

MADURACIÓ I CANVIS EN LA MORFOLOGIA ESPERMÀTICA DE PORCÍ MITJANÇANT LA COINCUBACIÓ AMB FRAGMENTES D'EPIDÍDIM

Estela Garcia-Bonavila, Marc Yeste, Sergi Bonet, Sílvia Sancho, Elisabeth Pinart, Eva Bussalleu, Isabel Casas, Anna Fàbrega i M. Dolors Briz

Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia, INTEA, Facultat de Ciències, Universitat de Girona.

Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. estela.garcia@udg.edu.

Resum

Estudis previs han demostrat que els espermatozoides poden madurar després d'un cocultiu amb cèl·lules epitelials epididimàries i amb cocultiu amb fragments d'epidídim. L'objectiu d'aquest estudi va ser determinar els efectes de la coïncubació amb espermatozoides ejaculats amb un alt percentatge d'imaduresa amb fragments d'epidídim de les diferents regions. Es va observar que el percentatge d'espermatozoides madurs augmentava significativament en caput i corpus després de 24 h d'incubació respecte als controls. Així es pot concloure que la coïncubació d'espermatozoides ejaculats amb fragments d'epidídim de les regions de caput i corpus indueix la migració de la gota citoplasmàtica.

Paraules clau: espermatozoides, epidídim, coïncubació, morfologia espermàtica, porcí.

Abstract

Previous reports have demonstrated that epididymal spermatozoa can be *in vitro* matured after both co-culturing with epididymal cell monolayers and co-incubating with epididymal explants. The aim of the present study was to determine the effects of co-incubating of ejaculated spermatozoa from low sperm quality ejaculates with epididymal explants on sperm quality for a 24 h period. Since it was observed that the percentage of mature spermatozoa significantly increases in caput and corpus after 24 h of co-incubation, we can conclude that epididymal explants from caput and corpus are able to promote the migration of cytoplasmic droplet in the boar ejaculated spermatozoa.

Key words: spermatozoa, epididymis, co-incubation, sperm morphology, porcine.

INTRODUCCIÓ

La morfologia dels espermatozoides és un paràmetre molt important en la valoració de la qualitat espermàtica d'una ejaculació tant en humans (Kruger *et al.*, 1986), com en altres espècies de mamífers com el porc (Alm *et al.*, 2006). Per això, en els espermogrames convencionals, s'examinen els percentatges d'espermatozoides madurs, immadurs i aberrants mitjançant l'anàlisi microscòpica del semen. En l'espècie porcina, quan el percentatge d'espermatozoides immadurs és superior al 25 %, es creu que hi pot haver una disfunció epididimària deguda a múltiples factors (Pruneda *et al.*, 2005).

La presència d'una gota citoplasmàtica a la peça intermèdia és un tret característic dels espermatozoides immadurs. Estudis previs han demostrat que el cocultiu homòleg *in vitro* d'espermatozoides epididi-

maris amb cèl·lules epitelials de l'epidídim indueix la migració de la gota citoplasmàtica després de 24 h (Bassols *et al.*, 2005). D'altra banda, en alguns estudis s'han trobat indicis que la coïncubació d'espermatozoides epididimaris amb fragments d'epidídim també promou la migració de la gota citoplasmàtica (Bassols *et al.*, 2006).

Així doncs, l'objectiu d'aquest estudi era determinar els efectes de la coïncubació d'espermatozoides ejaculats amb fragments de les diferents regions de l'epidídim (caput, corpus i cauda) durant un període de 24 h sobre la morfologia espermàtica.

MATERIAL I MÈTODES

Obtenció i preparació dels fragments d'epidídim

Els epidídims es van obtenir de mascles reproductors porcins postpuberals de la raça Piétrain i un cop al laboratori es van separar en tres regions diferents: caput, corpus i cauda. De cada regió se'n van fer 200 fragments de 5 mm de longitud i es van centrifugar dues vegades a 500 g durant 2 min. Posteriorment, es van col·locar en flascons amb medi de cultiu ECM (medi 199 suplementat amb 10 % FCS, 0,5 % fungicida, 1 % estreptomicina/penicil·lina i 0,1 % transferina) i es van incubar a 37,5 °C i atmosfera de CO₂ al 5 % durant 24 h.

Obtenció i preparació de les mostres seminals

Les mostres seminals es van obtenir de mascles Piétrain i es van enviar diluïdes (1:5, v/v) amb un diluent de llarga durada. Es van centrifugar durant 3 min a 640 g i el precipitat obtingut es va resuspendre amb medi TYR+EGTA (NaCl 116 mM, KCl 3,1 mM, MgSO₄ 0,4 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, HEPES 20 mM, kanamicina 100 µg/ml, glucosa 5 mM, lactat sòdic 21,7 mM, piruvat sòdic 1 mM, BSA 3 mg/ml, EGTA 1 mM).

Disseny experimental

Passades les 24 hores d'incubació, es va substituir el medi ECM dels flascons per 60 ml de la mostra d'espermatozoides, prèviament diluïts en medi TYR+EGTA fins a una concentració de 1·10⁸ cèllu-

les/ml. Com a control negatiu es va utilitzar el medi de coïncubació sense fragments, i com a control positiu un cocultiu obtingut a partir d'espermatozoides i un cultiu confluent de cèl·lules epitelials de ronyó (LLC-PK1). Es van incubar tots els flascons a 37,5 °C i atmosfera de CO₂ al 5 % durant 2, 4, 6 i 24 h. En tots aquests temps es van extreure al·lquotes per fer l'anàlisi de la morfologia i la viabilitat espermàtiques.

Anàlisi de la morfologia espermàtica

La morfologia espermàtica es va avaluar mitjançant un sistema d'anàlisi computada del semen; concretament, es va utilitzar el programa Sperm Class Analyser SCA®2002 Production Module, Microptic, Barcelona. Les mostres es van observar a 200 augmentes i es van fer tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun. Els espermatozoides es van classificar com a madurs, immadurs i aberrants.

Anàlisi de la viabilitat espermàtica

La viabilitat espermàtica es va valorar mitjançant un marcatge múltiple amb fluorocroms (Bussalleu *et al.*, 2005). Per a cada mostra, es van fer tres recomptes de 200 espermatozoides cadascun al microscopi d'epifluorescència (Zeiss AxioImager Z1) a 400 augmentes. Els espermatozoides considerats com a viables eren els que presentaven el nucli, l'acrosoma, la beina mitocondrial i la membrana plasmàtica intactes.

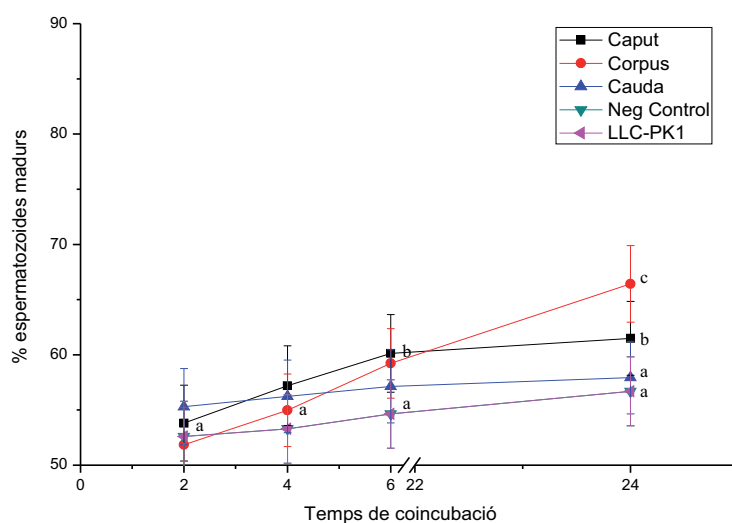


Figura 1. Percentatge d'espermatozoides madurs durant el període de coïncubació. Els superíndexs (a, b i c) indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) entre tractaments

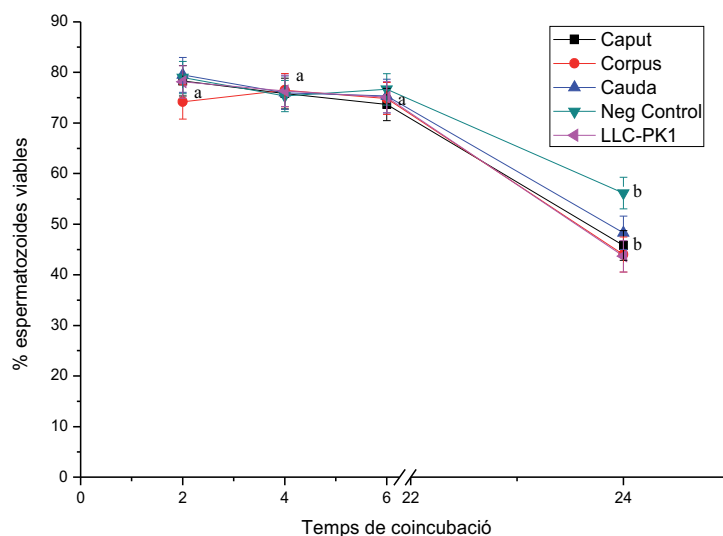


Figura 2. Percentatge d'espermatozoides viables amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes durant el període de coincubació. Els superíndexs (a i b) indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) entre tractaments

Anàlisi estadística dels resultats

Cadascun dels experiments de coincubació (rèplica) es va considerar com a cas estadístic ($n = 10$). Els resultats obtinguts com a percentatges (x) van ser prèviament estandarditzats mitjançant la transformació $\arcsin \sqrt{x}$. Per a l'anàlisi estadística dels resultats es va utilitzar el test ANOVA de mesures repetides d'un factor i el test post-hoc de Scheffé inclòs en el programa estadístic SigmaStat versió 3.5 per a Windows (Systat Software, Inc., San José, Richmond, Califòrnia, EUA). El nivell de significació (α) es va establir amb $P < 0,05$.

Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana (SEM).

RESULTATS

La figura 1 mostra el percentatge d'espermatozoides madurs (mitjana \pm SEM) durant tot el temps de coincubació. Després de 24 h d'inici de l'experiment, es va observar un augment significatiu ($P < 0,05$) del percentatge d'espermatozoides madurs al corpus i al cauda ($61,48 \pm 3,35$ i $66,42 \pm 3,46$, respectivament) respecte al control ($53,28 \pm 2,74$). Al mateix temps es va reduir el percentatge d'espermatozoides immadurs amb gota distal en els mateixos tractaments.

La viabilitat espermàtica (vegeu la figura 2) va disminuir de manera significativa en tots els tractaments després de 24 h de coincubació, sense que

s'observessin diferències significatives entre els tractaments dins del mateix període de temps.

DISCUSSIÓ

El trànsit dels espermatozoides a través de l'epidídim és un procés fisiològic molt important a fi que les cèl·lules espermàtiques adquireixin la capacitat fecundant (Cooper, 1999). En estudis previs s'ha vist que el cocultiu *in vitro* d'espermatozoides epididimaris amb cèl·lules epitelials cultivades de l'epiteli epididimari pot promoure la migració de la gota citoplasmàtica (Bassols *et al.*, 2005). El principal inconvenient d'aquest tipus de sistema de cocultiu és la desdiferenciació de les cèl·lules epitelials un cop el cultiu primari ha assolit un nombre de divisions determinat. Aquest inconvenient, que també s'observa en altres tipus cel·lulars però no en cèl·lules oviductals (Yeste *et al.*, 2008), explica la necessitat d'establir altres sistemes com la coincubació dels espermatozoides amb fragments del tub epididimari. Malgrat que aquest sistema tingui desavantatges, com ara la viabilitat reduïda de les cèl·lules epitelials que constitueixen el fragment, seria un mètode més idoni per a un estudi com el que es descriu en aquest text. Conseqüentment, i amb l'objectiu d'induir la maduració espermàtica dels espermatozoides ejaculats, es va dur a terme la coincubació d'espermatozoides amb fragments d'epidídim de diferents regions. S'observà que les regions del caput i el corpus promouien la

migració de la gota, mentre que aquest efecte no es va veure ni en el cauda ni en els controls positiu i negatiu.

Respecte a la viabilitat espermàtica, es va produir una reducció del percentatge d'espermatozoides viables després de 24 h de coïncubació. Així doncs, es pot concloure que la coïncubació d'espermatozoides ejaculats amb fragments d'epidídim de les regions del caput i del corpus indueix la migració de la gota citoplasmàtica, però cal millorar el sistema per tal d'augmentar la viabilitat després del temps de coïncubació.

BIBLIOGRAFIA

- ALM, K.; PELTONIEMI, O. A. T.; KOSKINEN, E.; ANDERSSON, M. (2006). «Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology». *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 210-213.
- BASSOLS, J.; KÁDÁR, E.; BRIZ, M.; PINART, E.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; CASAS, I.; DACHEUX, J. L.; BONET, S. (2005). «Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures». *Theriogenology*, 64: 1995-2009.
- (2006). «Migration of the cytoplasmic droplet in epididymal cultures of *Sus Scrofa*». *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 322.
- BUSSALLEU, E.; PINART, E.; YESTE, M.; BRIZ, M.; SANCHO, 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.
- COOPER, T. G. (1999). «Epididymis». A: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. [ed.]. *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 2. San Diego: Academic Press, 1-17.
- KRUGER, T. F.; MENKVELD, R.; STANDER, F. S.; LOMBARD, C. J.; MERWE, J. P. VAN DER; ZYL, J. A. VAN; SMITH, K. (1986). «Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization». *Fertility and Sterility*, 46: 1118-1123.
- PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M. D.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; KÁDAR, E.; BASSOLS, J.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. (2005). «Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars». *Theriogenology*, 63: 2219-2232.
- YESTE, M.; LLOYD, R. E.; BRIZ, M.; BADIA, E.; BONET, S.; HOLT, W. V. (2008). «Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro». *Anim. Reprod. Sci.*, DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.08.018.