

Evaluación de una prueba hipoosmótica simplificada en espermatozoides caninos frescos y refrigerados.

Evaluation of a simplified hypoosmotic swelling test in fresh and chilled canine spermatozoa.

Alfonso Sánchez¹ MV MSc, Daniela Garrido² MV, Claudia Rojas³ MV MSc.

Recibido: 06 Enero 2012

Aceptado: 03 Marzo 2012

Resumen

Objetivos: Evaluar una prueba hipoosmótica simplificada (HOST-s), empleando agua bidestilada e incubación por cinco minutos y compararla con una prueba hipoosmótica convencional (HOST), en espermatozoides caninos frescos y refrigerados, en diferentes tiempos, hasta por 96 horas.

Introducción: La evaluación de la fertilidad en reproductores caninos es un elemento clave para el éxito de la cría. El espermograma convencional considera relevantes aspectos tales como motilidad progresiva, morfología y concentración espermática, sin embargo, siempre existe el desafío de desarrollar técnicas para aplicar en la actividad clínica o de terreno. En este sentido se ha considerado la evaluación de la integridad de membrana, utilizando la prueba hipoosmótica (HOST) la cual, no obstante ser una buena evaluadora para espermatozoides caninos, es proceduralmente compleja; por ello se han ensayado modificaciones de la misma a fin de simplificar su aplicación, como por ejemplo el uso de agua bidestilada como solución hipoosmótica.

Materiales y Método: Se obtuvieron 20 eyaculados mediante manipulación digital, los cuales fueron evaluados por espermograma convencional; luego fueron diluidos con un diluyente a base de leche semidescremada UHT 0,5 % M.G. y refrigerados. Se realizaron evaluaciones mediante HOST, HOST-s y Motilidad Progresiva en semen fresco y a las 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración. Para comparar HOST v/s HOST-s, los datos porcentuales fueron transformados según la fórmula angular del arcoseno a fin de realizar un análisis unilateral de la varianza. Las diferencias se estimaron a través de la prueba de hipótesis específica de Tukey y para la estimación de los grados de correlación entre HOST, HOST-s y Motilidad Progresiva se utilizó el análisis de correlación de Pearson.

Resultados: Los porcentajes de espermatozoides con membrana funcional en el semen fresco, tanto con HOST ($77,0 \pm 10,5$) como con HOST-s ($95,3 \pm 3,8$) arrojaron una correlación positiva ($r=0,59$; $P < 0,05$); así como también con la motilidad progresiva (MP), $r=0,47$ para HOST y $r=0,52$ para HOST-s, respectivamente. Las correlaciones entre HOST y HOST-s en el semen refrigerado fueron $r=0,59$; $r=0,58$; $r=0,62$ y $r=0,57$ a las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente, destacándose que todas fueron significativas ($P < 0,05$).

Palabras clave: perro, semen, prueba hipoosmótica

Summary

Objectives: Evaluate a simplified hypoosmotic swelling test (HOST-s), using bidistilled water and incubation for 5 minutes and compares it with a conventional hypoosmotic test (HOST), in fresh and refrigerated canine spermatozooids in different times up to 96 hours.

Introduction: The evaluation of fertility in canine breeders is a key element for a successful nurture. The conventional spermogram considers relevant aspects such as progressive motility, morphology and spermatic concentration, however it always exist the challenge to develop techniques to apply in clinical or field work. In this way, it has been considered the evaluation of the integrity of membrane, using the hypoosmotic test (HOST), which despite being a good evaluator for canine spermatozooids, is more complex; for this reason, modifications in this test have been practiced in purpose to simplify its application, for example, the use of bidistilled water as hypoosmotic solution.

Materials and methods: It was obtained 20 ejaculation samples through digital manipulation, and these were evaluated by conventional spermogram, then they were diluted with extended based on skim milk UHT 5% M.G and refrigerated. They were evaluated through HOST, HOST-s and Progressive Motility in fresh semen and at 24, 48, 72 and 96 hours of refrigeration. For comparing HOST v/s HOST-s, the results were: The resulting percentages were transformed according to the angular formula of arcsine in purpose of doing a unilateral analysis of variance. The differences were estimated through the turkey test of specific hypothesis, and for the estimation of the grades of correlation between HOST, HOST-s and Progressive Motility was used the Pearson's correlation analysis.

Results: The percentages of sperms with functional membrane in fresh semen, so in HOST ($77,0 \pm 10,5$) as HOST-s ($95,3 \pm 3,8$) had a positive correlation ($r=0,59$; $P < 0,05$); so as the progressive motility (MP), $r=0,47$ for HOST and $r=0,52$ for HOST-s, respectively. The correlations between HOST and HOST-s in refrigerated semen were $r=0,59$; $r=0,58$; $r=0,62$ y $r=0,57$ at 24, 48, 72 and 96 hours respectively, emphasizing that all were significant ($P < 0,05$).

Key words: Dog, semen, hypoosmotic swelling test.

Introducción

En la clínica reproductiva canina, especialmente en la valoración andrológica y para la inseminación artificial, es común realizar estudios de calidad seminal en los cuales se busca establecer la fertilidad potencial de los reproductores.¹ Cabe destacar que en perros la metodología de evaluación seminal más utilizada en condiciones prácticas, considera fundamentales parámetros tales como motilidad progresiva, morfología espermática y concentración espermática.² Sin duda, uno de los desafíos para el trabajo de terreno y en la clínica es generar técnicas de evaluación de rutina, sencillas y que se correlacionen satisfactoriamente con la fertilidad.

Una de las pruebas que ha sido considerada como de metodología simple, es la prueba hipoosmótica, cuyo fundamento consiste en evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide³, esto considerando que la integridad de la misma es el requerimiento mínimo para que el espermatozoide sea móvil⁴ y que además, en condiciones fisiológicas, la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta.⁵

La prueba hipoosmótica se fundamenta en que la suspensión de espermatozoides en un medio hipoosmótico ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que la célula compensa fisiológicamente difundiendo agua al compartimento intracelular y, como consecuencia, el espermatozoide aumenta su volumen y se pueden observar cambios morfológicos en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos.^{4,6}

Para espermatozoides caninos frescos se han estudiado diferentes soluciones hipoosmóticas que fluctúan entre los 60 y 150 mOsm, siendo la fructosa y el ácido cítrico los principales solutos empleados, y con períodos de incubación de las muestras a 37° C que fluctúan entre los 30 a 60 minutos. Dichos estudios concluyen que la prueba hipoosmótica es apropiada para evaluar integridad de membrana y que podría ser incorporada a los análisis de rutina para semen de perro.^{7,8}

Por otra parte, Pinto y Kozink⁹ postulan que el tiempo de incubación podría ser una limitante para un uso más generalizado de esta técnica y evalúa la incubación de muestras de semen canino fresco y descongelado con una solución de 100 mOsm e incubación por un minuto, obteniendo correlaciones significativas con motilidad y vitalidad, destacando que los resultados no difieren de la incubación por 60 minutos.

Otro aspecto estudiado con el objeto de simplificar esta técnica, ha sido el uso de agua

bidestilada como solución hipoosmótica. Así, Hishinuma y Sekine¹⁰ evaluando espermatozoides caninos extraídos desde la cola del epidídimo en una dilución 1:4 con agua bidestilada e incubando por 5 minutos, obtuvieron una correlación significativa con la prueba hipoosmótica convencional y con la motilidad progresiva. Recientemente, se ha reportado para espermatozoides de burro, que una dilución del semen con agua bidestilada en una proporción 1:3 e incubación simple por cinco minutos a 37° constituye un buen predictor de fertilidad, dada las altas correlaciones obtenidas con pruebas más específicas de funcionalidad de membrana, utilizando fluoroforos (SYRB14 y Propidio iodado).¹¹

El objetivo del presente estudio fue evaluar una prueba hipoosmótica simplificada (HOST-s), empleando agua bidestilada e incubación por cinco minutos y compararla con una prueba hipoosmótica convencional (HOST), en espermatozoides caninos frescos y refrigerados en diferentes tiempos hasta por 96 horas.

Materiales y Método

El estudio se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Santo Tomás, Sede Catemito, Santiago de Chile, entre enero y marzo de 2011. Se utilizaron 12 perros reproductores, clínicamente sanos, ocho de raza Beagle y cuatro de raza Fox terrier, pertenecientes a un criadero de la Región Metropolitana de Chile. La edad promedio de los ejemplares fue de $3,2 \pm 1,4$ años.

Se obtuvieron 20 eyaculados por medio de manipulación digital, con presencia de hembra en celo, colectándose sólo la segunda fracción de cada eyaculado en un vaso temperado a 37° C. Cada eyaculado fue sometido a un espermograma convencional, registrándose volumen, color, pH, motilidad progresiva, concentración espermática, vitalidad y morfología.¹ Además, el semen fresco fue evaluado mediante la prueba hipoosmótica convencional (HOST)⁷ y una prueba hipoosmótica simplificada (HOST-s), diluyendo 5 μ l de semen con 45 μ l de agua bidestilada (1:10) e incubando por cinco minutos a 37° C.

El semen fue diluido en relación 1:3 con un diluyente a base de leche semidescremada UHT¹², almacenado a 4° C y evaluado a las 24, 48, 72 y 96 hrs de refrigeración, a través HOST, HOST-s y motilidad progresiva (MP). Tanto en el semen fresco como en el refrigerado, se consideraron espermatozoides con membrana funcional a aquellos que reaccionaron al estrés hipoosmótico mediante la dilatación de la parte distal de la cola espermática o enrollamiento de la misma, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados. Los resultados fueron expresados en porcentaje de espermatozoides con membrana funcional^{8,10}.

¹ Médico Veterinario, Universidad de Chile. Actividad Privada.

² Médico Veterinario, Universidad Santo Tomás. Actividad Privada.

³ Médico Veterinario, Universidad Santo Tomás. Universidad Santo Tomás (Santiago)

Los datos porcentuales fueron transformados según la fórmula angular del arcoseno a fin de realizar un análisis unilateral de la varianza. Las diferencias se estimaron a través de la prueba de hipótesis específica de Tukey. Para la estimación de los grados de correlación se utilizó el análisis de correlación de Pearson. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia de $P < 0,05$. Se utilizaron los programas Excel-Software® y Prism®.

Resultados y Discusión

Los doce perros utilizados como donantes respondieron satisfactoriamente al método de obtención de semen. Las características seminales de los 20 eyaculados se presentan en la Tabla 1 y los valores pueden ser considerados como normales para la especie.^{2,13}

Los porcentajes de espermatozoides con

membrana funcional en el semen fresco, tanto con HOST ($77,0 \pm 10,5$) como con HOST-s ($95,3 \pm 3,8$) arrojaron una correlación positiva ($r=0,59$; $P < 0,05$); así como también con la motilidad progresiva (MP), $r=0,47$ para HOST y $r=0,52$ para HOST-s, respectivamente; lo cual concuerda con otros estudios de integridad de membrana en espermatozoides caninos.^{7,8,9,12,14}

Las correlaciones entre HOST y HOST-s en el semen refrigerado fueron $r=0,59$; $r=0,58$; $r=0,62$ y $r=0,57$ a las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente, destacándose que todas fueron significativas ($P < 0,05$). El detalle de los valores de HOST y HOST-s en el semen refrigerado se presenta en la Tabla 2. El patrón de dilatación espermática observado en semen fresco y refrigerado, con ambas pruebas hipoosmóticas fue similar, destacando la curvatura de las colas con dilatación de la región distal de la misma (Figuras 1 y 2), tal como describen otros autores.^{8,10}

Tabla 1. Características del semen fresco ($n= 20$ eyaculados) obtenido de doce perros sexualmente maduros, de raza Beagle y Fox terrier.

Variable Seminal	Promedio \pm Desviación Estándar (D.E.)
Volumen (ml)	$1,7 \pm 0,67$
Concentración (esp. $\times 10^6$ /ml)	$335,3 \pm 230,3$
Espermatozoides totales (10^6 /ml)	$527,8 \pm 240,9$
Motilidad progresiva (%)	$90,9 \pm 6,3$
Espermatozoides vivos (%)	$97,5 \pm 1,6$
Espermatozoides normales (%)	$89,5 \pm 6,9$

Tabla 2. Valores de Integridad funcional de membrana evaluado mediante HOST y HOST-s en espermatozoides caninos frescos y refrigerados.

Parámetro	Semen	Semen Refrigerado a 4° C			
		Tiempo de Refrigeración (horas)			
		24 (n=20)	48 (n=20)	72 (n=20)	96 (n=20)
HOST (%)	$77,0 \pm 10,5a$	$76,0 \pm 10,1a$	$70,5 \pm 11,1a$	$64,4 \pm 10,6a$	$59,4 \pm 9,9a$
HOST-s (%)	$95,3 \pm 3,8b$	$86,8 \pm 9,8b$	$81,0 \pm 10,6b$	$72,8 \pm 12,3b$	$65,0 \pm 13,1b$

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas ($P < 0,05$)



Figura 1. Espermatozoides caninos dilatados (semen fresco) luego de ser sometidos a una prueba hipoosmótica simplificada, empleando agua bidestilada e incubación a 37° C por cinco minutos (40 X).



Figura 2. Espermatozoides caninos dilatados (semen refrigerado) luego de ser sometidos a una prueba hipoosmótica simplificada, empleando agua bidestilada e incubación a 37° C por cinco minutos (10X).

Al comparar la integridad de membrana entre HOST y HOST-s, ya sea en el semen fresco como a través de los todos los tiempos de refrigeración, se observaron mayores porcentajes de dilatación con el método simplificado ($P < 0,05$); esto se podría explicar por la menor osmolaridad de HOST-s respecto de HOST (55 mOsm versus 150 mOsm). Tal como en el semen fresco, en el semen refrigerado en los

diferentes tiempos se encontró una correlación significativa entre HOST/MP y entre HOST-s/MP con valores que se pueden agrupar en torno a $r=0,51$ ($P < 0,05$). La MP fue $90,9 \pm 6,3$ % en el semen fresco y en el semen refrigerado experimentó una disminución prácticamente lineal en el tiempo con valores de $77,5 \pm 12,4$; $68,1 \pm 13,9$; $60,3 \pm 13,9$; $51,8 \pm 14,1$ a las 24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente. Esté patrón de disminución de la motilidad progresiva en el semen refrigerado se asocia al shock térmico que inestabiliza el metabolismo de los espermatozoides.¹⁵

Conclusiones

Las relaciones estadísticas observadas entre la prueba hipoosmótica simplificada (HOST-s) propuesta en este estudio, y la prueba hipoosmótica convencional (HOST), así como con la Motilidad Progresiva, permiten señalar que el HOST-s es un método simple, rápido y barato que podría ser incluido en los análisis de rutina de semen canino fresco y/o refrigerado, especialmente en condiciones de terreno o en la clínica.

Referencias bibliográficas

1. Sánchez A. Estudio clínico reproductivo del macho canino. MEVEPA; 2006, 19 (4): 4 - 21.
2. Root Kustritz MV. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*; 2007, 68: 329 – 337.
3. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *J Reprod Fertil*; 1984, 70: 219 - 228.
4. De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ. The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl 1*; 1990, 95 - 104.
5. Hafez, ES. Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7^a ed. México: MacGraw-Hill. 2002, 441 - 452.
6. Bredderman P, Foote, R. Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmatic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. *Anim Reprod Sci*; 1969, 28: 496 - 501.
7. Kumi-Diaka J, Badtram G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology*; 1994, 41: 1355 – 1366.
8. England GC, Plummer JM. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*; 1993, 47: 261 – 270.
9. Pinto CR, Kozink DM. Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*; 2008, 104: 450 - 455.
10. Hishinuma M, Sekine J. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. *J Vet Med Sci*; 2003, 65 (7): 817 - 820.
11. Rota A, Bastianacci V, Magelli C, Panzani D, Camillo F. Evaluation of plasma integrity of donkey spermatozoa. *Reprod Dom Anim*; 2010, 45 (2): 228 - 232.
12. Sánchez A, Cartagena A, Berland M. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev Inv Vet Perú*; 2006, 17 (1): 1 - 7.
13. England GC, Allen WE. Semen characteristics and fertility in dogs. *Vet Rec*; 1989, 399 - 401.
14. Sánchez A, Rubilar J, Gatica R. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Arch Med Vet*; 2002, 34: 123 – 130.
15. Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon J, Magistrini M.. Advances in cooled semen technology. *Animal Reprod Sci*; 2001, 68: 181 -190.