

EFFECTE DE L'ADDICIÓ DE PROSTAGLANDINA F_{2α} SOBRE LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE LES EJACULACIONS DE MASCLES REPRODUCTORS PORCINS

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

Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia, Institut de Tecnologia Agroalimentària, Facultat de Ciències, Universitat de Girona
Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. marc.yeste@udg.es.

Resum

L'hormona prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) ha estat emprada per a augmentar l'eficàcia reproductiva de les truges. L'objectiu d'aquest estudi fou determinar els efectes de la PGF_{2α} sobre la qualitat espermàtica. Així, es van assajar cinc concentracions diferents de prostaglandina (2,50, 5, 10, 12,50 i 25 mg PGF_{2α}/100 ml) afegides a dosis seminals refrigerades i destinades a inseminació artificial, procedents de catorze mascles reproductors porcins de la raça Piétrain. Les mostres foren incubades durant 30 min i la qualitat espermàtica fou determinada mitjançant l'anàlisi de la viabilitat, la motilitat i la morfologia espermàtiques, i també el test de resistència osmòtica (ORT). L'anàlisi estadística dels resultats es va dur a terme mitjançant una ANOVA d'un factor amb un nivell de significació (α) de 0,05. Es va observar que les concentracions superiors a 12,5 mg/100 ml de PGF_{2α} eren citotòxiques, mentre que concentracions inferiors no afectaven els espermatozoides. Així doncs, la PGF_{2α} pot ésser utilitzada com a additiu en les dosis seminals en un rang de concentracions igual o inferior a 12,5 mg/100 ml de PGF_{2α}.

Abstract

In swine, prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) has been used to improve reproductive performance in swine. The goal of the present work was to determine how the addition of prostaglandin F_{2α} affects boar sperm quality. With this purpose, 5 different treatments were performed. Thus, 2.50, 5, 10, 12.50 and 25 mg PGF_{2α}/100 ml were added to diluted sperm samples from 14 post-pubertal Piétrain boars selected for artificial insemination (AI). Seminal samples were incubated for 30 min and sperm quality was then tested, for sperm viability, motility, morphology and osmotic resistance test. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA and significance level was set at 0.05. Concentrations of PGF_{2α} higher than 12.5 mg/100 ml were cytotoxic while the others did not damage boar spermatozoa. Thus, the other treatments may be used to produce their profitable effects without adverse effects.

INTRODUCCIÓ

La inseminació artificial (AI) ha esdevingut una pràctica rutinària per a la indústria ramadera porcina. La biotecnologia de la reproducció animal s'ha orientat, sovint, en la recerca d'estratègies destinades a augmentar el rendiment dels programes de les AI. És per això que s'ha assajat l'addició de substàncies a les dosis seminals o s'han injectat diversos fàrmacs a les femelles amb l'objectiu d'augmentar les taxes de no retorn a l'estre (NRR), de fecunditat i de prolificitat (Traas i Kustritz, 2004).

Les prostaglandines són eicosanoides, presents en molts teixits dels vertebrats, que duen a terme funci-

ons clau en un ventall força ampli de processos fisiològics (Kingsley *et al.*, 2005).

Concretament, pel que fa a la biologia de la reproducció, les prostaglandines es troben al fluid seminal (Templeton *et al.*, 1978) i al moc cervical (Charbonnel *et al.*, 1982). En humans, s'han estudiat els efectes de diferents tipus de prostaglandines sobre la funció espermàtica (19-OH-PGE, 19-OH-PGF, PGE₁, PGE₂, PGF_{1α} i PGF_{2α}) (Bendvold *et al.*, 1984). La PGF_{2α} és un agent contràctil molt important que actua localment sobre la musculatura de l'úter (Gustafsson *et al.*, 1975; Gamcick *et al.*, 1980). L'administració de la PGF_{2α} en truges influeix en el transport d'oòcits i en la interacció espermatozoide-zona

pellúcida i en el desenvolupament embrionari (Mwanza *et al.*, 2002).

L'objectiu del present estudi és determinar els efectes de l'addició de diferents concentracions de PGF_{2α} en la viabilitat, motilitat i morfologia espermàtiques, la integritat de l'acrosoma i de la beina mitocondrial i la resistència osmòtica dels espermatozoides (ORT) de dosis seminals refrigeraes i destinades a AI.

MATERIAL I MÈTODES

Obtenció de les dosis seminals

Les dosis seminals foren obtingudes a partir de catorze mascles postpuberals de la raça Piétrain. Els mascles es trobaven confinats en naus climatitzades amb condicions controlades de temperatura i humitat relativa i alimentats mitjançant una dieta ajustada i controlada. Les mostres foren obtingudes mitjançant la tècnica de masturbació manual i munta sobre el maniquí. La fracció rica de l'ejaculació fou filtrada, per eliminar la fracció gelatinosa i diluïda en una relació 1:5 (v/v) amb diluent BTS (Beltsville thawing solution, Cidosa, Tecnovit).

Concentracions de PGF_{2α}

Després de dur a terme diverses proves preliminars, es decidí analitzar cinc tractaments diferents de PGF_{2α} (Dinolytic®, Pharmacia, 5 mg PGF_{2α}/ml). Les concentracions finals foren 2,50 mg PGF_{2α}/100 ml, 5 mg PGF_{2α}/100 ml, 10 mg PGF_{2α}/100 ml, 12,50 mg

PGF_{2α}/100 ml i 25 mg PGF_{2α}/100 ml. El control es definí com a concentració 0 mg PGF_{2α}/100 ml. Després de l'addició dels tractaments, les mostres foren incubades durant 30 min a 37° C. La viabilitat, motilitat i morfologia espermàtiques, la integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma i la resistència osmòtica dels acrosomes fou determinada tant per al control com per als diferents tractaments.

Determinació de la viabilitat espermàtica i de la integritat de la beina mitocondrial i l'acrosoma

La viabilitat espermàtica i la integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma foren determinades mitjançant un marcatge múltiple amb fluorocroms, i l'observació posterior al microscopi d'epifluorescència (Leica DMLR-XA) a 400 augments (Objectiu: Leica 40X 1.32 HCX PL APO). Les mostres foren marcades amb els fluorocroms seguint el protocol descrit per Bussalleu *et al.* (2005): 1) Hoestch 33258 (específic per a cèl·lules viables; Sigma, St. Louis, MO, EUA), 2) iodur de propidi (específic per a cèl·lules no viables; Sigma, St. Louis, MO, EUA), 3) Mitotracker® Green FM fluorochrome (específic per a la funció del mitocondri; Molecular Probes®, Eugene, OR, EUA) i 4) el conjugat format per la lectina *trypsin inhibitor* (SBTI, procedent de la llavor de soja) i el fluorocrom Alexa Fluor® 488 (específic per a l'acrosoma; Molecular Probes®, Eugene, OR, EUA). Per a cada mostra, es feren tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun. Els espermatozoides foren considerats com a viables quan presentaven el nucli, l'acrosoma i la beina mitocondrial intactes. La

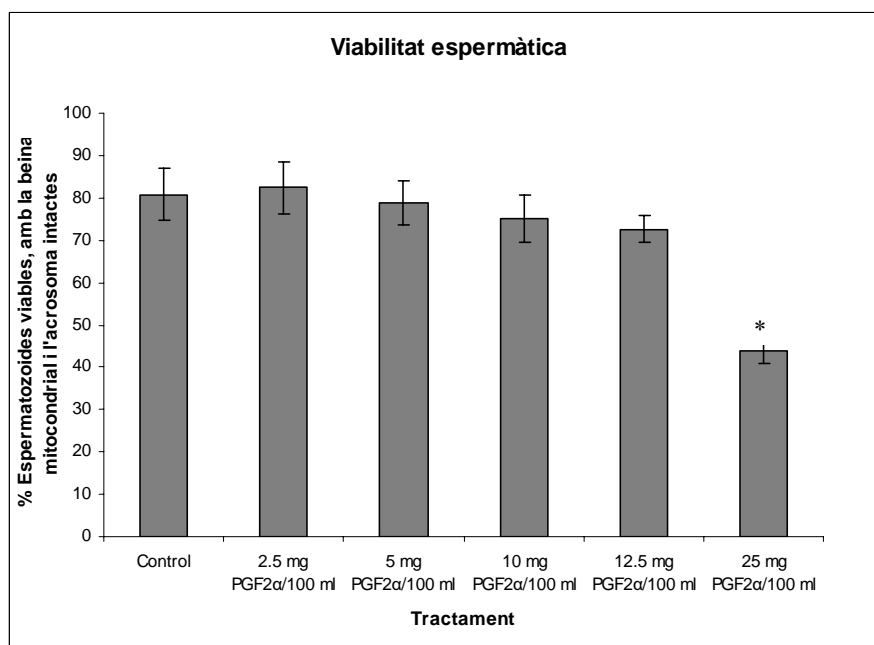


Figura 1 Viabilitat espermàtica. (*) $p < 0,05$ respecte del control.

resta d'espermatozoides, és a dir, aquells que presentaven com a mínim el nucli, l'acrosoma o la beina mitocondrial malmesos, foren considerats com a no viables.

Determinació de la motilitat espermàtica i d'altres paràmetres cinètics

La motilitat i la velocitat espermàtiques foren avaluades a 37° C mitjançant el sistema CASA (*computer assisted sperm analyser*), que consistia en un microscopi òptic de contrast de fases (Olympus BX41) i el programari Sperm Class Analyzer (SCA® motility module, Microptic, Barcelona). Per a cada anàlisi, 15 µl de mostra foren dipositades en una cambra de Makler (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel), prèviament atemperada a 37° C, i observades emprant un objectiu Olympus 10× 0.30 PLAN de contrast de fases negatives. En cada cas, s'analitzaren com a mínim 1.000 espermatozoides. Aquest sistema CASA proporciona per a cada mostra els paràmetres de motilitat i de cinètica espermàtiques següents: percentatge d'espermatozoides mòbils progressius (PMOT, %), percentatge d'espermatozoides mòbils totals (MOT, %), velocitat curvilínia (VCL, µm/s), velocitat mitjana de la trajectòria (VAP, µm/s), velocitat rectilínia (VSL, µm/s), amplitud del desplaçament lateral del cap (ALH, µm); freqüència de batec del cap (BCF, Hz), percentatge de linearitat (LIN, %), percentatge de rectitud (STR, %) i percentatge d'oscil·lació (WOB, %) (Verstegen *et al.*, 2002).

Determinació de la morfologia espermàtica

La morfologia espermàtica fou avaluada també mitjançant el sistema CASA i el mòdul de producció del programari Sperm Class Analyser (SCA® 2002 Production module, Microptic, Barcelona). Per a cadascuna de les anàlisis, es dipositaren 5 µl de mostra sobre un portaobjectes i s'incubà durant 30 min a 25° C de temperatura i 100 % d'humitat relativa, per tal d'immobilitzar els espermatozoides. Les mostres foren observades a 200 augments (amb un objectiu Olympus 20 × 0.40 PLAN de contrast de fases positives. Es feren tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun, i es van classificar en madurs, immadurs i aberrants (diferenciant morfoanomalies de la cua i del cap de l'espermatozoide) (OMS, 2000).

Test de resistència osmòtica (ORT)

La resistència osmòtica es va assajar seguint el protocol descrit per Rodríguez-Gil i Rigau (1995). Les mostres foren diluïdes (1:9) en una solució hipotònica (1 % Na₃C₆H₅O₇ (w/v), pH 7.4, 102 ± 3 mOsm·Kg⁻¹) o una solució isotònica (3.2 % Na₃C₆H₅O₇ (w/v), pH 7.4, 304 ± 7 mOsm·Kg⁻¹). S'incubà a 37° C durant 1 h, s'aplicà un mètode de doble marcatge (tinció Giemsa) i es comptaren els percentatges de viabilitat espermàtica i acrosomes alterats. Posteriorment, s'aplicà la fórmula descrita per Sánchez (1991).

Anàlisi estadística dels resultats

Els resultats obtinguts com a percentatges (x) foren

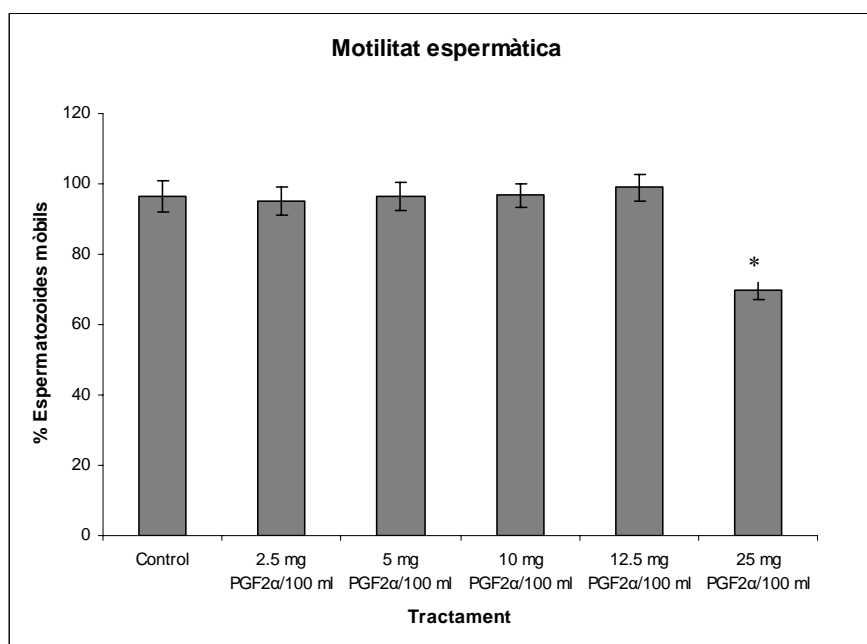


Figura 2 Motilitat espermàtica. (*) $p < 0,05$ respecte del control.

prèviament estandarditzats mitjançant la transformació arcsin \sqrt{x} . Es dugué a terme una ANOVA d'un factor, considerant el tractament com a factor i el paràmetre descriptor de la qualitat (PMOT, VCL, ORT, ...) com a variable dependent. La comparació entre tractaments es féu mitjançant el test post-hoc de Scheffé. L'anàlisi estadística dels resultats es va dur a terme utilitzant el paquet estadístic SPSS per Windows (versió 13.0). El nivell de significació (α) fou establert a 0,05. Els resultats es van expressar com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana (SEM).

RESULTATS

La figura 1 mostra el percentatge d'espermatozoides viables amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes (mitjana \pm SEM) per a cada tractament. S'observà una disminució significativa d'aquest percentatge quan la concentració de PGF_{2 α} era de 25 mg/100 ml, en comparació amb el control ($p < 0,05$). No s'observaren, en canvi, diferències significatives entre el control i la resta de tractaments ($p > 0,05$).

A la figura 2 es mostren els resultats del percentatge d'espermatozoides mòbils totals (mitjana \pm SEM). S'observà una reducció significativa ($p < 0,05$), respecte el control, de la motilitat espermàtica en el tractament de 25 mg/100 ml PGF_{2 α} . No s'observaren diferències significatives en els altres tractaments. La motilitat progressiva (PMOT) i els altres paràmetres cinètics (VCL, VAP, VSL, BCF, LIN, STR i WOB) (les dades no es mostren) es veuen significativament reduïts ($p < 0,05$) per la concentració de 25 mg/100 ml PGF_{2 α} , però no en els altres tractaments. No s'observaren diferències significatives ($p > 0,05$) entre el control i els cinc tractaments per ALH.

No s'observaren diferències significatives entre el control i els respectius tractaments ($p > 0,05$) quan s'analitzà la morfologia espermàtica. En canvi, pel que fa a l'ORT, la resistència osmòtica es veié significativament reduïda ($p < 0,05$) en el tractament de 25 mg/100 ml PGF_{2 α} . No s'observaren diferències significatives en els altres tractaments.

DISCUSSIÓ

La contracció del miometri té un paper bàsic en la fecundació, perquè gràcies a aquestes contraccions els espermatozoides poden arribar a la regió de l'oviducte, en la qual es produeix la fusió de l'oòcit amb l'espermatozoide (Kos i Bilkei, 2004). L'administració via intravenosa o l'additivació de l'ejaculació amb hormones que tenen aquest acció uterotòni-

ca s'ha dut a terme en porcí, utilitzant oxitocina (Odendhal *et al.*, 1990), prostaglandina (Gil *et al.*, 1998) i estradiol (Kirwood i Tacker, 1991).

L'objectiu d'aquest estudi era conèixer els efectes de l'additivació amb l'ecosainoide PGF_{2 α} sobre la qualitat espermàtica de les dosis seminals refrigera- des i destinades a AI.

En concentracions superiors a 12,5 mg/100 ml, la PGF_{2 α} té un efecte deleteri sobre la viabilitat espermàtica, malmet la integritat de l'acrosoma i en compromet la resistència enfront de canvis d'osmolaritat. A més, la concentració de 25 mg/100 ml sembla tenir un efecte supressor de la motilitat espermàtica, que s'observa analitzant diferents paràmetres, probablement provocat per la seva citotoxicitat, encara que aquest efecte també es podria atribuir no solament a aquesta, sinó a d'altres causes. En qualsevol cas, els estudis que s'havien dut a terme fins ara no havien mostrat aquest efecte citotòxic i supressor de la motilitat, perquè s'havien assajat concentracions que corresponien a un rang inferior a 25 mg/100 ml (Cheng *et al.*, 2001; Maes *et al.*, 2002). Per tant, i atès que la PGF_{2 α} té un efecte contràctil d'acció local sobre l'úter, de manera que la seva utilització pot augmentar l'eficiència i l'eficàcia de l'AI (Baldi *et al.*, 1991; Sbracia *et al.*, 1997; Friel *et al.*, 2005), es pot concloure que aquesta hormona pot ésser addicionada a la dosi seminal en concentracions inferiors a 25 mg/100 ml sense que això produeixi efectes nocius sobre la qualitat espermàtica, amb l'objectiu de millorar els resultats de l'AI en porcí.

BIBLIOGRAFIA

- BALDI, E.; CASANO, R.; CONSTANZA, F. (1991). «Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa». *J. Androl.*, 12: 323-330.
- BENDVOLD, E.; SVANBORG, K.; ENEROTH, P.; GOTTLIEB, C.; BYGDEMAN, M. (1984). «The natural variations in prostaglandin concentration in human seminal fluid and its relation to sperm quality». *Fertil. Steril.*, 41(5): 743-747.
- BUSSALLEU, E.; PINART, E.; YESTE, M.; BRIZ, M.; SANCHE, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; CASAS, I.; BONET, S. (2005). «Development for a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa». *Microsc. Res. Tech.*, 68(5), 227-283.
- CHARBONNEL, B., KREMER, M., GEROZISSIS, K., DRAY, F. (1982). «Human cervical mucus contains large amounts of prostaglandins». *Fertil. Steril.*, 38(1): 109-111.
- CHENG, H.; ALTHOUSE, G. C.; HSU, W. H. (2001). «Prostaglandin F_{2 α} added to extended boar semen at

- processing elicits in vitro myometrial contractility after 72 hours of storage». *Theriogenology*, 55: 1901-1906.
- FRIEL, A. M.; O'REILLY, M. W.; SEXTON, D. J.; MORRISON, J. J. (2005). «Specific PGF_{2α} receptor (FP) antagonism and human uterine contractility *in vitro*». *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112: 1034-1042.
- GAMCIK, P.; MESAROS, P.; SCVARC, F. (1980). «Influence of prostaglandins on fertility of sheep with the use of deep-frozen sperm». *Proc. 9th International Conference Animal Reproduction and AI. Madrid*, 3: 149.
- GIL, J.; CHICO, J.; GIL, O.; LÓPEZ, A. (1998). «Increasing swine prolificacy by adding Dinolytic to semen doses». *Proc. 15th IPVS Congress*, 216.
- GUSTAFFSON, B.; EDQVIST, S.; EINARSSON, S.; LINGE, F. (1975). «Fertility of deep frozen ram semen supplemented with PGF_{2α}». *Acta Veterinaria Scandinavica*, 16: 468-470.
- KINGSLEY, P. J., ROUZER, C. A., SALEH, S., MARNETT, L. J. (2005). «Simultaneous analysis of prostaglandin glyceryl esters and prostaglandins by electrospray tandem mass spectrometry». *Anal. Biochem.*, 343(2): 203-11.
- KIRWOOD, R. N., THACKER, P. A. (1991). «The influence of adding estradiol to semen on reproductive performance of sows». *Can. J. Anim. Sci.*, 71: 589-591.
- KOS, M.; BILKEI, G. (2004). «Prostaglandin F_{2α} supplemented semen improves reproductive performance in artificially inseminated sows». *Anim. Reprod. Sci.*, 80(1-2): 113-120.
- MAES, D. G. D.; MATEUSEN, T.; RIJSELAERE, T.; DE VliegHER, S.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. (2003). «Motility characteristics of boar spermatozoa after addition of prostaglandin F_{2α}». *Theriogenology*, 60: 1435-1443.
- MWANZA, A. M.; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; LUNDEHEIM, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KINDAHL, H. (2002). «Postovulatory effect of repeated administration of prostaglandin F_{2α} on the endocrine status, ova transport, binding of accessory spermatozoa to the zona pellucida and embryo development of recently ovulated sows». *Theriogenology*, 58(6): 1111-1124.
- ODENHAL, F.; BARTH, T.; JOST, K. (1990). «The effect of Depotocin (carbetocin) added to insemination doses of boar semen on the conception rate of sows and their fertility». *Pig News Info*, 11: 203.
- OMS (2000). *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Sperm and Sperm-Cervical Mucus Interaction*, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; RIGAU, T. (1995). «Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar semen». *Anim. Reprod. Sci.*, 39: 141-146.
- SÁNCHEZ, R. (1991). «Control de la calidad espermática». *Anaporc.*, 104: 27-33.
- SBRACIA, M.; GRASSO, J.; SYAME, N.; STRONK, J.; HUSZAR, G. (1997). «Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa». *Hum. Reprod.*, 12(9): 1949-1954.
- SCHILLING, E.; VENGUST, M.; BAJT, G.; TOMCIC, M. (1986). «The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size». *9th IPVS Congress*, Barcelona, p. 77.
- TEMPLETON, A. A.; COOPER, I.; KELLY, R. C. (1978). «Prostaglandin concentration in the semen of fertile men». *J. Reprod. Fertil.*, 52: 147-150.
- TRAAS, A. M.; KUSTRITZ, M. V. R. (2004). «Effect of administering oxytocin or prostaglandin F_{2α} on characteristics of the canine ejaculate». *Can. Vet. J.*, 45: 999-1002.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. (2002). «Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice». *Theriogenology*, 57: 149-179.