

CORRELACIONES ENTRE EL TEST HIPO-OSMÓTICO Y OTROS PARÁMETROS UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE SEMEN EQUINO CRIOPRESERVADO

Alierta S.^{1,2,3}, Losinno L.¹, Aguilar J.¹, María G.A.², Gil L.¹ y Moschetti E.²

¹ Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina. ² Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177 (50013) Zaragoza, España. ³ Becario doctoral Agencia Española de Cooperación Internacional

INTRODUCCION

La criopreservación de semen permite maximizar el uso de los ejemplares con mejor genética, minimizar los costes de transporte y sincronización de las yeguas y el control en la transmisión de enfermedades venéreas (4). La calidad espermática es un factor predeterminante en el proceso de criopreservación. La evaluación de la calidad seminal se ha basado fundamentalmente en la motilidad progresiva (MP) pre y post descongelado, y aunque la mayoría de las muestras de semen con buena MP después de descongelar producen porcentajes de preñez aceptables, la evaluación de este parámetro no es suficiente para algunos sementales (1,9).

Es necesario encontrar otros parámetros que permitan una mejor predicción de la congelabilidad del semen equino. El test hipoosmótico (HOST) consiste en la evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana de la cola del espermatozoide sometiéndolo a una solución hipoosmótica (3). Dado la gran importancia de la integridad y funcionalidad de la membrana del espermatozoide en el proceso de fertilización, la evaluación de la misma es fundamental para determinar la calidad de espermatozoides criopreservados, ya que en el proceso de enfriamiento se encuentra altamente comprometida, tanto su estructura como su funcionalidad (8).

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad predictora del HOST en la congelabilidad del semen equino. Para ello se lo correlacionó con otras pruebas "in vitro" como MP, morfología, microscopía de fluorescencia y con la capacidad fecundante "in vivo" de eyaculados congelados de sementales de la raza *Silla Argentina*.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en la Universidad Nacional de Río Cuarto (ARGENTINA) en cooperación con la Yeguada General Lavalle del Ejército Argentino. Se seleccionaron 3 sementales de raza *Silla Argentino*, de edades comprendidas entre los 4 y 9 años, fértiles y con una producción espermática estabilizada (D.S.O). Previo al proceso de criopreservación, se realizó una evaluación "in vitro" del semen fresco, midiendo en cada eyaculado su MP y realizando el test hipoosmótico. Se congelaron 17 eyaculados a cada semental, obteniendo 100 macropajuelas (4 ml) de cada uno. Posteriormente, se evaluó la calidad del semen postdescongelado realizandose las siguientes pruebas: MP, microscopía de fluorescencia, HOST y morfología. Finalmente se realizó la prueba "in vivo" asignando a cada semental tres yeguas de la raza *Silla Argentina*, con edades comprendidas entre los 3 y 15 años, condición corporal mínima grado 3 (G-1: mala ; G-4: óptima), ausencia de fluido uterino en diestro por ultrasonografía, y ciclo reproductivo regular.

La evaluación "in vitro" de semen fresco se realizó en cada eyaculado justo antes del proceso de criopreservación, midiendo visualmente (en porcentual) **motilidad**

progresiva siempre por el mismo operador con un microscopio óptico a 400X (5). Así mismo se realizó el **test hipoosmótico** incubando 100 microlitros de semen y 1 ml de una solución hipoosmótica (lactosa 50 mosm) a 37°C durante 30 min. La lectura se hizo observando al microscopio óptico 400X el porcentaje de espermatozoides que reaccionaron al estrés osmótico con un hinchazón en la cola indicativo de la integridad y funcionalidad de la estructura de la membrana (3). El proceso de criopreservación, se realizó según el protocolo de criopreservación de curva rápida de enfriamiento descrito por Burns et al. en 1992 (2).

Para la evaluación "*in vitro*" de semen postdescongelado, se descongeló el 10% de macropajuelas de cada semental. Se realizó un estudio de la **morfología**, utilizando BFS(buffer formol salino) como fijador y coloreando con azul de metileno. En la lectura se observó con microscopio de contraste de fase el porcentaje de espermatozoides con morfología normal (6). Se evaluó daño de membrana mediante **tinciones supravitales de fluorescencia**. Se utilizó como colorantes SYBR-14* (fluorescencia verde, identifica espermatozoides con integridad de membrana) y Yoduro de Propidium (fluorescencia roja, identifica espermatozoides con daño de membrana) y se calculó el porcentaje de espermatozoides viables (fluorescencia verde). Se repitió el **HOST** en cada una.

Para la evaluación "*in vivo*" del semen post descongelado, se inseminó post-ovulación controlando las yeguas ecográficamente cada 6 horas (7). La dosis inseminante fue de 3 macropajuelas/inseminación (400 millones de espermatozoides con MP), en un máximo de 2 ciclos consecutivos por yegua. El diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonografía los días 15 y 25 post-inseminación. En el estudio estadístico se realizó un análisis de correlación paramétrico y no paramétrico entre las variables.

RESULTADOS

Se calcularon las correlaciones para cada semental entre las variables HOST-fresco, morfología, fluorescencia y HOST-postdescongelado (tabla1), observándose correlación estadística en el semental 1 entre HOST-postdescongelado y fluorescencia postdescongelado (n=10) (r=0.683; p=0.0293) y en el semental 2 entre el HOST-fresco y morfología postdescongelado (n=10) (r=0.724; p=0.042). Al repetir el mismo análisis considerando los datos de los tres sementales conjuntamente (n=30), (tabla2) se observó correlación estadística entre HOST-postdescongelado y fluorescencia postdescongelado (n=30) (r=0.423; p=0.024). En la evaluación "*in vivo*", los porcentajes de preñez fueron: semental 1, 33.3% (1/3); semental 2, 33.3% (1/3); semental 3, 0% (0/3).

CONCLUSIONES

Los resultados analizados indican una baja correlación entre el HOST y los otros parámetros ya estandarizados para la evaluación de semen. Actualmente continuamos realizando las evaluaciones postdescongelado *in vitro* e *in vivo*. Probablemente al aumentar tanto el número de muestras procesadas "*in vitro*" como el número de yeguas estos resultados se vean modificados.

* LIVE/DEAD Sperm Viability Kit L-7011, Molecular Probes

Sin embargo, la alta correlación existente entre HOST-postdescongelado y fluorescencia post-descongelado observada tanto en el semental 1 (n=10), (r=0.683; p=0.0293) como en el análisis conjunto de los datos (n=30), (r=0.423; p=0.024), sugieren que el HOST es un buen estimador del daño de membrana, siendo una técnica más sencilla y económica que la fluorescencia.

La variabilidad de los resultados del HOST en los distintos sementales sugieren la posibilidad de una resistencia individual al estrés osmótico. La continuación de este estudio nos permitirá, tal vez, demostrar una asociación entre la resistencia al HOST y la congelabilidad del semen equino

Tabla 1 - Análisis de correlación por semental(n=10).

	Semental 1		Semental 2		Semental 3	
	r	p	R	p	r	p
Host fres/Morf	0.471	0.168	-0.075	0.835	0.724	0.042
Host fres/Fluo	-0.286	0.421	-0.258	0.470	0.246	0.555
Host fres/Hostpost	-0.056	0.877	0.017	0.962	-0.004	0.991
Host post/Morf	0.237	0.508	0.128	0.723	-0.111	0.759
Host post/Fluo	0.683	0.029	0.424	0.221	0.355	0.313
Morf/Fluo	0.123	0.734	-0.538	0.108	0.209	0.561

Tabla 2 - Análisis de correlación en conjunto para los tres sementales(n=30).

	R	p
Host fres/Morf	-0.186	0.343
Host fres/Fluo	-0.195	0.318
Host fres/Host post	0.171	0.383
Host post/Morf	0.158	0.421
Host post/Fluo	0.423	0.024
Morf/Fluo	-0.297	0.123

Host fres: test hipoosmótico precongelado

Host post: test hipoosmótico postcongelado

Morf: morfología postcongelado

Fluo: fluorescencia postdescongelado

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Amann RP; Pickett BW. 1987. J.Equine Vet. Sci.,7:145-173.
2. Burns PJ; Reasner DS. 1995. J.Eq. Vet.Sci. 15,9:377-382.
3. Correa JR; Zavos PM. 1994. Theriogenology 42: 351-360.
4. Grahams JK. 1996. Veterinary Clinics of North America-Equine practice. 12:131.
5. Heitland AV; Jasko DJ; Squires EL; Graham JK; Pickett BW; Hamilton C. 1996. Equine Veterinary Journal. 28:47-53.
6. Hermetet MJ; Sawyer HR; Pickett BW; Amann RP; Squires EL; Long MS. 1993. J.Eq.Vet.Sci.13, 8:449-456.
7. Pickett BW; Squires EL; Mckinon AO. 1987. Animal Reproduction Laboratory. Bulletin N.3. Fort Collins, Colorado State University.
8. Ruiz RD; Fiol M; Santillan ME; Ponce AA; Vicenti L; Lacuara JL; Stutz G. 1996. Journal of Spermental Animal Science. 37:149-157.
9. Samper JC; Hellander JC; Grabo BG. 1991. J. Reprod. Fertil. Suppl.,44:107-114.