

## NIVELES DE RESISTENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO A

### CONDICIONES DE STRESS OSMOTICO

J.E. Rodríguez Gil, F. Caiza de La Cueva y T. Rigau  
Dep. Patología y Producción Animales. Facultad de Veterinaria.  
Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra

#### Introducción

Una de las principales causas de las lesiones en espermatozoides sometidos a congelación es la exposición de las células a microambientes con elevados niveles de presión osmótica ( $\pi$ ), sometiendo a las células al denominado "stress osmótico" (1,2). El objetivo de este trabajo es observar la resistencia al "stress osmótico" por parte de espermatozoides de verraco, con la finalidad de comprender mejor la capacidad que presentan dichos espermatozoides para aguantar la congelación.

#### Material y métodos

Se utilizaron muestras procedentes de 9 verracos de razas puras. Inmediatamente tras la extracción, las muestras se diluyeron en medio de conservación MR-A, se distribuyeron en dosis de 100 mL, y se almacenaron a 16 °C. Una de las dosis se transportó en una nevera a 15-16 °C hasta el laboratorio, e inmediatamente la muestra de semen se dividió en 3 partes: Una se siguió almacenando a 16 °C, otra se puso en un baño termostatzado a 37 °C durante 10 min, y la tercera se guardó a 4 °C durante 20 min. En todas estas condiciones se aplicó el siguiente modelo experimental:

Se incubaron 5  $\mu$ L de semen con 45  $\mu$ L de una solución de NaCl, glicerol o glucosa. Estas soluciones podían tener una  $\pi$  aproximada de 300, 600, 1000, 2000, 3000 o 4000 mOsm en el caso del NaCl y el glicerol, o sólo de 300, 600, 1000 y 2000 mOsm en el caso de la glucosa. Tras 5 min, de cada mezcla se extraían 25  $\mu$ L, que se añadían a 1 mL de una solución isosmótica Krebs-Ringer glucosada (pH 7,4). Inmediatamente, se realizaba una tinción doble Azul Tripán/Giemsa (3) de todas las muestras, y sobre cada punto se contabilizaban los porcentajes de viabilidad y acrosomas alterados. La posible significación estadística de las diferencias fue estimada mediante ANOVA de 1 vía.

#### Resultados

La incubación durante 5 minutos de los espermatozoides a 4 y a 16 °C en las soluciones con una  $\pi$  de 600, 1000, 2000 y 3000

mOsm no produjo modificaciones significativas en los porcentajes de viabilidad y acrosomas alterados con respecto a las soluciones de 300 mOsm (ver Fig.). Sin embargo, se observó un descenso en la viabilidad y un aumento en los acrosomas alterados a 4000 mOsm en los medios a dichas temperaturas (ver Fig.). En cambio, a 37 °C los resultados fueron peores, observándose diferencias a esta temperatura entre los 2000 y los 3000 mOsm (ver Fig.). No se observaron diferencias significativas entre los medios de NaCl, glicerol o glucosa con un valor equivalente de  $\pi$ .

Cuando las muestras se incubaron durante 5 minutos en las soluciones hiperosmóticas y seguidamente se incluyeron repentinamente en una solución isosmótica, se observó un descenso en la viabilidad y una aumento en el porcentaje de acrosomas alterados que ya fue significativo cuando la  $\pi$  de la solución inicial era de 1000 mOsm y que alcanzó su extremo a 4000 mOsm de partida. Aquí, si bien en NaCl y glucosa se observaron peores resultados en los medios a 37 °C, en los medios con glicerol no se observaron diferencias en los resultados a las 3 temperaturas. Nuevamente, tampoco se observaron diferencias significativas entre las soluciones de NaCl, glicerol o glucosa (ver Fig.).

#### **Discusión**

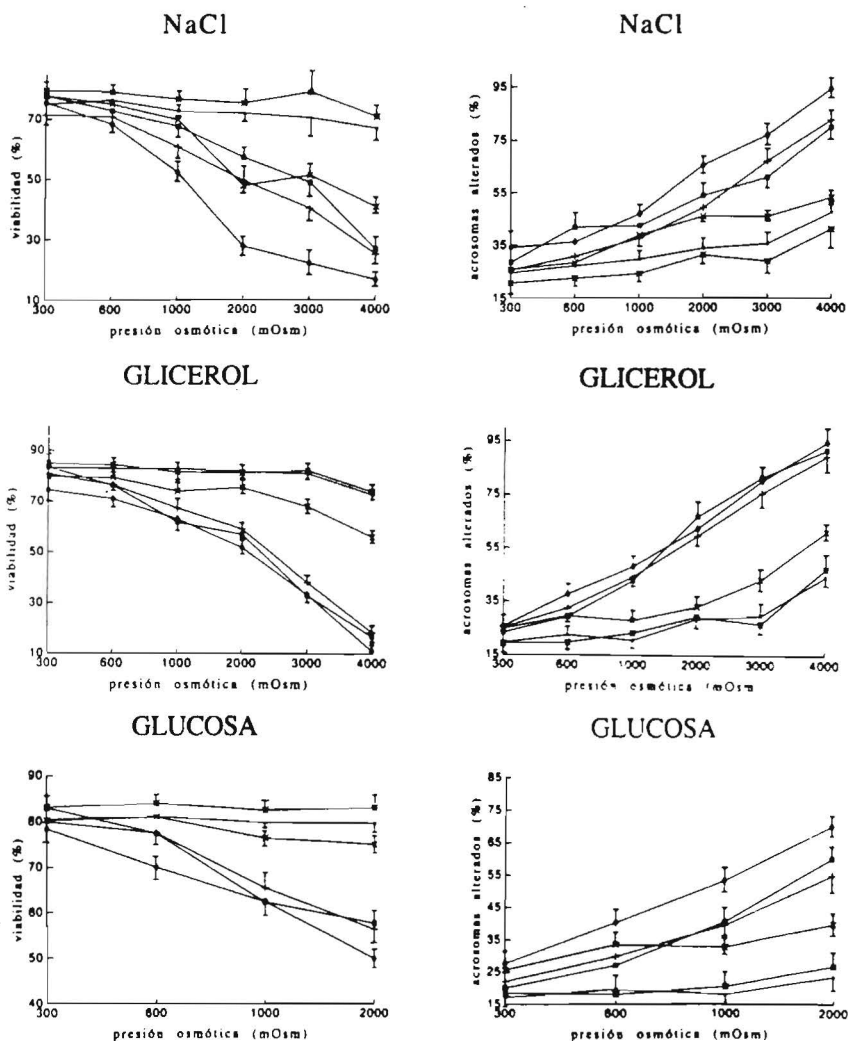
Los resultados obtenidos muestran que los espermatozoides de verraco son más sensibles a los cambios bruscos de  $\pi$  que a los altos niveles de  $\pi$  en sí mismos. Estos datos son similares a los observados para espermatozoides humanos (1,4) y de morueco (2,4). Es interesante destacar que los resultados fueron, al menos parcialmente, dependientes de la temperatura, con una mayor sensibilidad a 37 °C. Sin embargo, la composición de las soluciones no modificó la sensibilidad de los espermatozoides a los cambio de  $\pi$ . Estos datos indican que los mecanismos de resistencia al "stress osmótico" parecen ser independientes de la composición del medio extracelular, y más dependientes de la temperatura, lo cual se tendría de tener en cuenta en el momento de practicar la congelación del semen de verraco.

#### **Bibliografía**

- 1.- GAO, D.Y., ASHWORTH, E., WATSON, P.F., KLEINHANS, F.W., MAZUR, P. y CRITSER, J.K. (1993) *Biol. Rep.* 49, 112-123.
- 2.- HOLT, W.V. y NORTH, R.D. (1994) *Biol. Rep.* 51, 414-424.
- 3.- DIDION, B.A., DOBRINSKY, J.R., GILES, J.R. y GRAVES, C.N.

(1989) *Gamete Res.* 22, 51-57.

4.- CURRY, M.R. y WATSON, P.F. (1994) *Cryobiology* 31, 39-46.



Las Figuras muestran la viabilidad y los acrosomas alterados de espermatozoides incubados durante 5 minutos a 4 °C (\*), 16 °C (•) y 37 °C (X) en los medios con las  $\pi$  indicadas, así como los espermatozoides incubados en los mismos medios y seguidamente puestos repentinamente en un medio isosmótico a 4 (+), 16 (■) y 37 °C (♦). Los encabezamientos indican la sustancia de la cual están compuestos los diversos medios hiperosmóticos. Los resultados expresan medias  $\pm$  S.E. de 7 experimentos diferentes.