fructuosa en 100 mL de agua se comprobó en el equipo Osmomat<sup>®</sup> la osmolaridad promedio de 100 mOsmol/l.

Luego, se diluyeron 100  $\mu$ l de semen resuspendido de cada tiempo de Percoll en solución FIV en 500  $\mu$ l de solución HOST en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se incubó a 38.5 °C/60 minutos (Bedoya *et al.* 2003, p. 1989; Bernardi *et al.* 2011, p. 28). Al cabo de una hora se colocó una gota bien mezclada en un portaobjetos y cubierta con cubreobjetos atemperados, se observó en el microscopio de contraste de fase (Olympus CX31) a 40X, contando 200 espermatozoides como mínimo por placa y un total de 10 placas por tratamiento y por repetición, y se determinó el porcentaje de espermatozoides con EP y EN, siendo la EP aquellos espermatozoides que presentaron hinchazón o doblez de la pieza intermedia o enrollamiento de la cola.

## COLORACIÓN DE EOSINA-NIGROSINA PARA VIABILIDAD

Se utilizó la tinción o método de BLOM mezclando una gota de semen resuspendido + una gota de eosina 2% + una gota de nigrosina 10%, se mezcló suavemente durante 30 segundos, se colocó una gota fina y realizó un frotis en portaobjetos atemperado, observando en el microscopio de contraste de fase a 20X-40X en los primeros cinco minutos. Se contaron como mínimo 200 espermatozoides/placa y un total de 10 placas por tratamiento y por repetición, siendo los vivos aquellos que tienen la cabeza de color blanco (no teñidos) y los muertos o moribundos estará teñida de color rosa o rojo. Se considera un valor aceptable para viabilidad de  $\geq 70\%$  de espermatozoides vivos en semen fresco (Holy 1987, p. 309).

## COLORACIÓN SPERMAC<sup>®</sup> PARA MORFOLOGÍA

Se utilizó la coloración Spermac<sup>®</sup> de Minitube (Minitube 2016, p. 24) la cual consta de tres colorantes y un fijador. La observación se realizó a 40X en el microscopio de contraste de fase, contando mínimo 200 espermato-

zoides/placa y un total de 10 placas por tratamiento y por cada repetición. De verde se tiñen los acrosomas y la zona ecuatorial de verde claro, mientras que en color rojo aparece el resto de la cabeza y tanto la cola como pieza intermedia presentarán un color verde oscuro. A medida que se hizo el conteo se clasificaron las anomalías en cabeza y cola. De acuerdo con Holy (1987, p. 312) se considera un valor aceptable para una muestra seminal valores inferiores al 30% de anomalías.

## EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA

Para determinar este parámetro, se tomó una gota de semen resuspendido en medio FIV de cada uno de los tratamientos, se depositó en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos, ambos atemperados a 38.5°C; para su evaluación se utilizó el microscopio de contraste de fase con observaciones a 20X. Se evaluaron de cada tratamiento seis campos ópticos. Para la valoración se utilizó la escala propuesta por Zemjanis (1987): 80-100% de células móviles es "muy bueno"; 60-80% se considera "bueno"; 40-60% es "regular"; 20-40% como "pobre" y 0-20% "muy pobre."

## TRATAMIENTOS

Se aplicaron cuatro tratamientos: 1) Semen descongelado y centrifugado a 1000g en gradiente de Percoll 45-90% durante 15 minutos; 2) Semen descongelado y centrifugado a 1000g en gradiente de Percoll 45-90% durante 10 minutos; 3) Semen descongelado y centrifugado a 1000g en gradiente de Percoll 45-90% durante 5 minutos; 4) Semen descongelado (control).

Se analizaron las siguientes variables: Porcentajes de espermatozoides con endósmosis positiva (EP) y negativa (EN), motilidad individual, viabilidad (vivos y muertos) y porcentaje de espermatozoides normales de cabeza y cola

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro tratamientos y seis repeticiones por tratamiento. Para el análisis de los datos se aplicó la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) utilizando el programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS<sup>®</sup> 2012 versión 9.4), con un nivel de significancia exigido de  $P \leq 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ENDÓSMOSIS POSITIVA Y ENDÓSMOSIS NEGATIVA (PRUEBA DE HOST)

Las diferencias fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos (**Tabla I**) (**Figura 1**), siendo para la EP los tratamientos con tiempos de centrifugación, en la técnica de Percoll, de 15, 10 y 5 minutos los que presentaron los mejores resultados superando al control en 8.81%, 10.8% y 8.52% respectivamente. Las diferencias obtenidas con el grupo control se deben a que la técnica de Percoll tiene como uno de sus objetivos acondicionar y separar los espermatozoides vivos de los muertos, así como de los restos celulares, diluyentes, crioprotectores entre otros, obteniendo así una muestra seminal concentrada principalmente de espermatozoides vivos.

No hubo efecto del toro ( $P > 0.05$ ) en los valores de EP de acuerdo con los tratamientos, con valores medios de

**Tabla I.** Valores porcentuales de Motilidad Individual (MI %), Endósmosis Positiva (EP %), Viabilidad (espermatozoides vivos %), Cabezas normales (%) y Colas normales (%) en semen bovino sometido a diferentes tiempos de centrifugación utilizando el gradiente de Percoll 45-90% (Percentage values of Individual Motility (IM%), Positive Endosmosis (PE%), Viability (live sperm %), Normal heads (%) and Normal tails (%) in bovine semen subjected to different centrifugation times using the Percoll gradient 45-90%).

Tratamiento	MI (%)	EP (%)	Viabilidad (%)	Cabezas normales (%)	Colas normales (%)
15 minutos centrifugación	92a	73.92a	71.32a	93.50	85.61
10 minutos centrifugación	93a	75.19a	71.42a	94.23	89.34
5 minutos centrifugación	91.5a	73.63a	73.56a	93.35	86.03
Control	69.5b	65.11b	56.63b	94.6	85.02
Probabilidad	<0.0001	0.001	<0.0001	0.0984	0.7717
Coefficiente de variación	4.0463	4.8920	3.6133	3.7285	7.4820

73.67%, 74.94%, 72.58% y 63.52% para los tratamientos 15, 10, 5 minutos y control respectivamente para el toro 1 y para el toro 2 con valores de 74.16%, 75.45%, 74.68% y 66.71% para los tratamientos 15, 10, 5 minutos y control respectivamente.

Según López y Rivera (2015, p. 1) la prueba de endósmosis celular (HOST) para semen fresco y poscongelado consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo cual causa una entrada de agua al interior de la célula (cola) quedando hinchada y enroscada (Endósmosis Positiva EP). Para que esta respuesta se produzca la membrana plasmática debe estar íntegra. Los espermatozoides con daños o alteraciones físicas no experimentarán cambios en la forma del flagelo (Endósmosis Negativa EN). Rubio y Quintero (2008, p. 618) indican en su investigación, que si se presenta un HOST con EP alto este está relacionado al porcentaje de espermatozoides con alta fertilidad *in vivo* y *in vitro* tanto del semen fresco como para el semen descongelado.

Los resultados obtenidos en los tiempos de centrifugación (1000g) se encuentran clasificados como muy buenos/excelentes de acuerdo con López *et al.* (2014, p. 103) quienes concluyen que un valor de EP superior a 71% se considera muy bueno/excelente, sin embargo, pese a que el control fue el que obtuvo el menor resultado, su valor es clasificado como bueno por estos mismos autores. Al no existir variabilidad entre los toros, los resultados de la investigación se atribuyen al efecto de los tratamientos, de igual manera se confirma que los tres tiempos de centrifugación utilizados en esta investigación no afectan la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide.

#### MOTILIDAD INDIVIDUAL (MI)

Las diferencias fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos, siendo el tratamiento control el que presentó la menor MI (Tabla I), siendo superado por los tratamientos de 15, 10 y 5 minutos de centrifugación. Estos resultados se atribuyen a que las muestras sometidas a la técnica de Percoll presentarán una mayor cantidad de espermatozoides vivos y como tal mayor MI, ya que uno de los objetivos de dicha técnica es separar los espermatozoides vivos de los muertos.

Por otra parte, no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los toros y de acuerdo al tratamiento, presentando valores de MI en los tratamientos de 15, 10 y 5 minutos y el control para el toro 1 de 92.00%, 93.00%, 91.00% y 70.00% respectivamente y para el toro 2 de 92.00%, 93.00%, 92.00% y 60.00% respectivamente, lo cual sugiere que no hubo efecto del toro sobre los resultados y que éstos se deben a los tratamientos.

La motilidad individual progresiva es la característica de viabilidad donde el espermatozoide normal presenta un movimiento lineal, progresivo (hacia adelante) y rápido mientras rota sobre su eje longitudinal (Saacke *et al.* 1988, p. 7), por ello la motilidad es sólo uno de los muchos requisitos que ha de reunir un espermatozoide para ser capaz de fecundar a un ovocito, sin embargo, ha sido y todavía es el parámetro más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis de semen refrigerado o congelado. Los diferentes tipos de movimientos indican la viabilidad del espermatozoide, por consiguiente, los espermatozoides con un movimiento rectilíneo son considerados los más fértiles al momento de fecundar un óvulo y los que tienen movimiento circular, retroactivo y pendular son considerados menos fértiles por obvias razones (Muñio *et al.* 2006, p. 59). De acuerdo con Rosas (1997, p. 31) para tener una buena motilidad individual al poscongelado esta debería ser  $\geq 45\%$ , no obstante, todas las MI de los toros y tratamientos superaron dicho valor y son clasificadas como excelentes.

#### VIABILIDAD

Las diferencias fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos siendo el tratamiento control el que presentó menor porcentaje de espermatozoides vivos y mayor porcentaje de espermatozoides muertos, no obstante las diferencias entre los tiempos de centrifugado 5, 10 y 15 minutos no presentaron diferencias significativas entre sí (Tabla I) (Figura 2)

Cabe señalar que en los valores porcentuales de espermatozoides vivos tampoco hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los toros y de acuerdo con el tratamiento, presentando valores en los tratamientos de 15, 10 y 5 minutos y el control para el toro 1 de 70.22%, 72.95%, 73.20%



**Figura 1.** Espermatozoides con Endósmosis Positiva (EP) y Endósmosis Negativa (EN) (Sperm with Positive Endosmosis (PE) and Negative Endosmosis (NE))

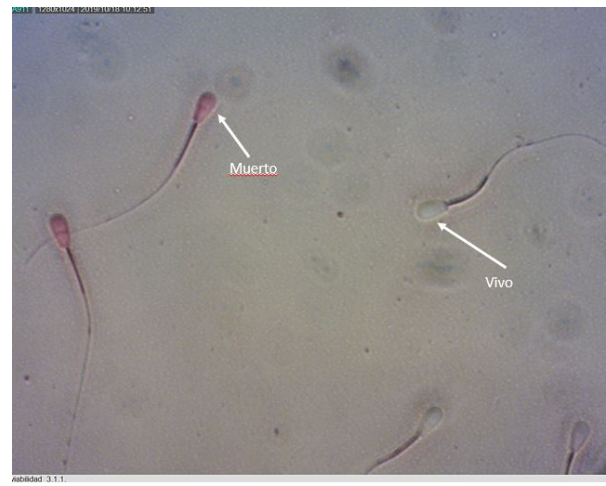
y 57.33% y para el toro 2 de 72.42%, 69.90%, 73.92% y 56.63% respectivamente.

La viabilidad hace referencia al número de espermatozoides vivos y muertos, por lo que se relaciona directamente con la fertilidad y con la motilidad tanto masal como individual, además este análisis permite medir la integridad de la membrana, por lo tanto, al momento de observar los espermatozoides en el microscopio cualquier ruptura en la membrana plasmática del espermatozoide es asociada como pérdida de la viabilidad espermática (De Leeuw *et al.* 1991, p. 112). Según Morrel *et al.* (2013, p. 64) la centrifugación es uno de los procesos que afecta la viabilidad de los espermatozoides y de acuerdo con Neira *et al.* (2007, p. 104) la centrifugación puede generar diversas alteraciones. El aumento en el tiempo de centrifugación o en la fuerza gravitacional, puede disminuir la movilidad de los espermatozoides e incluso su calidad en general, debido a las fuerzas mecánicas asociadas (Restrepo *et al.* 2013, p. 78).

Las diferencias encontradas entre el control y los tratamientos se atribuyen a que los tratamientos fueron expuestos a la técnica de Percoll 45-90%, la cual separa los espermatozoides muertos, restos celulares y otros detritos de los espermatozoides vivos, incrementando por lo tanto el porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras con tratamiento; estos resultados difieren de Urrego *et al.* (2008, p. 23) quienes sugieren que los espermatozoides con centrifugación y sin centrifugación no presentan diferencias significativas con respecto a su viabilidad. Los resultados obtenidos en los tres tratamientos de centrifugación a 1000g durante 15, 10 y 5 minutos son clasificados como aptos para ser utilizados en la reproducción de acuerdo con Holy (1987, p 309) quien recomienda que una muestra seminal se considera apta para ser utilizada en los procesos reproductivos cuando presenta menos del 30% de espermatozoides muertos.

#### MORFOLOGÍA NORMAL DE CABEZA Y COLA

En cuanto a la morfología de la cabeza, las diferencias encontradas no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (Tabla I). Estos resultados demuestran que la técnica de centrifugación con Percoll 45-90%



**Figura 2.** La cabeza sin teñir representa los espermatozoides vivos, mientras que, los muertos presentan una cabeza de coloración roja (The unstained head represents living sperm, while the dead have a red head)

desde 5 hasta 15 minutos no afecta la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide.

Así mismo, no se encontraron diferencias entre los toros y de acuerdo con los tratamientos de centrifugación ( $P > 0.05$ ), presentando valores de cabezas normales en los tratamientos de 15, 10 y 5 minutos y el control para el toro 1 de 94.99%, 96.34%, 93.49% y 94.94% y de 92.00%, 92.12%, 93.20% y 94.25% para el toro 2 respectivamente.

Para la morfología de cola las diferencias no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (Tabla I), por lo tanto, de acuerdo con los resultados de esta investigación, los diferentes tiempos de centrifugado (15, 10, 5 minutos) no afectan la integridad de la cola de los espermatozoides bovinos.

No hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los toros de acuerdo con los tratamientos, presentando valores de colas normales en los tratamientos de 15, 10 y 5 minutos y el control para el toro 1 de 88.60%, 89.86%, 86.32% y 85.27% y de 82.62%, 88.82%, 85.75% y 84.77% para el toro 2 respectivamente.

El espermatozoide es una célula flagelada libre, altamente especializada que no crece ni se divide, su morfología es semejante en todas las especies de animales domésticos. Tiene tres partes fundamentales: cabeza, cuello y cola (Albarrán 1992, p. 272).

Los resultados obtenidos en cuanto a la morfología de la cabeza difieren de Urrego *et al.* (2008, p. 19) quienes reportan que, en espermatozoides bovinos, la centrifugación a 700 g por 10, 30 o 45 minutos con gradiente de Percoll, afecta al ADN y cuando se realiza por 45 minutos reduce la integridad de la membrana plasmática. Estas diferencias se atribuyen al tiempo de centrifugación ya que estos últimos autores utilizaron 45 minutos.

La cola del espermatozoide es una estructura flagelada fina y alargada, encargada del movimiento y metabolismo. Si bien se sabe que la cola del espermatozoide es la porción que se encarga de proporcionarle

el movimiento que este necesita para avanzar por el tracto reproductivo de la hembra; no obstante, este movimiento se da de forma que la cola de los espermatozoides utiliza muelles elásticos interconectados para transmitir información mecánica a partes distantes de la cola, ayudándola a doblarse y nadar (Albarrán 1992, p. 272). Cabe recalcar que las diferencias encontradas no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) demostrando así que los diferentes tiempos de centrifugación utilizados en esta investigación no afectaron la cola de los espermatozoides. Así mismo, de acuerdo con Holy (1987, p.311) todos los valores obtenidos de cabezas y colas normales tanto en los tratamientos como en el control son clasificados por este autor como aptos para ser utilizados en la reproducción, ya que recomienda que las anomalías en general no deben superar el 30%.

#### CORRELACIONES

Se encontró una alta correlación positiva entre motilidad individual y viabilidad ( $P < 0.0001$ ;  $r = 0.8264$ ), entre endósmosis positiva y motilidad individual ( $P < 0.0001$ ;  $r = 0.7083$ ) y entre endósmosis positiva y viabilidad ( $P < 0.0001$ ;  $r = 0.6041$ ).

Los resultados obtenidos sugieren que al tener un alto porcentaje de espermatozoides vivos y mayor MI, mayor será la EP lo que representará un semen de mejor calidad y mayor capacidad fecundante para realizar la IA o la FIV, esto implica la gran importancia que cobra una alta MI y viabilidad del semen pos congelado al momento de realizar los procesos de fecundación *in vitro*; lo anterior sugiere que bajo las condiciones de este estudio, no hubo efectos deletéreos causados por los tiempos de centrifugación utilizados en la técnica de Percoll 45-90% sobre los parámetros analizados.

#### CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio los diferentes tiempos de centrifugado (5, 10 y 15 minutos) a 1000g cuando se realiza el gradiente de Percoll 45-90% presentaron valores similares de endósmosis positiva (EP), por lo tanto, no afecta la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos.

Así mismo, la motilidad individual, viabilidad y morfología de los espermatozoides bovinos fueron similares en los diferentes tiempos de centrifugación a 1000g utilizados (5, 10 y 15 minutos) cuando se realiza el gradiente de Percoll 45-90%.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal en la Universidad de Zamorano, Honduras por su apoyo tanto en la parte logística como de financiación de esta investigación.

#### BIBLIOGRAFÍA

Albarrán, I 1992, 'Reproducción zootécnica del macho', 1ed, Empresa Editorial Poligráfica Félix Varela, La Habana, Cuba.  
Bedoya, N, Vásquez, N, Rivera, M, Correa, G & Trujillo, E 2003, 'Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática

de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOST)', *Revista Facultad Nacional Agronomía*, vol. 56, no. 2, pp. 1983-1997.  
Bernardi, S, Allende, R, Mazzeo, R, Monti, J & Marini, P 2011, 'Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial', *IN VET*, vol. 13, no. 2, pp. 25-38.  
Campi, S, González, L, Blasi, C, Suhevic, J, Bonet, S & Cisale, H 2007, 'Comparación entre distintos tiempos de lectura en el test de endósmosis', *Avances en Tecnología Porcina*, no. 4, pp. 48-54, viewed 16 July 2020, <<http://www.laboratoriollamas.com.ar/wp-content/uploads/2012/08/Semen-porcino-test-de-endosmosis-2.pdf>>.  
Coetzee, K, Kruger, TF, Menkveld, R, Lombard, CJ & Swanson, RJ 1989, 'Hypoosmotic swelling test in the prediction of male fertility', *Archives of Andrology*, vol. 23, no. 2, pp. 131-138.  
De Leeuws, AM, den Dass, JH & Woelders, H 1991, 'The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and the acrosomal status of bovine spermatozoa', *Journal of Andrology*, vol. 12, no. 2, pp. 112-118.  
Hansen, PJ 2013, *In vitro production of bovine embryos*, Hansen Laboratory-University of Florida: Department of Animal Science, Florida, USA, p. 47.  
Hincapié, JJ 2019, 'La Fertilización *in vitro* (FIV) en bovinos: una Biotecnología Reproductiva innovadora al servicio del mejoramiento genético', *Blog de Investigación Zamorano*, viewed 4 september 2020, <<https://www.zamorano.edu/2019/03/13/la-fertilizacion-in-vitro-fiv-en-bovinos-una-biotecnologia-reproductiva-innovadora-al-servicio-del-mejoramiento-genetico/>>.  
Holy, L 1987, *Biología de la reproducción bovina: Introducción al proceso del examen de la fertilidad de la hembra y el macho*, Ed. Científico-Técnica, La Habana, Cuba.  
Jeyendran, RS, Van der Ven, HH & Zaneveld, LJD 1992. 'The hypoosmotic swelling test: an update', *Archives of Andrology*, vol. 29, no. 2, pp. 105-116.  
López, AP, Tarazona, AM, Giraldo, CA, Mesa, C, Cadavid, DA, Echeverry, DM, Penagos, F, Álvarez, JC, Bedoya, JV, Ortíz, LF, Arias, MC, Olivera, M, Gómez, NA, Lenis, Olivera, M, Giraldo, CA, YY, Ruiz & ZT 2014, *Procedimientos para la evaluación de semen utilizado en la producción de embriones bovinos: libro de procedimientos*, pp. 95-107, Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos. Fondo Editorial Biogénesis Universidad de Antioquia Facultad de Ciencias Agrarias Medellín, Colombia.  
López N & Rivera, D 2015, 'Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro', undergraduate Thesis, Zamorano University, Tegucigalpa, Honduras.  
Minitube 2016, Spermastain manual, Minitube GmbH, Germany.  
Minitube n.d., Medios de IVP para embriones bovinos, brochure, Minitube GmbH, Germany  
Morrel, JM, Winblad, C, Georgakakos, A, Stuhmann, G, Humblot, P & Johannisson A 2013, 'Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation', *Animal Reproduction Science*, vol. 140, no. 1, pp. 62-69.  
Muiño R, Fernández M & Peña A 2006, 'Parámetros cinéticos en eyaculados bovinos de toros de raza frisona y rubia gallega', *Revista ITEA*, vol. 102, no. 1, pp. 55-66.  
Neira, JA, Ramirez, GF, Leon, SA & Moreno, DA 2007, 'Efecto de la asociación de la L-Glutamina- Etilenglicol en criopreservación de semen equino', *Revista Médica Veterinaria*, vol. 1, no. 14, pp. 93-105.  
Restrepo G, Usuga, A & Rojano, BA 2013, 'Técnicas de evaluación para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino', *Revista CES Medicina Veterinaria Zootecnia*, vol. 8, no. 1, pp. 69-79.  
Rosas, J 1997, 'Determinación de la calidad biológica del semen congelado' en Universidad Juárez Autónoma de Tabasco e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (eds), *Memorias del VI curso de actualización en reproducción animal*, Tabasco, México, pp. 25-31.  
Rubio, J & Quintero, A 2008, 'Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros,' en Gonzales,

- C, Madrid, N & Soto, E (ed), *Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito*, Editorial Astro Data SA, Maracaibo, Venezuela.
- SAS 2012, *User Guide: Statistics* (version 9.4 ed.). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc
- Saacke, RG, Nebel, RL, Karabinus, DS, Bame, JH & Mullins, J, 1988 'Sperm transport and accessory sperm evaluation', *Proc 12th Tech Conf and AI Repro*, pp. 7-14.
- Urrego R, Ríos, A, Olivera, M & Camargo, O 2008, 'Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos', *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, vol. 21, no. 1, p. 20.
- Zemjanis, R 1981, '*Reproducción animal: diagnóstico y técnicas terapéuticas*', Editorial Limusa S.A, México D.F, México.