

# ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRUEBA DUAL COOMASSIE /HOST CON UNA TÉCNICA MODIFICADA DE CORTA DURACIÓN PARA EVALUAR LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO.

\*Vázquez C. Ma. del C<sup>1</sup>., Ramírez H. G<sup>1</sup>., Gutiérrez-Pérez O<sup>1,2</sup>., Espinosa H. S<sup>1</sup>., García S. J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>FMVZ – UNAM, C.U., Méx D.F., <sup>2</sup>INP Laboratorio de Biología de la Reproducción. Docente UVM-Coyoacán

## Introducción

Los centros de procesamiento de semen certifican la calidad de las dosis seminales con las pruebas rutinarias del espermograma (concentración, motilidad, viabilidad, etc.). Algunas de estas valoraciones son subjetivas, por lo cual la aplicación de pruebas de evaluación funcional espermática, favorecen una evaluación más objetiva. La prueba dual Coomassie/HOST, conjunta dos pruebas de funcionalidad que estiman tanto la integridad acrosomal como la funcionalidad de la membrana plasmática. La combinación de ambas pruebas en una sola prueba dual permite conocer la integridad y funcionalidad de ambas estructuras de manera simultánea, parámetros que se utilizan como marcadores pronósticos de la capacidad fertilizante del semen. (1) El objetivo de este trabajo fue comparar la metodología de laboratorio con una técnica modificada, buscando determinar si los resultados obtenidos en ambas técnicas son equiparables, permitiendo la aplicación de la segunda opción a nivel de campo.

## Material y métodos

Se utilizaron dosis seminales de cinco machos y de cada uno se obtuvieron cuatro muestreos. A su vez a cada dosis se le realizó el espermograma de rutina para confirmar la calidad seminal. Posteriormente, cada una de las dosis se dividieron en tres grupos: control (A), laboratorio (B) y modificada(C). Las muestras de los tres grupos fueron procesadas simultáneamente. Al **grupo A** se le realizó una tinción vital con eosina, una de prueba de integridad acrosomal mediante Coomassie y un Host corto. Estos valores sirvieron como referencia del estado espermático antes de las pruebas duales. Para el **grupo B** se realizó la prueba dual estandarizada en laboratorio. Para ello, la muestra se centrifugo y reconstituyó con una solución hipo-osmótica a base de BTS (dilución 1/3,75mOsm). Esta mezcla se incubó a baño María (60 minutos a 38°C). Posteriormente, se tomaron 500µl, los cuales se fijaron vol./vol. con paraformaldehído al 4%, dejando reposar por 5 minutos y se centrifugo por segunda ocasión. Al retirar el sobrenadante, la pastilla se reconstituyó en cloruro de amonio y se realizó un frotis, que se sumergió en la tinción de Coomassie por 2 minutos. Se realizó el conteo de por lo menos 200 células espermáticas, clasificándolas de acuerdo a su respuesta (reacción host positiva o no y grado de integridad acrosomal). En el **grupo C**, se realizaron las modificaciones para facilitar su aplicación en granja, por lo cual a las muestras se les agregó solo agua destilada para disminuir la osmolaridad (dilución 1/3,75 mOsm) y se incubaron a baño María por 30 minutos a 38°C. Se tomaron 500µl para después fijar vol./vol. con paraformaldehído al 4%, se dejaron reposar por 5 min.

Posteriormente se realizó un frotis y se sumergió en la tinción de Coomassie. A este también se le realizó el conteo y la clasificación celular, descrita en el grupo B. La osmolaridad de todos los medios de dilución utilizados, fue verificada mediante un osmómetro de depresión del punto de congelación (OSMETTE A 5002, Prec Syst Inc). Los conteos se analizaron con la prueba estadística de Mann-Whitney.

## Resultados

No se encontraron diferencias significativas entre las dos metodologías (Laboratorio y Modificada).

Grupos	Variable			
	Acrosoma Integro	Acrosoma Dañado	Reacción Acrosomal	Host +
A	80.43±3.15 <sup>a</sup>	11.24±2.27 <sup>a</sup>	8.51±1.30 <sup>b</sup>	52.77±1.33 <sup>a</sup>
*B	84.07±5.24 <sup>a</sup>	11.67±3.16 <sup>a</sup>	3.78±4.82 <sup>a</sup>	44.35±1.89 <sup>a</sup>
*C	85.51±2.91 <sup>a</sup>	9.23±2.23 <sup>a</sup>	4.437±0.881 <sup>a</sup>	48.10±1.62 <sup>a</sup>

Se presentan la media ± error estándar; <sup>a,b</sup> Literales distintas en la misma columna, indican diferencia estadística (p<0.05);

\* Los resultados de estado del acrosoma, corresponden a los espermatozoides con HOST+.

## Discusión

La funcionalidad de la membrana espermática, refleja su integridad al responder a los cambios osmóticos del entorno y esta capacidad se puede valorar mediante la prueba HOST. Por su parte la integridad acrosomal que asegura el potencial fecundante del espermatozoide es fácilmente evaluable mediante la tinción de Coomassie. Hasta el momento ambas pruebas se realizan por separado (2,3,4), aunque se ha documentado que de manera experimental se utilizan ambas pruebas en una sola evaluación (5). Esto potencializa el valor predictivo de dicha valoración. La prueba dual no se ha aplicado en el campo debido a que requiere de equipo sofisticado, medios elaborados e inversión de tiempo. Al no haber encontrado diferencias significativas al utilizar una prueba modificada que valora los mismos parámetros que una prueba de laboratorio, se sugiere que la aplicación de nuestra propuesta a nivel de campo, mantendrá los mismos resultados predictivos que la prueba original.

## Conclusión

En este estudio la prueba dual Coomassie /HOST demostró su utilidad en la evaluación de espermatozoides de verraco a nivel de campo. Su aplicación fortalecerá la información que brinda una evaluación seminal de rutina.

## Referencias:

1. Gutiérrez P.: Valoración In Vitro de la capacidad fecundante del espermatozoide de cerdo, criopreservado en diluyentes formulados con trehalosa y una baja concentración de glicerol Tesis doctorado. (2009);
2. Jeyendra et al (1984). J. Reprod. Fert. 70:219-228.;
3. Perez et al (1998). 15<sup>th</sup> IPVS Congress.;
4. Larson et al (1999). Mol. Reprod. Devel. 52:445-449.;
5. Gutiérrez P. (2011). Rep. J. Dom. Anim.46 (suppl2). 101-102.