

**TEST HIPOOSMÓTICO EN ESPERMATOZOIDES DE ALPACA (*Vicugna pacos*)  
RECUPERADOS DEL CONDUCTO DEFERENTE**

Hypoosmotic swelling test in alpaca (*Vicugna pacos*) spermatozoa recovered the  
vas deferens

H. Abel Quispe<sup>1</sup>, René Ciprián<sup>1</sup>, César Ordoñez<sup>1</sup>, Enrique Ampuero<sup>1</sup>, Hernán Cucho<sup>1</sup>

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.2>

<sup>1</sup> Carrera Profesional de  
Zootecnia, Universidad  
Nacional de San Antonio Abad  
del Cusco, Perú

E-mail: hernancucho@yahoo.com

**RESUMEN**

El objetivo del estudio fue evaluar la reacción de endosmosis en 5 soluciones hipoosmóticas de 100, 125, 150, 175 y 200 mOsm/l (HOS test) incubadas a 5 y 15 minutos utilizando espermatozoides de alpaca recuperados del conducto deferente. Se utilizaron 5 alpacas macho con los conductos deferentes desviados quirúrgicamente, recuperándose espermatozoides en 10 ocasiones por cada animal; las características microscópicas se evaluaron en un equipo ISAS®. La información del test hipoosmótico fue analizada con un arreglo factorial en un DCA, las relaciones entre la reacción total de endosmosis y los porcentajes de motilidad total y vitalidad se evaluaron con una correlación de Spearman. No se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tiempos de incubación; se halló diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre soluciones siendo superiores las de 100, 125 y 150 mOsm/l, encontrándose una correlación baja y no significativa ( $p > 0,05$ ) de la endosmosis con los porcentajes de motilidad total y vitalidad espermática; en conclusión una solución de 125 mOsm/l con 5 minutos de incubación es suficiente para realizar el test hipoosmótico en espermatozoides de alpaca recuperados del conducto deferente.

**Palabras clave:** Alpaca, espermatozoide, HOS test.

**ABSTRACT**

The study objective was to evaluate the endosmotic reaction in 5 hypoosmotic solutions 100, 125, 150, 175 and 200 mOsm/l (HOS test) incubated 5 and 15 minutes using alpaca sperm recovered the vas deferens. We used 5 male alpacas with the vas deferens surgically diverted, recovering sperm 10 times for each animal; the

microscopic characteristics were evaluated with ISAS®. Information's hypoosmotic test was analyzed with a factorial arrangement in a random one-way model, the correlation between endosmosis and percentages of motility and vitality was analyzed with Spearman correlation. There were no significant differences ( $p > 0,05$ ) in incubation times; highly significant differences ( $p < 0,01$ ) were found between solutions still

higher the 100, 125 and 150 mOsm/l, a low correlation and no significant ( $p > 0,05$ ) was found to endosmosis with percentages of sperm motility and vitality; in conclusion, a 125 mOsm/l solution with 5 minutes of incubation is sufficient to perform the hypoosmotic test in alpaca spermatozoa recovered the vas deferens.

**Keywords:** *Alpaca, spermatozoa, hypoosmotic swelling test.*

## INTRODUCCION.

La recuperación de espermatozoides de los conductos deferentes de alpacas machos de manera repetida ha sido reportada por Paricahua (2001), Perez *et al.* (2014), este procedimiento facilita la evaluación de los parámetros microscópicos y la aplicación de biotecnologías reproductivas (inseminación artificial, fecundación in vitro, etc.) en los camélidos sudamericanos domésticos.

El hypoosmotic swelling test (HOST) (Jeyendran *et al.*, 1984) es un método fácil, rápido y efectivo para evaluar la funcionalidad de la membrana celular del espermatozoide, se fundamenta en el estrés hypoosmótico al que son sometidos los espermatozoides y que se manifiesta con un enrollamiento o hinchazón (swell) a nivel de la cola. La integridad funcional de la membrana espermática tiene que ver directamente con el proceso óptimo de fertilización mediante una adecuada capacitación espermática y reacción acrosomal (Vera, 2008); se ha aplicado con éxito en bovinos, ovinos, porcinos, canes, etc., con protocolos específicos para cada especie, en alpacas existe escasa información acerca de una metodología para poder incluirla en los análisis rutinarios que se realizan a los espermatozoides.

Esta investigación pretende evaluar la reacción hypoosmótica que manifiestan los espermatozoides de alpacas recuperados de los conductos deferentes al ser sometidos a soluciones con diferente concentración salina (mOsm/l) en diferentes tiempos, y si existe relación entre la endosmosis con los porcentajes de motilidad total y vitalidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en la época de secas del 2013 en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco a 4133 metros de altitud. Se utilizaron 5 alpacas macho adultos de 5 a 6 años de edad con los conductos deferentes desviados quirúrgicamente hacia la cara interna del muslo

respectivo, el peso inicial de los animales fue de 65.6 kg y se mantuvieron en una pastura asociada de *Festuca rubra*, *Lolium perenne* y *Trifolium amabile*. Para la recuperación de espermatozoides de los conductos deferentes se utilizó 0,3 ml de base Tris (Souza, 2009) en viales de 2 ml, ésta se realizó dos veces por semana, y se obtuvieron 10 muestras por animal, todas durante la época de secas (julio – septiembre).

Se determinó el volumen (número y tamaño de gotas) de las muestras de espermatozoides recuperados; para el HOS test se prepararon 5 soluciones hypoosmóticas de 100, 125, 150, 175 y 200 mOsm/l con osmolaridad calculada con Citrato de sodio y D – fructosa al 50 % (Jeyendran *et al.*, 1984), cada muestra se separó en 10 alícuotas (5 soluciones y 2 tiempos de incubación). Cada alícuota con 25  $\mu$ l de muestra y 100  $\mu$ l de solución hypoosmótica (1:4) se incubó en baño maría a 37°C por los tiempos establecidos, al finalizar se agregó 31  $\mu$ l de solución formolada (1ml de solución hypoosmótica + 3  $\mu$ l de formaldehído) (Giuliano *et al.*, 2002). La reacción de endosmosis se evaluó en un microscopio de contraste de fases UOP – UB200i, colocándose muestras de 5  $\mu$ l, capturándose poblaciones espermáticas con una lente de 40X en el ISAS® v1.2, posteriormente se analizaron las imágenes evaluándose no menos de 200 espermatozoides por muestra, clasificados de acuerdo al criterio empleado por Vásquez *et al.* (2012) que considera al término “reacción fuerte” (Fig. 1: d-g) referido al porcentaje de espermatozoides que muestran mayor enrollamiento y que determina la funcionalidad de la membrana espermática de una muestra, “reacción débil” (Fig. 1: b-c) al porcentaje de células que muestran enrollamiento leve y “reacción total” al porcentaje de espermatozoides con algún tipo de enrollamiento (RF+RD) que es importante al evaluar protocolos y recomendar uno ideal que es materia de esta investigación (Fig.1) (Jeyendran *et al.*, 1984).

Vásquez *et al.* (2012) empleo los términos de reacción fuerte y reacción total tomando en cuenta ambos conceptos para su evaluación, ya que la reacción fuerte está referida al porcentaje de células que La motilidad y concentración se evaluó en el ISAS® utilizando muestras de 5  $\mu$ l que se analizaron con una lente de 10X en contraste de fase negativo; para la vitalidad se empleó la tinción de Hancock evaluándose con una lente de 40X en el módulo de vitalidad del ISAS®; para la morfometría espermática, se tiñeron éstos con Hemacolor, se evaluó empleando la lente de 100X con aceite de inmersión.

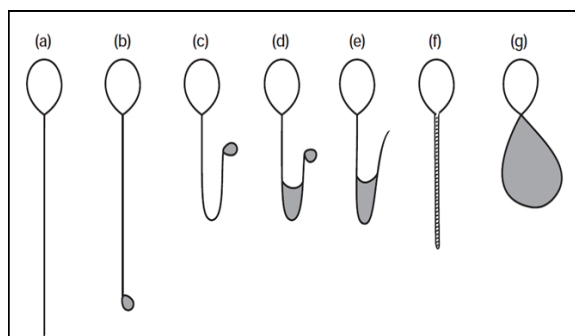


Figura 1. Representación esquemática de cambios morfológicos típicos en espermatozoides humanos sujetos a estrés hipoosmótico. (a) Sin cambio; (b-g) Varios tipos de cambios en la cola. La región gris indica enrollamiento de la cola (Jeyendran, *et al.*, 1984).

Se determinó la normalidad de las variables en estudio, se transformó los datos (proc transreg) de las variables que no mostraban distribución normal; el volumen, motilidad, concentración y vitalidad se analizaron en un diseño de bloques al azar, la endosmosis en un arreglo factorial en un DCA, se empleó el test de Tukey para comparar las medias; se utilizó la correlación de Spearman para evaluar la relación entre los porcentajes de reacción total de la endosmosis (soluciones hipoosmóticas superiores estadísticamente) con la motilidad total y vitalidad espermática, se usó el SAS en los análisis estadísticos.

## RESULTADOS

Se evaluaron 50 recuperaciones de espermatozoides de los conductos deferentes de alpacas, obteniéndose un volumen de  $0,0207 \pm 0,0106$  ml, la motilidad fue de  $17,03 \pm 9,76$  %, la concentración  $151,03 \pm 70,59 \times 10^6$  espermatozoides por ml, en todos los casos con diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre animales; la vitalidad fue de  $74,49 \pm 7,64$  %, con diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) entre animales. Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre animales para las variables de área, perímetro, largo y ancho de la cabeza del espermatozoide.

No se hallaron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tiempos de incubación de 5 y 15 minutos para la reacción fuerte y total a la endosmosis de los espermatozoides de alpacas recuperados por desviación de los conductos deferentes. Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre las soluciones

hipoosmóticas, en la reacción fuerte se observó que la endosmosis con 200 mOsm/l es inferior y estadísticamente diferente a las demás; evaluando la reacción total, la endosmosis es superior ( $p < 0,01$ ) en soluciones de 100, 125 y 150 mOsm/l (38,53, 38,93 y 37,11%) en relación a las otras concentraciones (Figura 2 y 3).

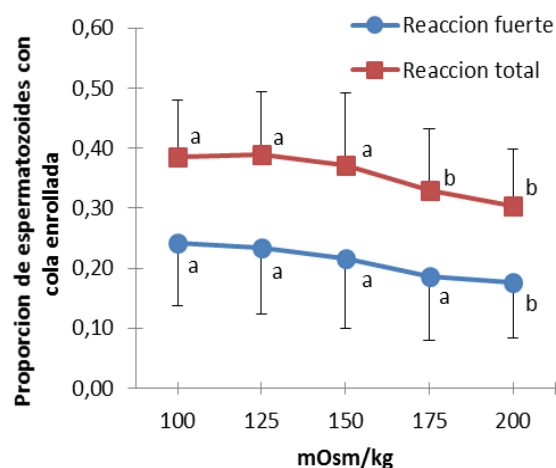


Figura 2. Efecto del estrés hipoosmótico después de 5 minutos de exposición a diferentes soluciones hipoosmóticas (promedio y desviación estándar).

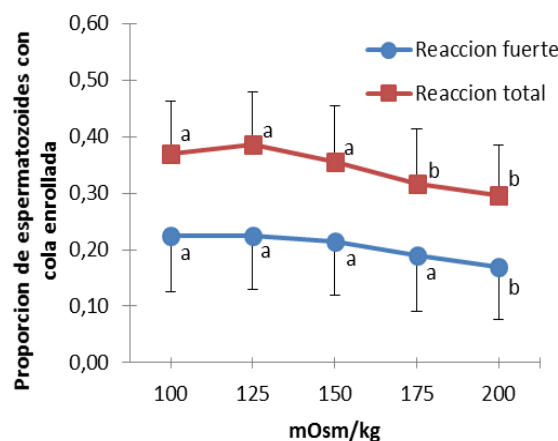


Figura 3. Efecto del estrés hipoosmótico después de 15 minutos de exposición a diferentes soluciones hipoosmóticas (promedio y desviación estándar).

Se halló que las correlaciones entre los porcentajes de motilidad y vitalidad espermática y las soluciones hipoosmóticas de 100, 125, 150 mOsm/l, eran bajas y no significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1).

Tabla 1. Correlación entre la reacción total de endosmosis con la motilidad total y vitalidad espermática, a diferentes soluciones hipoosmóticas y tiempos de exposición.

Concentración	Tiempo (minutos)	Con % motilidad total		Con % vitalidad	
		r	p	R	P
100 mOsm/l	5	0,114	0,430	-0,139	0,335
100 mOsm/l	5	-0,070	0,631	-0,178	0,215
125 mOsm/l	5	0,210	0,143	0,067	0,643
125 mOsm/l	15	0,156	0,278	-0,133	0,357
150 mOsm/l	15	0,038	0,794	-0,105	0,467
150 mOsm/l	15	0,113	0,433	-0,138	0,338

## DISCUSION

No se encontraron diferencias estadísticas entre los tiempos de incubación de 5 y 15 minutos, esto coincide con lo reportado por Vásquez *et al.* (2012) en espermatozoides epididimarios de alpaca, quienes tampoco encontraron diferencias en la reacción a 15 y 60 minutos de incubación. Asimismo, Giuliano *et al.* (2002) no encontraron diferencias en la reacción osmótica espermática de muestras incubadas por 10, 20 y 30 minutos; indicando posiblemente que los espermatozoides de alpaca tienen alta y rápida sensibilidad de la membrana espermática de alpaca.

Vásquez *et al.* (2012) reportaron que la solución hipoosmótica de 150 mOsm/l tenía una mejor performance (60 % de reacción total) y Pacheco *et al.* (2014) mostraron una endosmosis espermática total de 53,37% con solución de 50 mOsm/l. Estos resultados son superiores a nuestros índices de reacción osmótica a una solución hipoosmótica mayor a 100 mOsm/l. La diferencia entre estos estudios, posiblemente se deba a los distintos orígenes de recuperación de espermatozoides utilizados, algunas diferencias en los protocolos de endosmosis y el método de evaluación de los espermatozoides. Además, Vásquez *et al.* (2012) sostiene que las soluciones por debajo de 100 mOsm/l puedan dañar las células por un excesivo estrés hipoosmótico y provocar lisis celular.

Juyena (2011) encontró una correlación de Pearson alta entre la reacción de endosmosis (100 mOsm/l) con la motilidad total y vitalidad espermática (0,51 y 0,64 respectivamente), es posible que ello se debiera a las condiciones de manejo de los animales y de medio ambiente entre La Raya y Padova- Italia, y que usaron semen colectado por vagina artificial. (Jeyendran *et al.*, 1984) indica que el enrollamiento solo indica buen funcionamiento de la membrana, sin embargo la motilidad espermática no solo depende de la función de su membrana, sino también de un correcto metabolismo espermático en

general, por lo que en un alto porcentaje de endosmosis la motilidad puede o no ser buena; de igual manera al evaluar la vitalidad espermática, células teñidas con Eosina Y muy probablemente no reaccionarían al HOST, pero las células vivas puede que no sean capaces de reaccionar ala endosmosis, pero si lograrían impedir el ingreso de Eosina Y en su estructura.

Basándonos en el estudio de Vásquez *et al.* (2012) y el presente, podemos afirmar que espermatozoides epididimarios o recuperados de los conductos deferentes tienen un contacto directo con las soluciones hipoosmóticas, por lo que soluciones de 100, 125 y 150 mOsm/l son suficientes para la reacción de endosmosis.

## CONCLUSIÓN

Para determinar la funcionalidad de la membrana de los espermatozoides de alpacas recuperados de los conductos deferentes las soluciones hipoosmóticas de 100, 125 o 150 mOsm/l incubadas durante 5 minutos son las que presentan mayor reacción osmótica de los espermatozoides.

## REFERENCIAS

- Giuliano S, Ferrari M, Spirito S, Campi S, Director A, Fernández H. Methodological advances on the hypoosmotic swelling test (HOS test) in (*Lama glama*) spermatozoa. *Bioxcell.* 2002; 17: 149 (abstract).
- 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 other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 1984; 70, 219-228.
- Juyena N. Protein Profiles and Biochemical Characteristics of semen: Influence on Frozen-Thawed Spermatozoal Quality in rams (*Ovis aries*)

- and alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis doctoral. Italia. Università degli Studi di Padova, 2011. 182 pp.
- Pacheco J, Mamani R, Franco F, Zea O, Pezo D, Vélez V. Efecto de la osmolaridad sobre la respuesta endosmótica en espermatozoides de epidídimo y eyaculados de alpaca (*Vicugna pacos*). Spermova. 2014; 4: 36-38.
  - Paricahua, E. Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. Tesis MVZ. Puno, Perú. Universidad Nacional del Altiplano, 2001. 53 pp.
  - Pérez MG, Zeballos J, Pérez UH. Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. Spermova. 2014; 4: 139 – 144.
  - Souza T. Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas (*Puma concolor Linnaeus, 1771*) adultos. Tesis Magister. Viçosa, Brasil. Universidad Federal de Viçosa, 2009. 81 pp.
  - Vásquez J, Florentini E, Valdivia M. Hypoosmotic swelling test in Alpaca (*Vicugna pacos*) epididymal spermatozoa. Reprod Dom Anim. 2012; 47:e83 - 87
  - Vera M. Fisiología de los espermatozoides bovinos. In: González-Stagnaro C, Madrid C, Soto E. Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito. Maracaibo – Venezuela. Ediciones Astro Data. 2008. p. 495-504.