

EFFECTE DELS DIFERENTS XOCS OSMÒTICS EN LES EJACULACIONS DE MASCLES REPRODUCTORS PORCINS (*Sus domesticus*)

Marc Yeste,* M. Dolors Briz, Elisabeth Pinart, Sílvia Sancho, Núria Garcia-Gil, Elena Badia, Anna Pruneda, Eva Bussalleu, Isabel Casas, Sergi Bonet

Bioteconologia de la Reproducció Porcina. Departament de Biologia. Universitat de Girona.
Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. Tel. 972418366. Fax 972418150. Adreça electrònica: marc.yeste@udg.es.

Resum

Els espermatozoides es veuen sotmesos a lleugers canvis del seu entorn durant el seu trànsit. L'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar l'efecte dels canvis osmòtics en la integritat espermàtica. Les dosis seminals procedents de mascles Piétrain Sans foren sotmeses a dos tractaments hipotònics i hipertònics diferents: hipotònic suau (275 mOsm), hipotònic fort (225 mOsm), hipertònic suau (325 mOsm) i hipertònic fort (375 mOsm). La qualitat espermàtica fou avaluada mitjançant les anàlisis de la vitalitat, la motilitat i la morfologia espermàtiques, abans i després d'aplicar els tractaments. Els tractaments hipotònic i hipertònic forts produeixen una disminució significativa de la vitalitat i la motilitat espermàtiques, però no n'afecten la morfologia. En canvi, els tractaments hipertònic i hipotònic suaus no afecten cap dels tres paràmetres esmentats. En definitiva, l'espermatozoide de porcí és molt sensible als canvis hipotònics i hipertònics severos, mentre que lleugers canvis en la pressió osmòtica no l'afecten tant.

Paraules clau Pressió osmòtica, qualitat espermàtica, tractament hipertònic i hipotònic.

Abstract

Effects of osmotic shocks on boar sperm quality Spermatozoa are submitted to soft environment changes during its transit. The aim of this study was to determine the effects of different osmotic changes on sperm integrity. Sperm samples from healthy Pietrain boars were submitted to two different hypotonic and hypertonic treatments: soft hypotonic (275 mOsm), strong hypotonic (225 mOsm), soft hypertonic (325 mOsm) and strong hypertonic (375 mOsm). Sperm quality was evaluated in terms of sperm vitality, sperm motility and sperm morphology, before and after applying the treatments. Both strong hypotonic and hypertonic treatments produced a significant decrease of sperm motility and sperm vitality, but did not affect the sperm morphology. In contrast, soft hypertonic and hypotonic treatments did not affect significantly sperm vitality, sperm motility and sperm morphology. In conclusion, boar spermatozoa are very sensitive to strong hypertonic and hypotonic changes, whereas small changes in osmotic pressure do not affect the sperm function.

Key words Osmotic pressure, sperm integrity, hypotonic and hypertonic treatments.

INTRODUCCIÓ

La demanda de dosis seminals de mascles reproductors porcins de la raça Piétrain, refrigerades i destinades a la inseminació artificial, ha augmentat moltíssim en els darrers anys. Tanmateix, tant els centres d'inseminació artificial com els de selecció han constatat que la qualitat espermàtica de les ejaculacions d'aquests mascles no es manté constant al llarg de la seva vida reproductiva útil. Les explotacions porcines observen,

sovint, que semen fresc amb una qualitat espermàtica relativament bona es comporta de manera molt diferent en refrigeració, i disminueix sobtadament la seva qualitat seminal.

Encara que la criopreservació de semen porcí no sigui una pràctica habitual, atesa la reduïda qualitat del semen descongelat (si es compara amb el rendiment en d'altres espècies), es coneix que determinats mascles presenten una aptitud major per a congelar el seu semen que d'altres. Durant el protocol de congela-

ció i descongelació del semen de porc es produeixen un conjunt de canvis en la pressió osmòtica del medi en el qual es troben els espermatozoides. Encara que inicialment la qualitat del semen ejaculat sigui bona, la seva resposta pot ésser variable quan se sotmet al procés de criopreservació.

De manera tradicional, la valoració de la qualitat espermàtica s'ha dut a terme mitjançant l'anàlisi de la seva vitalitat, motilitat i morfologia espermàtiques. Tanmateix, poques vegades s'examina acuradament la qualitat d'aquest semen moments abans de la inseminació. En general, les anàlisis sobre la qualitat del semen no tenen en compte que aquest, des que és ejaculat i fins que entra en contacte amb l'oòcit, es troba amb un conjunt de diversos canvis osmòtics com a conseqüència de les variacions de tonicitat dels medis que l'espermatozoide haurà de travessar. Per això, la qualitat espermàtica s'hauria d'avaluar no solament quan el semen és fresc sinó també després d'aplicar xocs osmòtics com als quals es veurà sotmès posteriorment.

MATERIAL I MÈTODES

Les mostres seminals per a dur a terme aquest estudi s'han obtingut a partir de cent sis mascles reproductors porcins de la raça Piétrain, sexualment madurs, sans, confinats en naus climatitzades amb control de temperatura i humitat relativa, i sotmesos a un règim alimentari controlat i ajustat.

Les mostres s'obtingueren mitjançant la muntada sobre maniquí i masturbació manual. Del semen ejaculat se'n recollí només la fracció espermàtica (rica en espermatozoides), i es van descartar les fraccions pre i postespermàtiques, en un termo a 37° C en el qual s'havia col·locat prèviament una gasa per a eliminar la fracció de mucina.

Les fraccions espermàtiques van ésser diluïdes amb diluent CIDOSA (Tecnovit) en una relació 1:5 i es van distribuir en dosis seminals de 80 ml cadascuna, que foren transportades a 15° C en un recipient termoïllat des de les granges fins al laboratori de la Universitat de Girona.

La vitalitat, la morfologia i la motilitat espermàtiques de les mostres es van valorar abans i després d'aplicar els tractaments i es realitzà una classificació de la qualitat seminal atenent als criteris establerts per Bonet *et al.* (1995) i Pinart *et al.* (1999).

Per a valorar la motilitat i morfologia espermàtiques s'emprà el microscopi òptic de contrast de fases amb els objectius de deu i vint augments, respectivament, conjuntament amb el programa CASA (SCA production 2002, Microptic SL). La vitalitat espermàtica, la integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma es

van avaluar mitjançant la tècnica de la triple tinció amb fluorocroms.

Atenent als resultats obtinguts per a aquests paràmetres, s'establiren quatre grups diferents: el primer grup de quaranta mascles amb una bona qualitat espermàtica, perquè els tres paràmetres eren superiors als valors l·lindar; el segon grup de vint mascles amb una bona motilitat espermàtica però amb una morfologia i una vitalitat espermàtiques inferiors als l·lindars respectius; el tercer grup de tretze mascles amb bones motilitat i morfologia espermàtiques però mala vitalitat espermàtica i el quart grup de trenta-tres mascles amb bona motilitat i vitalitat espermàtiques però amb un percentatge d'espermatozoides madurs del 80 %.

Es van definir dos tipus de xocs osmòtics, hipotònics i hipertònics, segons si s'augmentava o es disminuïa l'osmolaritat del diluent inicial (300 mOsm), i també dues variants d'aquests: suau i forta (225 i 275 mOsm i 325 i 375 mOsm, respectivament). El tractament hipotònic s'aconseguí a partir de l'addició d'aigua miliQ i els hipertònics mitjançant clorur de sodi, glucosa, fructosa i sorbitol,

Els resultats foren analitzats mitjançant el test estadístic de l'anàlisi de la variància (ANOVA) d'un factor (el tractament) i amb una variable dependent (els diferents paràmetres que defineixen la qualitat seminal). Prèviament a l'aplicació del test de l'ANOVA les variables foren transformades amb l'arcsinus ($y = \arcsin \sqrt{x}$). El tractament de les dades es va dur a terme mitjançant el paquet estadístic SPSS per a Windows, versió 12.0 amb un nivell de significació (α) de 0,05.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els espermatozoides es troben, durant el seu trànsit, tant en l'aparell reproductor masculí com en el femení, amb lleugeres variacions de la pressió osmòtica dels fluids que han de travessar. Per això, en aquest treball es van assajar xocs osmòtics, tant hipotònics com hipertònics, amb un rang de variació en la tonicitat bastant petita (de 225 a 375 mOsm), perquè el que es pretenia era no solament conèixer la resistència de les cèl·lules espermàtiques enfront d'aquest estrès osmòtic, sinó també mimetitzar *in vitro* les condicions fisiològiques.

S'ha establert, també, un altre nivell de comparació analitzant la resposta que oferien ejaculacions de qualitats espermàtiques diferents (quatre tipus) respecte els tractaments aplicats.

En experiments precedents, efectuats tant en porcí com en altres espècies de mamífers domèstics, també s'havien aplicat xocs osmòtics per tal d'observar quina

Taula 1 Resultats obtinguts al grup de mascles amb bona qualitat espermàtica.

Tractament (% esp. mòbils)	Motilitat espermàtica	Morfologia espermàtica (% esp. madurs)	Vitalitat espermàtica (% esp. vius amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes)
Control 300 mOsm	89,5 ± 5,24 %	89,7 % ± 4,44 %	79,8 ± 9,06 %
Hipotònic 225 mOsm	70,1 ± 6,35 %*	85,1 % ± 5,23 %	63,6 ± 10,48 %*
Hipotònic 275 mOsm	79,3 ± 5,86 %	86,0 % ± 4,99 %	78,4 ± 9,75 %
Hipertònic NaCl 325 mOsm	85,0 ± 5,53 %	83,4 % ± 5,55 %	75,8 ± 9,06 %
Hipertònic NaCl 375 mOsm	71,2 ± 6,06 %*	84,2 % ± 4,87 %	65,5 ± 10,25 %*
Hipertònic glucosa 325 mOsm	86,2 ± 5,54 %	88,3 % ± 5,01 %	77,3 ± 8,87 %
Hipertònic glucosa 375 mOsm	72,4 ± 5,78 %*	86,2 % ± 4,58 %	67,9 ± 10,13 %*
Hipertònic fructosa 325 mOsm	87,8 ± 5,17 %	89,1 % ± 4,05 %	79,0 ± 8,91 %
Hipertònic fructosa 375 mOsm	79,6 ± 6,10 %	88,5 % ± 4,82 %	73,3 ± 9,23 %
Hipertònic sorbitol 325 mOsm	87,0 ± 5,31 %	88,0 % ± 4,63 %	78,7 ± 8,56 %
Hipertònic sorbitol 375 mOsm	73,7 ± 5,95 %*	87,9 % ± 4,77 %	72,8 ± 9,92 %

era la resistència dels espermatozoides a l'estrès osmòtic, encara que les variacions de tonicitat dels medis assajats eren molt superiors als d'aquest treball (Fraser *et al.*, 2001).

En tots aquests experiments es va observar que quan l'osmolaritat del medi es troba al voltant dels 300 mOsm, és a dir, quan la naturalesa del medi era isotònica, les mostres seminals presentaven una major qualitat que en condicions anisotòniques. Així, quan l'osmolaritat del medi s'allunya considerablement de 300 mOsm (especialment quan és inferior a 270 o superior a 360 mOsm) els espermatozoides esdevenen immòbils i en alguns casos es veuen malmeses les seves membranes plasmàtiques (Pommer *et al.*, 2002; Guthrie *et al.*, 2002).

Els experiments amb medis hipotònics són més abundants que els experiments amb medis hipertònics, atesa la importància d'algunes proves que analitzen la resistència dels espermatozoides enfront a importants disminucions en l'osmolaritat dels medis en condicions fisiològiques (inferiors a 200 mOsm). Hi ha, doncs, una gran varietat de treballs que estudien els tests HOS i ORT (Pérez-Llano *et al.*, 2003).

Tanmateix, el nombre de treballs que tracten els xocs hipertònics és significativament inferior. Els soluts que s'afegeixen amb més freqüència són monosacàrids, com la glucosa, la fructosa i el sorbitol (Rigau *et al.*, 2001; Agca *et al.*, 2002; Koshimoto *et al.*, 2002), el glicerol i l'etilenglicol, especialment per a observar la resistència osmòtica dels espermatozoides que després hauran d'ésser sotmesos a congelació/descongelació (Gilmore *et al.*, 1998, Guthrie *et al.*, 2002), el clorur de sodi (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997) i el citrat de sodi (Fraser *et al.*, 2001).

La motilitat espermàtica és un dels paràmetres que més s'utilitza per a valorar la qualitat seminal de les

ejaculacions de porcí, especialment en els centres de producció de les dosis seminals, on una anàlisi de la motilitat espermàtica és fonamental per a descartar o no una ejaculació. En aquest estudi s'ha constatat que en aplicar xocs osmòtics de diferent naturalesa, la freqüència d'espermatozoides mòbils disminueix. A més, sucres presents en el plasma seminal com la glucosa i la fructosa (Williams *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2002) són els que menys danys produeixen als espermatozoides.

Un altre aspecte observat és que el semen fresc de major qualitat és el més sensible als canvis osmòtics, perquè en la resta de casos la qualitat de l'ejaculació és d'antuvi inferior en els controls, de manera que les diferències observades respecte als tractaments són menors. Aquestes dades permeten constatar que el semen de porcí és molt làbil i que, per tant, petites variacions en el plasma seminal o en el diluent n'afecten, freqüentment, la qualitat.

En toros s'ha comprovat que les variacions de tonicitat del medi, tant si aquestes són superiors com inferiors a les condicions isotòniques, afecten la qualitat espermàtica de la seva ejaculació, encara que de manera lleugerament inferior a l'observada per a l'ejaculació de porcí. Això és conseqüència de la major sensibilitat de l'ejaculació de porcí a petites variacions del medi respecte d'altres mamífers domèstics. Així doncs, l'estratègia reproductora de l'espècie porcina ha estat augmentar preferentment el volum de l'ejaculació i mantenir una baixa qualitat espermàtica.

També, el fet que les diferències entre els tipus de xocs siguin més aviat baixes, de manera que el que s'observa quan s'apliquen xocs hipotònics i hipertònics són danys similars, indica que és l'efecte de la variació de la pressió osmòtica, més que el solut afegit per aconseguir-la, el que més afecta els espermatozoides. Aquestes consideracions estan d'acord amb altres

treballs precedents que s'han ocupat d'aquesta qüestió tant en porcí (Zeng *et al.*, 2002), como en cavalls (Pommer *et al.*, 2002), en toros (Guthrie *et al.*, 2002), en ratolins (Willoughby *et al.*, 1996), en gossos (Rigau *et al.*, 2001) i en humans (Rossato *et al.*, 2002).

En aquest i en altres experiments s'ha observat que els danys produïts per l'estrès osmòtic s'esdevenen durant el canvi inicial de les condicions de tonicitat de l'ambient en el qual es troben els espermatozoides, des del medi isotònic al medi hipotònic o hipertònic (Gilmore *et al.*, 1996). Això explicaria perquè sempre que es produeix un xoc hipotònic o hipertònic la motilitat espermàtica i, en alguns casos, la vitalitat, es veuen reduïdes, perquè quan s'aplica un retorn al medi isotònic no s'observa cap millora de la motilitat, car els danys ja han estat produïts i són irreversibles. Si es comparen els efectes que els xocs osmòtics produeixen en la motilitat espermàtica respecte els efectes produïts sobre la morfologia i la vitalitat espermàtiques i sobre la integritat de les membranes plasmàtiques, pot comprovar-se el que, prèviament, havien assenyalat alguns autors (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 2001; Rigau *et al.*, 2001), i és que tant en porcí com en d'altres mamífers la motilitat és el paràmetre que resulta més afectat quan es produeixen canvis en la naturalesa osmòtica del medi. Això demostra que en condicions anisotòniques les membranes plasmàtiques són més resistents a l'estrès osmòtic que els mecanismes responsables de la motilitat espermàtica (Fraser *et al.*, 2001).

Els danys en la membrana plasmàtica es deuen al fet que les condicions hipotòniques i hipertòniques provoquen una reducció ràpida dels nivells intracel·lulars d'ATP, que tenen un paper clau en el manteniment de la motilitat espermàtica.

En relació als resultats obtinguts en l'anàlisi de la morfologia espermàtica, no s'ha observat que els xocs osmòtics produeixin cap efecte ni en la freqüència d'espermatozoides madurs ni en la d'immadurs o aberrants. D'aquesta manera es comproven alguns dels aspectes que ja s'havien observat en estudis anteriors, com, per exemple, que les variacions d'osmolaritat no milloren les freqüències d'espermatozoides amb malformacions primàries ni secundàries (Pinart *et al.*, 1999).

La vitalitat espermàtica, la integritat de la beina mitocondrial i l'estabilitat de l'acrosoma també es veuen afectades per aquests canvis, encara que en menor grau que la motilitat i en major grau que la morfologia dels espermatozoides. Els canvis més importants quant a la freqüència d'espermatozoides vius i amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes i, per tant, els efectes dels tractaments aplicats sobre algun d'aquests paràmetres s'han observat, com succeïa en l'anàlisi

de la motilitat espermàtica, en aquelles ejaculacions que tenen una qualitat seminal millor. En relació a les diferències entre tractaments, els xocs hipotònic i hipertònic amb clorur de sodi són els que més afecten la freqüència d'espermatozoides vius amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes. La disminució d'aquesta freqüència es deu als danys causats sobre el nucli i sobre l'acrosoma. L'acrosoma és l'òrganul més afectat pels canvis en l'osmolaritat del medi. La resistència de l'acrosoma enfront dels canvis de tonicitat és diferent en cadascuna de les espècies de mamífers estudiada, i és inferior en el porcí que en el toro o el boc (Petrunkina *et al.*, 2001). La composició de la membrana acrosòmica, tant per la seva riquesa en fosfolípids insaturats, com en relació amb la petita quantitat de canals de potassi activats pels canvis d'osmolaritat que presenta, és una de les principals raons de la poca resistència de l'espermatozoide de porcí enfront de variacions de tonicitat i de la seva labilitat.

La sensibilitat dels espermatozoides a l'estrès osmòtic representa un criteri addicional per a la selecció de les mostres seminals. En els programes genètics de selecció que duen a terme els centres especialitzats, es tenen en compte tant els caràcters fenotípics del mascle com la capacitat de transmetre'ls a la seva descendència, és a dir, la qualitat del seu semen.

Actualment, la qualitat seminal de l'ejaculació de porcí es valora mitjançant les proves clàssiques de vitalitat, motilitat i morfologia espermàtiques. A partir dels resultats obtinguts, es pot concloure que la resposta als xocs osmòtics en funció de la qualitat espermàtica és un paràmetre que s'ha d'assajar conjuntament amb la resta, a fi de conèixer la labilitat del semen i seleccionar aquell que, en ésser menys làbil, és més apte per a refrigerar i congelar.

Per això, aquests estudis poden aplicar-se a la criopreservació del semen porcí, perquè és necessari conèixer l'estabilitat i la resposta dels espermatozoides a l'estrès osmòtic, tant en relació amb la motilitat com amb la integritat de la membrana plasmàtica per a, d'una banda, optimitzar el protocol de congelació/descongelació i, per l'altra, descriure les característiques del semen que millor congela/descongela. Aquest darrer aspecte és considerablement important en l'espècie porcina, perquè el seu semen presenta un alt grau de variació quant a la criosupervivència espermàtica i una dificultat afegida a l'hora de conservar els espermatozoides mitjançant protocols de congelació, atesa la composició de la seva membrana plasmàtica, molt rica en fosfolípids insaturats i amb tendència a la difusibilitat de les proteïnes de la bicapa lipídica.

BIBLIOGRAFIA

- AGCA, Y.; GILMORE, J.; BYERS, M.; WOODS, E. J.; LIU, J.; CRITSER, J. K. (2002). «Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars». *Biology of Reproduction*, 67:1493-1501.
- BALL, B. A.; VO, A. (2001). «Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential». *Journal of Andrology*, 22:1061-1069.
- BONET, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; CAMPS, R.; FRADERA, A.; CASADEVALL, M. (1995). «Light microscopy characterization of sperm morphology». *Microscopy and Analysis*, 9:29-31.
- CAIZA DE LA CUEVA, F. I.; RIGAU, T.; PUJOL, R.; PIEDRAFITA, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (1997). «Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival». *Animal Reproduction Science*, 48:301-315.
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A.; ROCA, J. (2004). «Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival». *Journal of Andrology*, 25:389-396.
- CHRISTOVA, Y.; JAMES, P. S.; MACKIE, A.; COOPER, T. G.; JONES, R. (2004). «Molecular diffusion in sperm plasma membranes during epididymal maturation». *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216:41-46.
- FRASER, L.; GORSZCZARUK, K.; STRZEZEK, J. (2001). «Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality». *Reproduction in Domestic Animals*, 36:325-329.
- GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. (2002). «Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa». *Biology of Reproduction*, 67:1811-1816.
- KOSHIMOTO, C.; MAZUR, P. (2002). «The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm». *Cryobiology*, 45:80-90.
- PINART, E.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; BONET, S.; GARCÍA-GIL, N. (1999). «Characterization of the semen quality of postpubertal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side». *Animal Reproduction Science*, 55:269-278.
- POMMER, A. C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S. A. (2002). «The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function». *Theriogenology*, 58:1373-1384.
- RIGAU, T.; FARRE, M.; BALLESTER, J.; MOGAS, T.; PENNA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (2001). «Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates». *Theriogenology*, 56:801-815.
- WILLOUGHBY, C. E.; MAZUR, P.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. (1996). «Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa».
- ZENG, W. X.; SHIMADA, M.; ISOBE, N.; TERADA, T. (2001). «Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality». *Theriogenology*, 56:447-458.