

COMPARACIÓN ENTRE DISTINTOS TIEMPOS DE LECTURA EN EL TEST DE ENDÓSMOSIS

Campi S*, González L*, Blasi C*, Suhevic J*, Bonet S#, Cisale H*.

* Laboratorio de calidad seminal y criopreservación. Fac. Cs. Veterinarias UBA.
Instituto de Tecnología Agroalimentaria. Universidad de Girona

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar diferentes tiempos de lectura post-incubación en el Test de Endósmosis (HOST) para establecer la posible existencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos. Se trabajó con semen fresco de cuatro verracos adultos en rutina de extracción. Las muestras fueron tratadas con y sin diluyentes comerciales elegidos aleatoriamente. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico que no mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los distintos tiempos de lectura.

INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática de los espermatozoides de mamíferos 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. (1, 12). 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 oocito. Todos ellos requieren de la actividad bioquímica de la membrana (4), y, por lo tanto, es muy importante evaluar la estructura e integridad funcional de la misma. (7, 12). Para ello existen distintas pruebas que valoran la respuesta osmótica de la membrana: Test de Resistencia Osmótica (ORT), Test de Resistencia Hiperosmótica (HRT) y Test de Endósmosis (HOST) (2).

El Test de Resistencia Osmótica (ORT) fue descrito por Schilling y colaboradores (10) 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 hipoosmótico con la posterior valoración de los fenómenos osmóticos que ocurren en el acrosoma (2).

El Test de Resistencia hiperosmótica (HRT) se basa en que la capacidad de resistencia de los espermatozoides porcinos a cambios súbitos de osmolaridad. Está relacionada con la calidad seminal, tanto cuando se compara con otras pruebas "in vitro" como cuando se utiliza como indicador de calidad seminal "in vivo" (2).

El Test de Endósmosis se basa en estudios previos realizados por Drevious y Eriksson (6), que demostraron la capacidad de los espermatozoides de toro, conejo y hombre para captar agua en un medio hipoosmótico. El fenómeno osmótico observado necesita de la integridad estructural y funcional de la membrana. (8)

El test de Endósmosis (HOST) (4, 6, 7, 11) se fundamenta en las modificaciones producidas en la cola (hinchamiento o "swelling") (3) cuando los espermatozoides son incubados en un medio hipoosmótico durante un breve período. Estos cambios se observan más fácilmente en la cola, ya que en ella la membrana está más libre que en la cabeza del espermatozoide (11).

En estudios previos no se han encontrado diferencias significativas en los resultados obtenidos entre el HOST y el ORT siendo el primero una prueba rápida, sencilla y de fácil lectura (3).

Uno de los problemas más importantes encontrados en la producción de dosis seminales porcinas refrigeradas, corresponde a la falta de uniformidad en la distribución del trabajo a lo largo de la semana, existiendo una mayor concentración de producción los días lunes y jueves en virtud de los sistemas de sincronización de celos por destete en las granjas. Este hecho impide la realización de una valoración completa de las dosis producidas durante esos días, dado que para ello debería aumentarse en forma considerable la mano de obra calificada. La motilidad espermática junto con la calidad del movimiento progresivo son los parámetros

utilizados con más frecuencia para medir la calidad de un eyaculado, a pesar de presentar una pobre correlación con la fertilidad en vivo y de no evaluar en forma integral la calidad de la muestra (5).

En virtud de que el Test de Endósmosis (HOST) ha demostrado ser una técnica confiable en la predicción de fertilidad, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar diferentes tiempos de lectura post-incubación del mismo para establecer si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos. De no existir variaciones, esta rápida prueba de fácil interpretación permitiría realizar una evaluación posterior de las dosis ya procesadas.

TABLA 1: MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DISPERSIÓN DE LAS DISTINTAS LECTURAS

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 7
Número de muestras	58	58	58	58
Media	52,8	49,7	50,0	49,5
Desvío Estándar	17,9	16,8	17,6	17,2
Coefficiente de variación (CV)	33,9	33,9	35,3	34,8

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó semen fresco de cuatro verracos adultos en rutina de extracción, alojados en corrales cubiertos, alimentados una vez al día con alimento balanceado y acceso al agua ad-libitum.

Extracción de semen: las muestras fueron obtenidas por la técnica de la "mano enguantada" una vez por semana. La fracción rica se colectó en un vaso de precipitados al que se le colocaron dos capas de gasa para filtrar los gránulos de tapioca. El semen fue transportado al laboratorio a 37 °C dentro de los 30 minutos de obtenido, tras lo cual fue mantenido a la misma temperatura en baño termostático.

Tratamiento de las muestras: una alícuota del semen fresco fue utilizada para realizar las distintas pruebas de valoración. El resto de la muestra fue fraccionado en cuatro partes iguales agregándose a cada uno un diluyente comercial diferente. Los diluyentes utilizados fueron: M III, Androstar, Porci-star y MR-A.

TABLA 2: RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA REALIZADO PARA LAS DISTINTAS LECTURAS

Variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	P
Entre grupos	3	142,82	0,47	0,97
Dentro de los grupos	228	303,23		
Total	231			

Pruebas de valoración: tanto en las muestras de semen fresco como en aquellas de semen con diluyente se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos (coloración vital con eosina), motilidad progresiva individual (porcentaje de espermatozoides móviles), integridad acrosomal (porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto) y Test de Endósmosis. La motilidad progresiva individual fue evaluada en forma subjetiva, tal como se realiza normalmente en la mayoría de los centros de producción de dosis seminales.

Test de Endósmosis: se utilizó 1 ml de una **solución hipoosmótica (100 mosmol/l) constituida por 490 mg de citrato de sodio y 900 mg de fructosa en 100 ml de agua**

destilada. A esta solución se le agregaron 25 ml de semen con y sin diluyente, incubándose a 37 °C durante 10 minutos. Cabe mencionar que los diluyentes fueron elegidos aleatoriamente. La valoración se realizó con microscopía de contraste de fase a 40X. Para ello se colocaron en un portaobjetos 5 ml de la muestra y 10 ml de solución HOS a la que se le agregó formol al 3 ‰ para detener la motilidad espermática (9). Se consideraron positivos aquellos espermatozoides en los que se observó cualquier grado de torsión helicoidal de la cola (“swelling”), contándose 100 espermatozoides por cada muestra. Las lecturas se realizaron el mismo día en que fue procesado el semen, a las 24 hs, a las 48 hs y a los siete días. Las muestras de semen con solución hipoosmótica formolada fueron mantenidas en tubos cerrados y en heladera a 17°C hasta la realización de las distintas lecturas.

RESULTADOS

Para realizar el análisis estadístico de las distintas lecturas, se evaluaron 58 muestras de semen de verraco adulto.

A continuación se resumen los principales valores de tendencia central y de dispersión de las muestras analizadas, expresados en % de espermatozoides que presentaron “swelling”:

Día 1	Día 2	Día 3	Día 7
Número de muestras	58	58	58
Media	52,8	49,7	50,0
Desvío Estándar	17,9	16,8	17,6
Coeficiente de variación (CV)	33,9	33,9	35,3

Tabla 1: Medidas de tendencia central y dispersión de las distintas lecturas

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, lo que da cuenta, a priori, de la similar variabilidad respecto de la media de cada lectura.

Se efectuó un análisis de varianza y un test de comparaciones múltiples de Tukey, con el objetivo de determinar el grado de homogeneidad de las distintas lecturas; y, en caso de no ser homogéneas, identificar las diferencias estadísticas entre las mismas.

Variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	P
Entre grupos	3	142,82	0,47	0,97
Dentro de los grupos	228	303,23		
Total	231			

Tabla 2: Resumen de los resultados del análisis de varianza realizado para las distintas lecturas.

Del análisis realizado surge que no existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las distintas lecturas. Además, el test de comparaciones múltiples indicó una alta uniformidad entre las medias de cada lectura.

DISCUSIÓN

La actual industrialización de la producción porcina exige un máximo rendimiento con un mínimo costo. Para esto es sumamente importante la valoración seminal con el objetivo de predecir la fertilidad y prolificidad.

La falta de uniformidad en la distribución semanal del trabajo de producción de dosis seminales en los centros de inseminación artificial, impide realizar un número importante de pruebas de valoración de calidad del semen. Rutinariamente es válida la apreciación de la motilidad individual y de la calidad del movimiento progresivo. Pruebas realizadas más esporádicamente son las tinciones vitales y las de resistencia de membrana a medios hipoosmóticos (5), dado que demandan un tiempo más prolongado, que es limitante dada la cantidad de trabajo de estos centros. Este hecho fundamenta la importancia de contar con una prueba que permita evaluar la calidad seminal y pueda ser leída en días posteriores al procesamiento del mismo. Las muestras fueron tratadas con distintos diluyentes a fin de eliminar la posible influencia de los mismos en la respuesta al Test.

El presente estudio nos ha permitido comprobar que no existen diferencias significativas ($P < 0,05$) en los distintos tiempos de lectura empleados en el Test de Endósmosis. Asimismo los resultados han sido homogéneos entre los distintos tipos de diluyentes empleados. En función de esto y dado la importancia de efectuar una valoración de la calidad del semen utilizado en los centros de inseminación artificial consideramos ventajoso la realización del Test de Endósmosis, aprovechando la posibilidad de efectuar la lectura en aquellos días en que no existe una concentración del trabajo de elaboración de dosis seminales. De esta manera no se vería afectada la rutina ni sería necesario aumentar la mano de obra calificada para realizar una valoración seminal completa.

Bibliografía

1. AURICH CHISTINE 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89: 65-75
2. BONET S, MARTÍNEZ E, RODRÍGUEZ J, BARRERA X. 2006. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcina. Biotecnología de la Reproducción Porcina. Universitat de Girona.
3. CAMPI S, BLASI C, FISCHMAN M, GARCÍA C, CISALE H. 2004. Comparación entre dos test de funcionalidad de membrana para valorar semen de verraco. *Veterinaria Argentina*, 21 (206): 421-426
4. CORREA JR, ZAVOS PM. 1994. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42: 351-360.
5. DOMÍNGUEZ JC, PELÁEZ J, PEÑA FJ, ALEGRE B, DOMÍNGUZZ MT, GONZÁLEZ R, FERRERAS A, ROBLES P, ABAD M. 2003. Inseminación artificial porcina: estrategias para optimizar resultados. *Mundo Ganadero* 155: 61-65
6. DREVIUS LO, ERIKSON H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research* 42: 136-156.
7. JEYENDRAN RS, VAN DER VEN HH, PÉREZ-PELÁEZ M, GRABO BG, ZANEVELD, LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219-225.
8. B. PÉREZ-LLANO, P. YENES-GARCÍA, P. GARCÍA-CASADO 2003. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37 °C. *Theriogenology* 60: 1401-1407
9. RIVOLTA MA, CAMPI SH, FERNÁNDEZ HA, CISALE HO. 2000. Optimización del test de hinchamiento osmótico (HOS test) para semen porcino. Congreso Mercosur de Producción Porcina, Buenos Aires, Argentina.; R1 abst.
10. SCHILLING E, VENGUST M, SMIDT D. GHENT. 1984 ORT: Un nuevo sistema para predecir la congelabilidad y la capacidad de almacenamiento de los espermatozoides de verraco. *Belgium 8th Congress IPVS* 346 abstr.
11. VÁZQUEZ JM, MARTÍNEZ EA, ROCA J, LUCAS X, GIL MA. 1999. Hypoosmotic swelling test as predictor of the membrane integrity in boar spermatozoa. *Proc IV Int. Conf. On Boar Semen Preservation, Beltsville Washington* P-21 abst.
12. VÁZQUEZ JM, MARTÍNEZ EA, MARTÍNEZ P, GARCÍA-ARTIGA C, ROCA J. 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology* 47: 913-922.

EN EL PRESENTE TRABAJO SE HA UTILIZADO EL TEST DE ENDOSMOSIS, TAMBIEN DENOMINADO TEST DE ESTRES HIPOSMOTICO Y HOS TEST, EL CUAL VALORA LA CAPACIDAD DE REACCION DEL ESPERMATOZOIDE SITUADO EN UN MEDIO HIPOSMOTICO, ATRAVES DE LA FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA