EL TEST DE ENDOSMOSIS COMO PRUEBA PARA EVALUAR LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO

Vázquez, J.M., Martínez, E., Martínez, P. y Roca, J.
Dpto. Patología Animal (Reproducción y Obstetricia). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30.071. Murcia

Introducción

El análisis rutinario del semen de verraco se basa, principalmente, en las distintas características físicas del eyaculado como son los patrones de motilidad, la morfología espermática, el número de espermatozoides en el eyaculados, etc. Sin embargo, estos parámetros no son capaces de discriminar, en todos los casos, el estado de fertilidad o infertilidad de un eyaculado. Existe la necesidad de encontrar métodos que sean baratos, rápidos, simples desde un punto de vista técnico y razonablemente exactos para poder ser utilizados junto a las pruebas rutinarias de evaluación del semen.

El análisis de la funcionalidad de la membrana plasmática podría ser un mejor indicador del estado de los espermatozoides que las técnicas de exclusión, tradicionalmente conocidas como tinciones vitales. cuyo único objetivo es determinar si las membranas espermáticas se encuentran físicamente alteradas como signo de muerte celular. Dentro de las pruebas que permiten evaluar la funcionalidad de la membrana se encuentra la prueba de hinchamiento del flagelo, HOS-test o prueba de endósmosis descrita inicialmente por Jeyendran y col. en 1984 para espermatozoides humanos. Esta prueba evalúa el paso del agua desde el exterior al interior de la célula, cuando los espermatozoides son expuestos a soluciones hiposmóticas. provocando una respuesta característica en la cola del espermatozoide que puede evaluarse bajo un microscopio de contraste de fases.

Aunque esta técnica se está utilizando en la especie humana y algunas especies domésticas, no es una técnica difundida entre los métodos de análisis de espermatozoides de verraco. Por lo tanto, es necesario adecuar la técnica de endósmosis a espermatozoides de verraco y encontrar las condiciones básicas de trabajo para inducir el máximo porcentaje de espermatozoides reaccionados sin provocar la lisis de las membranas como consecuencia del choque hiposmótico.

Los objetivos del presente estudio han sido los siguientes: 1) Determinar la presión osmótica y tiempo de incubación que induzcan el número máximo de espermatozoides con reacción identificable en la cola. 2) Investigar la composición más apropiada del medio de incubación para realizar el test de endósmosis con espermatozoides de verraco y 3) Analizar la relación existente en el ganado porcino entre el test de endósmosis y otras pruebas de evaluación de la integridad funcional de la membrana.

Material y Métodos

Se utilizaron un total de 10 verracos de raza Blanco Belga y Pietrain. Tras la obtención de la fracción rica mediante el método manual, se analizó el eyaculado excluyendose aquellos que no presentaban unas características seminales satisfactorias mediante el análisis rutinario del semen. Posteriormente se diluyó 1:4 (v/v) la fracción rica en diluyente comercial MR-A (Martín, 1984) y se transladó al laboratorio a 16° C. A continuación, se centrifugó durante 3 minutos a 1000g en tubos de 10 ml, resuspendiendose el pellet resultante en 2 ml de MR-A. Finalmente, se evaluó de nuevo la motilidad y el estado de los acrosomas.

En la primera experiencia se prepararon soluciones compuestas por fructosa y citrato sódico (v/v) a pH 7'2 en un rango de presiones osmóticas comprendidas entre 50 y 200 mOsm/kg (50, 100, 150 y 200 mOsm/kg). Posteriormente se incubaron los espermatozoides (1:10,v/v) en cada una de estas soluciones durante tiempos variables de 5, 30, 60 y 120 minutos a 37° C. Tras la incubación se fijó una alicuota de 0'1 ml en 0'9 ml de solución fijadora de glutaraldehido a pH 7'2. Las soluciones de glutaraldehido fueron específicas para cada una de las incubacíones, presentando la misma presión osmótica que el medio hiposmótico.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto 94/0059 de CEDETI. Nuestro agradecimiento a Dalland Hybrid España S.A. y al Instituto de Fomento de la Región de Murcia.

Las muestras fueron evaluadas bajo un microscopio de contraste de fases a 400 aumentos clasificándose los espermatozoides en función del grado de reacción de la cola: I: espermatozoides sin reacción o negativos; II: espermatozoides con reacción en la porción final de las colas; III: espermatozoides con colas en forma de látigo y IV: espermatozoides con colas en forma de ovillo.

En segundo lugar se determinó el tipo de soluto de la solución hiposmótica que, a una misma osmolaridad, presentaba un mayor porcentaje de respuesta a la endósmosis. Para ello se prepararon diferentes soluciones a 150 mOsm/kg, incubando los espermatozoides durante 30 minutos. Estas soluciones estuvieron compuestas por cloruro sódico, citrato sódico, glucosa, fructosa, fructosa/citrato sódico (v/v) y diluyente comercial MR-A. Tras la incubación, los espermatozoides fueron valorados bajo miscroscopía de contraste de fases como en la experiencia 1.

Finalmente, en la tercera experiencia, se procedió a valorar la técnica mediante concentraciones conocidas de espermatozoides muertos por congelaciones sucesivas en nitrógeno líquido. Las proporciones de estudio de espermatozoides diluidos/espermatozoides muertos fueron del 100/0 75/25, 50/50, 25/75 y 0/100. Asimismo, los resultados de endósmosis fueron comparados con los obtenidos mediante la técnica de eosina-nigrosina (Bamba, 1988), tripán azul (Vázquez y col., 1992) y diacetato de carboxifluoresceina (Harrison y Vickers, 1990).

Para el análisis estadístico utilizamos un ANOVA de dos vías para los tres experimentos usando el Multivariate General Linear Model del Systat (Wilkinson y Howe, 1992). Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores fueron comparados por el test de Tukey. En la experiencia 3 se realizó un test de Chi-Cuadrado para comparar entre los porcentajes de espermatozoides reaccionados observados y esperados. Además, se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson entre los resultados de endósmosis y el resto de las pruebas de evaluación de membrana (Steel y Torrie, 1980). Todas la experiencias se realizaron por quintuplicado.

Resultados y Discusión

En el experimento 1 se observó un efecto del verraco sobre los resultados obtenidos por lo que se procedió al análisis de los mismos de modo independiente. Se obtuvo en todas las muestras una marcada reactividad de la cola presentando, a diferencia de lo observado por Rodríguez y col. (1994b), una respuesta similar al resto de las especies citadas en la literatura. En cuanto al tiempo de incubación (Fig 1a), no existieron diferencias significativas en el número de espermatozoides reaccionados en ninguno de los casos, aunque fue a partir de los 30 minutos de incubación cuando estos porcentajes fueron mayores.

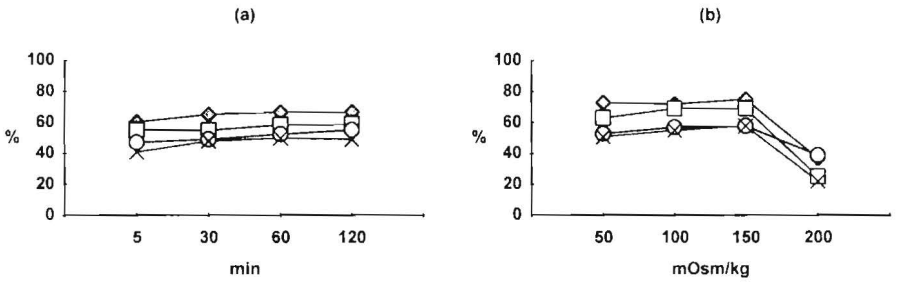


Fig.1. Efecto del tiempo de incubación (a) y de la presión osmótica (b) sobre el porcentaje de endósmosis de espermatozoides de verraco. Cada icono representa a un verraco diferente. Cada valor ha sido calculado como la media de cinco replicados para todos los valores de presión osmótica (a) o tiempos de incubación (b).

Sin embargo, se apreció un marcado efecto de la presión osmótica del medio sobre la respuesta espermática cuando esta fue de 200 mOsm/kg (Fig. 1b). De este modo, no existieron diferencias significativas entre los valores obtenidos para 50, 100 y 150 mOsm/kg, a diferencia de los resultados obtenidos por Jones (1973) quien observó que cuando la presión osmótica era inferior a 200 mOsm/kg se producía una ruptura de la membrana plasmática de los espermatozoides de verraco. Por el contrario, Vázquez (1980) observó como los espermatozoides de verraco soportaban presiones osmótica de hasta 40

mOsm/kg sin romperse. Bajo nuestras condiciones, cuando utilizamos una presión osmótica de 200 mOsm/kg se produce una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides reaccionados, lo que demuestra que existe una población importante de espermatozoides de verraco que es incapaz de reaccionar con presiones osmóticas superiores a 150 mOsm/kg.

Los resultados obtenidos en la experiencia 2 muestran como la composición de la solución no afecta de modo significativo al porcentaje de espermatozoides reaccionados bajo nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, existieron diferencias en cuanto al tipo de reactividad que presentaron, apareciendo un mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados tipo III y IV cuando se utilizaron soluciones de citrato sódico/fructosa y soluciones de MR-A a 150 mOsm/kg durante 30 min. Jeyendran y col. (1984) observaron como existía, en espermatozoides humanos, una relación directa entre la reactividad espermática y la naturaleza de los azúcares y electrolitos que componían la solución. De este modo estos autores obtienen los mejores resultados utilizando una solución de citrato sódico/fructosa.

Por último, en la experiencia 3, no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides esperados y observados en muestras con poblaciones conocidas de espermatozoides vivos. Cuando se compararon los resultados obtenidos con la prueba de endósmosis y el resto de las pruebas de valoración de membrana, se obtuvieron diferencias significativas siendo, en todos los casos, los valores de endósmosis inferiores al resto de la pruebas. En este sentido, Correa y Zavos (1994) obtienen, con espermatozoides de toro, una diferencia del 20% entre espermatozoides vivos y reaccionados a endósmosis, por lo que concluyen que la prueba de endósmosis podría ser mas discriminante en la búsqueda de alteraciones espermáticas. Sin embargo, cuando establecimos la matriz de correlaciones con el resto de las pruebas de valoración de membrana, se obtuvieron resultados de 0'77 para los resultados obtenidos con diacetato de carboxifluoresceina, 0'76 para los resultados de tripán azul y eosina ($p<0'001$). Estos coeficientes son similares a los que se describen en la bibliografía para otras especies. De este modo se ha encontrado una correlación de 0'65 con la viabilidad en espermatozoides humanos (Smith y col., 1992), de 0'78 en espermatozoides de morueco (García y col., 1994) y de 0'65 en espermatozoides de perro (Rodríguez y col., 1994a).

Como conclusión podemos afirmar que, bajo nuestras condiciones experimentales, los parámetros óptimos para elaborar una prueba de endósmosis con espermatozoides de verraco consisten en utilizar soluciones de citrato sódico/fructosa (v/v) o bien de diluyente comercial MR-A que se encuentren entre 100 y 150 mOsm/kg de presión osmótica e incubar a los espermatozoides entre 5 y 60 minutos.

Bibliografía

Bamba, K. (1988). *Theriogenology*, 29:1245-1251.

Correa, J.R. y Zavos, P.M. (1994). *Theriogenology*, 42:351-360.

García, C., Garde, J., Pérez, J., Martínez, E. y Vázquez, I. (1994). *7ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal*. Murcia. pp:116

Harrison, R.A.P. y Vickers, S.E. (1990). *J. Reprod. Fertil.*, 88:343-352.

Jeyendran, R.S., Van Der Ven, H.H., Pérez-Pelaez, M., Crabo, B.G. y Zaneveld, L.J. (1984). *J. Reprod. Fertil.* 70:219-228.

Jones, R.C. (1973). *J. Reprod. Fertil.* 33:179-183.

Martín, S. (1984). *Pig International (may)*: 24-28.

Rodríguez, J.E., Montserrat, A. y Rigau, T. (1994a). *Theriogenology* 42:815-829.

Rodríguez, J.E., Montserrat, A. y Rigau, T. (1994b). *7ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal*. Murcia. pp:130

Smith, R., Madariaga, M. y Bustos-Obregon, E. (1992). *Int. J. Androl.* 15:5-13.

Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. (1980). Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. McGraw-Hill, New York, USA.

Vázquez, I. (1980). Nuevos métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos. Tesis Doctoral. Universidad de León.

Vázquez, J.M., Martínez, E., Roca, J., Coy, P. y Ruíz, S. *Theriogenology*, 38:843-852.

Wilkinson, H. y Howe, P. (1992). Systat for Windows 5.0. Evanston, Illinois, USA.