

RELACIÓN ENTRE LOS DATOS OBTENIDOS POR ECOGRAFÍA TESTICULAR Y LA CALIDAD SEMINAL EN SEMENTALES OVINOS: RESULTADOS PRELIMINARES

Carvajal-Serna¹, M., Santorromán, M.J.¹, Barale, J.¹, Macías, A.^{1,3}, Quintín, F.⁴, Abecia, J.A.², Casao, A.¹ y Pérez-Pé, R.¹.

¹Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular y ²Dpto. PACA (grupo BIOFITER), Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Zaragoza. España.

³Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino de Raza Rasa Aragonesa (ANGRA). Cabañera Real s/n 50800 Zuera (Zaragoza).

⁴Centro de Transferencia Agroalimentaria
Email: melissac@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La ecografía testicular se ha revelado como una valiosa técnica no invasiva para evaluar el parénquima testicular, así como posibles patologías genitales en varias especies domésticas de interés veterinario, incluida la especie ovina (Gouletsou *et al.*, 2003). El tejido testicular presenta una alta actividad metabólica y por tanto es muy sensible a la disminución de su suministro nutritivo, que es aportado, principalmente, por medio de la arteria testicular. Varios investigadores han demostrado una asociación entre el flujo sanguíneo testicular y la calidad seminal en varias especies (Batissaco *et al.*, 2013; Hedia *et al.*, 2018). Como parte de un proyecto de investigación vigente, nos planteamos evaluar el potencial de la ecografía testicular junto con el análisis de imágenes con un software específico (Ecotext) para analizar cambios en el parénquima de los sementales ovinos sin necesidad de biopsia o análisis postmortem de los animales. Como primera aproximación se planteó el análisis ecográfico de un número suficiente de moruecos para establecer si los valores de referencia de la casa comercial del Ecotext eran válidos para la especie ovina. Además, se incluyeron en el estudio los datos relativos al flujo sanguíneo de la arteria testicular proporcionados por el ecógrafo en modo Dópler. Se obtuvieron muestras seminales y se estudió la relación de los parámetros proporcionados por el Ecotext y por el eco-dópler con determinados parámetros de calidad seminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron ecografías testiculares y eco-dópler de las arterias testiculares utilizando un ecógrafo Exago y una sonda de 7,5 MHz, a un total de 22 moruecos, de edades comprendidas entre 1 y 10 años, pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino de Raza Rasa Aragonesa (ANGRA). Parte de ellos estaban estabulados en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, y parte en el CENSYRA de Movera. Para la valoración de la estructura testicular se utilizó el software Ecotext (de Humeco) que consigue medir estructuras microscópicas y proporciona valores de 6 parámetros: 3 de ellos relacionados con la luz de los túbulos seminíferos (% área, diámetro medio en μm y densidad) y los otros 3 con el número de pixels negros (ECOTEXT 1, Ec1), blancos (ECOTEXT 2, Ec2) o grises (ECOTEXT 3, Ec3). Mediante eco-dópler se obtuvieron los índices de pulsatilidad (IP) y de resistencia (IR).

Se obtuvo semen de 12 de los machos del estudio estabulados en la facultad de Veterinaria mediante vagina artificial el mismo día de las ecografías, 1 vez al mes durante 4 meses durante la estación reproductiva. Se analizó la concentración por recuento en cámara de Neubauer, la motilidad total (MT) y progresiva (MP) usando un sistema CASA (PROISER) y la viabilidad mediante la doble tinción de fluorescencia con CFDA y yoduro de propidio (PI) y citometría de flujo. El estudio morfométrico (tinción eosina-nigrosina) incluyó la valoración de espermatozoides normales, con cabeza suelta, cola enrollada o doblada y presencia de gota citoplásmica proximal o distal. La valoración del estado de capacitación se llevó a cabo mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) (Gillan *et al.*, 1997). El daño en el DNA se estudió mediante la técnica TUNEL (Li y Darzynkiewicz, 1995) usando el kit "In situ cell death detection kit, fluorescein" (Roche) mediante citometría de flujo. La inversión de fosfaditilserina (PS) en la cara externa de la membrana espermática se evaluó usando anexina, junto con yoduro de propidio para diferenciar espermatozoides vivos y muertos con o sin inversión de PS.

Los niveles de especies oxígeno reactivas (ROS) en los espermatozoides se determinaron por tinción con H₂DCFDA y PI (Guthrie, 2006) mediante citometría de flujo, diferenciando entre vivos y muertos con altos o bajos niveles de ROS.

La relación entre los parámetros de calidad seminal y los valores ecográficos se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson usando el software SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos proporcionados por el software Ecotext tras las ecografías testiculares y los índices de pulsatilidad y resistencia del eco-dópler correspondientes a los 22 machos evaluados se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de los parámetros proporcionados por el software Ecotext tras ecografía testicular y valores de eco-dópler. Comparación con los valores publicados para otras especies (Humeco, Manual de uso de Ecotext)

Valores ecógrafo	Valores obtenidos (n=96)				Límites de referencia publicados para otras especies (Ecotext)
	MEDIA	S.E.M.	mínimo	máximo	
% área	8,67	0,25	4,00	14,80	6-15
Diámetro medio (µm)	106,0	1,46	79,95	149,4	90-150
Densidad	144,9	1,78	92,54	176,1	Min 155
Ecotext 1 (Ec1)	22,79	2,11	0,0	103,0	Min 1
Ecotext 2 (Ec2)	165,70	15,41	5,0	597,0	Max 30
Ecotext 3 (Ec3)	100,20	0,82	78,88	116,0	70-100
Valores Ecodópler					
Índice Pulsatilidad (IP)	0,84	0,02	0,16	2,27	
Índice Resistencia (IR)	0,54	0,00	0,14	0,99	

Los valores de referencia publicados en el manual de uso de Ecotext son cifras orientativas sobre el rango en el que debe estar situado un resultado ECOTEXT para ser considerado dentro de lo normal o fisiológico. Fuera de estos rangos, el valor puede estar indicando una anomalía de la función espermatogénica, mayor cuantos más parámetros están fuera de rango. Si atendemos a estos valores de referencia, de los 22 moruecos analizados, todos ellos presentan al menos algún valor fuera de rango para los 2 testículos: 10 de ellos, 1 valor fuera; 7, 2 valores fuera y 5, 3 valores fuera. Los parámetros se encuentran fuera de rango son Ec2 (para 17 machos), densidad (para 15) y Ec3 (para 7). Dado que los valores de referencia fueron obtenidos tras el análisis testicular de verracos, es posible que estas cifras no sean válidas para la especie ovina, especialmente Ec2, con valores mucho más altos, y la densidad de los túbulos seminíferos, con valores inferiores.

Los valores mínimos de IP e IR coinciden con los publicados por Hedia *et al.* (2019) para moruecos, aunque los máximos del presente estudio son ligeramente mayores.

Al analizar estadísticamente la relación entre los parámetros proporcionados por el software Ecotext y la calidad seminal, se encontraron algunas correlaciones significativas que se recogen en la Tabla 2.

La densidad de túbulos en el testículo correlacionó negativamente con el porcentaje de espermatozoides que presentan translocación de PS en su membrana (parámetro que suele relacionarse con un proceso apoptótico) y con gota citoplásmica proximal. Contrariamente, el área tubular y Ec3 mostraron una correlación positiva con anomalías morfológicas, en este caso, existencia de cabezas sueltas. Otros trabajos basados en análisis de imágenes ecográficas han relacionado la heterogeneidad de los píxeles con anomalías morfológicas en ovino (Ahmadi *et al.*, 2012). Ec2 correlacionó positivamente con la concentración, así como con el porcentaje de espermatozoides no capacitados, y con altos niveles de ROS. Además, es interesante señalar que la densidad mostró una correlación significativa con la edad de los animales. En cuanto a los valores del eco-dópler, IP e IR correlacionaron positivamente con el área ($r=0,43$ y $0,44$, respectivamente, $P < 0,01$) y la densidad de los túbulos ($r = 0,45$ y $0,46$,

respectivamente, $P < 0,01$) pero no se halló ninguna correlación con los valores de calidad seminal.

Tabla 2. Coeficiente de correlación de Pearson (y significación) entre parámetros proporcionados por el software Ecotext tras ecografía testicular con la edad y algunos parámetros de calidad seminal ($n=30$).

	Edad (años)	Conc. (10 ⁹ cel/mL)	M.P.	Viables /ann – (%)	Ann + (%)	ROS + (%)	NC (%)	C (%)	RA (%)	Cab. suelta (%)	Gota prox (%)
Densidad	,419 (,074)		,272 (,094)		-,348 (,032)						-,543 (,002)
% área									,395 (,014)	,445 (,014)	
Ecotext 2		,334 (,038)				,384 (,016)	,385 (,017)	-,348 (,032)			
Ecotext 3		,371 (,020)		-,354 (,029)						,647 (,000)	

M.P: motilidad progresiva; ann: anexina; NC: no capacitados; C: capacitados y RA: reaccionados.

A la vista de estos resultados preliminares se hace necesario un estudio con mayor número de animales para establecer unos valores de referencia válidos para sementales ovinos en relación con la calidad seminal y la fertilidad obtenida con las dosis seminales de esos sementales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Ahmadi, B. et al, 2012. Exp. Biol. Med. 237: 186-193 • Batissaco, L. et al., 2013. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 50:384-395 • Gillan, L. et al., 1997. Rep. Fertil. Dev. 9:481-487. • Gouletsou P.G. et al., 2003. Theriogenology 59:1959-1972. • Guthrie, H.D. & Welch, G.R., 2006. J. Anim. Sci. 84:2089-2100. • Hedia, M.G. et al., 2018. Theriogenology 123: 68-73. • Li X & Darzynkiewicz Z., 1995. Cell Prolif. 28:571-579. • **Agradecimientos: AGL2017-83799-R, DGA-A07_17R y IUCA.**

RELATIONSHIP BETWEEN TESTICULAR ULTRASONOGRAPHY DATA AND SPERM QUALITY IN RAMS: PRELIMINARY RESULTS

ABSTRACT: Ultrasonography has proved to be a non-invasive technique for evaluating testicular parenchyma in several domestic species, including ovine. The aim of this study was evaluated the potential of ultrasonography along with specific software for image analysis (Ecotext), to follow changes in the parenchyma without a biopsy or postmortem analysis. As a first approximation, a sufficient number of rams were subjected to ultrasonography to establish if the reference values provided by the Ecotext supplier were valid for rams. In addition, data related to the blood flow of the testicular artery provided by Doppler-mode were included in the study. Fresh semen samples were obtained, and the relationship of the Ecotext parameters and testicular blood flow with sperm quality parameters was studied. The obtained values of Ec2 and density of seminiferous tubules were out of range for all the animals analyzed. Taking into account that these are preliminary results, we found that some of the ultrasonography parameters correlated with morphological alterations, capacitation status, ROS levels or the age of the animals. A study with a larger number of animals is necessary to establish valid reference values for rams in relation to the sperm quality and the fertility obtained with the seminal doses.

Keywords: Blood flow, Doppler, Ecotext, Testicular tissue.