

CORRELACIÓN ENTRE EL TEST DE ENDOSMOSIS (HOST) Y OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD ESPERMÁTICA EN SEMEN CRIOPRESERVADO DE BÚFALOS MURRAH

Quintero-Moreno, A., Osorio, C., González, D., Nava-Trujillo, H. y Rubio-Guillén J.
Laboratorio de Andrología, Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA)/ Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia (LUZ). Venezuela.
armando.quintero@fcv.luz.edu.ve

INTRODUCCIÓN

Los parámetros convencionales de calidad usados para la evaluación seminal tienen aplicaciones limitadas debido a que solo ayudan a evaluar la integridad estructural de la célula. Por lo tanto, cualquier intento que derive en la evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática (IFMP) del espermatozoide es notorio debido a su importancia en el proceso de fecundación. Desde que Jeyendran *et al.* (1984), desarrollaron el test de endosmosis celular (HOST) para evaluar IFMP de los espermatozoides humanos, se han realizado muchos experimentos validando su uso como herramienta eficaz para la valoración seminal. Sin embargo, en búfalos solo se han realizado pocos estudios en referencia a este tópico. El fundamento del HOST se basa en la observación de las alteraciones morfológicas que sufren los flagelos de los espermatozoides (incremento de tamaño y flagelos flectados o curvos) al ser expuestos a un medio hiposmótico, el cual ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular e intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer difundiendo agua al compartimiento intracelular, aumentando la célula su volumen, lo cual se evidencia al observar la torsión de sus flagelos en diferentes grados. El presente estudio se condujo con el objetivo de evaluar si existe una correlación significativa entre el HOST y otros parámetros rutinarios (porcentajes de vitalidad, motilidad e integridad del acrosoma) que valoren la calidad seminal.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó semen criopreservado de 3 eyaculados de 5 búfalos (n=15) de raza Murrah con edades comprendidas entre 3 y 5 años, los cuales se procesaron en un centro especializado en la producción de semen bovino, ubicado en el estado Zulia, Venezuela, entre las coordenadas 10° 15' latitud norte y 72° 25' longitud oeste. Los eyaculados fueron colectados entre las 5:00 y 7:00 de la mañana mediante vagina artificial con temperatura entre 42-46°C. Una vez obtenido el eyaculado se realizó la evaluación seminal de rutina y las muestras clasificadas como idóneas para congelar fueron procesadas en un diluyente utilizado para bóvidos y almacenadas hasta su descongelación y evaluación (Rubio-Guillén *et al.*, 2007). Cerciorada su calidad, 3 pajuelas por cada búfalo se trasladaron al Laboratorio de Andrología de LUZ para realizar las evaluaciones complementarias que permitieron capitalizar los objetivos planteados en este experimento. Se descongeló cada pajuela de semen sumergiéndola en un baño de María (BM) a 37 °C durante 30 segundos y luego se vertió su contenido en un vial de micro centrífuga de 1,5 ml, ubicado en una gradilla colocada en BM a 37°C. Una vez descongelado el semen se tomó una alícuota de 5 µl y se colocó en una cámara desechable Leja® de 20 µm calefactada a 37°C y se cuantificó la motilidad espermática mediante un sistema de análisis computarizado de la motilidad (CASA/ Sperm Class Analyzer, S.C.A®. v 3.2.0, Microptic S.L., Barcelona, España), la cual captura los espermatozoides en movimiento con el fin de guardarlos como imágenes digitalizadas. Este análisis fragmenta la motilidad espermática según su velocidad y progresividad; sin embargo, en este ensayo se tomó en cuenta la motilidad según los porcentajes de espermatozoides rápidos (PER) y estáticos (PEE), y la motilidad individual progresiva (PMP). Para la evaluación de los otros parámetros se extrajeron 50 µl del semen descongelado y se introdujeron en un vial con 500 µl de solución salina fosfatada (PBS) temperada en el BM a 37°C. Luego se centrifugó la mezcla de PBS + semen a 600 g durante 2 min., se desechó parte del sobrenadante y se resuspendió el precipitado en PBS. La evaluación del porcentaje de vitalidad (PV) fue hecha por el método sugerido por Swanson y Bearden (1951). Se extrajo 10 µL del y se mezcló con una gota de igual volumen del colorante y se colocó en un portaobjeto temperado a 37°C, inmediatamente se

homogenizó suavemente y se hizo un extendido fino (frotis), dejando secar por 30 min. Los frotis se observaron en el microscopio con el objetivo de inmersión (1000X) y se cuantificó un total de 100 espermatozoides con el fin de valorar el porcentaje de espermatozoides vivos en la muestra seminal. La proporción de espermatozoides muertos con membranas plasmáticas permeables se tiñen, y sus cabezas se observaban de color rosado en sus diferentes tonalidades, que van desde el rojizo hasta el rosado pálido, en cambio, los espermatozoides vivos presentan las cabezas de color blanco y/o claros, lo cual es producto de que tienen sus membranas plasmáticas intactas, lo cual no permite el paso del colorante. El porcentaje de acrosomas íntegros (PAI) fue valorado mediante la tinción SpermBlue® (Van der Horst y Maree, 2009). Del mismo modo, el procedimiento empleado para realizar el HOST, además de la evaluación de sus resultados se realizó según el protocolo seguido por Quintero-Moreno et al. (2012) para espermatozoides bovinos utilizando una osmolaridad de 102 mOsm/L⁻¹. El análisis estadístico fue realizado mediante el paquete estadístico SAS para Windows, Software 8.2 (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. EEUU). En primera instancia se valoró la media y el error estándar de todos los parámetros de calidad seminal realizados en cada búfalo, para luego realizar una correlación de Pearson (sin discriminar por reproductor) con el fin de determinar la relación lineal existente entre la prueba HOST con los otros parámetros de valoración de la calidad seminal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que describen los valores medios obtenidos y la respuesta de someter la muestra seminal a la prueba HOST y su correlación con otros parámetros que califican la calidad seminal están presentados en la tabla 1 y 2, a excepción del PAI con valores que oscilaron entre 87 y 92%, no mostrando asociación con ninguno de los otros parámetros evaluados. La media de espermatozoides positivos a la prueba de HOST fue 55,8%, observando un valor numérico muy bueno en el búfalo 566 y valores aceptables para los otros cuatro búfalos restantes, tomando en cuenta que la muestra corresponde a semen criopreservado. En cuanto a la motilidad, los resultados muestran la misma tendencia observada en el HOST. La media del PV (70,6%) estuvo dentro de los valores aptos recomendados para semen criopreservado, observando dos búfalos con cifras excelentes. En referencia al estudio de correlaciones estos resultados demuestran que muestras seminales con buen PER ($p=0,0069$) y bajo PEE ($p=0,0065$) a la descongelación están altamente asociadas a una respuesta favorable al HOST. Sin embargo, cabe destacar que no se encontró asociación entre el test y el PMP ($p=0,78$). De la misma manera, se pudo apreciar una asociación positiva entre el PV y la prueba HOST ($P=0,0278$).

Los valores de esta investigación para HOST y PV son muy parecidos a los encontrados en estudios previos (Khan e Ijaz., 2008; Ijaz *et al.*, 2009). Haciendo referencia a la motilidad, sólo se encontró una investigación en semen criopreservado de búfalo donde utilizan el CASA bajo el criterio usado en esta investigación (Sohail et al., 2013) y los resultados son bastante parecidos al nuestro, sin embargo, el PMP en ese experimento fue ligeramente inferior. Estos resultados demuestran una correlación significativa entre el HOST y parámetros como el PV, PER y PEE, hecho que no se logró contrastar al no conseguir investigaciones de este tipo en semen criopreservado de búfalos; sin embargo, en semen fresco de búfalo (Lodhi et al., 2008) o semen criopreservado de toro (Sharma et al., 2012) describen que existe una correlación altamente significativa entre el HOST versus el PV y el PMP cuantificada mediante un técnico experto, lo cual sugiere que la sola medición de alguno de estos parámetros podría aportar información importante sobre el potencial reproductivo de un búfalo. Sin embargo, es importante acotar, que cuando se relaciona alguno de estos parámetros con la fertilidad los resultados son contradictorios. Quintero et al. (2011) encontraron una correlación significativa entre la fertilidad en vacas inseminadas con semen criopreservado de toros y la prueba de HOST, en contraste, Bacinoglu et al. (2008) no lograron demostrarlo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bacinoglu, S.; Tas, M.; Cirit, U.; Özdas, Ö. & Ak, k. Anim. Reprod. Sci. 104:38-46. 2008.

Ijaz, A., Hussain, A., Aleem, M., Yousaf, M.S. & Rehman, H. 2009. Theriogenology 71: 1326-1329.

Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Pérez-Pelaez, M. & Crabo, B.G. 1984. J Reprod Fertil. 70: 219-228.

Khan, M.I.R. & Ijaz, A. 2008. Animal 2: 548-553.

Lodhi, L., Zumbair, M., Qureshi, Z., Ahmad, I. & Jamil, H. 2008. Pakistan Vet J. 28: 186-188.

Quintero-Moreno, A., Nava, J., Legones, A., Osorio, C., Rubio-Guillen, J. & González, D. 2012. Rev Científ. FCV-LUZ. XXII (Suppl. 1): 82.

Quintero-Moreno, A., Rubio-Guillén, J., González, D., Gutiérrez, J., Madrid-Bury, N. & Garde, J. 2011. Rev Científ FCV-LUZ. XXI (5): 403 – 407.

Rubio-Guillén, J., González, D., Garde, J.J., Esteso, M., Fernández, M., Rodríguez-Gil J. E., Madrid, N. & Quintero-Moreno, A. 2007. Reprod Dom Ani. 42: 354-357.

Sharma, M., Singh, M., Kapoor, S. & Jasial, S. 2012. Open Vet J. 2: 26-31.

Sohail, A., Andrabi, S., Anwar, M., Ali, L. & Mehmood, A. 2013. Pakistan Vet J. 33: 53-56.

Swanson, E.W. & Bearden, H.J. 1951. J Anim Sci. 10: 981-987.

Van der Horst, G. & Mare, L. 2009. Biotech Histochem. 84: 299-308.

Tabla 1. Valores (Media±Error Estándar) porcentuales de los parámetros evaluados

Bufalo	Host+ (%)	Motilidad (%)			Vitalidad (%)
		Progresiva	Rápidos	Estáticos	
183	47,0±1,5	34,9±0,9	26,3±0,3	28,7±0,8	59,0±1,7
566	74,2±3,7	39,9±2,6	57,9±3,4	3,4±0,4	78,5±1,9
4119	57,0±3,8	24,5±3,2	25,4±2,1	23,0±1,2	87,0±1,6
4127	49,2±1,3	21,8±0,7	22,4±0,9	32,7±1,1	58,3±1,9
5711	49,2±4,2	33,7±2,4	27,7±3,2	36,4±4,6	63,2±0,7
Media	55,8±2,6	30,5±1,7	32,6±2,8	24,4±2,5	70,6±2,4

Tabla 2. Correlación de Pearson entre los diferentes parámetros evaluados

Parámetros	Vitalidad Espermática (%)	HOST+ (%)
Motilidad Progresiva (%)	0,16126	0,08616
Espermatozoides Rápidos (%)	0,39190*	0,58374**
Espermatozoides Estáticos (%)	-0,56098**	-0,58730**
Vitalidad Espermática (%)	-	0,49143*

* P<0,05. **P<0,01.

CORRELATION BETWEEN HYPO-OSMOTIC SWEELING TEST (HOST) AND OTHERS PARAMETERS OF SPERM QUALITY IN FROZEN-THAWED MURRAH BUFFALO SEMEN

ABSTRACT: The present study was conducted to determine the correlation of Hypo-osmotic swelling test (HOST) with routine sperm evaluation parameters of frozen-thawed semen (FTS) of Murrah buffalos. Percentages of sperm vitality (PV), acrosomal integrity (PAI), progressive motility (PMP) and rapid (PER)/ static (PEE) sperm associated with HOST positive sperm percentage were evaluated in 15 straws of 5 buffalo bulls. One part of FTS was used for the evaluation of sperm motility with Sperm Class analyzer®, while the other part was centrifugated and diluted with Phosphate buffered saline (PBS) to use in the evaluation of others parameters, and HOST preparation (osmolarity: 102 mOsm/L). Statistical analysis revealed a significant correlation between PER (positive, p<0.01), PEE (negative, p<0.01), PV (positive, p<0.05) and percentage of HOST. It was inferred that HOST could be a valuable method for routine evaluation of FTS.

Keywords: semen, sperm, HOST, buffalo.