

TEST HIPOOSMOTICO COMBINADO A LA TINCIÓN DE COOMASSIE BLUE EN ESPERMATOZOIDES DE LLAMA

Hypoosmotic Test Combined with Coomassie Blue Staining in Llama Sperm

María Ignacia Carretero^{1,2*}, Clara Pigretti³, Mariana Bertuzzi¹, Fernanda Fumuso^{1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Teriogenología.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET),

³ Práctica privada, Argentina.
Email: ignaciacarretero@gmail.com

* Corresponding author
María Ignacia Carretero
E-mail: ignaciacarretero@gmail.com

ABSTRACT

To establish sperm fertilization capacity membrane integrity and functionality are important characteristics to determine. The objectives of the present study were: 1) to evaluate the functionality of the plasma membrane over time by the hypoosmotic test (HOS) and 2) combined the HOS test with Coomassie Blue (CB) staining to simultaneously evaluate the functionality of membrane and acrosomal integrity in raw llama sperm. A total of 12 ejaculates from 6 adult llama males were collected using electroejaculation under general anesthesia. Hypoosmotic swelling test was performed with and without fixation in paraformaldehyde and the samples were evaluated over time (0 h without fixation and 0; 2; 4; and 24 h when fixed). To perform the CB stain one aliquot of the fixed samples was used. No significant differences ($p>0.05$) were observed in the percentage of sperm with membrane function when comparing fixed samples analyzed over time versus the samples not fixed. Also, no statistical differences ($p>0.05$) were observed on membrane functionality between the two protocols used; HOS test versus HOS combined with the CB stain. It is possible to differ the moment of the evaluation of the membrane functionality of llama spermatozoa using the HOS technique from the semen collection. The use of the dual technique (HOS + CB) allow the evaluation of sperm membrane function and acrosome status in raw llama semen with only one technique that can be applied on the field.

Keywords: acrosome, llama, Coomassie Blue, HOS – test

RESUMEN

La integridad de las membranas plasmática y acrosomal es de gran importancia para determinar la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática a través del tiempo mediante el test hiposmótico (HOS) y 2) combinar la técnica de HOS con la tinción de Coomassie Blue (CB) para evaluar simultáneamente la funcionalidad de membrana y la integridad acrosomal en espermatozoides de semen fresco de llama. Se obtuvieron 12 eyaculados de 6 machos mediante electroeyaculación bajo anestesia general. Se realizó el test de endosmosis con y sin fijación en paraformadehído y evaluando a diferentes tiempos de conservación (0 hs sin fijar y 0, 2, 4 y 24 hs fijado). Una alícuota de la muestra fijada se procesó y se tñó con CB. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el porcentaje de espermatozoides con membranas funcionales al comparar la muestra no fijada y las muestras preservadas durante diferentes tiempos en la solución de fijación. Tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el porcentaje de endosmosis en las muestras en las que sólo se realizó HOS y en las que se realizó HOS en combinación con CB. Es posible diferir el momento de la evaluación de la funcionalidad de membrana de los espermatozoides de llama mediante la técnica de HOS de la colecta del semen. La técnica dual (HOS + CB) permite evaluar en forma simultánea la

funcionalidad de las membranas e integridad acrosomal en espermatozoides de semen fresco de llama, facilitando el trabajo a campo.

Palabras clave: acrosoma, llama, Coomassie Blue, test hipoosmótico

INTRODUCCION

La integridad de las membranas plasmática y acrosomal es de gran importancia para determinar la capacidad fecundante de los espermatozoides. En la actualidad se utilizan varias pruebas que evalúan la integridad y/o funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide de llama como las tinciones vitales con fluorocromos (tinción con Diacetato de 6-carboxifluoresceína e ioduro de Propidio) y la prueba de endósmosis o HOS test (Giuliano et al., 2008; Carretero et al., 2012; Casaretto et al., 2012). A pesar del uso cotidiano de la técnica de HOS para evaluar espermatozoides de llama, aún no se ha comprobado que tan factible es, fijar la muestra y evaluarla tiempo después, permitiendo así distanciar el momento de evaluación de la extracción de semen.

En llama, se ha utilizado la tinción fluorescente de FITC-PNA/PI (Isotiocianato de Fluoresceína conjugado con Arachis Hypogea agglutinin e ioduro de propidio) para evaluar la reacción acrosomal que también permite evaluar la viabilidad espermática (Carretero et al., 2015). Sin embargo, esta técnica requiere de equipamiento e insumos costosos, como son el microscopio de fluorescencia y los fluorocromos. Como la mayoría de los establecimientos de cría de camélidos sudamericanos se encuentran lejos de centros especializados, Giuliano et al. (2012) pusieron a punto una técnica sencilla, la tinción de Coomassie Blue (CB), que utiliza microscopía de campo claro para evaluar el estado acrosomal. Esta coloración permite determinar la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal en el espermatozoide, pero no indica la viabilidad del mismo. En otras especies como el equino y el porcino se ha utilizado la combinación de la prueba de endósmosis (HOS test) y la tinción de CB para evaluar estas características simultáneamente (Ferrante et al., 2017).

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: 1) evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática a través del tiempo mediante el test hipoosmótico (HOS) y 2) combinar la técnica de HOS con la tinción de Coomassie Blue (CB) para evaluar simultáneamente la funcionalidad de membrana y la integridad acrosomal en espermatozoides de semen fresco de llama.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de semen

Se obtuvieron un total de 12 eyaculados de 6 machos llama mediante electroeyaculación bajo anestesia general. Para ello, se utilizó un electroeyaculador P-T Electronics modelo 304 (220 V), con un vástagos #4 con tres electrodos lineales. Se estimuló la micción previo a la maniobra de extracción, para evitar la contaminación del semen con orina. La anestesia general se realizó con xilacina (Clínica Equina, PRO-SER® S.A.; 0,2 mg/kg) y ketamina (Clínica Equina, PRO-SER® S.A.; 1,5 mg/kg) ambas administradas por vía endovenosa. La electroeyaculación se realizó según la técnica de Director et al. (2007). El vástagos, previa lubricación con gel, se colocó en el recto hasta la altura de la próstata, con los electrodos ubicados ventralmente. Previamente se midió por ecografía transrectal la distancia ano-próstata en cada macho. El voltaje comenzó

en 0,2 V y finalizó en 10 V; aumentando 0,2 V en cada estímulo sucesivo. Cada estímulo duró 3 segundos con 1 segundo de intervalo entre los mismos. Alcanzados los 10 V se mantuvo en ese valor hasta la obtención del eyaculado (período no mayor a 20 minutos). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (protocolo 2014/16).

Evaluación de las características seminales de rutina:

En el semen fresco se evaluaron las siguientes características seminales: volumen, filiancia, movilidad espermática, concentración y funcionalidad e integridad de membranas. El volumen se midió utilizando una micropipeta automática. La filiancia se evaluó a través del uso de una micropipeta colocando 20 µl de semen sobre un portaobjetos y observando al retirar la misma, la formación o no de un hilo de extensión variable, calificándose como presente o ausente. La movilidad fue evaluada utilizando microscopio de contraste de fase (100x) y platina térmica (37 °C). La concentración espermática fue calculada utilizando una cámara de Neubauer. La integridad de membrana fue evaluada utilizando los fluorocromos Diacetato de 6-Carboxifluoresceína (CFDA) e ioduro de Propidio (PI) de acuerdo a Giuliano et al. (2008). Brevemente, 50 µl de semen fueron incubados a 37 °C por 10 minutos en 510 µl de un medio de tinción. Este medio estaba formado por 500 µl de solución salina isotónica y 10 µl CFDA (0,5 mg/ml). Posteriormente, se agregaron 10 µl PI (0,5 mg/ml) y se incubó a 37 °C por otros 10 minutos. Se evaluaron un mínimo de 200 espermatozoides mediante microscopía de fluorescencia. Se clasificaron en dos categorías: espermatozoides que se tiñeron de verde con el colorante CFDA debido a que presentaron sus membranas íntegras (vivos) y espermatozoides teñidos de rojo con el colorante PI debido a que presentaron sus membranas dañadas o no íntegras (muertos).

Evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática mediante el test de endósmosis (HOS test):

Para obtener el porcentaje de espermatozoides con sus membranas funcionales se realizó el test de endósmosis según la técnica de Giuliano et al. (2008) con modificaciones. Se incubaron 50 µl de semen en 200 µl de una solución hipoosmótica de fructosa-citrato de sodio (50 mOsmolar) durante 20 minutos. Al término de la incubación se tomaron 10 µl de la muestra y se evalúo el porcentaje de espermatozoides con sus membranas funcionales. Posteriormente, a la muestra restante se le agregó igual cantidad de paraformaldehído al 4 % en PBS y se la incubó por 4 minutos a temperatura ambiente.

El diseño experimental realizado fue el siguiente:

- 1- Hora Cero sin fijar: test de endósmosis sin fijación con paraformaldehído.
- 2- Hora Cero con fijación: test de endósmosis evaluado a los 4 minutos de fijar las muestras con paraformaldehído.
- 3- Hora 2 fijado: test de endósmosis evaluado a las dos horas de fijación en paraformaldehído.

- 4- Hora 4 fijado: test de endósmosis evaluado a las cuatro horas de fijación en paraformaldehído.
- 5- Hora 24 fijado: test de endósmosis evaluado a las veinticuatro horas de fijación en paraformaldehído.

Cada una de las muestras se evalúo con microscopio de contraste de fase (400x) y se contaron un total de 200 espermatozoides. Los espermatozoides que mostraron un enrollamiento a nivel de la cola producto de la incorporación del medio se clasificaron como HOS positivos (membrana plasmática funcional).

Técnica dual de evaluación de la funcionalidad de membrana y el acrosoma espermático:

Una alícuota de la muestra de HOS se fijó con igual volumen de paraformaldehído al 4 % en PBS durante cuatro minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 800 g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en 100 µl de PBS. Luego, se colocaron microgotas de la suspensión en portaobjetos marcados con Dako pen y se dejaron secar al aire. Se tiñeron con el colorante CB al 0,22 % durante 5 minutos y se observaron en microscopio óptico a 1000x (Giuliano et al., 2012). Los espermatozoides teñidos con CB se clasificaron en dos categorías: presencia de acrosoma (tinción violeta a nivel acrosomal) y ausencia de acrosoma (ausencia de tinción a nivel acrosomal). Para la técnica de HOS en combinación con CB se contabilizaron un total de 200 espermatozoides y se clasificaron en 4 categorías:

- Espermatozoides con membrana funcional (HOS+) y presencia de acrosoma (CB+)
- Espermatozoides con membrana funcional (HOS+) y ausencia de acrosoma (CB-)
- Espermatozoides con membrana no funcional (HOS-) y presencia de acrosoma (CB+)
- Espermatozoides con membrana no funcional (HOS-) y ausencia de acrosoma (CB-)

Análisis estadístico:

Se realizó un diseño factorial tomando al macho como bloque para comparar el porcentaje de espermatozoides con membranas funcionales en las muestras fijadas y no fijadas y en la técnica dual (HOS en combinación con CB). El nivel de significancia fue del 0,05. Se realizó estadística descriptiva para los diferentes patrones observados con la técnica de HOS en combinación con la tinción de CB.

RESULTADOS

Los valores de las características seminales de rutina fueron similares a los observados en trabajos previos realizados en la especie. Los mismos fueron (promedio ± desvío estándar): volumen: $2,0 \pm 1,3$ ml; movilidad oscilatoria: $48,3 \pm 24,6$ %; concentración: $39,1 \pm 20,9 \times 10^6$ espermatozoides/ml y viabilidad o integridad de membranas: $57,6 \pm 8,3$ %. Todos los eyaculados presentaron filancia.

Con respecto a la técnica de HOS, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con membranas funcionales al comparar la muestra no fijada y las muestras preservadas durante diferentes tiempos en la solución de fijación (figura 1). Tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con sus membranas funcionales entre las muestras en las que sólo se realizó HOS test y en las que se realizó HOS en combinación con CB (figura 1).

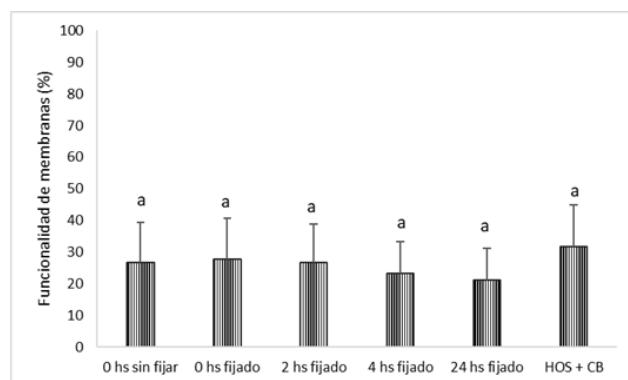


Figura 1. Funcionalidad de membrana en espermatozoides de semen fresco de llama evaluados con la técnica de HOS con y sin fijación en paraformaldehído, y evaluados a diferentes tiempos de conservación en la solución de fijación (0 h sin fijar, 0 h fijado, 2 h fijado, 4 h fijado y 24 h fijado). También se observa el porcentaje de espermatozoides con funcionalidad de membrana evaluados mediante la técnica de HOS en combinación con CB (HOS + CB) ($n=6$, $r=2$).

Los patrones observados con la técnica de HOS en combinación con la tinción de CB se pueden observar en la figura 2.

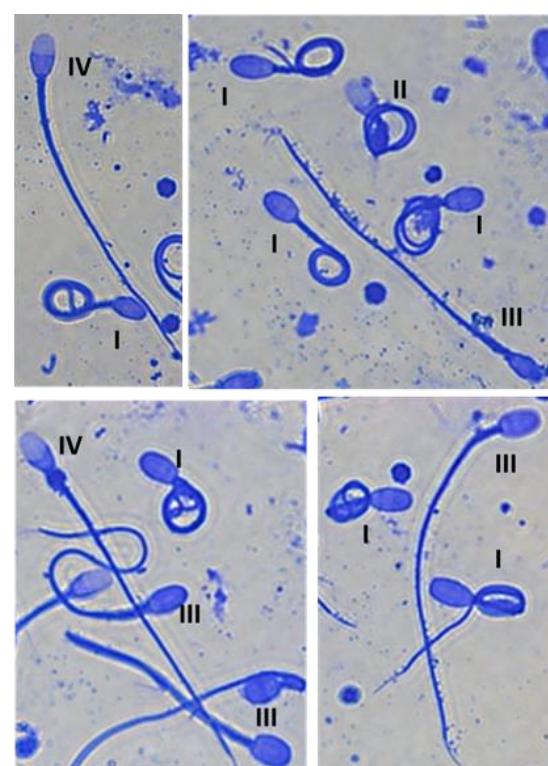


Figura 2. Espermatozoides de llama evaluados con la técnica de HOS en combinación con la tinción de CB. I: espermatozoides con membranas funcionales y presencia de acrosoma (HOS+/CB+), II: espermatozoide con membrana funcional y ausencia de acrosoma (HOS+/CB-), III: espermatozoides sin funcionalidad de membranas y presencia de acrosoma (HOS-/CB+) y IV: espermatozoides sin funcionalidad de membranas y ausencia de acrosoma (HOS-/CB-). Imágenes obtenidas con una cámara Leica DC180 (Leica Microsystems Co., Wetzlar, Alemania) (magnificación 1000x).

Los valores de cada uno de los patrones de la técnica dual se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de los diferentes patrones de espermatozoides de llama observados con la técnica dual: HOS en combinación con CB ($n= 6$, $r= 2$). Los valores son expresados como media \pm desvío estándar.

HOS+/CB+ (%)	HOS+/CB- (%)	HOS-/CB+ (%)	HOS-/CB- (%)
$33,0 \pm 14,4$	$1,5 \pm 2,9$	$60,0 \pm 17,6$	$5,5 \pm 5,5$

DISCUSIÓN

Se ha utilizado microscopía de fluorescencia para evaluar simultáneamente la viabilidad y el estado acrosomal de espermatozoides de llama (Carretero et al., 2015). Este es el primer ensayo en el que se combinan dos técnicas para evaluar simultáneamente la funcionalidad de membrana (HOS) y la integridad acrosomal (CB) en espermatozoides de semen fresco de llama utilizando microscopía de campo claro. Además, los resultados de este estudio muestran que es posible fijar dichos espermatozoides con paraformaldehído al 4 % (concentración final 2 %) y evaluarlos en forma posterior sin alterar el porcentaje de endósitos. Esto permite diferir el momento de evaluación de la muestra de la extracción de semen y así facilitar el trabajo a campo. En humanos, se ha establecido que la fijación con formaldehído (al 18,5 %) retiene el patrón adquirido por el espermatozoide incubado y permite su conservación y evaluación tiempo después (Jeyendran et al., 1992).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides con membranas funcionales evaluados por la técnica de HOS y aquellos evaluados con la combinación de HOS + CB. Resultados similares fueron reportados en espermatozoides de equino y porcino, utilizando la misma combinatoria de técnicas (Ferrante et al., 2017). Estos resultados y los nuestros estarían indicando que el procedimiento realizado en la técnica combinada no afecta la funcionalidad de las membranas de los espermatozoides. En otras especies, la prueba hiposmótica se ha combinado con tinciones vitales como la eosina-nigrosina permitiendo evaluar simultáneamente la viabilidad y funcionalidad de las membranas espermáticas (humano: Chan et al., 1991; porcino y bovino: Prinosilová et al., 2014).

Otro resultado que valida el uso de la técnica dual de HOS + CB fue que, tanto los porcentajes de espermatozoides con funcionalidad de membranas como de integridad acrosomal fueron similares a valores reportados previamente en semen fresco de llama al utilizar dichas técnicas en forma separada (Giuliano et al., 2008; 2012; Fumuso et al., 2014; Carretero et al., 2015).

CONCLUSIONES

Es posible diferir el momento de evaluación de la funcionalidad de las membranas de los espermatozoides de llama mediante la técnica de HOS de la extracción del semen. Además, la técnica dual (HOS + CB) permite evaluar en forma simultánea la funcionalidad de las membranas e integridad acrosomal en espermatozoides de semen fresco de llama, facilitando el trabajo a campo.

CONFLICTO DE INTERESES

No hay conflictos de intereses.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Concepción y diseño del estudio (MIC), desarrollo de la metodología (CP, FF, MB, MIC), escribe, y revisa el artículo (MIC, FF) y supervisión del estudio (MIC, FF).

REFERENCIAS

- Carretero MI, Lombardo D, Arraztoa CC, Giuliano SM, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Anim. Reprod. Sci.*, 2012; 131 (1-2): 63-71.
- Carretero MI, Fumuso FG, Neild D, Giuliano SM, Cetica P, Miragaya M. Evaluation of the acrosomal status in *Lama glama* sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Anim. Reprod. Sci.*, 2015; 160: 1-11.
- Casaretto C, Lombardo DM, Giuliano SM, Gambarotta MC, Carretero MI, Miragaya MH. Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head. *Andrologia*, 2012; 44: 424-430.
- Chan PJ, Tredway DR, Corselli J, Pang SC, Su BC. Combined supravital staining and hypoosmotic swelling test. *H. Reprod.*, 1991; 6(8): 1115-1118.
- Director A, Giuliano S, Trasorras V, Carretero I, Pinto M, Miragaya M. Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research*, 2007; 2: 203-206.
- Ferrante A, Caldevilla M, Miragaya M. Combinación de la tinción de Azul de Coomassie con la prueba hiposmótica para evaluar espermatozoides equinos y porcinos. V Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. InVet, 2017; 19(1): 66.
- Fumuso FG, Giménez ML, Neild DM, Giuliano SM, Chaves MG, Carretero MI. Comparación de métodos del lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de Llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova*; 2014; 4 (1):50-53.
- Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci.*, 2008; 104: 359-369.
- Giuliano SM, Bisbau C, Carretero MI, Arraztoa CC, Neild D. Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet*, 2012; 14(1): 279.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Zaneveld LJD. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch. Androl.*, 1992; 29: 105-116.
- Prinosilová P, Kopecká V, Hlavicová J, Kunetková M. Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. *Acta Vet. Brno.*, 2014; 83: 313-319.