RESISTENCIA AL ESTRES HIPEROSMOTICO EN ESPERMATOZOIDES DE CABALLO. EL POSIBLE PAPEL DE LAS BOMBAS IONICAS Y SU RELACION CON LA RESISTENCIA A LOS PROCESOS DE CONGELACION/DESCONGELACION

F. I. Caiza de la Cueva[1], M.R. Pujol[2], T. Rigau[1], J. Miró[1] y J. E. Rodríguez-Gil[1]

[1]Unidad de Reproducción. Departamento de Patología y Producciones Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.
[2]Unidad de Genética Animal. Departamento de Patología y Producciones Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

La resistencia a cambios de osmolaridad en el medio puede ser una herramienta importante para comprender mejor los mecanismos de resistencia del semen de caballo a las técnicas de congelación y descongelación, tal y como se ha puesto de manifiesto en otras especies, como el cerdo (1), el hombre (2,3) o el morueco (3,4). Con este fin, muestras seminales de caballos procedentes de tres razas diferentes (un árabe, un español y un hispano-bretón), así como de un caballo cruzado deportivo, todos ellos con una edad comprendida entre los 4 y los 7 años, se incubaron durante 5 minutos en diferentes soluciones con una osmolaridad comprendida entre alrededor los 600 mOsm y lo alrededor de 4000 mOsm, a 4°, 16° or 37°C (medios no interrumpidos). Estos medios, además, podian estar compuestos por NaCl, glicerol o glucosa. Tras esta incubación, el semen se introducía rápidamente dentro de una solución isosmótica del tipo Krebs/Ringer/Henseleit (medios interrumpidos), y con posterioridad se estudiaba el porcentaje de viabilidad de las células frente a los diferentes tratamientos tras una tinción vital Azul Tripán/Giemsa, modificada como se describe en (5).

La incubacion en los medios no interrumpidos mostró una disminución en la viabilidad espermática, que fue proporcional al aumento de osmolaridad de los medios. Este descenso fue mucho más evidente cuando las incubaciones se realizaron a 37°C, en comparación con los resultados observados a 4 o 16°C (Figura 1). El descenso en viabilidad fue aún más marcado en los medios interrumpidos, observándose un efecto dependiente de la presión osmótica del medio inicial, así como de la temperatura, observándose los peores valores de viabilidad nuevamente a 37°C (Figura 1). Los resultados obtenidos en los medios compuestos de NaCl fueron significativamente mejores que los obtenidos en los medios con glicerol o glucosa (datos no mostrados).

Por otra parte, la incubacion de los espermatozoides en presencia tanto de ouabaína (un inhibidor específico de la ATP-asa dependiente de Na^+ y K^+) como de amiloride (un inhibidor específico de la bomba de membrana de Na^+/H^+) disminuyeron aún más la viabilidad de los espermatozoides de caballo incubados durante 5 minutos a 16°C en un medio de NaCl, de presión osmótica 2206 mOsm, así como en el medio interrumpido correspondiente (Figura 2). Muy pocas correlaciones interesantes se observaron entre la viabilidad observada después del estrés hiperosmótico y los parámetros habituales de calidad seminal equina, como viabilidad, acrosomas alterados, anomalías morfológicas o parámetros de motilidad obtenidos tras un análisis computerizado, tanto en muestras de semen fresco como tras la congelación y descongelación (datos no mostrados).

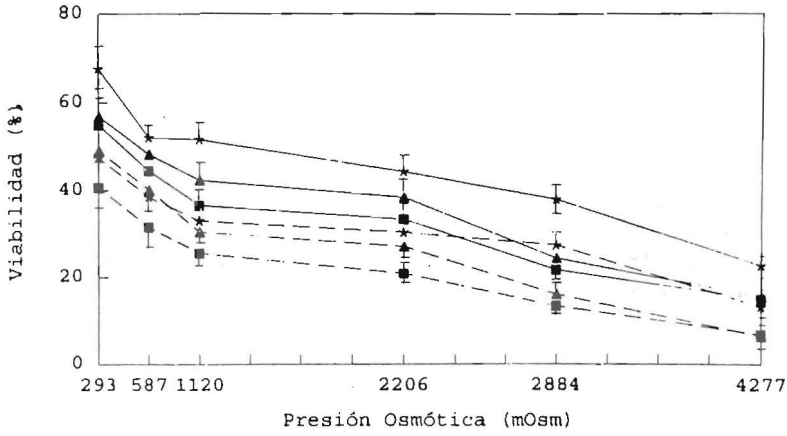


Figura 1. Cambios en los porcentajes de viabilidad tras la incubación en los diferentes medios hiperosmóticos compuestos por NaCl. Los espermatozoides se incubaron durante 5 min a 4°C (X,línea contínua), 16°C (▲,línea contínua) y 37°C (■, línea contínua) en las soluciones de NaCl con las presiones osmóticas indicadas. Inmediatamente después se calcularon los porcentajes de viabilidad y una alícuota de cada suspensión se introdujo súbitamente en solución isosmótica Krebs/Ringer/Henseleit a 4°C (X, línea discontínua), 16°C (▲, línea discontínua) y 37°C (■, línea discontínua). Inmediatamente después se volvieron a calcular los porcentajes de viabilidad. La Figura muestra las medias ± SE de 8 experimentos diferentes.

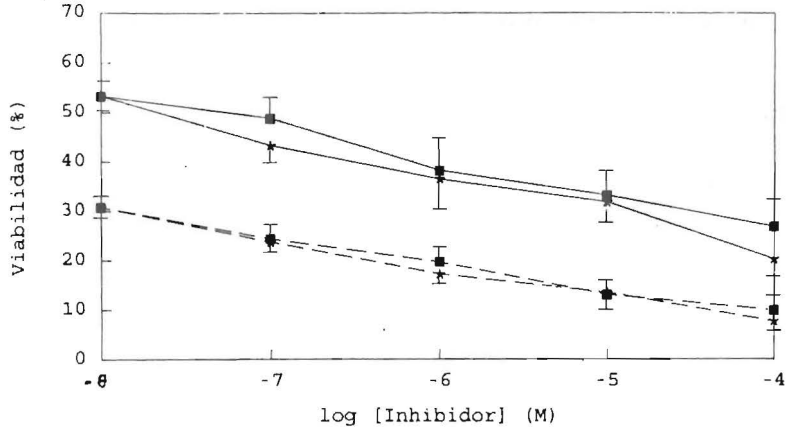


Figura 2. Effectos de la ouabaína y el amiloride sobre el porcentaje de viabilidad de espermatozoides de caballo sometidos a estrés osmótico. Los espermatozoides de caballo se preincubaron durante 30 min con las concentraciones indicadas de ouabaína (X) o amiloride (■). Inmediatamente después, las células se incubaron durante 5 min a 16°C en un medio de NaCl con una presión osmótica de alrededor los 2000 mOsm y se tomaron alícuotas para calcular la viabilidad (líneas contínuas). Otras alícuotas se introdujeron inmediatamente en un medio isosmótico Krebs/Ringer/Henseleit y nuevamente se calcularon los porcentajes de viabilidad (líneas discontínuas). Los resultados son las medias ± SE de 8 experimentos diferentes.

Estos resultados parecen indicar que, aunque la resistencia al estrés hiperosmótico puede jugar un papel importante en la resistencia a la congelación del semen equino, la utilidad de una prueba basada en el estrés hiperosmótico con valor predictivo para la resistencia a la congelación de una muestra seminal concreta parece estar muy comprometida por el hecho de la existencia de otros factores, aparte de los pu amente osmóticos, que influyen en la supervivencia del semen de caballo tras la congelación/descongelación. Por otra parte, tanto la ATP-asa dependiente de Na^+ y K^+ como la bomba iónica de Na^+/H^+ están claramente relacionadas con la resistencia del semen de caballo frente al estrés hiperosmótico.

Bibliografía

1.- Rigau T., Caiza de la Cueva F.I., Bonet S., Briz M. and Rodríguez-Gil J.E. (1995). Resistance to hyperosmotic stress of boar spermatozoa: Putative role for ionic pumps. Assisted Reproductive Technology/Andrology 8, 101-122.

2.- Gao D.Y., Ashworth E., Watson P.F., Kleinhans F.W., Mazur P., Critser J.K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. Biol. Reprod. 49, 112-123.

3.- Curry M.R., Watson, P.F. (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. Cryobiology 31, 39-46.

4.- Holt W.V., North R.D. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biol. Reprod. 51, 414-424.

5.- Rodríguez-Gil J.E., Montserrat A., Rigau T. (1994). Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure of canine spermatozoa. Theriogenology 42, 815-829.