

## TEST HIPOOSMÓTICO EN ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE OVINOS (*OVIS ARIES*)

Hypoosmotic swelling test of ram (*Ovis aries*) epididymal spermatozoa

J.H Vásquez C.<sup>1,2</sup>; E.A. Florentini<sup>1</sup>, L.A. Camargo<sup>1</sup> & M. Valdivia C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal, Instituto de Investigaciones en Ciencias Biológicas "Antonio Raimondi" (ICBAR), Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM

<sup>2</sup> jvcbioreprod@gmail.com (Vásquez J.H)

### INTRODUCCIÓN

El test hipoosmótico (TH) es una prueba de rutina utilizada para evaluar la integridad de la membrana plasmática y es de gran importancia en tecnologías de reproducción asistida (WHO, 2010). El TH es aplicado rutinariamente en distintas especies a las condiciones que inicialmente fue estandarizado y aplicado en humanos (Jeyendran et al. 1984). Debido a las diversas arquitecturas y perfiles bioquímicos y fisiológicos de las membranas plasmáticas de los espermatozoides de mamíferos, es necesario estandarizar las condiciones para cada especie y determinar la solución hipoosmótica que el efecto esperado en estas células. El presente trabajo tiene por objetivo establecer la solución hipoosmótica (SH) idónea para evaluar los espermatozoides epididimarios de ovinos y además evaluar la tolerancia del espermatozoide de ovinos durante su exposición a diferentes tiempos de exposición a la solución.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se prepararon SHs a concentraciones de: 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 275 y 300 mOsm, a partir de una solución madre de 300mOsm, preparada disolviendo 14.7 g de citrato de sodio y 27.02 g de fructosa en 1L de agua bidestilada. Se colectaron epidídimos de ovinos, de individuos mayores a 3 años, y con aproximadamente 35 kg de peso; se obtuvieron espermatozoides de 15 individuos y se incubaron en las SHs correspondientes por 15, 30, 45 y 60 minutos a 37°C. Transcurrido el respectivo tiempo, se evaluaron al menos 150 células en 5 campos considerando que ha reaccionado al test cuando una célula mostraba un enrollamiento en el flagelo. Los datos fueron expresados en porcentaje en relación a las células reactivas. Para el análisis estadístico, se empleó la prueba de dos vías de Friedman para estimar el efecto del tiempo y una prueba de rangos de Wilcoxon para comparar las respuestas fisiológicas de los espermatozoides entre diferentes SHs.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los diferentes tiempos de incubación no tuvieron un efecto significativo ( $P > 0.05$ ). Las soluciones hipoosmóticas de 75mOsm Y 100mOsm causaron consistentemente el mayor porcentaje de células tolerantes que reaccionaron al ambiente hipoosmótico ( $P < 0.05$ ). Es de notar que por lo general estas células, a diferencia de los espermatozoides eyaculados, están expuestas a un medio hipertónico (Christova, James et al. 2002), requiriendo por esta razón, probablemente soluciones con mayor hipotonicidad, para maximizar la reactividad (doble de la cola espermática) a comparación de las SH empleadas en espermatozoides eyaculados de ovinos, que conservan las condiciones originalmente descritas para humanos (150mOsm, Jeyendran et al. 1984). Este ensayo permite, contribuir a la madurez de la técnica, en la estimación de la capacidad fertilizante en ovinos. Nuestro laboratorio intenta, tanto fisiológicamente como molecularmente, seguir contribuyendo con la optimización de otros ensayos evaluativos en esta especie.

## **CONCLUSIONES**

Concluimos que una SH entre 75 mOsm y 100 mOsm durante 15 minutos de incubación son condiciones adecuadas para la evaluación de la integridad de MP en espermatozoides epididimarios de ovinos mediante el TH.

## **REFERENCIAS**

- Christova, Y., P. S. James, et al. (2002). "Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure, and knockout of the c-ros gene." *J Androl* 23(3): 384-392.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D., 1984 Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70, 219–228.
- World Health Organization, 2010. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen FIFTH EDITION. Cambridge University Press, Cambridge.