

## **MILLORA DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE DOSIS SEMINALS DE MASCLES ASTENOTERATONECROSPÈRMICS PER FILTRACIÓ EN COLUMNES DE SEPHADEX NEUTRE**

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

Biotecnologia de la Reproducció Porcina. Departament de Biologia. Facultat de Ciències. Universitat de Girona. Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. Tel. 972 418 366. Fax 972 418 050. Adreça electrònica: [eva.bussalleu@udg.es](mailto:eva.bussalleu@udg.es).

### *Resum*

L'objectiu d'aquest estudi és millorar la qualitat espermàtica de mascles reproductors subfèrtils mitjançant la filtració de dosis seminals en columnes de Sephadex neutre. Amb aquest propòsit es van usar columnes de Sephadex G-25 Medium, G-50 Fine, G-50 Medium i Sephadex G-75 de 10+0,5 cm d'alçada. 10 ml de la fracció rica de l'ejaculació de cinquanta-vuit mascles Piétrain astenoteratonecrospermics diluïda 1:6 es van eluir a una velocitat d'1 ml/20 segons amb 40 ml de diluent BTS. La qualitat espermàtica es va analitzar abans i després de la filtració. Per a l'anàlisi de la motilitat i morfologia espermàtiques es va emprar el programa informàtic SCA®2002 Producció. La vitalitat es va analitzar a partir del triple marcatge amb fluorocroms per a la valoració conjunta de l'estat del nucli, l'acrosoma i la beina mitocondrial. Els resultats obtinguts mostren que la filtració de dosis seminals en columnes de Sephadex neutre augmenta la freqüència d'espermatozoides madurs i d'espermatozoides viables amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes, i disminueix la freqüència d'espermatozoides aberrants. De tota manera, la filtració en columnes de Sephadex neutre disminueix encara més la freqüència d'espermatozoides mòbils dels mascles porcons astenoteratonecrospermics.

**Paraules clau** Dosi seminal, astenoteratonecrospermia, Sephadex neutre, espermatozoide, *Sus domesticus*.

### *Abstract*

#### **Improvement of sperm quality of astenotheratonecrospermic boars by filtration in neuter Sephadex columns.**

The aim of this study is to enhance the semen quality of subfertile boars by filtering their seminal doses in neuter Sephadex columns. For this purpose we used columns of Sephadex G-25 Medium, Sephadex G-50 Fine, Sephadex G-50 Medium and Sephadex G-75 of 10+0.5 cm of length. 10 ml of the sperm-cell rich fraction of 58 astenotheratonecrospermic Pietrain boars diluted at 1:6 were eluted with 40 ml of diluent BTS at a flow rate of 1 ml/20 seconds. Sperm quality was analysed before and after filtration. Sperm morphology and sperm motility were assessed using the computer analyzer SCA®2002 Producció. Sperm vitality was analyzed by fluorescence multistaining in order to evaluate the integrity of the nucleus, the acrosome and the mitochondrial sheath simultaneously. The results obtained showed that the filtration of sperm doses in columns of neuter Sephadex increases the frequency of mature spermatozoa and viable spermatozoa with intact acrosoma and mitochondrial sheath. The sperm filtration results in a decrease of the frequency of aberrant spermatozoa, but it also decreases the frequency of motile spermatozoa. In conclusion, neuter Sephadex columns improve the sperm morphology and sperm vitality of astenotheratonecrospermic boars, but do not enhance the low sperm motility.

**Key words** Seminal dose, astenotheratonecrospermia, Sephadex neuter, spermatozoa, *Sus domesticus*.

## **INTRODUCCIÓ**

La presència d'una o diverses malalties espermàtiques a l'ejaculació dels mascles reproductors comporta importants pèrdues econòmiques a les granges i centres

d'inseminació artificial. A més, també s'ha demostrat que a l'ejaculació la presència d'espermatozoides morts o aberrants té efectes tòxics (Shannon i Curson, 1972) i lítics (Lindemann *et al.*, 1982) sobre la resta

d'espermatozoides, i conseqüentment, redueix la seva capacitat fecundant.

Per a la millora de la qualitat espermàtica de les dosis seminals s'han desenvolupat mètodes de filtració en columnes de llana de vidre, de boletes de vidre, de Leucosorb i de Sephadex, que permeten augmentar el nombre d'espermatozoides viables i mòbils, per bé que el seu efecte varia considerablement en funció de la reïna emprada i de l'espècie (Johnson *et al.*, 1996; Centola *et al.*, 1998; Adiga i Kumar, 2001). El principi de la filtració amb aquestes columnes es basa en el fet que els espermatozoides no viables són més susceptibles d'adherir-se a la reïna que no pas els espermatozoides mòbils i aparentment funcionals (Jeyendran, 2002); d'altra banda, els espermatozoides viables poden travessar la barrera de filtració sense modificar les seves característiques funcionals.

La filtració en columnes de llana de vidre i Sephadex ha permès millorar la qualitat espermàtica de les dosis seminals de mascles subfèrtils i s'aplica de forma habitual en braus (Anzar i Graham, 1995, 1996), en búfals (Ahmad *et al.*, 2003), en cavalls (Samper *et al.*, 1995; Alghamdi *et al.*, 2002) i en gossos (Mogas *et al.*, 1998).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar l'efecte de la filtració en diferents columnes de Sephadex neutre sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals de mascles porcs subfèrtils.

## MATERIAL I MÈTODES

Per a les anàlisis es van utilitzar les ejaculacions procedents de cinquanta-vuit mascles porcs de raça Piétrain afectats d'astenoteratonecrospermia i que procedien de les empreses Semen Cardona (Cardona, el Bages) i Selecció Batallé (Riudarenes, la Selva).

L'extracció del semen es va realitzar pel mètode de la munta dels mascles sobre maniquí i masturbació manual. La fracció espermàtica es va recollir en un termo a 37° C en el qual prèviament s'havia col·locat una gasa per a eliminar la fracció de mucina. La fracció espermàtica es va diluir a la proporció 1:6 amb diluent Bestville (BTS) (Cidosa, Tecnovit, Espanya) i es va al·licuar en dosis seminals de 80 ml que van ser transportades al laboratori de Biotecnologia de la Reproducció Porcina de la Universitat de Girona refrigerades a 15° C.

Al laboratori les dosis seminals es van filtrar en quatre columnes diferents de Sephadex neutre: G-25 Medium, G-50 Fine, G-50 Medium i G-75 (Amersham Biosciences, Suècia). Per a totes les columnes l'alçada del llit de Sephadex es va establir en 10 + 0,5 cm, la temperatura de treball al laboratori de 23° C i el flux de

sortida en 1 ml/20 segons. Les dosis seminals filtrades es van eluir amb 40 ml del mateix diluent BTS.

L'anàlisi de la qualitat espermàtica de les dosis seminals es va realitzar abans i després de la filtració. Per a la valoració de la concentració espermàtica, la motilitat espermàtica i la morfologia espermàtica es va emprar el programa informàtic SCA®2002 Producció (Microptic, Barcelona, versió 2003). L'estudi de la vitalitat espermàtica es va basar en la valoració conjunta de l'estat del nucli, la integritat de la beina mitocondrial i l'estat de l'acrosoma mitjançant el mètode de la triple tinció fluorocròmica amb els fluorocroms iodur de propidi (Sigma, EUA)/bis-benzimida (Sigma, EUA), MitoTracker FM (Molecular Probes, EUA) i Alexa Fluor® 488 Conjugate (Molecular Probes, EUA) (Pinart *et al.*, 2005); l'observació es va realitzar en un microscopi d'epifluorescència Leica DMR-XA i amb els filtres DAPI, FITC i rodamina

Per a l'anàlisi estadística de l'efecte de les diferents columnes de Sephadex neutre sobre la qualitat espermàtica de les dosis seminals es va emprar el test ANOVA, inclòs al paquet estadístic SPSS per a Windows, versió 12.0, amb un nivell de significació de  $P < 0,05$  i prèvia transformació  $\sqrt{\text{variable}/100}$  de les variables.

## RESULTATS

A la taula 1 es mostren els resultats obtinguts de l'anàlisi de la qualitat espermàtica de les dosis seminals abans i després de la filtració en columnes de Sephadex neutre.

La filtració en les quatre columnes de Sephadex neutre provoca un augment significatiu del nombre d'espermatozoides madurs respecte de les dosis no filtrades, i una disminució significativa de la freqüència d'espermatozoides amb gota distal i de la freqüència d'espermatozoides aberrants, per bé que no afecta la freqüència d'espermatozoides amb gota proximal. De totes maneres, la filtració en columnes de Sephadex G-25 Medium, G-50 Fine i G-75 també provoca un descens significatiu de la freqüència d'espermatozoides mòbils respecte de les dosis sense filtrar.

## DISCUSSIÓ

Els mascles de la raça Piétrain són àmpliament utilitzats en els centres d'inseminació artificial del nostre país per a la inseminació de truges de diferents races, amb la finalitat d'aconseguir descendència amb unes determinades característiques càrniques i de creixement ràpid. Tot i la importància d'aquesta raça, molts

**Taula 1** Qualitat espermàtica de les dosis seminals de mascles astenoteratonecrospermics abans i després de la filtració en columnes de Sephadex neutre.

PARÀMETRE	DOSIS		DOSIS FILTRADES		
	NO FILTRADES	Sephadex G-25 Medium	Sephadex G-50 Fine	Sephadex G-50 Medium	Sephadex G-75
<b>Motilitat espermàtica</b>					
% espermatozoides mòbils	57,98 % + 16,55	44,99 % + 22,49 <sup>a</sup>	48,67 % + 19,93	45,52 % + 20,61 <sup>a</sup>	46,61 % + 22,24 <sup>a</sup>
<b>Vitalitat espermàtica</b>					
% espermatozoides VBBAB <sup>(*)</sup>	49,77 % + 12,04	63,60 % + 8,54 <sup>a</sup>	62,98 % + 14,87 <sup>a</sup>	64,32 % + 8,94 <sup>a</sup>	63,87 % + 9,19 <sup>a</sup>
<b>Morfologia espermàtica</b>					
% espermatozoides madurs	64,33 % + 8,28	75,25 % + 8,01 <sup>a</sup>	75,26 % + 7,47 <sup>a</sup>	74,79 % + 7,25 <sup>a</sup>	75,28 % + 6,67 <sup>a</sup>
% espermatozoides amb gota proximal	5,54 % + 3,32	4,99 % + 2,07	4,55 % + 2,18	5,08 % + 2,59	4,75 % + 2,31
% espermatozoides amb gota distal	6,28 % + 5,00	3,49 % + 2,28 <sup>a</sup>	3,73 % + 2,59 <sup>a</sup>	3,76 % + 1,90 <sup>a</sup>	3,74 % + 2,72 <sup>a</sup>
% espermatozoides aberrants	23,85 + 3,33	16,27 + 5,92 <sup>a</sup>	16,46 + 5,90 <sup>a</sup>	16,37 + 5,46 <sup>a</sup>	16,23 + 5,95 <sup>a</sup>

(\*): espermatozoide viu amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes.

Els resultats s'expressen com a mitjana % + SD.

<sup>a</sup> valors significativament diferents respecte de la mostra no filtrada.

mascles manifesten anomalies en la qualitat espermàtica de les seues ejaculacions (Buxadé, 1984).

Sovint interessa mantenir la línia genètica d'un determinat mascle malgrat que la seva qualitat seminal sigui baixa. En aquests casos s'intenta millorar la qualitat espermàtica de les dosis seminals mitjançant l'aplicació de diferents tècniques, entre les quals destaquen la filtració en columnes de Sephadex, la filtració en llana de vidre, els gradients de Percoll, el *swim-up* i el *swim-down* (Zavos *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1996; Centola *et al.*, 1998; Adiga i Kumar, 2001).

El present estudi demostra que les columnes de Sephadex neutre milloren la qualitat espermàtica dels mascles Piétrain amb astenoteratonecrospermia, ja que augmenten la freqüència d'espermatozoides madurs i viables i disminueixen la freqüència d'espermatozoides amb gota distal i d'espermatozoides aberrants. De totes maneres, la majoria d'aquestes columnes, a excepció de la columna de Sephadex G-50 Fine, disminueixen la freqüència d'espermatozoides mòbils. Tant en boví com en porcí, s'ha demostrat que els espermatozoides han de tenir els acrosomes intactes per a poder travessar les columnes de Sephadex, ja que la integritat acrosòmica és essencial per a la interacció espermatozoide-Sephadex (Anzar *et al.*, 1995). La filtració en Sephadex neutre no altera la integritat de membrana dels espermatozoides, ja que la taxa de reacció acrosòmica espontània és molt baixa (Drobnis *et al.*, 1991). El percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma i la membrana intactes després de la filtració de semen de búfal en Sephadex G-10 i Sephadex G-10 + Sephadex G-10 amb intercanviadors iònics augmenta notablement (Ahmad *et al.*, 2003).

La disminució de la freqüència total d'espermatozoides aberrants en dosis seminals filtrades en Sephadex neutre també ha estat descrita en bovins (Graham i Graham, 1990). Aquests mateixos autors observen que la filtració en columnes de Sephadex neutre disminueix la freqüència d'espermatozoides amb la cua doblegada i d'espermatozoides amb anomalies cefàliques de les dosis seminals.

El descens de la freqüència d'espermatozoides mòbils es pot atribuir al fet que durant la filtració alguns substrats necessaris per a mantenir la motilitat dels espermatozoides queden retinguts, ja sigui per la mida dels porus dels diferents tipus de Sephadex o per la velocitat del flux de recollida. Fernández *et al.* (1985) consideren que els fluxos massa ràpids provoquen acomodaments del Sephadex que formen corrents d'alta velocitat que arrossegueuen els espermatozoides immòbils. Per tant, sembla que el flux emprat en el present estudi és massa ràpid; aquest flux ràpid impedeix la separació dels espermatozoides en funció de la motilitat. D'altra banda, alguns autors creuen que la temperatura a la qual es realitzen les filtracions té una influència cabdal sobre la motilitat espermàtica de les dosis eluïdes. Així, en búfals la filtració en columnes d'intercanvi iònic (Ahmad *et al.*, 2003) i en columnes de Sephadex (Heuer *et al.*, 1983) a una temperatura de 28-30° C permet obtenir una major freqüència d'espermatozoides mòbils que la filtració a 23° C. En aquest treball es va escollir una temperatura de 23° C perquè es va considerar que era fàcilment regulable amb qualsevol aparell d'aire condicionat, ja que en un futur, si els resultats són favorables, es pretén transferir a l'empresa aquest mètode de filtració per a millorar la

qualitat espermàtica de les dosis seminals de mascles subfèrtils de la raça Piétrain. Els resultats obtinguts fan pensar que serà necessari augmentar la temperatura de treball al laboratori.

Un altre factor que també pot afectar la motilitat espermàtica de les dosis eluïdes és l'alçada de les columnes (Cisale *et al.*, 2001). En el present estudi, l'alçada dels llits de Sephadex es va establir en 10 + 0,5 cm. Cisale *et al.* (2001) van provar columnes d'òxid de sílice, de boletes de vidre i de Sephadex amb diferents volums de matriu i diferents alçades. En tots els casos, un major volum de matriu permetia l'obtenció de dosis seminals de millor qualitat espermàtica. En la filtració en Sephadex, les columnes més altes proporcionaven dosis amb una elevada motilitat i vitalitat espermàtiques; l'alçada de les columnes de Sephadex no sembla tenir cap efecte sobre la integritat de l'acrosoma ni de la membrana plasmàtica ni sobre el percentatge de recuperació d'espermatozoides. Les matrius altes d'òxid de sílice també milloren la motilitat i la vitalitat espermàtiques, la integritat acrosòmica i l'estabilitat de les membranes, mentre que l'alçada de les matrius de boletes de vidre no modifica la qualitat espermàtica de les dosis recollides (Cisale *et al.*, 2001). En comparar aquestes tres reïnes amb una mateixa alçada, Sephadex dona millors resultats que les altres, possiblement com a conseqüència de les característiques de la superfície de les seves boletes (Cisale *et al.*, 2001). Per tant, sembla que existeix una certa independència del tipus de matriu, i que són els mecanismes de filtració els que tenen un paper més important en la millora de la qualitat seminal. Segons Cisale *et al.* (2001) les matrius de Sephadex, d'òxid de sílice i de boletes de vidre tenen un efecte similar en la millora de la qualitat espermàtica de les dosis, sempre i quan les condicions hidrodinàmiques estiguin controlades i s'aconsegueixin les condicions més òptimes de viscositat, temperatura i flux de cadascuna de les diferents matrius. Una rectificació en alguns d'aquests paràmetres comportaria una millora de la motilitat de les dosis filtrades, i és un aspecte a tenir en compte amb vista a futurs estudis.

Contràriament als resultats obtinguts en el present treball, en altres espècies com bovins (Anzar i Graham, 1993; Ahmad *et al.*, 2003) i búfals (Ahmad *et al.*, 2003) s'observa un augment de la freqüència d'espermatozoides mòbils després de la filtració de dosis seminals en columnes de Sephadex i en columnes d'intercanvi iònic. En bocs s'ha demostrat que les tècniques de filtració en Sephadex i els gradients de Percoll són efectius per a incrementar la motilitat espermàtica de les dosis seminals refrigerades i congelades, i fins i tot de les dosis de mascles amb astenospermia (Valcárcel *et al.*, 1996). En gossos, en canvi, la filtració

en Sephadex G-15 més un filtre de polipropilè produeix una disminució significativa de la motilitat total de les dosis eluïdes (Mogas *et al.*, 1998).

En conclusió, la filtració de dosis seminals de mascles Piétrain amb astenoteratonecrospermia en columnes de Sephadex neutre augmenta la morfologia i la vitalitat espermàtiques, de manera que es pot considerar un mètode efectiu per a la millora de la qualitat espermàtica de mascles subfèrtils d'interès productiu.

## BIBLIOGRAFIA

- ADIGA, S.; KUMAR, P. (2001). «Influence of swim-up method on the recovery of spermatozoa from different types of semen samples». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 18(3):160-164.
- AHMAD, Z.; ANZAR, M.; SHAHAB, M.; AHMAD, N.; ANDRABI, S. M. H. (2003). «Sephadex and Sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates». *Theriogenology.*, 59:1189-1202.
- ALGHAMDI, A. S.; TROEDSSON, M. H.; XUE, J. L.; CRABO, B. G. (2002). «Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen». *Am. J. Vet. Res.*, 63(6):880-885.
- ANZAR, M.; GRAHAM, E. F. (1993). «Filtration of bovine semen. and. development of a Sephadex ion-exchange filter». *Anim. Reprod. Sci.*, 31:187-195.
- (1995). «Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen». *Theriogenology*, 43:439-449.
- (1996). «Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen». *Theriogenology.*, 45:513-520.
- BUXADÉ, C. (1984). *Ganado porcino*. Mundi Prensa.
- CENTOLA, G. M.; HERKO, R.; ANDOLINA, E.; WEISENSEL, S. (1998). «Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation». *Fertil. Steril.*, 70(6):1173-1175.
- CISALE, H. (1998). «Mejoramiento de la calidad seminal en especies de abasto. Revisión de los métodos físicos empleados sobre el semen». *Med. Vet.*, 15(9):445-453.
- CISALE, H. O.; FISCHMAN, K. L.; BLASI, C. D.; FERNÁNDEZ, H. A.; GLEDHILL, L. (2001). «Enrichment of high-quality spermatozoa in bovine semen: relative effectiveness of three filtration matrices». *Andrologia*, 33:143-150.
- DROBNIS, E. Z.; ZHONG, C. Q. I.; OVERSTREET, J. W. (1991). «Separation of cryopreserved human semen using Sephadex™ columns, washing, or Percoll gradients». *J. Androl.*, 12:201-208.
- FERNÁNDEZ, H. A.; CISALE, H.; AISEN, E. G. (1985). «Mecanismo de mejoramiento de semen bovino por filtración a través de Sephadex». *Vet. Arg.*, 2(2):144-148.
- GRAHAM, E. F.; GRAHAM, J. (1990). «The effect of whole

- ejaculate filtration on the morphology and fertility of bovine semen». *J. Dairy Sci.*, 73:91-97.
- HEUER, C.; TAHIR, N.; CRABO, B. G.; BADER, H.; SHAH, M.; SAJI, M. (1983). «A simple method for the assay of water buffalo semen by filtration through Sephadex». *Pak. Vet. J.*, 3:157-161.
- JEYENDRAN, S. R. (2002). *Interpretation of semen analysis results. A practical guide*. Cambridge University Press.
- (2002). *Sperm collection and processing methods. A practical guide*. Cambridge University Press.
- JOHNSON, D. E.; CONFINO, E.; JEYENDRAN, R. S. (1996). «Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples». *Fertil. Steril.*, 66(3):459-62.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. (2000). «Storage of boar semen». *Anim. Reprod. Sci.*, 62:143-172.
- LINDEMANN, C. B.; FISHER, M.; LIPTON, M. (1982). «A comparative study on the effect of freezing and frozen storage on intact and demembrated bull spermatozoa». *Cryobiol.*, 19:20-28.
- MOGAS, T.; RIGAU, T.; PIEDRAFITA, J.; BONET, S.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. (1998). «Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen». *Theriogenology.*, 50:1171:1189.
- PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; CASAS, I.; BONET, S. (2005). «Assessment of the functional status of boar spermatozoa by multiple staining with fluorochromes». *ESDAR*. [Acceptat]
- SAMPER, J. C.; HAMILTON, D. W.; PRYOR, J. L.; LOSETH, H. J.; TROEDSSON, M. H. T.; CRABO, B. G. (1995). «Mechanism of Sephadex trapping of capacitated stallion spermatozoa». *Biol. Reprod. Monograph*, 1:729-737.
- SHANNON, P.; CURSON, B. (1972). «Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen». *J. Dairy Sci.*, 55:615-620.
- VALCARCEL, A.; HERAS, M. A.; MOSES, D. F.; PÉREZ, L. J.; BALDASSARRE, H.; DE LAS HERAS, M. A. (1996). «Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram sperm». *Anim. Reprod. Sci.*, 41:215-224.
- ZAVOS, P. M. (1992). «Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the SpermPrep\* filtration method: improvements over the conventional swim-up method». *Fertil. Steril.*, 57(6):1326-1330.