

EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA HIPOOSMÓTICA SIMPLIFICADA EN SEMEN CANINO FRESCO Y REFRIGERADO

Evaluation of a Simplified Hypoosmotic Swelling Test in Fresh and Chilled Canine Semen

Alfonso Sánchez Riquelme^{1*} y Daniela Garrido Burgos²

¹ Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Recursos Naturales, Universidad Nacional Andrés Bello, Avenida República # 440, Santiago, Chile. ² Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Avenida Ejército # 146, Santiago, Chile. *teriogenologiachile@vtr.net

RESUMEN

Con el propósito de 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 (h) se obtuvieron veinte eyaculados mediante manipulación digital, los cuales fueron evaluados por espermograma convencional, luego fueron diluidos con un diluyente a base de leche semi-descremada UHT 0,5% materia grasa y refrigerados a 4°C. Se realizaron evaluaciones mediante HOST, HOST-s y Motilidad Progresiva (MP) en semen fresco y a las 24; 48; 72 y 96 h de refrigeración. Para comparar HOST vs. 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 evaluaron a través de la prueba de hipótesis específica de Tukey y para la estimación de los grados de correlación entre HOST, HOST-s y MP se utilizó el análisis de correlación de Pearson. Los porcentajes de espermatozoides con membrana funcional en el semen fresco, tanto con HOST (77,0 ± 10,5) como con HOST-s (95,3 ± 3,8) arrojaron una correlación positiva ($r=0,59$; $P < 0,05$); así como también con la 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 h, respectivamente, destacándose que todas fueron significativas ($P<0,05$).

Palabras clave: Perro, semen, prueba hipoosmótica.

ABSTRACT

With the purpose of evaluating a simplified hypoosmotic swelling test (HOST-s), using bidistilled water and incubation for five minutes and compares it with a conventional hypoosmotic test (HOST), in fresh and refrigerated canine spermatozoids in different times up to 96 hours (h). It was obtained twenty ejaculates through digital manipulation, and these were evaluated by conventional spermogram, then they were diluted with a extended based on skim milk UHT 5% M.G and refrigerated at 4°C. They were evaluated through HOST, HOST-s and Progressive Motility (PM) in fresh semen and at 24, 48, 72 and 96 h of refrigeration. The variables obtained from HOST and HOST-s were transformed according to the angular formula of arcsine in purpose of performing a unilateral analysis of variance. The differences were estimated through the Tukey test of specific hypothesis, and for the estimation of the grades of correlation between HOST, HOST-s and PM was used the Pearson's correlation analysis. The percentages of sperms with functional membrane in fresh semen, so in HOST (77.0 ± 10.5) as HOST-s (95.3 ± 3.8) had a positive correlation ($r=0.59$; $P<0.05$); so as the PM, $r= 0.47$ 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 h, respectively, emphasizing that all were significant ($P<0.05$).

Key words: Dog, semen, hypoosmotic swelling test.

INTRODUCCIÓN

En la clínica reproductiva canina (*Canis lupus familiaris*), 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 poten-

cial de los reproductores [20]. Cabe destacar que en perros, la metodología de evaluación seminal más utilizada en condiciones prácticas, considera parámetros fundamentales, tales como motilidad progresiva (MP), morfología espermática y concentración espermática [15]. Sin duda, uno de los desafíos en la evaluación andrológica es generar técnicas de evaluación de rutina, sencillas y que se correlacionen satisfactoriamente con la fertilidad.

Una de las pruebas que ha sido considerada de metodología simple, es la prueba hipoosmótica, cuyo fundamento es evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide [9]; esto considerando que la integridad de la misma es el requerimiento mínimo para que el espermatozoide sea móvil [4] y que además, en condiciones fisiológicas, la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente inactiva, aún cuando permanezca estructuralmente intacta [7].

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 [3, 4].

Para espermatozoides caninos frescos se han estudiado diferentes soluciones hipoosmóticas que fluctúan entre los 60 a 150 mOsm/L, siendo fructosa y ácido cítrico los principales solutos empleados, con períodos de incubación de las muestras a 37°C que fluctúan entre los 30 a 60 minutos (min). 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 [6, 10].

Otros autores 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 min obteniendo correlaciones significativas con motilidad y vitalidad, destacando que los resultados no difieren de la incubación por 60 min [14].

Otro aspecto estudiado con el objetivo de simplificar esta técnica ha sido, el uso de agua bidestilada como solución hipoosmótica. Un estudio evaluó espermatozoides caninos extraídos desde la cola del epidídimo en una dilución 1:4 con agua bidestilada e incubándolos por cinco min a 38,5°C, reportando una correlación significativa con la prueba hipoosmótica convencional y con la MP [8]. Recientemente, se ha reportado para espermatozoides de burro (*Equus asinus*) que, una dilución del semen con agua bidestilada en una proporción 1:3 e incubación por cinco min a 37°C 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) [16].

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

MATERIALES Y MÉTODOS

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. Se utilizaron doce 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 espermiograma convencional, registrándose: volumen mediante tubo graduado, color por observación directa, pH con tira reactiva, MP con microscopio óptico (Globe 1600, Alemania) de campo claro (40x y 100x), concentración espermática con el método del hemocitómetro (Precicolor HBG, Alemania), vitalidad espermática con tinción eosina 5% -nigrosina 10% y morfología espermática con tinción eosina y 5% [20]. Además, el semen fresco fue evaluado mediante la prueba hipoosmótica convencional (HOST), consistente en la incubación de 5 µL de semen con 45 µL de una solución de fructosa y ácido cítrico de osmolaridad 55 mOsm/L por 45 min a 37°C [9] y una prueba hipoosmótica simplificada (HOST-s), diluyendo 5 µL de semen con 45 µL de agua bidestilada de osmolaridad 0 mOsm/L e incubando por 5 min a 37°C. La dilatación espermática se evaluó utilizando un microscopio óptico de campo claro (40x y 100x). La osmolaridad de las soluciones y plasma seminal se midió con un osmómetro digital, basado en la técnica de descenso crioscópico (Roebing, 1313, Alemania).

Para la refrigeración, el semen fue diluido en relación 1:3 con un diluyente a base de leche semidescremada UHT 0,5% de materia grasa adicionada con sulfato de estreptomicina (50 mg/100 mL) y penicilina benzatínica (50 mg/100 mL) [21]. La osmolaridad del diluyente fue de 287 mOsm/L. Posteriormente las muestras fueron almacenadas (Mademsa, Premier 315, Chile) a 4°C y evaluadas a las 24; 48; 72 y 96 h de refrigeración, a través de HOST, HOST-s y MP. Tanto en el semen fresco como en el refrigerado, se consideraron espermatozoides con membrana funcional, los 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, y los resultados fueron expresados en porcentaje de espermatozoides con membrana funcional [6, 8].

Los datos porcentuales fueron transformados según la fórmula angular del arcoseno a fin de realizar un análisis unilaterial de la varianza [23]. Las diferencias se estimaron a través de la prueba de hipótesis específica de Tukey [23]. Para la estimación de los grados de correlación utilizó el análisis de correlación de Pearson [23]. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia de $P < 0,05$. Se utilizaron los programas Excel-Software® y Prisma®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los doce perros utilizados como donantes respondieron satisfactoriamente al método de obtención de semen. Las características seminales de los veinte eyaculados obtenidos se presentan en la TABLA I, destacándose que los valores promedios y las desviaciones estándar del espermiograma pueden ser considerados como normales para la especie [5, 15].

Las células espermáticas, ya sea en el semen fresco inmersas en el plasma seminal (osmolaridad: 297 mOsm/L) o diluidas en leche UHT semidescremada (osmolaridad: 287 mOsm/L), se encontraban en un estado de equilibrio osmótico; sin embargo, al someterlas a incubación con una solución de fructosa y citrato de sodio (osmolaridad: 55 mOsm/L) o con agua bidestilada (osmolaridad: 0 mOsm/L), resultaron expuestos a cambios en la presión osmótica con el consiguiente movimiento de agua entre compartimientos y la consiguiente dilatación de los espermatozoides [9, 22]. Ambas pruebas de funcionalidad de membrana (HOST y HOST-s) reflejaron altos porcentajes de dilatación (>70%), interpretándose esto como células fisiológicamente normales [9], situación que guardaría relación con los buenos niveles de vitalidad espermática ($97,5 \pm 1$) observados en el semen fresco.

Cabe destacar que, el patrón de dilatación espermática observado con ambas pruebas hipoosmóticas, tanto en el semen fresco como en el refrigerado fue similar, sobresaliendo la curvatura de las colas con dilatación de la región distal de la misma tal como describen otros autores [1, 5, 8, 10, 14, 16, 19, 21].

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 MP, $r=0,47$ para

TABLA I
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. x 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

HOST y $r=0,52$ para HOST-s, respectivamente, lo cual concuerda con otros estudios de integridad de membrana en espermatozoides caninos [6, 8, 10, 14, 19, 21]. Estas correlaciones positivas y significativas también han sido descritas en ensayos con espermatozoides humanos y caprinos (*Capra aegagrus hircus*) [1, 11, 13].

En el semen refrigerado, las correlaciones entre HOST y HOST-s fueron $r=0,59$, $r=0,58$, $r=0,62$ y $r=0,57$ a las 24; 48; 72 y 96 h, 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 II. Al comparar la integridad de membrana entre HOST y HOST-s, ya sea en el semen fresco o refrigerado a través de los todos los tiempos de evaluación, 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, situación también observada en espermatozoides humanos, caninos y bovinos (*Bos taurus*) [1, 8, 12], sugiriendo esto que la membrana plasmática de los espermatozoides presentaría alta permeabilidad al agua.

En el semen refrigerado, en los diferentes tiempos de evaluación se encontró una correlación significativa entre HOST/MP y entre HOST-s/MP con valores que se pueden agrupar en torno a $r=0,5$ ($P < 0,05$). 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 h, respectivamente. Los

TABLA II
VALORES DE INTEGRIDAD FUNCIONAL DE MEMBRANA EVALUADO MEDIANTE HOST Y HOST-S
EN ESPERMATOZOIDEOS CANINOS FRESCOS Y REFRIGERADOS

Parámetro Evaluado	Semen Fresco (n=20)	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 10,5 ^a	76,0 \pm 10,1 ^a	70,5 \pm 11,1 ^a	64,4 \pm 10,6 ^a	59,4 \pm 9,9 ^a
HOST-s (%)	95,3 \pm 3,8 ^b	86,8 \pm 9,8 ^b	81,0 \pm 10,6 ^b	72,8 \pm 12,3 ^b	65,0 \pm 13,1 ^b

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

menores porcentajes de dilatación del plasmalema y la disminución de la MP observados en los espermatozoides refrigerados a través de los tiempos de estudio, se pueden asociar al shock térmico, que inestabiliza el metabolismo y la membrana plasmática de los espermatozoides [2, 4], situación que ha sido descrita en estudios de refrigeración de espermatozoides en diferentes especies [17, 18, 21].

Si bien en Chile se han realizado estudios de integridad de membrana en espermatozoides caninos frescos, refrigerados y congelados con la técnica HOST [19, 21], este estudio sería el primero en utilizar la prueba de agua o prueba de hinchamiento hipoosmótica simplificada, restando establecer la relación entre esta y la fertilidad del semen canino.

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 MP, 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAHAMONDES, L.; FAZANO, F.; DE LUCIO, M.; NEVES, P.; BOTTECHER, L.; LORENZETTI, G. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. **Androl.** 33:75-77. 2001.
- [2] BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Anim. Reprod. Sci.** 68: 181 -190. 2001.
- [3] BREDDERMAN, P.; FOOTE, R. Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. **Anim. Reprod. Sci.** 28: 496 – 501.1969.
- [4] DE LEEUW, F.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. The role membrane plays in cold shock and freezing injury. **Reprod. Dom. Anim.** 1: 95-104. 1990.
- [5] ENGLAND, G.; ALLEN, W. Semen characteristics and fertility in dogs. **Vet. Rec.** 125: 399-401. 1989.
- [6] ENGLAND, G.; PLUMMER, J. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47: 261-270. 1993.
- [7] HAFEZ, E. Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez, ESE; Hafez, B (Eds). **Reproducción e inseminación artificial en animales.** 7ª Ed. México: McGraw-Hill. Pp. 441-452. 2002.
- [8] HISHINUMA, M.; SEKINE, J. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. **J. Vet. Med. Sci.** 65 (7): 817-820. 2003.
- [9] JEYENDRAN, R.; VAN DER VEN, H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.; ZANEVELD, L. 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.** 70: 219-228. 1984.
- [10] 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. **Theriogenol.** 41: 1355-1366. 1994.
- [11] LOMEEO, A.; GIAMBRESIO, A. Water test: a simple method to assess sperm-membrane integrity. **Int. J. Androl.** 14(4): 278-282. 1991.
- [12] NAVA-TRUJILLO, H.; QUINTERO-MORENO, A.; OSORIO, C.; RUBIO, J.; CARRILLO, F.; FINOL, G. Use of water test to assess the sperm membrane functional integrity in cryopreserved bull semen. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XXI (3): 211-214. 2011.
- [13] NUR, Z.; DOGAN, I.; GUNAY, U.; SOYLU, M. Relationships between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of saanen goat bucks. **Bull. Vet. Inst. Pulawy.** 49:183-187. 2005.
- [14] PINTO, C.; KOZINK, D. Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** 104:450 - 455. 2008.
- [15] ROOT-KUSTRITZ, M. The value of canine semen evaluation for practitioners. **Theriogenol.** 68:329-337. 2007.
- [16] ROTA, A.; BASTIANACCI, V.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Evaluation of plasma integrity of donkey spermatozoa. **Reprod. Dom. Anim.** 45 (2): 228 - 232. 2010.
- [17] SÁNCHEZ, A.; VON FREY, W.; DE LOS REYES, M. Efecto de dos diluyentes y plasma seminal en la preservación de espermatozoides equinos refrigerados. **Vet. Arg.** 113: 172-178. 1995.
- [18] SÁNCHEZ, A. Evaluación de dos diluyentes para la preservación refrigerada de espermatozoides de gato. Nota técnica. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XII (4): 249-253. 2002.
- [19] 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.** 34: 123-130. 2002.
- [20] SÁNCHEZ, A. Estudio clínico reproductivo del macho canino. **MEVEPA.** 19 (4): 4 - 21. 2006.

- [21] SÁNCHEZ, A.; CARTAGENA, A.; BERLAND, M. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. **Rev. Inv. Vet. Perú.** 17 (1): 1-7. 2006.
- [22] WHITMIRE, S. Fluids and electrolyte. In: **Contemporary nutrition support practice. A clinical guide.** Matarese, L.; Gottschlich, M. (Eds). Philadelphia. WB Saunders Company. Pp. 128-29. 1998.
- [23] ZAR, J. Data Transformations. **Biostatistical Analysis.** 4ª Ed. New Jersey. Prentice Hall. 929 pp. 1999.