

## EFFECTES DE LA FILTRACIÓ AMB GRANADURA SOBRE LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE DOSIS SEMINALS DE PORCÍ DE BAIXA QUALITAT ESPERMÀTICA

Eva Bussalleu, Elisabeth Pinart, Mailo Briz, Sílvia Sancho, Marc Yeste, Isabel Casas, Anna Fàbrega, Estela Garcia, Marta Puigmulé i Sergi Bonet

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

17071 Girona. [eva.bussalleu@udg.edu](mailto:eva.bussalleu@udg.edu).

### Resum

L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un mètode per millorar la qualitat espermàtica d'ejaculacions de mascles reproductors Piétrain afectats per astenospèrmia, astenoteratospèrmia i teratospèrmia. Les dosis seminals es van filtrar en columnes de granadura (10 + 0,5 cm) amb un flux de sortida d'1 ml / 40 s. Per cada mascle es van filtrar 10 ml de la fracció rica de l'ejaculació, diluïda 1:6. La qualitat espermàtica es va analitzar abans i després de la filtració. La morfologia, la concentració i la motilitat espermàtica es van avaluar utilitzant el programa informàtic SCA®2002 Producció, mentre que la viabilitat espermàtica es va valorar amb una múltiple tinció fluorocromica. Els resultats indiquen que la filtració en columnes de granadura és un mètode efectiu per a la millora de la qualitat espermàtica de mascles reproductors Piétrain que presenten baixa qualitat espermàtica.

**Paraules clau:** dosi seminal, ejaculacions amb baixa qualitat espermàtica, filtració en columna, granadura, qualitat espermàtica.

### Abstract

The aim of this work is to develop a method to enhance the sperm quality of low sperm quality ejaculates from Piétrain boars affected by asthenospermia, asthenoteratospermia and teratospermia. Seminal doses were filtered through columns of glass beads (length 10 + 0.5 cm) with an exit flow rate of 1 ml / 40 s. For each male 10 ml of the sperm cell-rich fraction, diluted at 1:6, were filtered. Sperm quality was assessed before and after filtration. Sperm morphology, sperm motility and sperm concentration were determined using the computer program SCA®2002 Production and, sperm viability was evaluated by fluorescence multistaining. Results show that filtration through glass beads columns is an effective method for enhancing the sperm quality of Piétrain boars with low sperm quality.

**Key words:** seminal dose, low sperm quality ejaculates, column filtering, glass beads, sperm quality.

## INTRODUCCIÓ

L'èxit dels processos d'inseminació artificial (IA) està determinat bàsicament per la qualitat dels gàmetes. En els mascles d'alt interès genètic, però que presenten ejaculacions de baixa qualitat, cal aplicar mètodes de selecció d'espermatozoides funcionals de l'ejaculació (Morrell, 2006). Entre tots els mètodes disponibles cal escollir aquell que permeti l'obtenció de dosis seminals de major qualitat i concentració espermàtica, ja que entre el procés de recollida del semen i la IA hi ha una gran pèrdua d'espermatozoides viables (Anzar i Graham, 1995).

En mamífers, s'han desenvolupat diversos mètodes per millorar la qualitat espermàtica abans de la

IA. Entre d'altres, es poden destacar tècniques com el *swim-up* (Morrell, 2006), els gradients de Percoll (Somfai *et al.*, 2003) i la filtració amb substàncies adhesives com llana de vidre (Mogas *et al.*, 1998), Sephadex neutre (Bussalleu *et al.*, 2008) o granadura (Foote, 2001; Klinc *et al.*, 2005). L'eficiència d'aquests mètodes varia segons les espècies. Així doncs, en humans, la filtració de semen a través de granadura comporta un augment de la motilitat progressiva, de la viabilitat i de la capacitat fecundant dels espermatozoides (Daya i Gwatkin, 1987). En equins també s'ha demostrat que la filtració en granadura és efectiva per a la millora de la qualitat espermàtica (Klinc *et al.*, 2005).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar l'efecte

de la filtració en granadura sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals de mascles porcins afectats per astenospèrmia, ateneratospèrmia i teratospèrmia.

## MATERIAL I MÈTODES

En aquest treball es van utilitzar 46 mascles porcins postpuberals i amb baixa qualitat espermàtica de la raça Piétrain, procedents de les empreses Semen Cardona (Cardona, el Bages) i Selecció Batallé (Riudarenes, la Selva).

Atenent als criteris establerts per Bonet *et al.* (1995), els mascles es van classificar com a: mascles astenospèrmics ( $n = 7$ ), amb baixa motilitat espermàtica; mascles asteneratospèrmics ( $n = 6$ ), amb baixa motilitat i una baixa freqüència d'espermatozoides madurs; mascles teratospèrmics amb  $> 10\%$  d'anomalies cefàliques ( $n = 22$ ); mascles teratospèrmics amb  $> 10\%$  d'anomalies a la cua ( $n = 3$ ) i mascles teratospèrmics amb  $> 8\%$  d'anomalies cefàliques i  $> 10\%$  anomalies de la cua ( $n = 8$ ).

Les mostres de semen es van obtenir pel mètode de la munta sobre maniquí i masturbació manual. La fracció espermàtica recollida es va diluir a la proporció 1:6 amb diluent BTS (Tecnovit, Espanya) i es van transportar refrigerades des de les instal·lacions de Selecció Batallé i Semen Cardona al Laboratori de Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana de la Universitat de Girona. Al laboratori les dosis seminals es van filtrar en columnes de granadura (Sigma) amb les següents condicions de treball:  $10 + 0,5$  cm d'alçada del llit,  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura al laboratori i un flux de sortida de  $1\text{ ml} / 40\text{ s}$ . Les dosis seminals filtrades es van eluir amb  $40\text{ ml}$  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 (% total d'espermatozoides mòbils) i la morfologia espermàtica es va emprar el programa informàtic SCA®2002 Producció (Microptic, Barcelona, versió 2003). L'estudi de la viabilitat espermàtica es va basar en la valoració conjunta de l'estat del nucli, de la membrana plasmàtica, de l'acrosoma i la integritat de la beina mitocondrial mitjançant el mètode de la múltiple tinció fluorocròmica (Bussalleu *et al.*, 2005). Per a l'anàlisi estadística es va emprar el test ANOVA (SPSS per a Windows, versió 14.0) amb un nivell de significació de  $P < 0,05$  i amb transformació arcsinus prèvia ( $\sqrt{x/100}$ ) per a les variables.

## RESULTATS

En els mascles astenospèrmics, la filtració a través de columnes de granadura provocà un augment de la freqüència d'espermatozoides madurs i una disminució de la freqüència d'espermatozoides aglutinats ( $P < 0,05$ ), però no va afectar ni la motilitat, la viabilitat ni la concentració espermàtica ( $P > 0,05$ ). Després de la filtració de dosis seminals de mascles teratospèrmics amb anomalies cefàliques en columnes de granadura, es va observar un augment de la freqüència d'espermatozoides madurs i una disminució de la freqüència d'espermatozoides aglutinats i d'espermatozoides amb anomalies cefàliques ( $P < 0,05$ ). Per contra, el procés de filtració va causar un descens significatiu de la concentració espermàtica ( $P < 0,05$ ) però no va afectar ni la freqüència d'espermatozoides mòbils ni la de viables ( $P > 0,05$ ). En els mascles teratospèrmics amb  $> 8\%$  d'anomalies cefàliques i  $> 10\%$  d'anomalies de la cua, després de la filtració s'incrementà la freqüència d'espermatozoides madurs i va disminuir la freqüència d'espermatozoides amb gota distal ( $P < 0,05$ ), mentre que la resta de paràmetres analitzats no variaren entre abans i després de la filtració ( $P > 0,05$ ).

En els mascles asteneratospèrmics i els mascles teratospèrmics amb anomalies a la cua, la filtració en columnes de granadura no va afectar la motilitat, la viabilitat, la concentració ni la morfologia espermàtica ( $P > 0,05$  en tots els casos).

## DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha testejat l'efecte de la filtració a través de columnes de granadura sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals de mascles reproductors Piétrain afectats d'astenospèrmia, asteneratospèrmia i teratospèrmia. En tots els grups s'observà una disminució de la concentració espermàtica, mentre que la viabilitat es va mantenir constant després de la filtració. La pèrdua d'espermatozoides després del procés de filtració s'ha descrit per a diferents espècies, com ara cavalls (Sieme *et al.*, 2003), toros (Januskauskas *et al.*, 2005) i porcs (Bussalleu *et al.*, 2008).

En aquest estudi, els espermatozoides viables eren aquells que presentaven el nucli, la membrana plasmàtica, la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes. Després de la filtració en les columnes de granadura no es va observar, en cap dels grups estudiats, que la filtració induís la reacció acrosòmica o afectés la integritat de les membranes o del DNA. En estu-

Taula 1. Grups de mascles

Paràmetre	Astenoespèrmics (n = 7)		Astenoaterospèrmics (n = 6)		Teratospèrmics amb anomalies cefàliques (n = 22)		Teratospèrmics amb anomalies a la cua (n = 3)		Teratospèrmics amb anomalies cefàliques i a la cua (n = 8)	
	Dosi no filtrada	Dosi filtrada	Dosi no filtrada	Dosi filtrada	Dosi no filtrada	Dosi filtrada	Dosi no filtrada	Dosi filtrada	Dosi no filtrada	Dosi filtrada
<b>Motilitat espermàtica</b> % spz. mòbils	67,69 % ± 12,60	57,26 % ± 22,19	71,47 % ± 7,09	65,85 % ± 17,74	89,17 % ± 5,03	79,46 % ± 11,45	91,67 % ± 4,02	74,83 % ± 10,59	87,80 % ± 5,56	82,43 % ± 8,16
<b>Viabilitat espermàtica</b> % spz. VBBAB	78,71 % ± 3,32	78,57 % ± 6,56	77,28 % ± 5,81	81,44 % ± 3,12	78,70 % ± 4,38	82,35 % ± 3,74	81,22 % ± 3,87	80,55 % ± 3,24	77,71 % ± 4,44	82,96 % ± 3,12
<b>Morfologia espermàtica</b> % spz. madurs	88,95 % ± 3,30	94,33 % ± 2,32 <sup>a</sup>	74,89 % ± 11,08	84,50 % ± 6,94	74,79 % ± 7,00	86,43 % ± 4,69 <sup>a</sup>	72,44 % ± 6,08	80,22 % ± 2,71	65,75 % ± 6,10	81,58 % ± 4,68 <sup>a</sup>
% spz. amb anomalies cefàliques	3,71 % ± 1,32	2,67 % ± 1,43	7,33 % ± 2,30	4,89 % ± 2,03	11,42 % ± 4,89	6,53 % ± 3,56 <sup>a</sup>	4,00 % ± 1,15	3,45 % ± 1,07	8,50 % ± 3,68	4,25 % ± 2,90
% spz. amb ano- malies a la cua	0,95 % ± 0,75	0,52 % ± 0,74	3,17 % ± 2,56	2,11 % ± 1,89	1,53 % ± 1,24	0,92 % ± 1,28	12,22 % ± 4,91	10,44 % ± 4,62	15,21 % ± 7,96	9,42 % ± 5,30
% spz. amb gota proximal	1,62 % ± 1,16	0,52 % ± 0,84	2,61 % ± 0,93	1,94 % ± 1,60	4,18 % ± 2,45	2,29 % ± 2,35	1,22 % ± 1,26	1,22 % ± 2,12	0,87 % ± 0,73	0,54 % ± 0,40
% spz. amb gota distal	2,00 % ± 1,89	0,81 % ± 1,45	9,67 % ± 10,91	4,50 % ± 5,20	5,95 % ± 6,65	2,86 % ± 4,42	6,89 % ± 3,34	2,33 % ± 1,15	6,00 % ± 3,97	2,13 % ± 1,71 <sup>a</sup>
% spz. aglutinats	2,76 % ± 1,09	1,14 % ± 0,88 <sup>a</sup>	2,34 % ± 1,18	2,06 % ± 1,26	2,12 % ± 0,86	0,97 % ± 0,64 <sup>a</sup>	3,22 % ± 0,20	2,33 % ± 1,15	3,67 % ± 1,71	2,08 % ± 1,03
<b>Concentració espermàtica</b> (× 106 spz./ml)	1031,14 ± 550,47	570,86 ± 347,48	928 ± 192,62	733,50 ± 274,92	1495,45 ± 542,80	981,82 ± 479 <sup>a</sup>	1796,33 ± 179,81	987 ± 325,54	1377 ± 401,80	978,75 ± 596,81

Els resultats s'expressen com la mitjana % ± SD.

<sup>a</sup>Diferències significatives entre les dosis no filtrades i les dosis filtrades en granadura ( $P < 0,05$ )

dis similars amb boví, però, la filtració amb granadura incrementava la freqüència d'espermatozoides viables (Foote, 2001). Així doncs, les diferències entre els nostres resultats i els obtinguts en altres treballs poden ser degudes a la tècnica utilitzada per a l'avaluació de la viabilitat espermàtica. En la majoria d'estudis, la permeabilitat de la membrana, la integritat del DNA i l'estat de l'acrosoma s'analitzen de manera independent. Per contra, en aquest treball l'estat d'aquests paràmetres s'estudia simultàniament. Conseqüentment, l'anàlisi mitjançant la múltiple tinció amb fluorocroms és més restrictiva que l'avaluació independent, ja que només es consideren viables aquells espermatozoides amb la membrana plasmàtica, el nucli, la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes.

Respecte a la millora de la morfologia espermàtica, els millors resultats s'observen en les dosis seminals que abans de la filtració presenten més d'un 15 % d'espermatozoides aberrants. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per Grahma i Graham (1990) en boví; segons aquests autors, l'efectivitat de la columna en la millora de la morfologia esper-

màtica està inversament correlacionada amb la qualitat espermàtica. També en equins, la filtració de semen a través de columnes de granadura ocasiona una millora de la morfologia espermàtica (Klinc *et al.*, 2005).

En conclusió, segons els resultats obtinguts en aquest estudi, malgrat que hi hagi una pèrdua de concentració espermàtica, les columnes de granadura són efectives per millorar la qualitat espermàtica de mascles reproductors Piétrain que presenten una baixa qualitat espermàtica abans dels processos d'inseminació artificial o de criopreservació.

## BIBLIOGRAFIA

- ANZAR, M.; GRAHAM, E. F. (1995). «Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen». *Theriogenology*, 43: 439-449.
- BONET, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; CAMPS, R.; FRADERA, A.; CASADEVALL, M. (1995). «Light microscopy characterization of sperm morphology». *Microsc. Anal.*, 9: 29-31.
- BUSSALLEU, E.; PINART, E.; RIVERA, M. M.; ARIAS,

- X.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCÍA-GIL, N.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; YESTE, M.; CASAS, I.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S.; (2008). «Effects of filtration of semen doses from low sperm quality ejaculates boars through new ter Sephadex columns». *Reprod. Domest. Anim.*, 43: 48-52.
- 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 of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa». *Micros. Res. Tech.*, 68(5): 277-283.
- DAYA, S.; GWATKIN, R. B. (1987). «Improvement in semen quality using glass bead column». *Arch. Androl.*, 18(3): 241-244.
- FOOTE, R. H. (2001). «Inhibition of sperm motility does not affect live-dead separation of bull sperm by glass beads». *Asian. J. Androl.*, 3: 197-204.
- GRAHAM, E. F.; GRAHAM, J. K. (1990). «The effect of whole ejaculate filtration on the morphology and fertility of bovine semen». *J. Dairy Sci.*, 73: 91-97.
- JANUSKAUSKAS, A.; LUKOSEVICIUTE, K.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2005). «Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation». *Theriogenology*, 63: 160-178.
- KLINC, P.; KOSEC, M.; MAJDIC, G. (2005). «Freezability of equine semen after glass beads column separation». *Equine Vet. J.*, 37(1): 43-47.
- MOGAS, T.; RIGAU, T.; PIEDRAFITA, J.; BONET, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (1998). «Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen». *Theriogenology*, 50: 1171-1189.
- MORRELL, J. M. (2006). «Update on semen technologies for animal breeding». *Reprod. Domest. Anim.*, 41(1): 63-67.
- SOMFAI, T.; BODO, S.; NAGY, S.; PAPP, A. B.; IVANCICS, J.; BARANYAI, B.; GOCZA, E.; KOVACS, A. (2003). «Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa». *Reprod. Dom. Anim.*, 37(5): 285-290.