

## LA SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES POR LAS CÉLULAS OVIDUCTALES MODIFICA LOS PARÁMETROS DE FECUNDACIÓN *IN VITRO*

López-Úbeda, R. y Matás, C.

Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus *Mare Nostrum*, 30100 Murcia. cmatas@um.es

### INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se han producido numerosos avances en el campo de la maduración y fecundación *in vitro* en la especie porcina. Sin embargo, aún existen una serie de problemas asociados a esta especie que impiden que el rendimiento de los sistemas de FIV sea plenamente satisfactorio. Actualmente se considera que la causa principal del bajo éxito de la producción de embriones en esta especie son las fecundaciones polispermicas.

El oviducto tiene un papel significativo en el proceso reproductivo de los mamíferos, ya que proporciona un ambiente apropiado para el transporte de gametos, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Hunter, 2005). *In vivo*, la interacción entre los espermatozoides y las células oviductales es una de las fases finales de la maduración, ya que además de tener una gran importancia en la selección espermática (Gualtiere y Talevi 2003) le confiere al espermatozoide la habilidad de penetrar el ovocito al modular la capacitación espermática (Hunter, 1984).

En la especie porcina, estudios *in vitro* han mostrado que la incubación de espermatozoides sobre cultivos de células epiteliales del oviducto tiene un efecto beneficioso sobre la fecundación de ovocitos madurados *in vitro*, aunque con esta metodología se reduce la tasa de monospermia (Romar et al., 2001). Las células oviductales *in vitro* no sólo unen los espermatozoides, sino que también prolongan su viabilidad y su capacidad fecundante (Pollard et al., 1991) al disminuir su estado de capacitación. Diversos estudios han demostrado, *in vitro*, que los espermatozoides unidos a las células oviductales presentan bajos niveles de fosforilación en tirosina y de calcio intracelular (Petrunkina et al., 2001; 2003; Zumoffen et al., 2010). Sin embargo, y bajo nuestro conocimiento, no hemos encontrado en la literatura ningún estudio en el que se analice la capacidad fecundante de los espermatozoides que no se adhieren o no son seleccionados por las células oviductales. No obstante, los espermatozoides que tras ser incubados en las células oviductales no se unen a ellas presentan un alto grado de fosforilación de proteínas en la cabeza espermática (López-Úbeda et al., 2012).

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la capacidad fecundante de los espermatozoides seleccionados por las células del oviducto difería de la población no seleccionada bajo condiciones *in vitro*.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y cultivo de células epiteliales de oviducto: los oviductos se obtuvieron a partir de genitales de cerdas procedentes de matadero. Fueron transportados al laboratorio en un recipiente atemperado a 37°C. En el laboratorio se lavaron en solución de cetramida (Cetab) y posteriormente en suero salino fisiológico atemperado. Sobre una placa de Petri, bajo condiciones estériles, se procedió a la disección del oviducto separándolo de los tejidos adyacentes, así como del ovario. La obtención de las células epiteliales del oviducto se realizó por compresión del mismo, desde la región del istmo hasta la ampolla. El contenido se recogió sobre una placa de Petri con medio TCM-199 equilibrado, las células se disgregaron. Tras varios lavados, las células se resuspendieron en medio TCM-199 fresco y se sembraron en placas de Petri a 38°C con 5% CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada. Transcurridos 3 días desde la siembra, se retiró el medio con las células no adheridas y se reemplazó por medio TCM-199 fresco. El proceso se repitió cada 2 días hasta la total confluencia de las células en una monocapa, aproximadamente unos 7 días. Con cada cambio de medio se comprobó la ausencia de contaminación y el crecimiento celular.

Obtención de ovocitos y maduración *in vitro*: los ovocitos se obtuvieron mediante la aspiración de folículos ováricos de 3-6 mm de diámetro, de ovarios procedentes de matadero. El contenido folicular se recogió en tubos estériles y se dejó sedimentar durante 5

minutos. El sedimento se lavó con PBS atemperado y se seleccionaron los complejos cúmulo-ovocito (COC). Una vez seleccionados se lavaron en PBS y dos veces en medio NCSU-37 suplementado con fluido folicular porcino y equilibrado a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y atmosfera saturada de humedad durante 2 horas. El cultivo se realizó en pocillos de 500 µl en grupos 50 COC, suplementados con 10 µl de PMSG/HCG y 10 µl de AMPc. Pasadas 20 horas de cultivo, fueron trasferidos a medio NCSU-37 libre PMSG, HCG y AMPc y se cultivaron durante 20-22 horas más (Funahashi y Day, 1993).

Procesado espermático: el procesado se realizó a través de gradientes de Percoll® (Pharmacia, Uppsala, Sweden), mediante una columna de doble banda (45% Percoll® sobre 90% Percoll®) sobre la que se depositaron 0.5 ml de eyaculado. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 700g durante 30 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en medio TALP previamente equilibrado, tras lo cual se centrifugó nuevamente a 700g durante 10 minutos, el pellet final se resuspendió en medio TALP ajustando la concentración a 1x10<sup>6</sup> células/ml.

La incubación de los espermatozoides (1x10<sup>6</sup> spz/ml) sobre las células oviductales se realizó en medio TALP durante 30 minutos a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y atmosfera saturada de humedad. Transcurrido este tiempo se obtuvieron los espermatozoides no adheridos y las placas se lavaron con medio TALP fresco y se dejaron preparadas para hacer la FIV.

La fecundación *in vitro* se realizó en placas de Petri de 2 ml con 25 ovocitos por placa. Los espermatozoides utilizados fueron: los lavados sin incubar en células oviductales (grupo control), los NU (lavados no unidos a las células oviductales tras 30 minutos de incubación) y los U (espermatozoides unidos, esta FIV se realizó lógicamente sobre las células que se encontraban adheridas a las placas). Pasadas 16-18 horas del cocultivo se evaluaron los diferentes parámetros de FIV: porcentaje de penetración, número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida, número de espermatozoides por ovocito penetrado, tasa de monospermia, número de espermatozoides descondensados y formación de pronúcleo masculino. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y se les realizó una prueba post hoc (Tukey) aquellos que mostraron diferencias significativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se observan en la tabla 1. En ella podemos ver que la penetración fue significativamente diferente entre los tres grupos de estudio, siendo muy superior (94,9%) para los espermatozoides unidos a las células oviductales (U). Esto podría ser debido, al igual que ocurre *in vivo*, a que las células oviductales son capaces de seleccionar aquellos espermatozoides con mejores condiciones para la fecundación (Petrunkina et al., 2001; 2003; Zumoffen et al., 2010), aunque posiblemente existan algunos factores secretados por las células (Nagai y Moor, 1990) capaces de incrementar este parámetro. El porcentaje de penetración para el grupo U fue incluso superior al grupo control, en el cual se encuentra toda la población espermática. Igualmente, se observa que el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida fue mayor para el grupo U que para el resto. Sin embargo, a pesar de que la unión a la zona fue mayor en el grupo U, el número de espermatozoides por ovocito fue similar al control y superior al grupo NU. El valor más alto de monospermia y más bajo de penetración se encontró en el grupo NU. Además, el número de espermatozoides que se encontraban en estadio de descondensación nuclear para este grupo (NU) fue inferior al resto. Este resultado refuerza la hipótesis de que los espermatozoides no seleccionados por las células oviductales puedan tener alguna alteración que, además de afectar a su capacidad fecundante, les impida la descondensación nuclear. Sin embargo, esta hipótesis podría estar equivocada ya que la formación del pronúcleo masculino se produjo en todos los grupos estudiados.

Como conclusión de este trabajo podemos decir que las células oviductales seleccionan la subpoblación espermática con mayor capacidad para penetrar a los ovocitos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Funahashi, H. & Day, B.N. 1993. J. Reprod Fertil. 98:179-185.
- Gualtiere, R. & Talevi, R. 2003. Reproduction. 125: 251-258.
- Hunter, R.H. 2005. Reprod Nutr Dev. 45:281-290.
- Hunter, R.H. 1984. J Reprod Fertil. 72 (1): 203-21.
- López-Úbeda, R. & Matás, C. 2012. Reproduction, Fertility and Development. 25(1): 270. doi:10.1071/RDv25n1Ab245.
- Nagai,

T. & Moor, R.M. 1990. *Mol Reprod Dev.* 26:377-382. • Petrunkina, A.M., Friedrich, J., Drommer, W., Bicker, G., Waberski, D. & Töpfer-Petersen, E. 2001. *Reproduction.* 122: 469-480. • Romar, R., Coy, P., Campos, I., Gadea, J., Matás, C. & Ruiz, S. 2001. *Anim Reprod Sci.* 68:85-98. • Zumoffen, C.M., Caille, A.M., Munuce, M.J., Cabada, M.O. & Ghersevich, S.A. 2010. *Human Reproduction.* 25:1504-1512.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue financiado por Fundación Séneca 08752/PI/08 y MICINN-FEDER (AGL 2009-12512-C02-01-02).

**Tabla 1.** Resultados de FIV obtenidos a partir de espermatozoides incubados en células oviductales: Control (espermatozoides no incubados), NU (espermatozoides no unidos a las células oviductales tras 30 minutos de incubación), U (espermatozoides unidos a las células oviductales tras 30 minutos de incubación).

TRATAMIENTO	N	PEN %	SPZ/ZP	SPZ/O	MON %	DES
Control	135	62,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	25,6 ± 1,7 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	9,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,1 ± 0,5 <sup>a</sup>
NU	270	19,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	12,3 ± 0,7 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	35,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>b</sup>
U	219	94,9 ± 0,1 <sup>c</sup>	52,9 ± 2,6 <sup>c</sup>	6,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	14,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,4 <sup>a</sup>

a,b,c: Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

N: número de ovocitos. PEN%: porcentaje de penetración. SPZ/ZP: número medio de espermatozoides unidos a la zona pelúcida. SPZ/O: número medio de espermatozoides por ovocito penetrado. MON%: tasa de monospermia. DES: número medio de espermatozoides descondensados.

#### SPERM SELECTION BY OVIDUCTAL CELLS CHANGES THE PARAMETERS OF IN VITRO FERTILIZATION (IVF)

**ABSTRACT:** The polyspermy is a major problem associated with in vitro fertilization in pigs. In vivo, the adhesion between sperm and OEC allows maintenance sperm viability, motility and fertile life span, because the oviduct modulates and control sperm capacitation until the time of ovulation. The spermatozoa bound to OEC appear to be an uncapacitation status. In vitro studies have shown that the cultured of oviduct epithelial cells have a beneficial effect on oocytes fertilization. The aim of this study was to evaluate whether the fertilizing capacity of sperm selected by oviduct cells differed from those not selected under in vitro conditions. Ejaculated sperm were incubated in oviductal cells, after which time sperm that were not bound to the oviductal cells (NU) and the sperm bound (U) were used for IVF. As IVF control were used sperm washed through Percoll®. The results of in vitro fertilization show an increase in penetration and in number of spermatozoa bound to the zona pellucida, for sperm bound to oviductal cells (U). The highest value of monospermy was found in NU group, but also showed the lowest value of nuclear descondensation. In conclusion oviductal cells select the sperm subpopulation more apt to penetrate oocytes.

**Keywords:** oviductal epithelial cells, in vitro fertilization, sperm.