

Artículo corto:

**EFFECTO DE LA OSMOLARIDAD SOBRE LA RESPUESTA ENDOSMÓTICA
EN ESPERMATOZOIDEOS DE EPIDIDIMO Y EYACULADOS DE ALPACA**
(*Vicugna pacos*)

**Osmolarity effect of endosmotic response on epidymis sperm and ejaculated
alpaca (*Vicugna pacos*)**

J.I. Pacheco-Curie¹, R. Mamani-Cato², F. Franco¹, O. Zea¹, D. Pezo¹, V. Vélez¹

¹Estación IVTTA Maranganí, Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM - Lima Perú.

²CIP Quimsachata, Instituto Nacional de Investigación Agraria-ILLPA. Puno Perú.

E-mail: (Joel Pacheco) mvz_joelpc@hotmail.com

RESUMEN

ABSTRACT

El test hipoosmótico permite evaluar la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide. Con el objetivo de evaluar el efecto de la osmolaridad de la solución y la presencia o no de plasma seminal sobre la respuesta al test hipoosmótico en espermatozoides de alpaca se utilizaron 6 machos adultos. Se colectaron espermatozoides mediante vagina artificial y desviación de los conductos deferentes, se utilizaron 3 soluciones hipoosmóticas calculadas a 50, 100 y 150 mOsmoly se incubó 0.1 mL de muestra en 0.9 mL de cada solución hipoosmótica a 37°C por 30 minutos evaluando 200 espermatozoides para determinar respuesta endosmótica. La vitalidad se determinó mediante tinción de eosina-nigrosina. Se encontró diferencia estadística entre las tres soluciones hipoosmóticas ($p \leq 0.05$), siendo la mejor respuesta endosmótica de espermatozoides con plasma seminal incubados en solución hipoosmótica de 50 mOsmol.

Palabras Clave: *alpaca, espermatozoides, endósmosis, plasma seminal*

The hypoosmotic swelling test is a test that assesses the integrity of the sperm plasmatic membrane; with the objective of evaluating the effect of osmolarity of the solution and in the presence or not of seminal plasma, adult males were used; semen was collected using the technique of artificial vagina and deviation of the vas deferens. Three hypoosmotic solutions of 50, 100 and 150 mOsmol were used, was incubated in 0.1 mL of 0.9 mL sample of hypoosmotic solution to 37° C for 30 minutes 200 sperm were evaluated to determine the endosmótica response, vitality was determined by eosin-nigrosin stain. Statistical difference was found between the three hypoosmotic solutions ($p \leq 0.05$), with the best endosmótica response sperm with seminal plasma incubated in hypoosmotic solution of 50 mOsmol.

Key words: *alpaca, spermatozoa, endosmosis, seminal plasma*



INTRODUCCIÓN

El test hipoosmótico (HOST) es una prueba funcional, donde los espermatozoides vivos son sometidos a incubación en solución hipoosmótica, los espermatozoides con membrana funcional permiten el ingreso de agua por osmosis, lo cual se evidenciará por hinchamiento y enrollamiento de la cola (endosmosis) (Jeyendran *et al.*, 1984). El proceso de fecundación no puede ser atribuido solamente al número de espermatozoides vivos, mótils y normales depositados dentro de la hembra sino especialmente a su funcionalidad (Petrunkina *et al.*, 2007).

Estudios previos indican que espermatozoides de alpaca colectados del epidídimo sometidos al test hipoosmótico a una osmolaridad de 100 mOsmol, obtienen una respuesta de 89.08 % (Rodríguez, 2009), evidenciando una mayor respuesta en espermatozoides libres de plasma seminal. En semen de alpaca obtenido por electroeyaculación el rango de porcentaje de endosmosis utilizando solución hipoosmótica de 100 mOsmol es de 20 a 62 % (Giuliano *et al.*, 2010), mientras que en semen entero de alpacas utilizando solución hipoosmótica de 150 mOsmol el porcentaje obtenido fue de 23.5 % (Pacheco *et al.*, 2011). En eyaculados de llamas obtenidas por vagina artificial, y sometidos a dicha prueba, se han observado porcentajes de endosmosis del 40 % utilizando una solución de 100 mOsmol (Giuliano *et al.*, 2007). Otros reportes en llamas indican 33.48 % en semen colectado por electroeyaculación y 30.15 % en semen colectado por vagina artificial usando solución hipoosmótica ajustada a 50 mOsmol (Giuliano *et al.*, 2008).

El objetivo fue evaluar la respuesta endosmótica de espermatozoides de epidídimo y eyaculados de alpaca sometidos a tres diferentes soluciones hipoosmóticas para establecer la mejor solución hipoosmótica en espermatozoides de alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se utilizaron 6 alpacas macho, de los cuales tres machos donaron semen entero mediante la técnica de vagina artificial (Bravo *et al.*, 1997), y de tres machos se obtuvieron espermatozoides epididimarios libres de plasma seminal, obtenidos por la técnica de desviación de los conductos deferentes (Pérez *et al.*, 2004). Se colectaron 15 muestras en cada grupo (5 muestras por macho) y cada muestra se dividió en tres alícuotas para la incubación con las soluciones hipoosmóticas.

Las muestras de espermatozoides fueron divididas en dos grupos por tratamiento:

- Grupo 1 (n=3, r=5) *espermatozoides libres de plasma seminal.*
- Grupo 2 (n=3, r=5) *semen entero.*

Las muestras fueron incubadas en 3 soluciones hipoosmóticas calculadas para 50, 100 y 150m Osmol preparadas de la siguiente manera: Solución 1 (citrato de sodio 0.268 gr+ fructosa 0.675 gr + 2H₂O c.s.p. 100 mL), solución 2 (citrato de sodio 0.490 gr + fructosa 0.900 gr + 2H₂O c.s.p. 100 mL) y solución 3 (citrato de sodio 1.475 gr + fructosa 2.746 gr + 2H₂O c.s.p. 100 mL). Se mezcló 0.1 mL de semen + 0.9 mL de solución hipoosmótica, incubado por 30 minutos en baño maría a 37°C y se detuvo la reacción con 0.1 mL de

formaldehído al 4%. Se realizó el conteo de espermatozoides positivos a endosmosis, contando no menos de 200 espermatozoides por muestra utilizando microscopio óptico con objetivo de inmersión (100 X), así mismo se evaluó la vitalidad mediante tinción supravital de eosina (0.7%) - nigrosina (1 %).

El diseño estadístico correspondió a un DCA, y se realizó la prueba de Duncan, se usó un valor de probabilidad del 95%, los datos fueron analizados utilizando el programa SAS V9.0 (SAS, 2002).

RESULTADOS

Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 1.

Tabla 1. Promedios de endósmosis espermática y vitalidad según solución hipoosmótica y presencia o no de plasma seminal en alpaca.

semen	solución hipoosmótica	Promedio ± DS	vitalidad
Sin plasma seminal	50 mOsmol	53.37±8.22 b	
	100 mOsmol	38.96±7.82 b	69.12a
	150 mOsmol	21.51±6.06 c	
Con plasma seminal	50 mOsmol	73.87±8.15 a	
	100 mOsmol	55.80±8.91 b	67.20a
	150 mOsmol	18.73±6.10 c	

P<0.05. Letras diferentes indican diferencia estadística.

DISCUSIÓN

La respuesta endosmótica fue diferente entre los 3 grupos, estando probablemente relacionado con la osmolaridad de la solución, ya que la osmolaridad aproximada de las soluciones 1, 2 y 3, corresponderían a 50, 100 y 150 mOsm., de manera similar a lo descrito en otras especies como cabras (Fonseca *et al.*, 2005), conejos (Amorim *et al.*, 2009) y equinos (Neild *et al.*, 1999). En ambos grupos la solución 3 produjo baja respuesta endosmótica, incrementándose cuando se utiliza la solución 2, sin embargo al utilizar solución 1, la respuesta se incrementa solo en los espermatozoides con plasma seminal, estos resultados son concordantes con lo descrito en semen de alpacas por Giuliano *et al.*, (2010) quien encontró 62% de endosmosis utilizando solución hipoosmótica de 100 mOsmol, lo cual es superior al 23.5 % descrito por Pacheco *et al.*, (2011) quienes usaron 150 mOsmol; pero es diferente a lo descrito en semen de llamas donde se describen porcentajes similares (rango de 30 a 40 %) cuando se utilizan soluciones de 50 y 100 mOsmol (Giuliano *et al.*, 2008).

El mejor resultado obtenido fue de 73.87 % utilizando solución hipoosmótica de 50 mOsmol en espermatozoides con plasma seminal (semen entero obtenido por vagina artificial).

De la misma forma como en otras especies, los espermatozoides de alpaca demuestran patrones de enrollamiento de cola después de ser sometidos a incubación con soluciones hipoosmóticas (Fonseca *et al.*, 2005). En un trabajo anterior se describe que espermatozoides del epidídimo libres de plasma seminal presentan alta respuesta endosmótica (Rodríguez, 2009), con respecto a espermatozoides de eyaculados completos con presencia de plasma seminal, sin embargo se encontró que la respuesta



endosmótica es mayor para espermatozoides con presencia de plasma seminal en muestras con la misma vitalidad que los espermatozoides sin plasma seminal solo cuando se incubaba en una solución de 50 mOsmol ($P < 0.05$) y no existe diferencia estadística cuando se incubaba en soluciones de 100 y 150 mOsmol, por lo que se asume que el plasma seminal no tendría ningún efecto negativo sobre la respuesta endosmótica y la actividad de la membrana espermática.

CONCLUSIÓN

La osmolaridad de la solución produce diferencias estadísticas en la respuesta endosmótica entre las tres soluciones, siendo la mejor respuesta endosmótica en espermatozoides con plasma seminal e incubados en solución hipoosmótica calculada a 50 mOsmol.

REFERENCIAS

- Amorin EAM, Torres CAA, Graham JK, Amorin LS, Santos LVL. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2009; 111: 338-343.
- Fonseca JF, Torres AA, Maffili VV, et al.. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim. Reprod.* 2005; 2: 139-144.
- Giuliano S, Ferrari MR, Spirito SE, et al.. Avances en la implementación del test hipoosmótico (Hos test) en espermatozoides de llama. *Avances de investigación.* 2007. Fac.Cs.Vet. UBA. Buenos Aires. Argentina.
- Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 104: 359-369.
- Giuliano S, Casaretto C, Morán M, Huanca W. Electroeyaculación y Características Seminales de Alpaca. *III Simposium Internacional de Investigaciones sobre Camélidos.* Organizado por DESCO Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo Septiembre 9 y 10, 2010. Arequipa, Perú.
- Jeyendran RS, Van Der Vem HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld JL. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationships to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 1984; 70: 219-228.
- Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51(4): 721-727.
- Pacheco JI, Deza HW, Mamani RH, Quispe YE. Evaluación de la respuesta del test hipoosmótico en espermatozoides frescos de alpaca. Resúmenes del *XXXIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de producción Animal.* APPA Trujillo-Perú 2011.
- Pérez GM, Zevallos JP, Quintano J. Sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente en tres dilutores. *Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias.* Tacna Perú 2004.
- Petrunkina AM, Waberski D, Gunzel-ApelAR, Topfer-Petersen. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 2007; 134: 3-17.
- Rodríguez C. Efecto del plasma seminal sobre la sobrevivencia de espermatozoides criopreservados de Alpaca "*Vicugna pacos*". *Tesis de Maestría. Unidad de Post Grado. Facultad de Medicina Veterinaria.* Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú 2009..

