

CULTIU DE CÈL·LULES EPITELIALS EPIDIDIMÀRIES DE *Sus domesticus*

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

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia. Universitat de Girona.
Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. Tel. 972 418 366. Fax 972 418 150. Adreça electrònica: judit.bassols@udg.es.

Resum

Aquest treball descriu un protocol per al cultiu de les cèl·lules epitelials del caput, corpus i cauda epididimaris de *Sus domesticus*. Uns trenta fragments de cadascuna de les regions de l'epidídim, obtinguts mitjançant dissecció i digestió enzimàtica amb collagenasa, es van cultivar en plaques de cultiu de vint-i-quatre pous amb medi RPMI-1640 suplementat a 37° C en 5 % de CO₂ i humitat del 100 %. Al cap de 12-16 dies es va formar una monocapa confluent que contenia un 80 % de cèl·lules epitelials, que es van mantenir *in vitro* durant seixanta dies. Observacions al microscopi electrònic de transmissió van indicar que les cèl·lules epitelials del caput, corpus i cauda epididimaris en cultiu mantenen les característiques pròpies de l'epiteli epididimari *in vivo*. Aquest sistema pot ser molt útil per a l'estudi dels mecanismes de maduració espermàtica *in vitro*.

Paraules clau *Sus domesticus*, cèl·lules epitelials, epidídim, cultiu *in vitro*.

Abstract

Culture of epididymal epithelial cells of *Sus domesticus* This work describes a protocol to culture epididymal epithelial cells from the caput, corpus and cauda regions of *Sus domesticus*. About 30 epididymal epithelial fragments from each epididymal region obtained after dissection and enzymatic digestion with collagenase were cultured in 24-well culture plates with supplemented RPMI-1640 medium at 37° C, 5% CO₂ in air and 100% humidity. A confluent monolayer containing 80% of epithelial cells was obtained after 12-16 days in culture and maintained *in vitro* for more than 60 days. Electron microscopy observations indicated that caput, corpus and cauda epididymal cells in culture retain some fundamental features that characterize the epididymal epithelium in the intact organ. This system might be a valuable tool for studying the mechanism of sperm maturation *in vitro*.

Key words *Sus domesticus*, epithelial cells, epididymis, *in vitro* culture.

INTRODUCCIÓ

La maduració espermàtica és el procés que té lloc durant el trànsit dels espermatozoides a través de les diferents regions de l'epidídim. Durant aquest procés els espermatozoides experimenten canvis per a adquirir la motilitat i la capacitat fecundant. Aquests canvis són el resultat de la interacció dels espermatozoides amb factors, principalment proteïnes, presents al fluid epididimari. El fluid epididimari resulta de les secrecions del testicle però és modificat per l'activitat secretora i absorbida de l'epiteli de l'epidídim (Hinton i Palladino, 1995). Diferents autors han purificat i identificat moltes proteïnes secretades per l'epiteli epididimari de diverses espècies a partir del fluid epididimari (Gatti

et al., 2004), però el seu paper i importància en la maduració espermàtica són encara poc coneguts. Aquests mètodes fan difícil l'estudi de les activitats de l'epiteli epididimari sense interferència de factors testiculars i de teixits no epitelials. Una solució a aquest problema és l'ús de cultius primaris de cèl·lules epitelials epididimàries. Aquests mètodes proporcionen un model simple per a l'anàlisi de les activitats metabòliques de les cèl·lules epitelials epididimàries i la seva regulació, perquè es pot estudiar la síntesi i secreció de components específics en condicions definides. Fins al moment s'han desenvolupat sistemes de cultiu de cèl·lules epitelials epididimàries en humans (Akhondi *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 1990) i en diverses espècies animals com rosegadors (Byers *et al.*, 1992;

Carballada i Saling, 1997), boví (Gagnon *et al.*, 2000) i marsupials (Lin *et al.*, 2000), però no en porcí.

MATERIAL I MÈTODES

Animals

Masclles reproductors porcins de la raça Pietrain sans i sexualment madurs (8-12 mesos d'edat).

Obtenció i cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries

Al laboratori, sota condicions estèrils, es van identificar les tres regions epididimàries (caput, corpus i cauda) i es va agafar una mostra de cada regió, que es va tallar en fragments de 2-5 mm de longitud. Després de tres rentats amb PBS suplementat amb antibiòtics els fragments es van incubar amb 300 U ml⁻¹ de collagenasa (de tipus VII) en PBS suplementat amb antibiòtics a 37° C. Els fragments que procedien de les regions del caput i corpus es van incubar durant dues hores i els fragments que procedien de la regió caudal durant tres hores. La digestió enzimàtica es va aturar afegint medi de cultiu, format per medi RPMI 1640 suplementat amb 10% de sèrum fetal, 1 mM de sodi-piruvat, 100 nM d'insulina, 200 nM d'hidrocortisona, 200 nM de testosterona, 1 µM de dihidrotestosterona, 5 µg ml⁻¹ d'apotransferrina, 1 µg ml⁻¹ d'acetat retinol, 25 mM d'Hepes i 50 U ml⁻¹ de penicil·lina-estreptomicina. Després de tres rentats amb medi de cultiu, es va procedir a la segona digestió amb 150 U ml⁻¹ de collagenasa en medi de cultiu a 37° C. Els fragments de caput es van incubar durant una hora, els de corpus dues hores i els de cauda tres hores. Igual que abans, la digestió enzimàtica es va aturar afegint medi de cultiu i les mostres es van rentar tres vegades amb medi de cultiu per a treure les restes d'enzim, de teixit i d'espermatozoides. Uns trenta fragments de cada una de les regions es van transferir a plaques de cultiu de vint-i-quatre pous amb 1 ml de medi de cultiu per pou, i es van incubar a 37° C en 5% de CO₂ i humitat del 100%. El dia sisè de cultiu es van treure, per aspiració, els fragments que no s'havien adherit a les plaques de cultiu. El medi de cultiu es canviava cada quaranta-vuit hores

Microscòpia òptica

L'establiment i l'evolució dels cultius es va avaluar a partir de l'observació diària al microscopi de contrast de fases invertit. Els dies 4, 7, 10, 14, 21, 28 i 35 de cultiu es va estimar el percentatge de confluència

dels cultius i les característiques morfològiques de les cèl·lules. També es va determinar la viabilitat i la concentració cel·lular mitjançant la tinció amb blau tripà 0,1% i recompte en cambra de Neubauer.

Immunofluorescència

Un cop per setmana, des de l'inici del cultiu i fins al dia 49, les cèl·lules en cultiu es van marcar amb un anticòs anticitoceratines i es van observar al microscopi òptic de fluorescència per tal de determinar la presència de cèl·lules epitelials. Els percentatges de cèl·lules epitelials es van determinar per immunofluorescència indirecta de les cèl·lules en suspensió i lectura mitjançant el citòmetre de flux.

Microscòpia electrònica

Els dies 7, 14, 21, 28 i 35 de cultiu es va estudiar la ultraestructura de les cèl·lules en cultiu a partir de l'observació al microscopi electrònic de transmissió.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Després de la digestió amb collagenasa es va obtenir una suspensió formada per fragments del conducte epididimari. Els fragments de cauda epididimari van necessitar períodes més llargs de digestió amb collagenasa que els fragments de caput i corpus, possiblement a causa de la major quantitat de teixit connectiu que envolta el conducte, tal i com passa en humans (Akhondi *et al.*, 1997). Al cap de 36-72 hores els fragments de les tres regions van començar a adherir-se a la base de la placa de cultiu i, un cop ben adherits, les cèl·lules epitelials de l'interior dels fragments van migrar cap a l'exterior i es van adherir a la placa de cultiu, amb la formació de colònies de cèl·lules polygonals i aplanades. El nombre de cèl·lules de les colònies va augmentar durant els següents dies i es va formar una monocapa contínua de cèl·lules densament empaquetades que van adquirir una confluència del 80-90% després de 12-16 dies de cultiu (vegeu la figura 1a). Aquestes monocapes es van mantenir en cultiu durant dos mesos.

Les cèl·lules de la monocapa presentaven una morfologia semblant en els cultius de les tres regions de l'epidídim. Eren cèl·lules polygonals, amb un nucli central i ovalat, que contenien diversos nuclèols i un citoplasma ple de grànuls. Al citoplasma d'aquestes cèl·lules també s'observaven unes vesícules que augmentaven en nombre i mida a partir de 10-12 dies de cultiu. Després de trenta-cinc dies, la morfologia de les cèl·lules en cultiu de les tres regions de l'epidídim

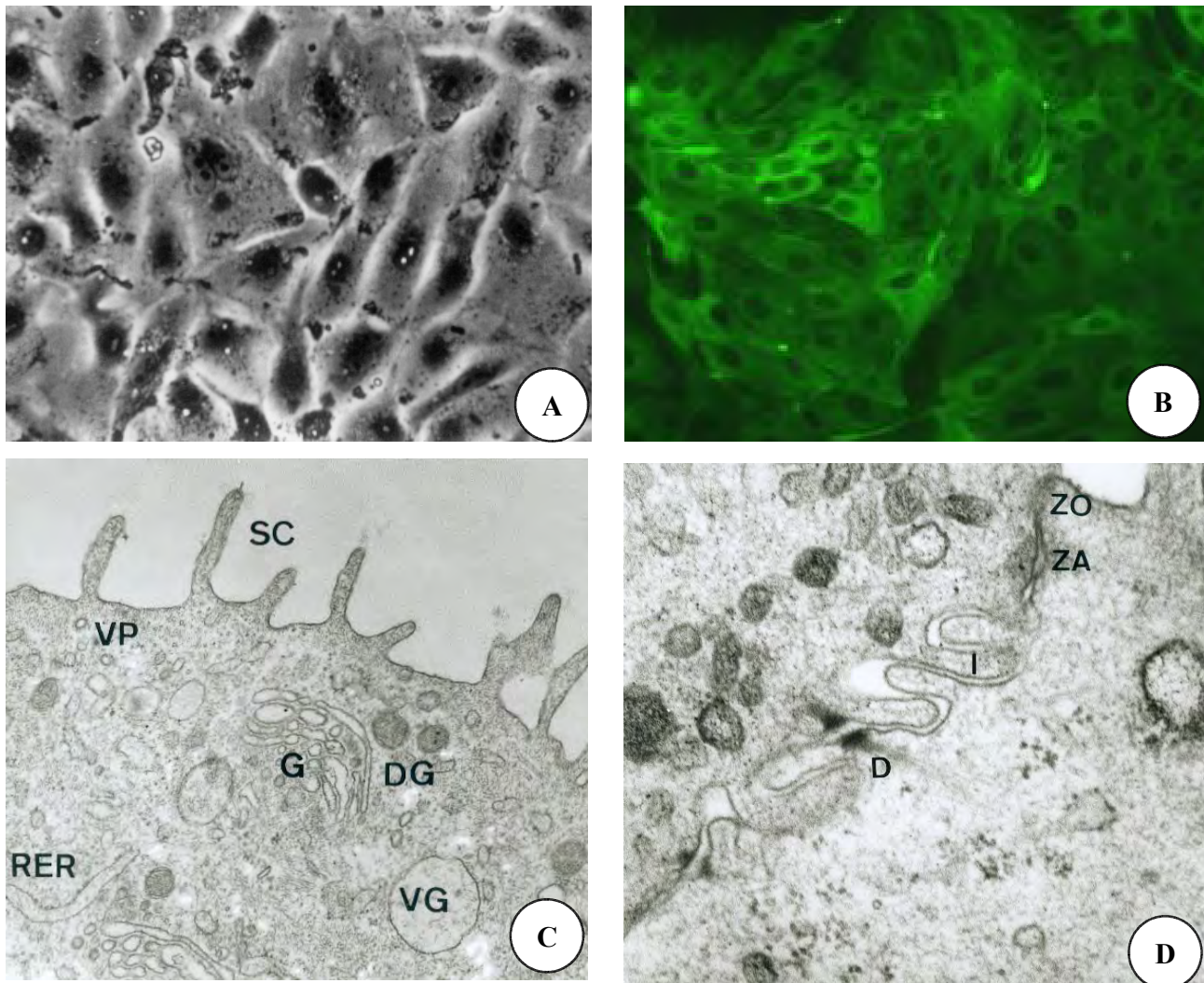


Figura 1 Aspecte de les cèl·lules epitelials del caput epididimari el dia 14 de cultiu al MO de contrast de fases (A), al MO de fluorescència després del marcatge amb anticòs anticitoceratina (B), i al ME de transmissió (D i E). Estereocilis (SC), vesícules petites (VP), vesícules de mida gran (VG), reticle endoplasmàtic rugós (RER), aparell de Golgi (G), mitocondris (M), ribosomes (R), interdigitacions (I) i complexos d'unió de tipus *zonula occludens* (ZO), *zonula adherens* (ZA) i desmosomes (D).

era similar a la morfologia que presentaven a l'inici, però les cèl·lules de la monocapa estaven més empaquetades i contenien una gran quantitat de vesícules al seu citoplasma.

L'ús de fragments epididimaris provoca la presència de cèl·lules epitelials i no epitelials als cultius. El percentatge de cèl·lules epitelials es va mesurar amb un anticòs contra citoceratines, un marcador específic de cèl·lules epitelials (Olson *et al.*, 1982). Tots els cultius epididimaris presentaven un 80 % de cèl·lules citoceratina positives durant quaranta-nou dies en cultiu (vegeu la figura 1b). Aquests resultats demostren que la majoria de cèl·lules de la monocapa eren epitelials i que no hi havia sobrecreixement de cèl·lules no epitelials.

Està ben establert que les monocapes de cèl·lules

epitelials epididimàries es formen per migració de les cèl·lules epitelials dels fragments epididimaris adherits. Alguns autors han demostrat que les monocapes també proliferen a causa de la divisió mitòtica d'aquestes cèl·lules (Carballada i Saling, 1997; Pera *et al.*, 1996). En el nostre estudi, la tinció simultània de les cèl·lules en cultiu amb l'anticòs anticitoceratines i amb bisbenzimidida va permetre observar nombroses figures mitòtiques en cèl·lules citoceratina positives en els cultius de les tres regions de l'epidídim, i això indica que les cèl·lules epitelials es dividien en cultiu. No es van observar nuclis en divisió a les cèl·lules citoceratina negatives. Igualment, l'activitat proliferant de les cèl·lules epitelials epididimàries en cultiu també es va comprovar mitjançant l'establiment de cultius secundaris de cèl·lules epitelials de caput, corpus i cauda

epididimaris. Es va observar que en tres dies es duplica el nombre de cèl·lules epitelials presents a cada pou.

Mitjançant el microscopi electrònic de transmissió s'observà que les característiques ultraestructurals de les cèl·lules epitelials de les tres regions de l'epidídim en cultiu eren similars i mantenien molts trets propis de les cèl·lules epitelials *in vivo* (vegeu les figures 1c i d). La superfície apical d'aquestes cèl·lules estava en contacte amb el medi de cultiu i es caracteritzava per la presència d'estereocilis, els quals són més curts que *in vivo*, tal i com s'ha descrit en altres espècies (Byers *et al.*, 1985). Les cèl·lules epitelials dels cultius es mantenen unides mitjançant interdigatacions i complexos d'unió situats a les seves membranes basals i laterals. El citoplasma contenia un reticle endoplasmàtic rugós abundant, un aparell de Golgi desenvolupat, nombrosos mitocondris allargats, ribosomes lliures sovint agrupats en forma de polisomes, fibres de filaments intermedis, cossos residuals i cossos multivesiculats. A partir del dia 21 de cultiu també s'observaven gotes lipídiques i grànuls densos. Les cèl·lules dels cultius de les tres regions també contenien vesícules de mida i electrodensitat variable. Es podien distingir unes vesícules petites i electrolúcides, que es localitzaven bàsicament al citoplasma apical, a la base dels estereocilis, i vesícules grans d'electrodensitat dèbil, que tenien una posició bàsicament perinuclear. La presència de ribosomes, reticle endoplasmàtic rugós, aparell de Golgi i vesícules perinuclears indica que les cèl·lules epitelials epididimàries mantenen la seva capacitat de sintetitzar i secretar proteïnes.

Aquest estudi demostra que les cèl·lules epitelials epididimàries es poden mantenir *in vitro* formant una monocapa durant dos mesos sense perdre les característiques morfològiques de les cèl·lules natives, i suggereix que també expressen les característiques funcionals. Els treballs que duem a terme en aquests moments al laboratori del nostre grup de recerca estan orientats a estudiar l'activitat secretora de les cèl·lules epitelials epididimàries en cultiu, per a verificar si mantenen les característiques fisiològiques. Si així fos, aquest sistema de cultiu seria de gran utilitat per a l'estudi de la maduració espermàtica. Els futurs experiments del grup de recerca estan enfocats a l'estudi de la maduració dels espermatozoides. Aquests estudis

es duren a terme mitjançant el cocultiu d'espermatozoides immadurs amb cultius de cèl·lules epitelials epididimàries de les diferents regions de l'epidídim.

BIBLIOGRAFIA

- AKHONDI, M. A.; CHAPPLE, C.; MOORE, H. D. (1997). «Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures». *Hum. Reprod.*, 12:514-522.
- BYERS, S. W.; CITI, S.; ANDERSON, J. M.; HOXTER, B. (1992). «Polarized functions and permeability properties of rat epididymal epithelial cells *in vitro*». *J. Reprod. Fertil.*, 95:385-396.
- BYERS, S. W.; DJAKIEW, D.; DYM, M. (1985). «Structural features of rat epididymal epithelial cells *in vitro*». *J. Reprod. Fertil.*, 75:401-411.
- CARBALLADA, R.; SALING, P. M. (1997). «Regulation of mouse epididymal epithelium *in vitro* by androgens, temperature and fibroblasts». *J. Reprod. Fertil.*, 110:171-181.
- COOPER, T. G.; YEUNG, C. H.; MEYER, R.; SCHULZE, H. (1990). «Maintenance of human epididymal epithelial cell function in monolayer culture». *J. Reprod. Fertil.*, 90:81-91.
- GAGNON, A.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. (2000). «Epididymal epithelial cells cultured *in vitro* prolong the motility of bovine sperm». *J. Androl.*, 21:842-907.
- GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. L. (2004). «Post-testicular sperm environment and fertility». *Anim. Reprod. Sci.*, 82:321-339.
- HINTON, B. T.; PALLADINO, M. A. (1995). «Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment». *Microsc. Res. Tech.*, 30:67-81.
- LIN, M.; ZHANG, X.; MURDOCH, R.; AITKEN, R. J. (2000). «*In vitro* culture of brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) epididymal epithelium and induction of epididymal sperm maturation in co-culture». *J. Reprod. Fertil.*, 119:1-14.
- OLSON, G. E.; JONAS-DAVIES, J.; HOFFMAN, L. H.; ORGEBIN-CRIST, M. C. (1982). «Structural characterization of isolated rat epididymal epithelial cells». *Gamete Res.*, 6:161-178.
- PERA, I.; IVELL, R.; KIRCHHOFF, C. (1996). «Body temperature (37° C) specifically down-regulates the messenger ribonucleic acid for the major sperm surface antigen CD52 in epididymal cell culture». *Endocrinology*, 137:4451-4459.