

APLICACIÓN DEL TEST HIPOOSMÓTICO (HOST) EN LA EVALUACIÓN DE CALIDAD SEMINAL EN OVINOS CRIOLLOS DE PELO COLOMBIANO

Hernandez D.^{1*}, Carrillo-González D.¹

¹Grupo de Investigación Reproducción y Mejoramiento Genético Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre. *darwin.hernandez@unisucre.edu.co

RESUMEN

En la búsqueda de la aplicación de pruebas complementarias en la caracterización seminal de los ovinos de pelo, se implementó la utilización del test hipoosmótico (HOST) para la evaluación de funcionalidad de membrana plasmática. El semen fue colectado de cuatro ovinos criollos de pelo mediante la técnica de electroeyaculación con intervalos de cinco días cada uno. Cada muestra fue procesada para la realización del HOST, morfología y movilidad individual. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las variables evaluadas entre cada uno de los individuos colectados. Se encontró una proporción de espermatozoides que reaccionaron al test hipoosmótico en promedio de $80,64 \pm 1,28\%$, un porcentaje de normalidad espermática del $76,64 \pm 1,99\%$ y un porcentaje de movilidad individual de $74,09 \pm 2,0\%$. Los valores anteriores evidencian una asociación positiva entre el porcentaje de espermatozoides funcionales, aquellos espermatozoides morfológicamente normales y los espermatozoides con movilidad progresiva. Se concluye que el uso del test hipoosmótico como metodología para la evaluación de la integridad de membrana, además de ser una prueba complementaria en la evaluación del semen, es un parámetro indicativo que permite mejorar el proceso de caracterización y de selección de machos reproductores ovinos de pelo criollos colombianos.

Palabras clave: Calidad de semen; Conservación de semen; Recurso zoogenéticos.

APPLICATION OF THE HYPOSMOTIC SWELLING TEST (HOST) IN THE EVALUATION OF SEMEN QUALITY IN COLOMBIAN CREOLE HAIR SHEEP

ABSTRACT

In searching for the application of additional tests for seminal characterization of sheep with hair, the use of hyposmotic (HOST) test for assessing plasma membrane functionality was implemented. The semen was collected four Creoles hair sheep through technical electroejaculation at intervals of five days each. Each sample was processed for conducting the HOST test, morphology and individual mobility evaluation. No significant differences ($p > 0.05$) in the evaluated variables among each of the collected rams were found. The proportion of spermatozoa that react during the hyposmotic test averaged $80,64 \pm 1,28\%$, the percentage of normal sperm was $76,64 \pm 1,99\%$ and of individual mobility of $74,09 \pm 2,0$. The above values show a positive association among the percentage of functional sperm, sperm classified morphologically as normal and sperm with progressive motility. It is concluded that the use of hyposmotic test as a methodology for assessing membrane integrity, as well as a complementary test in the evaluation of semen, is an indicative parameter which may improve the process of characterization and selection of breeding males the Colombian Creole hair sheep.

Keywords: Genetic resources conservation; Semen preservation; Semen quality.

INTRODUCCIÓN

Los ovinos al igual que otros animales domésticos, no son originarios del continente Americano. Estos animales llegaron desde España, primero en calidad de alimento para los navegantes y conquistadores, y luego como pie de cría para los primeros colonos y religiosos. Se cree que están conformados genéticamente por las razas Churra, la Manchega, la Rasa y la Canaria y la Merino (Pedraza *et al.*, 1992). La explotación ovina en Colombia ha estado tradicionalmente vinculada a una “economía de subsistencia” de bajo uso de insumos y generalmente está relacionada con sistemas tradicionales y artesanales de producción, de tal forma que se concentra en pequeños rebaños, formados básicamente por sangre criolla, que se estima en un 80 a 85 % de la población ovina total; se considera que alrededor de un 10 a 15% son animales mestizos y el otro 5% corresponde a los animales de razas puras introducidas al país (Grajales & Tovío, 2010). Los ovinos criollos presentan características adaptativas importantes propias del clima tropical, además, en nuestra región, en las practicas de selección de machos reproductores no se han implementado practicas de evaluación seminal.

La evaluación estándar de semen incluye varios parámetros: volumen, concentración, movilidad, vitalidad y morfología. Se ha asumido que estas medidas proveen información de la cantidad del eyaculado y de la calidad de la espermatogénesis, sin embargo, estos parámetros tienen limitaciones y no pueden ser usados como pronóstico confiable de la capacidad fertilizante del espermatozoide *in vivo* ó *in vitro* (Bedoya *et al.*, 2003), por lo tanto se hace necesario implementar metodologías adicionales para la evaluación de estructuras propias del espermatozoide como por ejemplo la membrana espermática. La membrana espermática que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio en que se encuentra, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Oliveira *et al.*, 2010). La evaluación de su integridad aporta información importante sobre el metabolismo del espermatozoide y por lo tanto, es un estimador de la fertilidad potencial del macho (Angel *et al.*, 2009), pues la fertilización no ocurre si la membrana no está estructural o físicamente intacta, pero bioquímica y funcionalmente inactiva (Bedoya *et al.*, 2003). Una de las pruebas para evaluar la integridad funcional de la membrana es la prueba hipoosmótica (hypoosmotic swelling test HOST), se fundamenta en la suspensión de espermatozoides en un medio hipoosmótico que 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 con consecuentes cambios morfológicos en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos (Jeyendran *et al.*, 1984). El objetivo de este trabajo fue evaluar la integridad funcional de la membrana espermática en Ovinos criollos de pelo Colombianos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron cuatro ovinos de pelo criollos de la granja Los Pericos, propiedad de la Universidad de Sucre, los parámetros para la selección de machos constaron de una evaluación andrológica, donde se tomó como requisito de inclusión, que todos hubieran alcanzado la madurez sexual y se encontraran sanos al examen clínico. Siempre se tuvo presente que los animales no sufrieran ningún tipo de maltrato durante el desarrollo del proyecto. A cada uno de los animales se les realizaron cuatro colectas de semen con intervalos de cinco días, por método de electroeyaculación usando el equipo Electrojac6[®]. En cada uno de los eyaculados fueron evaluadas las pruebas macroscópicas de: volumen, en un tubo cónico graduado de 15 ml, color y aspecto mediante observación directa; y las pruebas microscópicas de concentración espermática mediante la dilución 1:200 con agua

destilada y conteo en cámara de Neubauer (Mellisho, 2010), la movilidad masal e individual en una gota de 30µl observada a 400X y evaluada en escala de cero a cinco para la primera y en porcentaje para la segunda, y la morfología espermática mediante extendidos de semen teñidos con eosina-tinta china y mediante la utilización de microscopio (1000X) (Mellisho, 2010). El test de funcionalidad de membrana HOST (Oliveira *et al.*, 2010) se realizó usando una dilución de semen en relación de 1:10 en solución de dextrosa al 5% (252 mOsmol/L), incubándose en baño maría por un periodo de 25 minutos a 25°C, y observación con microscopio (400X). El diseño estadístico empleado correspondió a un diseño completamente al azar y posterior comparación de medias por test de Tukey, se realizaron análisis de correlación lineal de Pearson entre los valores de HOST y las características espermáticas evaluadas. Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico StatPlus^{®:mac2009} ver 5.8.3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I se muestran los resultados sobre los parámetros evaluados en cada uno de los eyaculados de los machos ovinos. El volumen seminal promedio fue de 1,41±0,11ml, sin presentar diferencias significativas ($p>0,05$) entre eyaculados.

Tabla I. Características seminales en ovinos criollos de pelo Colombiano (*Seminal characteristics in Colombian creole hair sheep*)

Variable	NE ¹	Media	EE ²	Mínimo	Máximo
Volumen, ml	16	1,41	0,11	0,8	1,8
Mov. Masal (0-5)	16	3,77	0,12	3	4
Mov. Individual, %	16	74,09	2,00	65	90
Concentración, esp/ml	16	711,89 x 10 ⁶	133,86x 10 ⁶	70	1570
Morfología, %	16	76,64	1,99	60	85
HOST, %	16	80,47	1,28	75	88

¹ Número de eyaculados evaluados, ² Error estándar

Estos valores fueron superiores a los reportados por Al-Samarrae, (2009) en las razas Karradi y Arrabi con volúmenes de 0,61±0,11ml y 0,59±0,03ml respectivamente, al igual que los mostrados por Moghaddam *et al.*, (2012) en cruces de razas Iranies (1,16±0,08ml) y por Aguirre *et al.*, (2007), en la raza Peligüey con un volumen promedio de 0,68±0,04ml. Por otra parte Janett *et al.*, (2000) reporta volúmenes similares a los encontrados en el estudio utilizando vagina artificial como método de colecta del semen. Se observó una movilidad masal en promedio de 3,77±0,12⁺⁺ ($p<0,05$ entre eyaculados), mientras que la

movilidad individual fue de $74,09 \pm 2,00\%$ ($p > 0,05$ entre eyaculados), adicionalmente se encontró una correlación de 0,80 ($p < 0,05$) entre las movilidades. Los porcentajes de movilidad masal e individual hallados, fueron superiores en comparación a los reportados en diversas razas (Al-Samarrae, 2009; Moghaddam *et al.*, 2012), pero inferiores a los reportados en la raza Merino (Abdel-Rahman *et al.*, 2000) en este último estudio, los eyaculados también se colectaron por electroeyaculación. La concentración espermática promedio fue de $711,89 \times 10^6 \pm 133,86 \times 10^6$ esp/ml, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las muestras, por efecto de la alta variación en la concentración de los eyaculados (min: 70 y max: 1570×10^6 esp/ml). En contraste con el resultado obtenido en la evaluación de concentración, estudios realizados por Al-Samarrae, (2009), en las razas Karradi y Arrabi fueron menores ($121,88$ y $120,5 \times 10^6$ esp/ml respectivamente), sin embargo, Moghaddam *et al.*, (2012), en cruces de razas Iranies reporta concentraciones mayores (3470×10^6 esp/ml), al igual que Aguirre *et al.*, (2007) en la raza Pelibuey (3880×10^6 esp/ml). En la prueba de morfología espermática se encontró un $76,64 \pm 1,99\%$ de normalidad, sin observarse diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los eyaculados, otros resultados reportados en diferentes razas son: Karradi 82,87%, Arrabi 82% (Al-Samarrae, 2009) y cruces de razas Iranies 88,63% (Moghaddam *et al.*, 2012).

Por otra parte, en la prueba de funcionalidad de membrana plasmática mediante la técnica HOST, el porcentaje de espermatozoides que reaccionaron fue del $80,47 \pm 1,28\%$ con un valor mínimo de 75% y máximo de 88%, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre eyaculados, similares a los expuestos por Oliveira *et al.*, (2010) quien evaluando diferentes soluciones con osmolaridades entre 100 y 150 mOsmol/L, reporta valores del 95,8% con citrato de sodio y 76,9% con sacarosa. Adicionalmente en la raza Merino, Abdel-Rahman *et al.*, (2000) reportan un valor de $74,1 \pm 7,6\%$ en semen fresco, mientras que Pelufo *et al.*, (2015) un valor de $59,6 \pm 3,8\%$ con semen criopreservado y Borreto *et al.*, (2002) de 35,5%. Aunque se encontraron correlaciones positivas entre las características evaluadas y los porcentajes de HOST, los resultados no fueron estadísticamente significativos, contrario a lo encontrado por Borreto *et al.*, (2002) quien correlaciona de forma positiva y significativa el HOST, con movilidad progresiva y el porcentaje de espermatozoides vivos, pero no, con el porcentaje de preñez. Lo anterior puede ser explicado debido a que la presencia de cambios morfológicos en la cola de los espermatozoides (reacción positiva al HOST) no siempre indicaría la integridad funcional de la membrana acrosomal externa en la cabeza de los espermatozoides, la cual es imprescindible para la reacción acrosómica y la penetración del ovocito. Sin embargo, las diferencias encontradas con relación al HOST en los estudios presentados, pueden deberse a la composición molecular de las soluciones

empleadas y a efectos raciales de los animales, puesto que los tiempos de incubación según Vásquez *et al*, (2011) no generan diferencias entre los eyaculados ovinos.

CONCLUSIONES

Los espermatozoides de los ovinos criollos de pelo colombianos, reaccionan de manera eficiente a los estímulos con la concentración hipoosmótica de 250 mOsmol/L. Existe una tendencia entre la correlación de movilidad individual (74,09%), la morfología (76,64%) y la respuesta al HOST (80,47%) a pesar de no existir significancia, pudiéndose asociar la movilidad progresiva y la normalidad espermática, con espermatozoides que presenten una membrana celular intacta, la cual le permite tener una excelente interacción con el medio extracelular. Por lo tanto se puede asociar la respuesta al HOST como un indicador de fertilidad en ovinos, permitiendo que dicha técnica sea integrada en los procesos de evaluación de calidad seminal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al laboratorio de reproducción animal de la Universidad de Sucre.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman H.A., El-Belely M.S., Al-Qarawi A.A. & El-Mougy S.A. 2000. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. *Small Ruminant Research* 38, 45-49.
- Aguirre V., Orihuela A. & Vázquez R. 2007. Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behaviour, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*). *Tropical Animal Health Production* 39, 271-277
- Al-Samarrae S.H. 2009. Semen quality of arrabi and karradi iraqi rams. *Diyala Agricultural Sciences Journal* 1, 30-36.
- Angel D., Perez N., Pareja A., Camargo O & Urrego R. 2009. Efecto de la preparación espermática previo a la fertilización in vitro sobre la membrana plasmática y el ADN del sêmen bovino sexado. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 4, 29-37.
- Bedoya N., Vásquez N., Rivera M., Correa G & Trujillo L. 2003. Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hiposmótico (HOST). *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 56, 1983-1997.
- Borroto J., Gibbones A., Bunge M., Cueto M & Bidinost F. 2002. Calidad seminal pos-descogelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos. *Revista de Medicina Veterinaria* 83, 185-188.

- Grajales H & Tovio N. 2010. Importancia de la oveja criolla colombiana como base genética en proyectos productivos. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Primer congreso internacional de producción ovina-Centro de Convenciones CAFAM - La Floresta.
- Janett F., Htissy la D., Lischer C., H~ssig I M & Thun R. 2001. Semen characteristics after vasectomy in the ram. *Theriogenology* 56, 485-491.
- Jeyendran R., Van Der Ven H., Perez-Pelaez M., Crabo B & Zaneveld L. 1984. Development on an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other sêmen characteristics. *Journal Reproduction Fertility* 70, 219-228.
- Moghaddam G. H., pourseif M. M. & Rafat S. A. 2012. Seasonal variation in semen quantity and quality traits of iranian crossbred rams. *Journal Animal Science* 45 3, 67-75.
- Mellisho E. 2010. Manual de laboratorio de reproducción animal. URL: http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/reproduccion_archivos/practica%204-eval-semen.pdf. Fecha de consulta: 5 de junio de 2015
- Oliveira L., Corona, M., & Das Neves P. 2010. Diferentes soluções de teste hiposmótico para sêmen ovino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria* 32, 146-150
- Pedraza P., Peralta M & Perez Grovas R. 1992. Chiapas Sheep: A Mexican Local Breed of Spanish Origin. *Archivos de Zootecnia* 41, 355-362.
- Pelufó V., López Armengol M.F., Malcotti V., Venturino A. & Aisen E.G. 2015. Effects of glycerol and sugar mixing temperature on the morphologic and functional integrity of cryopreserved ram sperm. *Theriogenology* 83, 144-151
- Vásquez J., Florentini E., Camargo L & Valdivia C. 2011. Test hipoosmótico en espermatozoides epididimarios en ovinos (*Ovis aries*). *Spermova* 1, 119-120.