

Choque hipoosmótico en espermatozoides de víbora de cascabel

Pablo R. Simón-Salvador¹, Agustín Álvarez Trillo² y Gisela Fuentes-Mascorro¹

Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal¹, Herpetario Reptilium²

Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca¹, Zoológico de Zacango²

Oaxaca de Juárez, Oax.¹, Calimaya, Méx.²; México

[rogeliosimonsalvador, lirauabjo] @gmail.com

Abstract— Currently there are few studies in collection and evaluation sperm snakes, studies using a *Crotalus durissus* as a model have focused on parameters such as sperm motility and ultrastructure, such reproductive parameters are considered a helpful tool for generating gene banks as an alternative conservation for endangered snakes. Because this is important do study in other semen parameters therefore, the objective of this study was to evaluate the response of sperm 3 species of rattlesnake's solutions to different osmolarity. It is noteworthy that the sperm of viper to differ mammalian morphology to present a different response to exposure to different osmolarity.

Keyword— *Crotalus*, Osmolarity, Semen, Collection.

Resumen— Actualmente son pocos los estudios realizados en colecta y evaluación de espermatozoides de serpientes, los estudios utilizando a *Crotalus durissus* como modelo, se han enfocado en parámetros como movilidad espermática y ultraestructura, dichos parámetros reproductivos son considerados una herramienta útil para la generación de bancos de germoplasma como una alternativa de conservación para serpientes en peligro de extinción. Lo que hace importante el realizar estudios en demás parámetros seminales, por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue el evaluar la respuesta de los espermatozoides de 3 especies de serpientes de cascabel a soluciones de diferente osmolaridad. Cabe mencionar que el espermatozoide de víbora al diferir en morfología al de mamífero presentó una respuesta diferente a la exposición a diferente osmolaridad.

Palabras claves— *Crotalus*. Osmolaridad, Semen, Colecta.

I. INTRODUCCIÓN

México cuenta con la mayor diversidad de serpientes cascabel, de las aproximadamente 42 especies descritas, el 92% se encuentra en el país siendo endémicas 25 de estas [1]. Cabe mencionar que las especies endémicas del país se encuentran en una categoría de riesgo en base a la normatividad mexicana vigente (SEMARNAT, 2010), *C. transversus*, endémica se encuentra en “en peligro de extinción”; 7 también endémicas, en la categoría de “amenazada”, y 16 en “sujeta a protección especial”. De acuerdo con el sistema de categorización de la IUCN (2010), *C. catalinensis* está considerada como “critically endangered”, *C. pusillus* como “endangered” y *C. stejnegeri* como “vulnerable”, todas éstas, endémicas de México. Este grupo es particularmente vulnerable debido a su sensibilidad a cambios en el ambiente, además de ser un grupo con mala reputación al poseer un veneno inminentemente peligroso, el encuentro con humanos la mayoría de las ocasiones deriva en la muerte del ejemplar. Como resultado de esto, sus poblaciones han mermado. La fragmentación del hábitat ha causado el aislamiento de pequeñas poblaciones presentado endogamia y los problemas de concepción o apareamiento han restringido la reproducción en cautiverio [2].

Las técnicas de reproducción asistida son una herramienta para cambiar este escenario y promover programas de reproducción para la conservación de estas especies [3]. Por lo tanto, el Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal, con la finalidad de poder utilizar el semen de serpientes de cascabel en técnicas de reproducción asistida empleó diluyentes como método de conservación [4], sin

embargo al realizar la evaluación de los espermatozoides, estos presentaban un alto porcentaje de células con choque hipo osmótico, por lo cual el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de los espermatozoides de serpiente de cascabel en soluciones de diferente osmolaridad.

II. MATERIALES Y METODOS

Para este estudio se utilizaron 9 machos de serpientes pertenecientes al género *Crotalus*, utilizando las especies *Crotalus atrox*, *Crotalus culminatus* y *Crotalus molossus*, 3 individuos de cada especie, estos ejemplares se encuentran confinados en el herpetario *Reptilium*, el cual siempre se encuentra a una temperatura de 26°C. Los ejemplares fueron manejados utilizando los protocolos de seguridad adecuados para la integridad del ejemplar tanto como para la de las personas responsables del manejo. La contención física de los ejemplares se llevó a cabo con la técnica de entubamiento que consiste en introducir el tercio anterior de su cuerpo en un tubo de plástico transparente y se sujetó al ejemplar en la unión del tubo con el cuerpo, monitoreando constantemente los movimientos y reacciones del ejemplar, posteriormente el semen se extrajo empleando la técnica no invasiva descrita por Fuentes-Mascorro [4]. Debido a la cantidad de muestra los eyaculados fueron recogidos por impronta con ayuda de un portaobjetos a 28°C.

A. Soluciones de trabajo:

En el laboratorio se prepararon soluciones de fructosa a 200, 300, 400 y 500 mOsm/L, en agua tridestilada.

B. Tratamiento de la muestra:

Se colocaron 200µL de cada solución en tubos eppendorf, que se mantuvieron a 28°C, que corresponden a la temperatura de la cloaca de las hembras del herpetario. Se tomaron 50 µL, de la solución, se colocaron en la cercanía del eyaculado, sobre el portaobjetos dónde se improntó este, se mezclaron con ayuda de la punta de la micropipeta, se colocó la mezcla en la micropipeta y se trasladó a el tubo eppendorf, dónde originalmente se colocaron los 200 µL, de cada ejemplar se tomaron 5 improntas. Las muestras se mantuvieron en un baño seco en incubación a 28°C.

C. Evaluación Seminal:

Se procedió a realizar la evaluación de espermatozoides vivos-muertos y morfología a los 30 minutos, 12 horas y 48 horas posteriores de su inmersión en cada solución, para observar la respuesta de los espermatozoides, realizando frotis colocando 5 µL de la tinción supravital eosina-nigrosina [5] y 5 µL de la muestra a evaluar. La evaluación de estrés osmótico se evaluó en base a los criterios descritos por Jeyedran [6], los frotis se observaron en un microscopio fotónico a 400 aumentos, se contaron 200 espermatozoides en al menos cinco campos, agrupándose de acuerdo con el tipo de hinchamiento que presentaron, calculándose el porcentaje para cada grupo.

D. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa SAS[®] Statistical Analysis System (Versión 9.0). Se realizó un análisis factorial 3x4x4 con $p < 0.05$, donde los factores fueron la especie, osmolaridad y

tiempo. Posteriormente la comparación de medias se realizó con prueba de Duncan. Los resultados son expresados en promedio \pm Error estándar (EE).

III. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

A. *Morfología del los espermatozoides de Crotalus y choque osmótico:*

La morfología clásica de los espermatozoides de las 3 especies de serpiente de cascabel analizadas concuerda con lo descrito por Jamieson [7]. Al observar en el microscopio fotónico claramente una cabeza filiforme, un acrosoma en forma de una punta delgada, con una gran pieza media y una pieza terminal corta (Figura 1)

Partiendo de la morfología clásica de un espermatozoide de ofidio, se observaron cambios sumamente notorios, mostrados por los espermatozoides al ser sometidos a soluciones de diferentes osmolaridad, el más evidente se da en la cabeza, sin afectar el acrosoma (Figura 2). Los espermatozoides al sufrir estrés osmótico, pierden la característica forma alargada de la cabeza para tornarse redonda, a diferencia de lo que muestran los espermatozoides de los mamíferos, que presentan un enrollamiento del flagelo [8].

Los métodos de conservación del semen, deben garantizar la viabilidad de la célula, durante un tiempo determinado, por lo que los protocolos de conservación son especie-específicos debido a la estructura única del espermatozoide en cada especie, como forma volumen, tamaño de organelos y composición [9].

Cabe destacar que la capacidad de los espermatozoides a hincharse cuando se somete a condiciones hipoosmóticas indica una membrana funcional, es decir, la capacidad de la membrana para permitir el paso del agua con el fin de establecer un equilibrio entre el medio intracelular y extracelular. Dicha integridad es de vital importancia debido a que está relacionada con su metabolismo, capacitación, reacción acrosomal y el evento de unión del espermatozoide con la superficie del ovocito. Por esta razón, la determinación de la función de la membrana puede ser indicador indirecto de capacidad de fertilización de los espermatozoides. Los estudios de ultraestructura del espermatozoide del género *Crotalus*, muestran la presencia de una membrana multilaminar en la cabeza del espermatozoide [10, 11]. Esta estructura, puede ser la responsable de permitir el incremento de volumen de la región nuclear en la cabeza de los espermatozoides, que se observa en las diferentes osmolaridades estudiadas, a diferencia de la respuesta de enrollamiento del flagelo, que presentan los espermatozoides de mamífero [12], la región acrosomal, se mantiene sin presentar cambios, en todas las osmolaridades evaluadas, esta respuesta sugiere una regionalización altamente especializada de la membrana celular del espermatozoide tal como propone Fuentes-Mascorro [13].



Fig. 1. Espermatozoide de *Crotalus spp* con morfología clásica. 1000 X.



Fig. 2. Espermatozoide de *Crotalus atrox* con estrés osmótico en la región de la cabeza. 1000X, la barra indica 10 μ m.

Tras aplicar el análisis ANOVA con un $\alpha=0.05$, se observó que no existe diferencias significativas entre las 3 especies de serpientes utilizadas para este experimento a diferencia de lo que mostro el factor concentración (Tabla I). Por lo tanto se realizó un estudio *a posteriori* de Duncan.

Tabla I. Análisis factorial de la variable porcentaje de espermatozoides con estrés osmótico.

Factor	Grados de libertad	Valor de F	Pr>F
Especie	2	5.36	0.1510
Osmolaridad	3	41.17	0.0004
Tiempo	3	0.34	0.0001

Tabla II. Efecto del factor especie sobre el porcentaje de espermatozoide con estrés osmótico.

Especie	Media ± EE
<i>Crotalus molossus</i> (n=48)	63.65±7.34 ^a
<i>Crotalus atrox</i> (n=48)	58.90±7.58 ^a
<i>Crotalus culminatus</i> (n=48)	46.94±7.62 ^a

Tabla III. Efecto del factor Osmolaridad sobre el porcentaje de espermatozoide con estrés osmótico.

Osmolaridad	Media ± EE
200 mOsm/L	74.09±7.37 ^a
300 mOsm/L	28.80±7.77 ^b
400 mOsm/L	60.98±8.31 ^a
500 mOsm/L	65.68±8.02 ^a

Tabla IV. Efecto del factor Tiempo sobre el porcentaje de espermatozoide con estrés osmótico

Tiempo	Media ± EE
0 hrs	44.82±8.57 ^a
0.5 hrs	38.44±8.57 ^a
12 hrs	66.75±8.05 ^a
48 Hrs.	70.64±8.40 ^a

El análisis muestra que el factor especie no influye en el porcentaje de espermatozoide con estrés osmótico, tal como podemos observar en la (tabla II), al no existir diferencias significativas entre las tres especies de serpientes utilizadas para este estudio.

En el caso de la osmolaridad podemos observar que la solución a 200 mOsm/L fue la que presentó una mayor cantidad de espermatozoides con estrés osmótico, y la solución que presento una menor cantidad de espermatozoides con estrés osmótico fue la solución a 300 mOsm/L y que además tal como lo muestra la prueba de Duncan, esta solución presento una diferencia significativa frente a las demás soluciones las soluciones a 400 y 500 mOsm/L presentaron un alto porcentaje de estrés osmótico incluso más que con la solución a 200 mOsm/L.

El factor tiempo no muestra diferencias significativas sobre la variable porcentaje de espermatozoides con estrés osmótico en los 4 tiempos evaluados, pero como podemos observar del tiempo 0 a los 30 minutos existió una disminución de espermatozoides con estrés osmótico y posteriormente a las 12 y 24 horas volvía a elevarse.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados muestran que la respuesta de los espermatozoide de las 3 especies de cascabel evaluadas al estrés osmótico, sin presentar diferencias entre especies. Existe la probabilidad de que las demás especies del género *Crotalus*, respondan de igual manera a la osmolaridad. Los resultados en 200,

400 y 500 mOsm/L, indican que el espermatozoide de *Crotalus*, responde con incremento de volumen tanto a ambientes externos hipo osmóticos, como hiper osmóticos, por lo que la función de la membrana multilaminar reportada en los estudios de ultraestructura, probablemente sea una adaptación, para responder poder atravesar ambientes con diferentes osmolaridades, sin perder la integridad membranal.

REFERENCIAS

- [1] D. Paredes-G, M. Ramírez-B, y A. Martínez-M, “Distribución y representatividad de las especies del género *Crotalus* en las áreas naturales protegidas de México”. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, vol. 70, pp. 34-53, 2011.
- [2] R. Zacariotti, M. Guimarães, T. Jensen, and B. Durrant, “117 Cryopreservation of snake semen: are we frozen in time?” *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 24 (1), pp. 171-171, 2011.
- [3] R. Zacariotti, y M. Guimarães, “Aplicações da biotecnologia na reprodução de serpentes” *Rev. Bras. Reprod. Anim*, vol.34 (2), pp.98-104, 2010.
- [4] G. Fuente-Mascorro, A. Álvarez, M. Bautista, D.Giron, Y L. Ramirez, .“Diluciones como metodo de conservación de semen del genero *Crotalus*”. *Actas iberoamericanas de Conservación Animal*, vol. 4, pp. 303-304, 2014.
- [5] R. Jeyedran, R. Van der Ven, H. Perez-pelaez, M. Crabo, B. and Zaneveld. “Development of an assay to ass de functional integrity of the human sperm mebrane and its relationship to the other semene characteristics” *Journals of Reproduction Fertility*, vol. 70, pp. 219-228, 1984.
- [6] R. Campbell, M. Dott, and D. Glover, “Nigrosin eosin as a stain for differentiatin live and dead spermatozoa” *The Journal of agriculture science*, vol 48. pp. 301, 1956.
- [7] M. Jamieson, “Spermatozoal phylogeny of vertebrata” In: *The male gamete*, C. Gangno, Eds. Basic Science to clnical applications, 1999, pp 303-331.
- [8] R. Santymire, P. Marinari, J. Kreeger, D. Wilt, and J. Howard, “Sperm viability in the black-footed ferret (*Mustela nigripies*) is influenced by seminal and medium osmolality” *Cryobiology*, vol. 53, pp. 37-50, . 2006.
- [9] H. Meryman, “The exceeding of a minimum tolerancecell volume in hypertonic suspensions as a acause of freezing injury” In: *The frozen cell*, O. E. W Wolsteinhoime, M. Connor, Eds. Ciba Foundation Symposium, London, 1970, pp. 51-64.
- [10] K. Gribbins, and J. Rheubert, “The ophidian testis, spermatogenesis, and mature spermatozoa”; In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*. D. Aldridge y M. Sever, Eds. Science Publishers, 2011, pp. 183-264.
- [11] L. Cunha, L. Tavares-B, and S. Bao, “Ultrastructural description and cytochemical study of the spermatozoa of *Crotalus durissus terrificus* (Squamata, Serpentes).” *Micron*, vol. 39, pp. 915-925, 2008.
- [12] R. Jeyedran, R. Van der Ven, H. Perez-pelaez, M. Crabo, B. and Zaneveld. “Development of an assay to ass de functional integrity of the human sperm mebrane and its relationship to the other semene characteristics” *Journals of Reproduction Fertility*, vol. 70, pp. 219-228, 1984.
- [13] G. Fuentes-M, P.Simón-S, H.Tamayo, A. Alvarez “Osmolaridad del espermatozoide de los reptiles” *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, vol. 6, pp. 218-225, 2015. http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf