INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES RECIÉN COLECTADOS DE OVINOS EN CONDICIONES DE TRÓPICO SECO

Rubio-Guillén, J., Portillo-Guevara, O., Montero, M., Velásquez, A., Zalahne W., González-Villalobos, D., Torres-Rodríguez, P. y Quintero-Moreno, A.
Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA). Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ. Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A, Venezuela. jorge.rubio@fcv.luz.edu.ve

INTRODUCCIÓN

La integridad de la membrana plasmática (MP) es fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible para la fecundación (Rubio et al., 2009). Esta participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones que permiten la adaptación metabólica del espermatozoide al medio circulante, proporcionándole, un sistema molecular para el reconocimiento del oocito. De aquí deriva que la evaluación estructural del espermatozoide hace énfasis en la valoración de la integridad de su MP, así como también la membrana acrosomal (MA); pudiendo en algunos casos evaluarlas juntas o por separado mediante tinciones sencillas en microscopio óptico (Zhu y Liu, 2000).

Es bien sabido también que la criopreservación seminal afecta la integridad de estas membranas, produciendo efectos deletéreos que menoscaban la funcionalidad espermática (Rubio et al., 2009). Por tal razón, la integridad estructural y funcional de la MP y MA antes del proceso criogénico debe mostrarse incólume en ejemplares destinados a Inseminación Artificial (IA), para no sumar al daño subletal producido por la congelación un efecto previo por falta de adaptabilidad a condiciones de manejo del semen recién colectado, para que éste pueda predecir eficientemente la congelabilidad de muestras destinadas a IA.

Particularmente, razas de ovinos tropicales como la West African (WA), y mestizos como el Santa Inés-West African (SI-WA) han mostrado adaptación a las condiciones extensivas de sistemas productivos y reproductivos de Venezuela, obteniéndose eyaculados frescos con aceptable calidad espermática desde la pubescencia (Villasmil et al., 2011). Sin embargo, la validación del rendimiento reproductivo en ovinos bajo condiciones de trópico seco no está bien documentada, más aún si se habla de animales mestizos utilizados comúnmente en Centros de IA ovino. Por la razón antes citada, en este estudio se pretende caracterizar la integridad estructural y funcional de la MP y MA de espermatozoides ovinos, valorando para tal fin: la vitalidad (%Vivos), los acrosomas alterados (DAR) y la respuesta a las pruebas HOS-t y HOST/Eosina-Nigrosina (Inclusión de tinción supra-vital al test original).

MATERIAL Y MÉTODOS

En este ensayo fueron colectados seriadamente, mediante vagina artificial, los eyaculados de 10 ovejos adultos (5 WA y 5 mestizos SI-WA) mantenidos en condiciones de trópico seco y pertenecientes al Centro Experimental de Producción Animal (CEPA) de la Universidad del Zulia, en Venezuela. Se efectuaron pruebas de valoración de la integridad estructural (Eosina-Nigrosina: EN, y DAR) y funcional (HOS-t) de la MP con el objetivo de contrastar los resultados de valoración seminal entre estos dos grupos raciales del trópico venezolano. Para esta evaluación, se tomaron 10 µl de semen fresco sobre una platina termorregulable (Osaka, OK 51, España) a 37ºC, se mezclaron suavemente con 10 µl del colorante EN para realizar un frotis donde se evaluó el %Vivos y %DAR. Para la valoración de la funcionalidad de la MP, se utilizó el test HOS-t y HOST-EN. En ambas pruebas se incubó en un Baño María (YCW-035, Taiwán) a 37ºC una alícuota de 50 µl de semen diluido en 500 µl de cloruro de sodio a 154 mOsm/l durante 30 minutos. En el primer caso (HOS-t), se observaron las reacciones positivas al test, verificando los flagelos espermáticos enrollados parcial o totalmente. Para el segundo caso, se hizo una pequeña modificación del test original y se tomó 10 µl para realizar la tinción de EN (Quintero et al., 2012), luego en un microscopio óptico y utilizando el objetivo de inmersión se contabilizaron 200 espermatozoides por muestra que presentaran la condición de no teñidos (Vivos) y

reaccionados a la hiposmosis. Las variables evaluadas (Vivos, DAR, HOS-t, HOST-EN), se analizaron utilizando el Procedimiento GLM del SAS. Cuando se hallaron diferencias, se cuantificó el efecto con el Test de separación de medias Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La integridad estructural y funcional de MP y MA se observa notoriamente en cuatro parámetros de valoración de estas membranas (%Vivos, %DAR, %HOS-t, %HOST-EN) (Tabla 1). Aunque retrospectivamente se conoce que los resultados de estos cuatro parámetros de evaluación seminal no siempre están correlacionados con la predicción de congelabilidad o inclusive con la fertilidad (Rubio et al., 2009), a menos que el daño que presenten los espermatozoides sea muy importante (Rodríguez-Martínez, 2003).

Los resultados demostraron que los grupos raciales evaluados presentaron características similares al valorar la integridad estructural y funcional de la MP. Para la funcionalidad de la MP mediante HOS-t, ambos grupos fueron similares en respuesta al cambio osmótico (WA: 58,89% *vs* SI-WA: 55,86%. P>0,05). La integridad de la MP y MA reflejan viabilidad espermática, y en el semen recién colectado es idóneo que las muestras posean una excelente calidad e integridad de estas membranas, ya que sumado a la exteriorización del semen hay que adicionar el daño por la criopreservación que afecta estas estructuras, ocasionando fallas como hinchamiento y disrupción de las mismas, que pueden inducir una capacitación espermática anticipada y/o reacción acrosómica, produciéndose un daño subletal que afectará la fertilidad de muestras destinadas a IA (Tartaglione y Ritta, 2004). Así mismo, en cuanto a la integridad estructural valorada mediante EN (%Vivos) y contabilizando los DAR, al comparar los ejemplares WA con los mestizos SI-WA no se encontraron diferencias (P>0,05) en ambas variables estudiadas. Aunque al contabilizar sus DAR, hubo una tendencia numérica a favor de los WA frente a sus coetáneos SI-WA (P=0,06). Se conoce que cambios osmóticos pueden producir efectos perjudiciales sobre las muestras seminales incubadas en anisosmosis, reflejándose en un aumento del porcentaje de espermatozoides con cambios muy parecidos a los ocurridos en un proceso de capacitación *in vivo* (Leahy et al., 2010). La determinación de la presencia del acrosoma en semen fresco y descongelado se considera un buen indicador de calidad seminal óptima (Rubio et al., 2009). Por esta razón, resulta tan importante valorar adecuadamente esta estructura, que en este caso no mostró falta de integridad morfológica, si se considera el 15% de DAR como límite máximo admisible para IA (Rodríguez-Martínez, 2003).

Al realizar dos pruebas de evaluación de la funcionalidad espermática, en dos distintas partes (MP y MA), se pretendió mejorar la predictividad de los resultados, como lo sugieren otros autores (Zhu y Liu, 2000). Empero, un porcentaje de espermatozoides reaccionados al HOS-t por debajo del 60% en ambos grupos raciales, sugiere que quizás la MP no respondió adecuadamente a la hiposmosis en un intento por equilibrar ambos ambientes, similar a lo conseguido por otros autores (Nava et al., 2011). También pudiera ser que la presión de 154 mOsm/l usada en el test no fue lo suficientemente baja para inducir que los espermatozoides reaccionaran adecuadamente, debido a que, algunos investigadores han sugerido para el semen de rumiantes, una presión osmótica de 100 mOsm/l (Rota et al., 2000). En contraparte, existen reportes que al comparar estas dos condiciones osmolares de 100 y 154 mOsm/l no han conseguido diferencias significativas (Quintero et al., 2012).

El valor del test HOST-EN muestra que el porcentaje de espermatozoides vivos con integridad funcional de la MP para ambos grupos raciales están cercanos al 42%, lo que hace inferir la resistencia osmótica que presentan estas células de animales adaptados a ambientes adversos, y condición está, tan necesaria para una fertilidad óptima a nivel de campo. La resistencia al estrés anisosmótico producto de una hiposmosis de incubación en muestras seminales destinadas a criopreservación puede ser un importante factor predictivo de congelabilidad y fertilidad si se evalúa minuciosamente la calidad espermática mediante

técnicas de medición de la fosforilación proteica que indiquen la generación de aniones superóxidos producto del estrés oxidativo concomitante a la hiposmosis (Burnaugh et al., 2010). En resumen, se evidenció que los espermatozoides de ambos grupos raciales presentaron características semejantes de vitalidad y resistencia a cambios osmóticos, lo que hace inferir su adaptación a condiciones de trópico seco inherente al rendimiento reproductivo del ovino, sobretodo, si tomamos al grupo WA como control adaptado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Burnaugh, L., Ball, B., Sabeura, K., &Meyers, S.A. 2010. Ani. Reprod. Sci. 117: 249-260.
Leahy, T., Marti, J., Mendoza N., Pérez R., & Evans G. 2010. Ani. ReprodSci. 119: 137-146.
Nava, H., Quintero A, Rubio J.,&Finol G. 2011. Rev. Científ FCV-LUZ XXI (3): 211-214.
Quintero, A., Nava, A, Osorio, C, Rubio, J. & González, D. 2012. Rev. Científ. LUZ 12(1): 21.
Rodríguez-Martínez, H. 2003. Reprod Dom Anim.38: 312–318.
Rota, A., Penzo, N., Vicenti, L., & Mantovani, R. 2000. Theriogenology.53: 1415-1420.
Rubio, J., González, D., & Quintero, A. 2009. Rev. Científ. FCV-LUZ XIX(4): 382-389.
Tartaglione, C.M., & Ritta, M.N. 2004. Theriogenology. 62: 1245-1252.
Villasmil, Y., Aranguren, J., Madrid N., González, D., & Rubio, J. 2011. Actas AICA: 419-422
Zhu, W., &Liu, X. 2000. Asian J Androl. 2: 135-138.

Agradecimientos: Trabajo financiado por la LOCTI-PEII (Proyecto Nº 2012000851).

Tabla 1. Valoración de integridad de la membrana plasmática en ovinos tropicales

Grupos Raciales	Pruebas de Valoración Estructural		Pruebas de Valoración Funcional	
	%Vivos	%DAR	%HOS-t	%HOST-EN
West-African	87,44	7,14[a]	58,89	39,26
Mestizos SI-WA	83,92	14,53[a]	55,86	40,26

SI-WA: Mestizos Santa Inés–West African. %Vivos y %DAR: Porcentaje de espermatozoides vivos y con acrosoma reaccionado. %HOS-t y %HOS-EN: Porcentaje de espermatozoides reaccionados a la hiposmosis. a: Tendencia numérica con diferencia a P= 0,06.

PLASMA MEMBRANE INTEGRITY OF SPERMATOZOA IN FRESH SEMEN OF RAM KEPT UNDER DRY TROPICAL CONDITIONS

ABSTRACT: With the aim of contrasting the results of plasma membrane functional integrity in fresh semen, were collected serially 5 ejaculates from 10 fertile rams, five West African (WA) and five Santa Ines-WA crossbred. Tests were performed for evaluating the structural integrity (Eosin-Nigrosin stain: EN) and functional (HOS-t) of the plasma membrane (MP) individually (EN and HOS-t) and combined (HOST-EN). The data were analysed by GLM procedure. Results showed that genotype had relatively similar characteristics concerning structural and functional integrity of MP. Structural integrity was assessed using EN, comparing specimens WA y SI-WA crossbreds, differences were not statistically significant (P>0.05) in the percentage of viability: 87.44% *vs* 83.92%, respectively. Also, to assess the functionality of MP with HOS-t, both genotypes were similar in response to osmotic change (WA: 58.89% *vs* SI-WA: 55.86%. P>0.05). Interestingly, it was evident that both genotypes had similar characteristics of vitality and resistance to osmotic changes in fresh semen, deducing adaptation to dry tropic conditions inherent in the reproductive performance of ram, especially if WA is taken as control group adapted.

Keywords: Plasma membrane, acrosome, ram.