



Universitat de Girona

**NEW INSIGHTS INTO BOAR SPERM FUNCTION AND  
SURVIVAL FROM INTEGRATED FIELD AND  
LABORATORY STUDIES**

**Marc YESTE OLIVERAS**

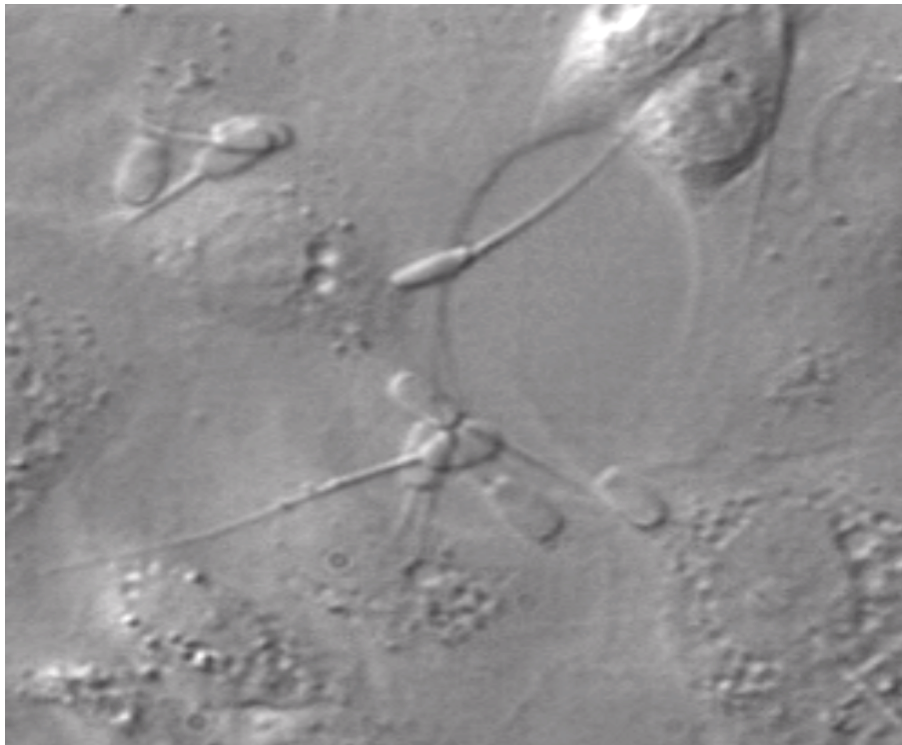
**ISBN: 978-84-692-1449-7**

**Dipòsit legal: GI-101-2009**



Universitat de Girona

**New insights into boar sperm function and survival  
from integrated laboratory and field studies**



Doctoral Thesis

**Marc Yeste Oliveras**

2008





Cell Biology Unit  
Department of Biology  
University of Girona

Doctoral Thesis

**New insights into boar sperm function and survival  
from integrated laboratory and field studies**

By

**Marc Yeste Oliveras**

**Supervisors**

Prof Sergi Bonet

Dr Maria Dolors Briz

Submitted to the Department of Biology and the Institute of Food and Agricultural Technology (INTEA) in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Girona with the “European Doctorate” mention

**2008**





Àrea de Biologia Cel·lular  
Departament de Biologia  
Universitat de Girona

Tesi Doctoral

# **New insights into boar sperm function and survival from integrated laboratory and field studies**

Marc Yeste Oliveras

## **Directors**

Dr. Sergi Bonet

Dra. Maria Dolors Briz

Memòria que presenta Marc Yeste Oliveras, inscrit al programa de doctorat de Ciències Experimentals i de la Salut, itinerari de Biotecnologia, per optar al grau de Doctor per la Universitat de Girona amb menció de “Doctorat Europeu”.

Marc Yeste Oliveras

Girona, 23 de juny de 2008





Àrea de Biologia Cel·lular  
Departament de Biologia  
Universitat de Girona

**Sergi Bonet Marull**, Catedràtic de l'àrea de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia de la Universitat de Girona, i **Maria Dolors Briz González**, Professora Titular de la mateixa Àrea i Departament,

**CERTIFIQUEN:**

Que el Llicenciat en Biologia Marc Yeste Oliveras ha dut a terme sota la seva direcció el treball que porta per títol *New insights into boar sperm function and survival from integrated laboratory and field studies*, que es presenta en aquesta memòria per optar al grau de Doctor per la Universitat de Girona amb menció de Doctorat Europeu.

I per a què consti als efectes oportuns, signen la present a Girona, el 23 de juny de 2008

Vist-i-plau dels directors de tesi

Dr. Sergi Bonet Marull  
Catedràtic de Biologia Cel·lular  
Departament de Biologia

Dra. Maria Dolors Briz González  
Professora Titular de Biologia Cel·lular  
Departament de Biologia







Institute of Zoology

LIVING CONSERVATION

To whom it may concern,

**William V. Holt**, Professor of Reproductive Biology at the Institute of Zoology, Zoological Society of London (ZSL),

**CERTIFIES:**

That the Doctoral Thesis entitled *New insights into boar sperm function and survival from integrated laboratory and field studies* by Marc Yeste Oliveras, to obtain the degree of Doctor of Philosophy at the University of Girona with the European Doctorate mention, has been partially carried out at the Institute of Zoology under his supervision during a research stay from January to June 2006.

London, 25<sup>th</sup> June 2008

Professor William V. Holt  
Institute of Zoology  
Zoological Society of London

*The Institute of Zoology is supported by the Higher Education Funding Council for England, in partnership with the University of Cambridge*





La realització d'aquest treball ha estat possible gràcies al suport del Ministeri d'Educació i Ciència (MEC), mitjançant la concessió d'una beca pre-doctoral del programa de formació del personal investigador (BES-2003-2298) i d'un ajut de la mateixa administració pública per fer una estada a l'estranger.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat duta a terme al Departament de Biologia de la Universitat de Girona i a l'*Institute of Zoology* de Londres.



*“Avant tout, il faut savoir poser les problèmes. Et quoi qu’on dise, dans la vie scientifique, les problèmes ne se posent pas tout seuls. C’est précisément ce sens du problème qui donne la marque du véritable esprit scientifique. Pour un esprit scientifique toute connaissance est une réponse à une question. S’il n’y a pas eu de question, il ne peut y avoir connaissance scientifique. Rien ne va de soi. Rien n’est donné. Tout est construit”* (Gaston Bachelard)

*“The only source of knowledge is experience”* (Albert Einstein)

*“I don’t mind your thinking slowly; I mind your publishing faster than you can think”* (Wolfgang Ernst Pauli)



---

## Agraïments

---

En el moment de donar per conclosa aquesta tesi, escric la part més difícil de totes i la que més he reflexionat i meditat, no només perquè aquestes línies seran molt probablement les més llegides de la tesi sinó també perquè em toca parlar de sentiments. Això tant i tant bonic que els éssers humans tenim, que ens fa riure i ens fa plorar, i que de vegades a alguns – entre els quals m’incloc – ens consta tant i tant d’expressar.

Sou moltes les persones que heu viscut de prop al meu costat aquesta tesi i sabeu prou bé el que m’ha costat de fer-la, el que he suat, el temps esmerçat i a tot el que he renunciat. Al darrera d’aquestes pàgines no només s’hi amaguen un conjunt de coneixements assolits i de tècniques adquirides sinó també, i això per a mi és el més important, hi sou tots vosaltres a qui haig d’agrair que hàgiu fet aquest llarg camí amb mi.

Per això, vull donar les gràcies en primer lloc al Prof. Sergi Bonet i a la Dra. Mailo Briz. Gràcies per la possibilitat d’haver-me deixat formar part del vostre grup de Recerca. Gràcies als dos per haver confiat en mi i gràcies per la llibertat i el suport personal que sempre m’heu donat.

A totes les meves companyes del grup de Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana de la Universitat de Girona: la Beth, la Sílvia, l’Elena, la Judit, l’Anna P., l’Eva, la Isabel, l’Anna F., la Marta, l’Estela i la Mònica. Per a totes no tinc sinó paraules boniques d’agraïment, perquè dia a dia m’heu demostrat que per damunt de tot vosaltres éreu el millor del nostre Grup. Crec que no us ho he dit mai, però us haig de confessar que haver treballat amb vosaltres ha estat més que un plaer i que em sento afortunat d’haver-vos tingut al meu costat. A totes avui ja no us puc dir només companyes, sinó també i sobretot amigues.

A l’Ignasi Colina, a en Xavier Barrera, a en Josep Reixach i a la Marta Guitart, gràcies pels bons moments que em vàreu fer passar quan era a Riudarenes i gràcies per la vostra predisposició i ajuda.



Al personal del Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona: en Jordi Blàvia, la Carme Carulla, en Vicenç Oliveras i la Tina Pedreró, vull agrair-los-hi la seva col·laboració en la observació al microscopi d'epifluorescència de les mostres marcades amb el mètode del triple marcatge.

Haig de donar també les gràcies a la Dra. Núria Cortadellas, a l'Almudena i a l'Anna dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona per la seva col·laboració en les proves preliminars del tercer capítol, sobre les variacions de la osmolalitat del medi.

A los profesores Dr. José Álvaro Cebrián-Pérez y Dra. Teresa Muiño-Blanco, y a la Dra. Patricia Grasa del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, tengo que agradecerles que pacientemente me enseñaran las técnicas de análisis de la capacitación espermática.

Quiero dar las gracias también a los profesores Dra. Pilar Coy, Dr. Joaquín Gadea, Dra. Carme Matás y Dr. Salvador Ruiz, del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, quienes calurosa y amablemente me acogieron en su grupo de investigación y me introdujeron en el mundo de los cultivos celulares.

Ich möchte auch meinem Deutschlehrer Jordi Sunyer für seine Hilfe bei der Korrektur von der Zusammenfassung danken.

I would like to thank my colleagues from the Institute of Zoology (Zoological Society of London) and from the Royal Veterinary College (University of London): Professor Paul F. Watson, Dr Roslyn Elliot, Dr Nana Satake, Dr Abdul Alhaider, Ms Daphne Green, Dr Claudia Carraro, Dr Nielendran Pratahalingam and Dr Katrien Van Look. Thanks for your immeasurable kindness and for making things so easy.

Je tiens à remercier Dr. Natalie Pettorelli qui me rendait des opportunités pour parler en Français à Londres, quand l'Anglais était trop. Merci aussi, Natalie, pour avoir réviser le Résumé de cette Thèse.

I give special thanks to Professor William V. Holt and, last but not least, to Dr Rhiannon Lloyd, for their guidance, their patience and their supervision. Without them, a large part of this thesis would not have been possible.

Bill, thanks for finding me a place in your group that will ever be my group as well. Since we met, you have always helped me when I needed your advice or anything else. I will always be grateful to you.

Thanks Rhi for all techniques you taught me and for sharing so many nice things. I will never forget those days spent in London and all our long talks in the lab about several protocols and research projects. Thanks for your help and for your friendship, supporting for whatever I needed. Thanks for giving me the choice to work with you and to share this fantastic experience.

I am also indebted to ‘my English Family’, Viv and Pete, Anna, Wallis, Asa and Vanessa. Thank you all for looking after me, for inviting me to parties and roast dinners. Thanks for considering me part of your family. Thanks for cheering me up, and for your kindness.

Als meus companys i amics del Departament de Biologia de la Universitat de Girona que com sempre us dic, i no em cansaré de repetir-vos-ho, sou el millor d’aquesta Universitat: Àlex nen, Àlex nena, Anna, Ariadna, Eva, Gela, Gerard, Jess, Marc, Marçal, Marta, Mireia, Montse, Olaya, Olga, Vicky, i Pere. Gràcies, de tot cor, a totes i a tots per tots els bons moments que m’heu fet passar; estic molt content d’haver-vos tingut com a companys i d’haver compartit tantes i tantes experiències amb vosaltres.

Als meus amics de sempre: l’Eduard, en Charly, en Josep Maria, i en Jordi. Gràcies pel vostre suport constant, per escoltar els meus problemes, per donar-me ànims contínuament, especialment quan més els necessitava, i per ajudar-me a desconnectar quan calia.

A la Núria, d’una manera especial, gràcies per la teva amistat al llarg de tots aquests anys, gràcies per escoltar-me i per tot el suport que m’has donat, i sobretot moltes “gràcies per ser-hi sempre”.

Gràcies al meu germà, Xavier, que sempre ha confiat en mi i que sempre hi ha sigut, a la Míriam, i a les meves nebodes, Alba i Júlia, que en els moments més durs tant personals com laborals han aconseguit arrancar-me un somriure i fer-me content i feliç amb el seu amor.

I, finalment, i d’una manera molt especial i molt important per a mi, gràcies als meus pares. Gràcies perquè a vosaltres us ho dec tot. Us dec, en primer lloc, que hàgiu fet tots els esforços que heu fet per donar-me l’educació que m’heu donat i us dec, també, que m’hàgiu encoratjat a fer el doctorat. Vosaltres sabeu tota la il·lusió i tot l’esforç que he posat en aquest projecte i el que m’ha costat d’arribar fins aquí. Per tot això avui us vull dir, sobretot a vosaltres dos, “moltes gràcies” perquè sense el vostre suport incondicional, sense el vostre amor i sense la vostra ajuda constant aquesta tesi no s’hauria dut a terme. Aquesta és doncs, també, la vostra Tesi.



*Al meu pare, que és el millor pare del món i de qui tant he après, perquè sempre m'encomana el seu optimisme i m'ensenya dia rere dia que estimar als altres és la millor teràpia per lluitar contra la malaltia.*

*A la meva mare, a qui sempre he admirat i admiro i que és per a mi un exemple de sacrifici, valentia i superació constant. No sé si ho saps, però tu també ets la millor mare del món.*

*Al meu germà, perquè és una de les poques persones que mai ha deixat de confiar en mi i mai ha deixat de donar-me ànims.*



---

# Summary Contents

---

	<i>Agraïments</i>	<i>Page</i>	xv
	Summary Contents		xxi
	Detailed Contents		xxiii
	List of Figures		xxvii
	List of Tables		xxix
	Abbreviations		xxxii
	<b>Thesis Outline</b>		<b>3</b>
	<b>Summary / Resum / Resumen / Résumé / Zusammenfassung</b>		<b>5</b>
Chapter I	<b>General Introduction</b>		<b>23</b>
Chapter II	<b>Assessment of sperm parameters</b>		<b>37</b>
Chapter III	<b>Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C</b>		<b>51</b>
	1 Introduction		53
	2 Objectives		73
	3 Material and methods		77
	4 Results		93
	5 General Discussion		167
	6 Conclusions		183
Chapter IV	<b>Spermatozoa and oviductal epithelial cells in co-culture</b>		<b>187</b>
	1 Introduction		189
	2 Objectives		227
	3 Material and methods		231
	4 Results		263
	5 General Discussion		355
	6 Conclusions		375
	<b>Concluding remarks</b>		<b>379</b>
	<b>Appendix in Catalan</b>		<b>383</b>
	<b>Bibliography</b>		<b>519</b>



---

# Detailed Contents

---

	<i>Agraïments</i>	<i>Page</i>	xv
	Summary Contents		xxi
	Detailed Contents		xxiii
	List of Figures		xxvii
	List of Tables		xxix
	Abbreviations		xxxii
	<b>Thesis Outline</b>		<b>3</b>
	<b>Summary</b>		<b>5</b>
	<i>Resum</i>		<b>7</b>
	<i>Resumen</i>		<b>11</b>
	<i>Résumé</i>		<b>15</b>
	<i>Zusammenfassung</i>		<b>19</b>
Chapter I	<b>General Introduction</b>		<b>23</b>
	<b>1 The domestic pig and the Piétrain breed</b>		<b>25</b>
	1.1 Introduction		25
	1.2 Morphologic characteristics of Piétrain pigs		26
	1.3 Productive characteristics of Piétrain pigs		27
	<b>2 Boar ejaculate and spermatozoon</b>		<b>27</b>
	2.1 The ejaculate		27
	2.2 The spermatozoon		29
	<b>3 Sperm quality</b>		<b>30</b>
	3.1 Sperm viability and acrosome and mitochondrial sheath integrity		31
	3.2 Sperm motility		34
	3.3 Sperm morphology		35
	3.4 Sperm agglutination		36
Chapter II	<b>Assessment of sperm parameters</b>		<b>37</b>
	<b>1 Sperm viability</b>		<b>39</b>
	1.1 Sperm viability (SYBR-14/EthD-1)		39



---

1.2	Sperm viability, mitochondrial sheath and acrosome integrity (triple-stain technique)	40
<b>2</b>	<b>Sperm capacitation</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>Sperm motility and concentration</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>Sperm morphology</b>	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>Sperm agglutination</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Acrosome-reacted sperm by phase contrast</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Osmotic resistance test (ORT)</b>	<b>49</b>
<b>Chapter III</b>	<b>Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C</b>	<b>51</b>
<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>53</b>
1.1	Pig reproduction: semen extenders and artificial insemination	55
1.2	Improvement of seminal doses and sperm quality	60
1.3	Concepts relating to osmolality	67
<b>2</b>	<b>Objectives</b>	<b>73</b>
<b>3</b>	<b>Material and methods</b>	<b>77</b>
3.1	Effects of the addition of prostaglandin F <sub>2α</sub> on sperm quality	79
3.2	Effects of the addition of hyaluronic acid and caffeine on sperm quality	82
3.3	Effects of osmolality changes on sperm quality and fertility prediction using osmotic resistance	84
<b>4</b>	<b>Results</b>	<b>93</b>
4.1	Article 1 Boar spermatozoa and prostaglandin F <sub>2α</sub> . Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F <sub>2α</sub> to the short-term extender over cooling time	95
4.2	Article 2 Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15°C	119
4.3	Article 3 The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its correlation with fertility and prolificacy	145
<b>5</b>	<b>General Discussion</b>	<b>167</b>
<b>6</b>	<b>Conclusions</b>	<b>183</b>
<b>Chapter IV</b>	<b>Spermatozoa and oviductal epithelial cells in co-culture</b>	<b>187</b>
<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>189</b>
1.1	The oviduct	191
1.2	Heat shock proteins, clusterin and the reproductive function	203
1.3	Gene silencing	212
<b>2</b>	<b>Objectives</b>	<b>227</b>
<b>3</b>	<b>Material and methods</b>	<b>231</b>
3.1	Culture methods	233
3.2	Co-culture and co-incubation methods	238

	3.3	DNA and RNA techniques	241
	3.4	<i>In vitro</i> effects of OEC co-culture and cell-CM on boar spermatozoa	249
	3.5	<i>In vitro</i> effects of spermatozoa on the gene expression of OEC	251
	3.6	Effects of <i>HSP90AA1</i> -silencing in oviductal epithelial porcine using siRNA on sperm viability after <i>in vitro</i> co-culture	253
	<b>4</b>	<b>Results</b>	<b>263</b>
	4.1	Article 4 Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival <i>in vitro</i>	265
	4.2	Article 5 Boar spermatozoa alter the gene expression of Heat Shock Proteins during <i>in vitro</i> homologous oviductal epithelial cell co-culture	295
	4.3	Article 6 <i>HSP90AA1</i> silencing in porcine OEC and effects on sperm viability after co-culture	323
	<b>5</b>	<b>General Discussion</b>	<b>355</b>
	<b>6</b>	<b>Conclusions</b>	<b>375</b>
		<b>Concluding remarks</b>	<b>379</b>
		<b>Appendix in Catalan</b>	<b>383</b>
Capítol I		<b>Introducció general</b>	<b>385</b>
	<b>1</b>	<b>L'espècie porcina i la raça Piétrain</b>	<b>387</b>
	1.1	Introducció	387
	1.2	Característiques morfològiques de la raça Piétrain	388
	1.3	Característiques productives de la raça Piétrain	389
	<b>2</b>	<b>L'ejaculació i l'espermatozoide de porcí</b>	<b>390</b>
	2.1	L'ejaculació	390
	2.2	L'espermatozoide	391
	<b>3</b>	<b>La qualitat espermàtica</b>	<b>392</b>
	3.1	Viabilitat espermàtica, integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma	393
	3.2	Motilitat espermàtica	396
	3.3	Morfologia espermàtica	397
	3.4	Aglutinació espermàtica	398
Capítol II		<b>Determinació dels paràmetres espermàtics</b>	<b>399</b>
	<b>1</b>	<b>Anàlisi de la viabilitat espermàtica</b>	<b>401</b>
	1.1	Anàlisi de la viabilitat espermàtica (SYBR-14/EthD-1)	401
	1.2	Anàlisi de la viabilitat espermàtica i integritat de la beina mitocondrial i l'acrosoma (mètode del triple marcatge)	402
	<b>2</b>	<b>Anàlisi de la capacitat espermàtica</b>	<b>404</b>
	<b>3</b>	<b>Anàlisi de la motilitat i la concentració espermàtiques</b>	<b>406</b>

	<b>4 Anàlisi de la morfologia espermàtica</b>	<b>409</b>
	<b>5 Anàlisi de l'aglutinació espermàtica</b>	<b>410</b>
	<b>6 Anàlisi del percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat per contrast de fase</b>	<b>411</b>
	<b>7 Test de resistència osmòtica (ORT)</b>	<b>412</b>
<b>Capítol III</b>	<b>Comportament dels espermatozoides en refrigeració a 15-17°C</b>	<b>413</b>
	<b>1 Introducció</b>	<b>415</b>
	1.1 Els diluents de refrigeració i la inseminació artificial	417
	1.2 Millora de les dosis seminals	422
	1.3 Conceptes sobre la osmolaritat	431
	<b>2 Objectius</b>	<b>435</b>
	<b>3 Discussió general</b>	<b>439</b>
	<b>4 Conclusions</b>	<b>459</b>
<b>Capítol IV</b>	<b>Espermatozoides i cèl·lules epitelials de l'oviducte en cocultiu</b>	<b>463</b>
	<b>1 Introducció: l'oviducte</b>	<b>465</b>
	<b>2 Objectius</b>	<b>481</b>
	<b>3 Discussió general</b>	<b>485</b>
	<b>4 Conclusions</b>	<b>513</b>
	<b>Conclusions generals</b>	<b>515</b>
	<b>Bibliography</b>	<b>519</b>

---

## List of Figures

---

<b>Figure I-1</b>	Landrace boar	<i>Page</i>	25
<b>Figure I-2</b>	Piétrain boar		25
<b>Figure I-3</b>	Duroc boar		26
<b>Figure I-4</b>	Schema of boar spermatozoa ( <i>Sus domesticus</i> )		29
<b>Figure II-1</b>	Sperm viability (SYBR-14/EthD-1) at 400x magnification		40
<b>Figure II-2</b>	Images of triple staining obtained with A (DAPI) filter at 400x magnification		41
<b>Figure II-3</b>	Images of triple staining obtained with I3 (FITC) filter at 400x magnification		42
<b>Figure II-4</b>	Image of triple staining obtained with N2.1 (Rhodamine) filter at 200x magnification		42
<b>Figure II-5</b>	Image of sperm motility taken with SCA <sup>®</sup> 2002 at 100x magnification		44
<b>Figure II-6</b>	Image of sperm morphology taken with SCA <sup>®</sup> 2002 at 200x magnification		48
<b>Figure III-1</b>	Diagram of the sow reproductive tract illustrating the site of semen deposition for three different types of artificial insemination		59
<b>Figure III-2</b>	Prostaglandins synthesis from arachidonic acid		61
<b>Figure III-3</b>	Chemical formula of prostaglandin F <sub>2α</sub>		63
<b>Figure III-4</b>	Chemical formula of repeating disaccharide unit in hyaluronic acid		66
<b>Figure III-5</b>	Chemical formula of caffeine		67
<b>Figure III-6</b>	Experimental design of Article 3		88
<b>Figure A2-1</b>	Sperm capacitation at days 0 and 3 (Article 2)		129
<b>Figure A2-2</b>	Sperm viability at days 0 and 3 (Article 2)		131
<b>Figure A3-1</b>	Sperm viability after applying hypertonic treatments. (Article 3)		156
<b>Figure A3-2</b>	Sperm motility after applying hypertonic treatments (Article 3)		157
<b>Figure IV-1</b>	Sow reproductive tract		191
<b>Figure IV-2</b>	Oviduct anatomy (I) – Parts of the oviduct		192
<b>Figure IV-3</b>	Oviduct anatomy (II) – Infundibulum and ampulla (left) and isthmus (right)		193
<b>Figure IV-4</b>	<i>In vitro</i> culture of porcine OEC (100x magnification)		201
<b>Figure IV-5</b>	<i>In vitro</i> homologous porcine co-culture (200x magnification)		202
<b>Figure IV-6</b>	Human HSP90AA1		207
<b>Figure IV-7</b>	Heat shock proteins and steroid receptors		210
<b>Figure IV-8</b>	Antisense mRNA and RNAi		213
<b>Figure IV-9</b>	Evolution of RNAi		214
<b>Figure IV-10</b>	Mechanism of RNAi		216
<b>Figure IV-11</b>	Small hairpin RNA		220

<b>Figure IV-12</b>	Image of OECs in OptiMEM® I without transfection agent after 24 h (100x)	258
<b>Figure IV-13</b>	Image of OECs in OptiMEM® I with 6 µl transfection agent after 24 h (400x)	259
<b>Figure A4-1</b>	Sperm viability in co-culture experiment (Article 4)	278
<b>Figure A4-2</b>	Sperm viability in cell-conditioned medium experiment (Article 4)	279
<b>Figure A4-3</b>	Sperm viability and acrosome and mitochondrial sheath integrity in unbound population from co-culture and in conditioned medium experiments (Article 4)	280
<b>Figure A4-4</b>	Unbound sperm motility in co-culture experiment (Article 4)	281
<b>Figure A4-5</b>	Linearity percentage of unbound spermatozoa in co-culture experiment (Article 4)	282
<b>Figure A4-6</b>	Sperm capacitation in co-culture experiment (Article 4)	284
<b>Figure A4-7</b>	Sperm capacitation in cell-conditioned medium experiment (Article 4)	285
<b>Figure A5-1</b>	Expression of clusterin, <i>HSP90AA1</i> , <i>HSPA8</i> and <i>HSPA5</i> in OEC follicular, OEC luteal and LLC-PK1 cultures (Article 5)	309
<b>Figure A5-2</b>	Expression of clusterin in co-cultured OECs and LLC-PK1 (Article 5)	310
<b>Figure A5-3</b>	Expression of <i>HSP90AA1</i> in co-cultured OECs and LLC-PK1 (Article 5)	311
<b>Figure A5-4</b>	Expression of <i>HSPA8</i> in co-cultured OECs and LLC-PK1 (Article 5)	312
<b>Figure A5-5</b>	Expression of <i>HSPA5</i> in co-cultured OECs and LLC-PK1 (Article 5)	313
<b>Figure A6-1</b>	Cell viability after 24 h of neofection using siPORT™ Amine (Article 6)	343
<b>Figure A6-2</b>	Cell viability after 24 h plated transfection using siPORT™ Amine (Article 6)	344
<b>Figure A6-3</b>	Optimising <i>ACTB</i> -siRNA delivering in <i>in vitro</i> EP (Article 6)	345
<b>Figure A6-4</b>	Sperm viability indexes of unbound and bound spermatozoa to OEC after <i>HSPAA1</i> -silencing and co-culture (Article 6)	346

---

## List of Tables

---

<b>Table II-1</b>	Reading of triple staining technique	<i>Page</i>	43
<b>Table II-2</b>	Reading of CTC staining technique		44
<b>Table II-3</b>	Classification of sperm motility		45
<b>Table II-4</b>	Sperm velocity parameters		46
<b>Table II-5</b>	Parameter settings for sperm motility assessment		46
<b>Table II-6</b>	Kinetic parameters' restrictions in sperm motility assessment		47
<b>Table II-7</b>	Sperm subpopulations depending on VAP		47
<b>Table II-8</b>	Classification of sperm morphology		48
<b>Table III-1</b>	Osmolality and molarity		68
<b>Table III-2</b>	Preparation of hypertonic treatments		85
<b>Table III-3</b>	Osmotic treatments		86
<b>Table III-4</b>	Osmotic resistance parameters		89
<b>Table A1-1</b>	Frequencies of viable spermatozoa (Article 1)		105
<b>Table A1-2a</b>	Values of VCL and VAP (Article 1)		107
<b>Table A1-2b</b>	Values of VSL and BCF (Article 1)		108
<b>Table A1-3</b>	Frequencies of progressive motility (Article 1)		109
<b>Table A2-1</b>	Frequencies of progressive motility (Article 2)		132
<b>Table A2-2</b>	Values of VSL, VAP and VCL (Article 2)		133
<b>Table A3-1</b>	Osmotic resistance parameters (Article 3)		153
<b>Table A3-2</b>	Correlations of non-return rates and litter size with sperm quality parameters (Article 3)		158
<b>Table IV-1</b>	Sequences, annealing temperatures, and fragment sizes of the primers used		246
<b>Table A4-1</b>	Categories according to sperm viability, acrosome and mitochondrial sheath integrity (Article 4)		275
<b>Table A4-2</b>	Sperm motility parameters (Article 4)		276
<b>Table A5-1</b>	Primers used (Article 5)		305
<b>Table A6-1</b>	Primers used (Article 6)		332
<b>Table A6-2</b>	siRNAs used (Article 6)		335
<b>Table A6-3</b>	Optimising table (Article 6)		338



---

## Abbreviations

---

<b>ACR</b>	Percentages of acrosome-intact sperm
<b>ACR<sub>r</sub></b>	Osmotic resistance in percentage of acrosome-intact sperm
<b>ACTB</b>	β-Actin
<b>AI</b>	Artificial Insemination
<b>ALH</b>	Amplitude of lateral head displacement of spermatozoa
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>AODN</b>	Single stranded antisense oligonucleotides
<b>APM</b>	Apical Plasma Membrane fractions
<b>AR</b>	Acrosome-reacted sperm
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>ATTC</b>	American Type Culture Collection
<b>BCF</b>	Beat cross frequency of spermatozoa
<b>Bp</b>	Base pairs
<b>BP</b>	Filter bandpass
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>BTS</b>	Beltsville thawing solution
<b>cAMP</b>	Adenyl cyclase-cyclic adenosine 3', 5' – monophosphate
<b>CASA</b>	Computer Assisted Semen Analysis
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>CLU</b>	Clusterin
<b>CM</b>	Conditioned medium by <i>in vitro</i> cultured cells
<b>CTC</b>	Chlortetracycline
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DNase</b>	Deoxyribonuclease
<b>dsRNAi</b>	Double stranded small interfering RNA
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetraacetic acid.
<b>EP</b>	Electroporation
<b>EST</b>	Percentage of immotile spermatozoa
<b>EthD-1</b>	Ethidium homodimer
<b>FCS</b>	Foetal calf serum
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate



<b>GAGs</b>	Glycosaminoglycans
<b>GRPs</b>	Glucose regulated proteins
<b>HA</b>	Hyaluronic acid
<b>HABP1</b>	Hyaluronic acid binding protein 1
<b>HBSS</b>	Hanks' balanced Saline Solution
<b>Hepes</b>	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
<b>HOS</b>	Hypoosmotic swelling test
<b>HSPs</b>	Heat shock proteins
<b>HSP90AA1</b>	Heat shock protein 90 kDa alpha A.1
<b>HSPA1A</b>	Heat shock 70 kDa protein 1A
<b>HSPA5</b>	Glucose regulated protein 78 kDa (also GRP78)
<b>HSPA8</b>	Heat shock cognate protein related 70 kDa (also HSC70)
<b>HSPB1</b>	Heat shock 27 kDa protein 1
<b>HSPD1</b>	Heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin)
<b>IVF</b>	<i>In vitro</i> fertilisation
<b>KHR</b>	Krebs–Henseleit Ringer solution
<b>LIN</b>	Percentage of linearity
<b>LLC-PK1</b>	Pig kidney epithelial cells line
<b>LLC-PK1-CM</b>	Conditioned medium by LLC-PK1 cells
<b>LP</b>	Filter longpass
<b>LS</b>	Litter size
<b>miRNA</b>	Intron-derived microRNAs
<b>Mops</b>	3-N-morpholinopropanesulfonic acid
<b>MOT</b>	Sperm motility
<b>MOT<sub>r</sub></b>	Osmotic resistance in sperm motility
<b>MR</b>	Percentage of mature sperm
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>MR<sub>r</sub></b>	Osmotic resistance in sperm morphology
<b>NaCl</b>	Sodium chloride
<b>NRR<sub>60d</sub></b>	Non-return rates within 60 days of the first insemination
<b>OEC</b>	Oviductal epithelial cell
<b>OEC-CM</b>	Conditioned medium by oviductal epithelial cells
<b>ORT</b>	Osmotic Resistance Test
<b>OSP</b>	Oviductal secretory glycoprotein
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PGE<sub>1</sub></b>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>

<b>PGF<sub>1α</sub></b>	Prostaglandin F <sub>1α</sub>
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
<b>PGG<sub>2</sub></b>	Hydroperoxy endoperoxide
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Hydroxyl endoperoxide
<b>PGs</b>	Prostaglandins
<b>PI</b>	Propidium iodide
<b>PMOT</b>	Percentage of spermatozoa with a progressive motility
<b>PMOT<sub>r</sub></b>	Osmotic resistance in sperm progressive motility
<b>PNA</b>	Peanut agglutinin
<b>PSA</b>	<i>Pisum sativum</i> agglutinin
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>RNAi</b>	RNA interference
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RT</b>	Reverse transcription
<b>SBTI</b>	Soybean trypsin inhibitor
<b>SD</b>	Standard deviation
<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b>shRNA</b>	Small hairpin RNA
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>ssRNAi</b>	Single stranded RNA
<b>STR</b>	Percentage of straightness
<b>TAE</b>	Tris Acetate EDTA
<b>Tes</b>	N-tris(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethanesulfonic acid
<b>T<sub>m</sub></b>	Annealing temperature
<b>Trf Ag</b>	Transfection agent
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
<b>VAP</b>	Average velocity of the smoothed path of the sperm cell
<b>VB</b>	Viable spermatozoon with intact acrosome and mitochondrial sheath
<b>VB<sub>r</sub></b>	Osmotic resistance in sperm viability
<b>VCL</b>	Average velocity measured over the actual point-to-point track followed by the sperm cell
<b>VSL</b>	Average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of a track
<b>WOB</b>	Motility parameter wobble
<b>ZP</b>	Zona pellucida



# **Thesis Outline**

**Summary**

**Resum**

**Resumen**

**Résumé**

**Zusammenfassung**

---



---

## Thesis Outline

---

The present thesis dissertation has been divided into four chapters and a final part for concluding remarks. It also includes a summary and its translation into Catalan, Spanish, French and German.

The **first chapter** is a general introduction outlining some of the general concepts relating to boar sperm which appear in the other chapters.

The **second chapter** is a methodological section describing the assessment of boar sperm functional parameters that are used in both Chapter Three and Chapter Four.

**The third and fourth chapters** focus on the results obtained and are organised in a similar way:

- a) A specific introduction as background to the chapter.
- b) The objectives, the material and methods used.
- c) The results (i.e. the three articles forming each chapter).
- d) A general discussion that deals with the results obtained in the articles as a whole, but also mentioning other aspects not referred to in the articles.
- e) The conclusions of the chapter.

The **third chapter** basically concerns boar spermatozoa in refrigerated seminal doses. Two of the three reports aim to improve the quality of seminal doses in storage at 15-17°C by adding different substances, and the last documents the effects of osmotic changes on sperm quality. It provides evidence to support osmotic tolerance's relevance as a functional sperm parameter and a predictor of the fertilising capacity of an ejaculate.

The **fourth chapter** studies oviductal epithelial cells in culture, how these cells affect some sperm parameters in co-culture, and how the presence of spermatozoa influences the expression of some genes in oviductal cells. Following this, the chapter ends with a study of the effects of a gene silencing on sperm viability in co-culture.

The last part of this dissertation, the **concluding remarks**, summarises the most important findings from the third and fourth chapters, and suggests some points that could be usefully addressed in further research.

---

## Summary

---

The addition of different substances to seminal doses has been described as a method of improving sperm quality in storage at 15-17°C, or cryopreservation. Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) is a hormone that has been used to improve reproductive performance in pigs. The present study has shown that the addition of PGF<sub>2α</sub> to extended semen at 2.5, 5 and 10 mg/100 ml does not damage spermatozoa in storage at 15°C, when sperm viability, acrosome and mitochondrial sheath integrity, sperm motility, sperm morphology and agglutination and osmotic resistance are assessed. Moreover, the addition of PGF<sub>2α</sub> at 5 mg/100 ml seems to maintain sperm viability better than un-supplemented semen extender. Apart from the effects of PGF<sub>2α</sub>, it has also been observed in the present study that hyaluronic acid (HA, 50 and 100 µg·ml<sup>-1</sup>) delays boar sperm capacitation in short-term storage (up to three days), without affecting other functional sperm parameters. This delaying effect is clearer when compared with the effects of caffeine. Thus, PGF<sub>2α</sub> and HA can be added to seminal doses without damaging sperm quality, with the latter delaying sperm capacitation after two days of cooling.

Many efforts to predict the fertility outcome of a given ejaculate have been developed in the pig industry, and the present study has also studied the effect of osmolality changes (from 100 to 4000 mOsm·Kg<sup>-1</sup>) on boar spermatozoa. It has been observed that osmotic changes in the environment significantly impair functional sperm parameters, especially at the extreme osmolalities. The tolerance of spermatozoa to these changes has therefore been used as a parameter for assessing sperm function, being later correlated with fertility and prolificacy data, assessed as non-return rates within 60 days of the first inseminations (NRR<sub>60d</sub>) and litter size (LS) respectively, and finally included in multiple regression models. From this, the tolerance of spermatozoa to osmotic treatments (defined for every parameter as quotient between each treatment and the negative control) is correlated with NRR<sub>60d</sub> and LS. Three treatments present the highest determination coefficients (R<sup>2</sup>): 150 mOsm·Kg<sup>-1</sup> with non-



return to isotonic conditions, 200 mOsm·Kg<sup>-1</sup> with return to such conditions, and 500 mOsm·Kg<sup>-1</sup> using sodium citrate and non-return to isotonic conditions.

Oviductal epithelial cells (OECs) influence sperm cell parameters due to their direct contact and secretory activity. The present study also reports the effects of OEC co-culturing on functional sperm parameters, the differences between the follicular and luteal stages in the gene expression of cultured OECs, the effects of the presence of spermatozoa on the expression of some significant genes in OECs, and the effects of heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (*HSP90AA1*) silencing in OECs on sperm viability in co-culture.

It has been observed that co-culturing with OECs maintains sperm viability and motility, especially when the spermatozoa are bound to the OECs, and induces sperm capacitation. The effects of OECs have also been observed after incubating spermatozoa with medium conditioned by those epithelial cells, although not to the same extent as with co-culturing. This suggests that direct contact between spermatozoa and OECs is needed to prolong sperm survival in pigs, in accordance with the formation of a sperm reservoir *in vivo*.

On the other hand, no differences between follicular and luteal cultured OECs have been observed in the analysis of the expression of four significant genes (clusterin (*CLU*), heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (*HSP90AA1*), heat shock 70 kDa cognate protein related (*HSPA8*) and glucose regulated protein 78 kDa (*HSPA5*)), all of their corresponding proteins being present in a 70 kDa-fraction of porcine sAPM (solubilised apical plasma membranes from OECs) that binds to boar spermatozoa. Moreover, as is clear from the results about how spermatozoa influence gene expression in OECs, male gametes upregulate the expression of *HSP90AA1*, *HSPA8* and *HSPA5*, all belonging to the heat shock protein family, but do not affect the expression of clusterin. Some role in the reproductive processes taking place in the oviduct is therefore suggested for this protein family.

In addition, the role of *HSP90AA1* among these proteins in prolonging sperm viability in co-culture has been studied using RNA interference (RNAi). After delivering the small interfering RNA that works when *in vitro* electroporation is used in primary culture of OEC, but fails when chemical transfection is employed, no changes in sperm viability are observed when *HSP90AA1*-silenced-OECs and non-*HSP90AA1*-silenced-OECs are compared after co-culturing over 48 hours. These data lead to the conclusion that *HSP90AA1* does not extend sperm survival, although according to other reports it could be involved in other important reproductive processes, such as sperm capacitation.

---

## Resum

---

L'addició de diferents substàncies a les dosis seminals s'ha descrit com una estratègia de millora de la qualitat espermàtica en refrigeració i en congelació. La prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) és una hormona que s'ha utilitzat per augmentar el rendiment reproductiu en porcí. Aquest estudi ha determinat, mitjançant les anàlisis de la viabilitat, la motilitat, la morfologia i l'aglutinació espermàtiques, així com també de la integritat de la beina mitocondrial i l'acrosoma i de la resistència osmòtica dels espermatozoides, que l'addició de la  $PGF_{2\alpha}$  a les concentracions de 2,5, 5 i 10 mg/100 ml no malmena la qualitat espermàtica del semen preservat a 15°C. A més, sembla que l'addició d'aquesta hormona a una concentració de 5 mg/100 ml manté amb millors condicions la viabilitat espermàtica que la resta de tractaments. A més dels efectes de la  $PGF_{2\alpha}$ , en aquest estudi s'ha determinat també que, en porcí, l'àcid hialurònic a 50 i 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  retarda la capacitació espermàtica quan els espermatozoides són preservats en refrigeració durant un període curt de temps (fins a tres dies), sense que la resta de paràmetres funcionals en quedin afectats. Aquest efecte de retardament és més evident quan es comparen els efectes d'aquest glicosaminoglicà amb els de la cafeïna. Així, la  $PGF_{2\alpha}$  i l'àcid hialurònic es poden addicionar a les dosis seminals sense que malmenin, en determinades concentracions, la qualitat espermàtica, i, a més, aquest darrer retarda la capacitació espermàtica després de dos dies d'emmagatzemament de les mostres a 15°C.

Atès que s'han desenvolupat un bon nombre d'experiments amb l'objectiu de predir la capacitat fecundant d'una ejaculació, aquest estudi ha avaluat també l'efecte dels canvis de l'osmolalitat (de 100 a 4000  $\text{mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) del medi en els espermatozoides de porcí. En aquest sentit, s'ha observat que aquests canvis d'osmolalitat malmenen significativament els paràmetres espermàtics funcionals, especialment en les condicions d'estrès osmòtic més extremes. Endemés, la tolerància dels espermatozoides a aquests canvis d'osmolalitat ha estat utilitzada també com a paràmetre funcional dels espermatozoides i s'ha demostrat, en alguns casos, que està correlacionada amb dades de fertilitat i prolificitat *in vivo*, assajades,

respectivament, com a taxes de no-retorn a l'estre després de 60 dies de la primera inseminació (NRR<sub>60d</sub>) i de mida de la camada (LS), i que fins i tot pot ser inclosa en models de regressió múltiple. A partir d'aquests resultats, la resistència dels espermatozoides als canvis d'osmolalitat del medi (definida com a quocient del tractament i el control negatiu) està més ben correlacionada amb les NRR<sub>60d</sub> i les LS, i presenta els coeficients de determinació ( $R^2$ ) més elevats en tres dels tractaments assajats (hipotònic a 150 mOsm·Kg<sup>-1</sup> i sense retorn a les condicions isotòniques, hipotònic a 200 mOsm·Kg<sup>-1</sup> i amb retorn, i hipertònic amb citrat de sodi i 500 mOsm·Kg<sup>-1</sup> sense retorn a la solució isotònica).

Les cèl·lules epitelials de l'oviducte (OECs) afecten els paràmetres cel·lulars espermàtics, com a conseqüència del contacte directe entre ambdós tipus de cèl·lules i de l'activitat secretora d'aquestes cèl·lules somàtiques, tal com s'ha observat en aquest estudi. De fet, al capítol quart s'han investigat els efectes del cocultiu homòleg amb cèl·lules oviductals sobre els paràmetres funcionals dels espermatozoides, les diferències en l'expressió d'alguns gens entre els estadis fol·licular i luti d'aquestes cèl·lules somàtiques, els efectes de la presència d'espermatozoides sobre l'expressió d'aquests mateixos gens a les cèl·lules oviductals després de cocultiu, i els efectes del silenciament del gen que codifica per la proteïna de xoc tèrmic alfa A.1 de 90 kDa (HSP90AA1) sobre la viabilitat espermàtica.

Com s'ha demostrat, el cocultiu amb cèl·lules epitelials de l'oviducte manté la motilitat i la viabilitat espermàtiques, especialment a la població d'espermatozoides units a aquestes cèl·lules epitelials, i indueix la capacitació. Els efectes d'aquestes cèl·lules oviductals s'observen també després d'incubar els espermatozoides amb el medi condicionat per aquestes cèl·lules, encara que no amb el mateix abast que el cocultiu. Això suggereix que el contacte directe dels espermatozoides amb les cèl·lules epitelials de l'oviducte és necessari per perllongar la viabilitat espermàtica en porcí, en concordança amb la formació del reservori seminal *in vivo*.

D'altra banda, no s'observen diferències entre els estadis fol·licular i luti de les cèl·lules epitelials de l'oviducte quan s'analitza l'expressió de quatre gens rellevants (clusterina, HSP90AA1, HSPA8 i HSPA5), els productes proteics dels quals foren prèviament identificats en una fracció soluble de 70 kDa preparada a partir de les membranes apicals d'aquestes cèl·lules. A més, la presència d'espermatozoides sobreexpressa els gens HSP90AA1, HSPA8 i HSPA5, tots pertanyents a la família de proteïnes de xoc tèrmic, però no afecta l'expressió de

la clusterina, de manera que se suggereix que aquestes proteïnes tenen algun paper en els processos reproductius que tenen lloc a l'oviducte.

Finalment, d'entre aquestes proteïnes, s'ha estudiat l'efecte del silenciament del gen *HSP90AA1* en el manteniment de la viabilitat espermàtica mitjançant la tècnica de la interferència de l'RNA i el cocultiu *in vitro*. Després de transferir les molècules curtes i de doble cadena de RNA (siRNA) necessàries per desencadenar aquest mecanisme, mitjançant l'electroporació *in vitro* (atès que la transfecció no és efectiva en el cultiu primari de cèl·lules oviductals), no s'han observat canvis en la viabilitat espermàtica comparant les cèl·lules que tenen el gen *HSP90AA1* silenciats amb les que no el tenen. Aquest resultat permet concloure que la *HSP90AA1* no perllonga la viabilitat espermàtica. Malgrat tot, altres treballs suggereixen que aquesta proteïna té algun paper en la capacitació espermàtica, de manera que estudis futurs podrien tenir en compte aquest aspecte i estudiar els efectes del silenciament sobre aquest paràmetre funcional.



---

## Resumen

---

La adición de distintas sustancias en las dosis seminales se ha descrito como estrategia para la mejora de la calidad espermática en refrigeración y en congelación. La prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) es una hormona que se ha utilizado para aumentar el rendimiento reproductivo en porcino. Por ello, el presente estudio ha determinado, mediante los análisis de viabilidad, motilidad, morfología y aglutinación espermáticas, así como de la integridad de la vaina mitocondrial y del acrosoma y de la resistencia osmótica de los espermatozoides, que la adición de la  $PGF_{2\alpha}$  en un rango de concentraciones de 2,5 a 10 mg/100 ml no produce daño alguno sobre la calidad espermática del semen refrigerado a 15°C. Además, parece que la adición de esta hormona a una concentración de 5 mg/100 ml mantiene la viabilidad espermática en mejores condiciones que el resto de tratamientos. Aparte de los efectos de la  $PGF_{2\alpha}$ , en el presente estudio se ha determinado que el ácido hialurónico en concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  retrasa la capacitación espermática en refrigeración a corto plazo (hasta tres días), sin que se vean, por ello, afectados los demás parámetros espermáticos analizados. Este retraso es más evidente, aún, cuando se compara con el comportamiento de los espermatozoides después de la adición de cafeína. Así, la  $PGF_{2\alpha}$  y el ácido hialurónico pueden ser añadidos a las dosis seminales refrigeradas y destinadas a inseminación artificial en determinadas concentraciones, sin que se produzcan daños en la calidad espermática, y además éste último retrasa la capacitación de los espermatozoides después de dos días de conservación a 15°C

Dado que se han desarrollado un elevado número de trabajos con el objetivo de predecir la capacidad fecundante de un eyaculado, el presente estudio ha evaluado, también, el efecto de los cambios en la osmolalidad del medio (de 100 a 4000  $\text{mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) sobre los espermatozoides de verraco. En este sentido, se ha observado que dichos cambios producen graves daños en los parámetros espermáticos funcionales, especialmente en las condiciones de estrés osmótico más extremas. Además, la tolerancia de los espermatozoides a estos cambios

ha sido utilizada también como un parámetro funcional y se ha demostrado que, en algunos casos, dicha tolerancia se halla correlacionada con las pruebas de fertilidad y prolificidad *in vivo* ensayadas, respectivamente, mediante la tasa de no retorno al estro dentro de los 60 días posteriores a las primeras inseminaciones ( $NRR_{60d}$ ) y el tamaño de la camada (LS), y que puede ser aun incluida en modelos de regresión lineal múltiple. Con todo, la resistencia osmótica de los espermatozoides a los cambios de osmolalidad del medio (definida como el cociente del tratamiento y el control negativo) está mejor correlacionada con las  $NRR_{60d}$  y los LS y presenta mayores coeficientes de determinación ( $R^2$ ) en tres de los tratamientos ensayados (hipotónico a  $150 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  y sin retorno a las condiciones isotónicas, hipotónico a  $200 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  y con retorno, e hipertónico con citrato sódico a  $500 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  y sin retorno a la solución isotónica).

Las células epiteliales del oviducto (OECs) afectan a los parámetros celulares espermáticos como consecuencia del contacto directo entre ambos tipos celulares y de la actividad secretora de estas células somáticas, tal y como se ha observado en este estudio. En realidad, en el cuarto capítulo se han investigado los efectos del cocultivo homólogo con células oviductales sobre los parámetros funcionales de los espermatozoides, las diferencias en la expresión de algunos genes entre las fases folicular y luteal de dichas células, los efectos de la presencia de espermatozoides sobre la expresión de estos mismos genes en las células oviductales después de cocultivo *in vitro*, y los efectos que produce sobre la viabilidad espermática el silenciamiento del gen que codifica para la proteína de choque térmico alfa A.1 de 90 kDa (HSP90AA1).

Como se ha demostrado, el cocultivo con células epiteliales del oviducto mantiene la motilidad y la viabilidad espermáticas, especialmente en aquellas poblaciones de espermatozoides que se hallan unidas a estas células epiteliales, e induce la capacitación espermática. Los efectos de estas células oviductales se observan también después de incubar los espermatozoides con el medio condicionado por dichas células, aunque no en la misma medida que el cocultivo. Ello sugiere, en fin, que el contacto directo de los espermatozoides con las células epiteliales del oviducto es necesario para la prolongación de la viabilidad espermática en porcino, de acuerdo con la formación del reservorio seminal *in vivo*.

Por otra parte, no se observan diferencias significativas entre la fase folicular y la fase luteal de las células epiteliales del oviducto cuando se analiza la expresión de cuatro genes relevantes (clusterina, *HSP90AA1*, *HSPA8* y *HSPA5*), los productos proteicos de los cuáles

fueron previamente identificados en una fracción soluble de 70 kDa, preparada a partir de las membranas plasmática apicales de dichas células. Además, la presencia de espermatozoides sobreexpresa los genes *HSP90AA1*, *HSPA8* y *HSPA5*, todos ellos pertenecientes al grupo de genes que codifican para las proteínas de choque térmico, sin afectar la expresión del gen que codifica para la clusterina, de modo que ello sugiere que dichas proteínas juegan algún papel en los procesos reproductivos que tienen lugar al oviducto.

Finalmente, de entre estas proteínas, se han estudiado los efectos del silenciamiento del gen *HSP90AA1* en el mantenimiento de la viabilidad espermática mediante las técnicas de la interferencia del RNA y del cocultivo *in vitro*. Después de transferir las moléculas cortas y de cadena doble de RNA (siRNA) necesarias para inducir este mecanismo, mediante la electroporación *in vitro* (puesto que la transfección no es efectiva en el cultivo primario de células oviductales), no se han observado cambios en la viabilidad espermática comparando las células que tienen el gen *HSP90AA1* silenciado de las que no lo tienen. Este resultado permite concluir que la *HSP90AA1* no prolonga la viabilidad espermática. A pesar de ello, otros trabajos han sugerido que esta proteína juega algún papel en la capacitación espermática, de modo que en estudios futuros se podría tener en cuenta dicho aspecto y ensayar los efectos del silenciamiento sobre este parámetro funcional.





---

## Résumé

---

En élevage porcin, l'addition de différentes substances aux doses séminales a été décrite comme une stratégie d'amélioration de la qualité spermatique lors de la réfrigération et de la surgélation. En l'occurrence, la prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) est une hormone qui a été utilisée afin d'augmenter le rendement reproductif. La présente étude vise à déterminer l'effet de l'addition de  $PGF_{2\alpha}$  aux concentrations de 2,5, 5 et 10 mg/100 ml sur la qualité spermatique du sperme préservé à 15°C, et ce au moyen de l'analyse de la viabilité, de la motilité, de la morphologie et de l'agglutination spermatiques, ainsi que de l'analyse des intégrités de la gaine mitochondriale et l'acrosome, et de la résistance osmotique.

Outre la détermination des effets de la  $PGF_{2\alpha}$  sur la qualité spermatique, cette étude vise également à évaluer les conséquences de l'addition d'acide hyaluronique au sperme. Il a été précédemment rapporté que l'ajout d'acide hyaluronique à 50 et 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  agit sur la capacitation spermatique, qui peut être ainsi retardée en réfrigération pendant une courte période de temps (jusqu'à trois jours), ceci sans endommager les autres paramètres fonctionnels. Cet effet de retardement apparaît plus clairement lorsque les effets de cette substance sont comparés à ceux provoqués par la caféine. Les résultats obtenus confirment que la  $PGF_{2\alpha}$  et l'acide hyaluronique peuvent être additionnés aux doses séminales à concentrations déterminées sans affecter la qualité spermatique, ce dernier retardant aussi la capacitation spermatique après deux jours de préservation du sperme à 15°C. De plus, l'addition de cette hormone à une concentration de 5 mg/100 ml a été décrite comme contribuant à l'amélioration de la viabilité des spermatozoïdes.

Puisque des études concernant la prédiction de la capacité fécondant d'un éjaculé donné ont été préalablement développées, cette thèse a également évalué les effets des changements de l'osmolalité (dès 100 à 4000  $\text{mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) de l'environnement sur les spermatozoïdes du porc. Les résultats obtenus démontrent que les changements d'osmolalité malmènent les paramètres spermatiques fonctionnels, notamment dans les conditions les plus extrêmes du

stress osmotique. Ces résultats nous ont permis de valider l'utilisation de la tolérance des spermatozoïdes à ces changements comme paramètre fonctionnel des spermatozoïdes, et il a été démontré que (1) cette tolérance est en corrélation avec la fertilité et prolificité *in vivo* (via l'utilisation des taux de non retour à l'œstrus après 60 jours des premières inséminations,  $NRR_{60d}$ , et de la taille de la portée, LS) et que (2) cette tolérance peut être incluse dans des modèles de régression linéaire multiple. À partir de ces résultats, la résistance des spermatozoïdes aux changes d'osmolalité du milieu (définie comme le quotient entre le traitement et le control négatif) apparaît comme étant mieux reliée aux  $NRR_{60d}$  et aux LS, et présente les coefficients de détermination ( $R^2$ ) les plus élevés dans les trois traitements suivants: hypotonique à  $150 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  et sans retour aux conditions isotoniques, hypotonique à  $200 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  avec retour, et hypertonique avec citrate sodique à  $500 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  et sans retour à la solution isotonique.

Les cellules épithéliales de l'oviducte (OECs) affectent les paramètres cellulaires spermatiques, et ceci non seulement à cause du contact direct entre les deux types cellulaires, mais aussi à cause de l'activité sécrétoire de ces cellules somatiques, comme reporté dans cette étude. De ce fait, dans le Chapitre 4 les effets de la coculture homologue avec les cellules épithéliales de l'oviducte sur les paramètres fonctionnels des spermatozoïdes ont été analysés, ainsi que les différences entre l'expression de quelques gènes entre les phases folliculaire et lutéale des cellules de l'oviducte, les effets de la présence des spermatozoïdes sur l'expression de ces gènes aux mêmes cellules après coculture et, enfin, les effets de l'éteignement du gène qui encode la protéine de choc thermique alfa A.1 de 90 kDa (HSP90AA1) sur la viabilité spermatique.

Les résultats obtenus sont les suivants: tout d'abord, la coculture avec ces cellules somatiques maintient la motilité et la viabilité spermatiques, notamment dans la population de spermatozoïdes qui sont unis à ces cellules épithéliales, et induise la capacitation. Les effets de ces cellules de l'oviducte sont aussi observés quand les spermatozoïdes sont incubés avec le medium conditionnée par ces cellules, même si ceci est observé à une moindre échelle que lors de la coculture. Ce résultat suggère que le contact direct entre les spermatozoïdes et les cellules épithéliales de l'oviducte est nécessaire à la prolongation de la viabilité spermatique des porcs, tout en s'accordant à la formation du réservoir séminal *in vivo*.

D'ailleurs, l'analyse de l'expression de quatre gènes (clusterine, *HSP90AA1*, *HSPA8* et *HSPA5*), les protéines résultants desquels furent préalablement identifiées dans une fraction

soluble préparée à partir des extraits des membranes apicales (sAPM) des cellules épithéliales de l'oviducte, ne révèle pas de différences entre des cellules épithéliales de l'oviducte à cause des phases folliculaire et lutéale. En outre, la présence des spermatozoïdes mène à la sur-régulation des gènes *HSP90AA1*, *HSPA8* et *HSPA5*, tous appartenant à la famille de gènes qui encodent les protéines de choc thermique, sans modifier l'expression du gène de la clusterine (*CLU*). Il apparaît donc que ces protéines jouent un rôle dans les processus reproductifs qui se passent dans l'oviducte.

Enfin, l'effet de l'inhibition de l'expression du gène *HSP90AA1* sur la maintenance de la viabilité spermatique a été étudié, et ceci en utilisant les techniques d'interférence de l'ARN et de la coculture *in vitro*. Depuis le transfert des molécules courtes d'ARN double brin (siRNA) pour déclencher ce mécanisme moyennant l'électroporation *in vitro* (car la transfection chimique n'est pas effective dans le cultivate primaire de cellules de l'oviducte), des changements dans la viabilité spermatique n'ont pas été observés en comparant les cellules qui ont le gène éteint de celles qui ne l'ont pas. Ces résultats permettent de conclure que la protéine HSP90AA1 ne prolonge pas la viabilité spermatique. Malgré tout, des travaux précédents suggèrent que cette protéine est importante lors du processus menant à la capacitation spermatique, de telle sorte que des prochaines études pourraient prendre en considération cet aspect et étudier les effets de l'inhibition génique sur ce paramètre fonctionnel.



---

## Zusammenfassung

---

Die Hinzufügung der unterschiedlichen Substanzen zu den besser Samendosierungen ist als Methode des Verbesserns von Samenzellenqualität in der Ablage bei 15-17°C oder Kryokonservierung beschrieben worden. Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) ist ein Hormon, das benutzt worden ist, um reproduktive Leistung bei den Schweinen zu verbessern. Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass die Hinzufügung von  $PGF_{2\alpha}$  gezeigt zu Samen bei 2.5, 5 und 10 mg/100 ml Spermien in der Ablage bei 15°C nicht beschädigt, wenn Samenzellenentwicklungsfähigkeit, Acrosome und mitochondrische Hülle, Samenzellenmotilität, Samenzellenmorphologie und Agglutination und osmotischer Widerstand festgesetzt werden. Außerdem scheint die Hinzufügung von  $PGF_{2\alpha}$  bei 5 mg/100 ml, besser die Samenzellenentwicklungsfähigkeit beizubehalten nicht vervollständigte Samen besser als andere Behandlungen. Abgesehen von den Effekten von  $PGF_{2\alpha}$  ist auch in der vorliegenden Untersuchung beobachtet worden, dass die hyaluronische Säure (50 und 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) Ebersamenzellen Kapazitation in der kurzfristigen Lagerung (bis 3 Tage) verzögert, ohne andere Funktionssamenzellenparameter zu beeinflussen. Dieser „Verzögern Effekt“ ist im Vergleich zu den Effekten des Koffeins klarer. So  $PGF_{2\alpha}$  und hyaluronische Säure können zu Samendosierungen hinzugefügt werden ohne die Samenzellenqualität zu vermindern, mit den letzten Verzögern-Samenzellen Kapazitation bei drei Tage des Abkühlens.

Viele Bemühungen, das Ergiebigkeitresultat vorauszusagen bei einem Ejakulat haben sich entwickelt in der Schweinindustrie, und die vorliegende Untersuchung hat auch den Effekt der Osmolalityänderungen (von 100 bis 4000  $\text{mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) auf Eber Spermien studiert. Es ist besonders an den extremen Osmolalitäten beobachtet worden, dass osmotische Änderungen im Milieu erheblich Funktionssamenzellenparameter hindern. Die Toleranz von Spermatozoen zu diesen Änderungen ist folglich als Parameter für das Festsetzen von Samenzellenfunktion verwendet worden und aufeinander bezogen worden später mit den Ergiebigkeitsdaten (festgesetzt worden als Nichtrückgabe innerhalb 60 Tage nach der ersten

Befruchtung) und eingeschlossen worden in den Modellen der mehrfachen Rückbildung. Von diesen Ergebnissen her wird die Toleranz von Spermatozoen zu den osmotischen Behandlungen (definiert für jeden Parameter als Quotient zwischen jeder Behandlung und der negativen Steuerung) mit  $\text{NRR}_{60t}$  drei Behandlungsmethoden ergeben das höchste  $R^2$  aufeinander bezogen:  $150 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  mit Nichtrückkehr zu den isotonischen Bedingungen,  $200 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  mit Rückkehr und  $500 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  mit Natriumzitat und Nichtrückkehr zu den isotonischen Bedingungen.

Oviductal Epithelzellen (OECs) beeinflussen die Samenzellenparameter wegen ihres direkten Kontaktes und ausscheidenden Tätigkeit. Die vorliegende Untersuchung berichtet auch über die Effekte von OEC, das auf Funktionssamenzellenparametern die Unterschiede zwischen follicularen und luteal Stadien im Genausdruck von kultiviertem OECs, die Effekte des Vorhandenseins von Spermien auf den Ausdruck einiger bedeutender Gene in OECs und das Wärmewirkungs-Protein alpha A.1 90 kDa (*HSP90AA1*), das in OECs die amenzellenentwicklungsfähigkeit in der Co-Kultur zum Schweigen bringt.

Es ist beobachtet worden, dass Co-Züchtungen mit Oviductal Epithelzellen, Samenzellenentwicklungsfähigkeit und -motilität beibehalten, besonders wenn die Spermatozoen zum OECs springen, und Samenzellen Kapazitation verursachen. Die Effekte von OECs sind auch beobachtet worden, nachdem man Spermatozoen mit dem Mittel ausgebrütet hatte, das durch jene Epithelzellen, obgleich nicht im gleichen Umfang wie mit dem Co-Züchten bedungen wird. Dieses lässt vermuten, dass direkter Kontakt zwischen Spermien und OECs erforderlich ist, um das Samenzellenüberleben in den Schweinen zu fördern, in Übereinstimmung mit der Anordnung eines Samenzellenvorratsbehälter in Vivo.

Andererseits sind keine Unterschiede zwischen follicular und luteal kultivierten OECs in der Analyse des Ausdruckes von vier bedeutenden Genen beobachtet worden (clusterin (*CLU*), Hitzeschlagproteine 90 kDa alpha A.1 (*HSP90AA1*), verwandtes Proteine des Hitzeschlages bezog 70 kDa (*HSPA8*) und Glukose reguliert das Proteine 78 kDa (*HSPA5*)). Außerdem wie aus den Resultaten zu entnehmen ist, wie bei Spermieinfluss-Genausdruck in OECs, männliche Keimzellen upregulate den Ausdruck von *HSP90AA1*, *HSPA8* und *HSPA5* regulieren, alle gehörend zu der Hitzeschlag-Proteinfamilie, aber nicht den Ausdruck von Clusterin beeinflussen. Irgendeine Rolle in den reproduktiven Prozessen, die im Eileiter stattfinden, wird folglich für diese Proteinfamilie vorgeschlagen.

Zusätzlich ist die Rolle von HSP90AA1 unter diesen Proteinen, wenn man Samenzellenentwicklungsfähigkeit in der Co-Kultur ausdehnte, mit RNS-Störung (RNAi) studiert worden. Nach dem Liefern der kleinen behindernden RNS, die arbeitet, wenn in-vitroelectroporation in der Primärkultur von OEC verwendet wird, aber, fallen aus, wenn chemische Transfektion eingesetzt wird, aber keine Änderungen in der Samenzellenentwicklungsfähigkeit werden beobachtet, wenn *HSP90AA1*-silenced-OECs und non-*HSP90AA1*-silenced-OECs verglichen werden, nachdem man über 48 Stunden Co-gezüchtet hat. Diese Daten führen zu der Zusammenfassung, dass HSP90AA1 Samenzellenüberleben nicht verlängern, obgleich, übereinstimmend mit anderen Reports, es in andere wichtige reproduktive Prozesse mit einbezogen werden könnte, so wie bei Samenzellen Kapazitation.





# Chapter I

---

## General Introduction

### **1 The domestic pig and the Piétrain breed**

- 1.1 Introduction
- 1.2 Morphologic characteristics of Piétrain pigs
- 1.3 Productive characteristics of Piétrain pigs

### **2 Boar ejaculate and spermatozoon**

- 2.1 The ejaculate
- 2.2 The spermatozoon
  - 2.2.1 The head
  - 2.2.2 The neck
  - 2.2.3 The tail

### **3 Sperm quality**

- 3.1 Sperm viability and acrosome and mitochondrial sheath integrity
  - 3.1.1 Nucleus
  - 3.1.2 Acrosome
  - 3.1.3 Mitochondrial sheath
  - 3.1.4 Sperm viability in standard conditions
- 3.2 Sperm motility
- 3.3 Sperm morphology
- 3.4 Sperm agglutination



---

# General Introduction

---

## 1 The domestic pig and the Piétrain breed

### 1.1 Introduction

The domestic pig (*Sus scrofa domesticus*, Linnaeus 1758) occupies a significant position in the global economy, especially in Europe and America (Honeyman et al., 2006), where the three most popular breeds on farms are Landrace, Piétrain and Duroc (Figures I-1, I-2 and I-3).



**Figure I-1** Landrace boar



**Figure I-2** Piétrain boar



**Figure I-3** Duroc boar

All sperm samples used in the present thesis came from Piétrain boars. This breed is named after a place of the same name in Brabant, a province in the Francophone Walloon region of Belgium. The breed seems to have made its appearance on farms for the first time between 1919 and 1920.

Although this date is known, there are doubts about the origin of these animals, which are principally characterised by their ability to produce pork meat. The latest reports hypothesise that the breed was the result of a cross between Yorkshire and Bayeux pigs (a breed imported from Normandy during the First World War).

The breed only became widespread during the second half of the last century. In 1953, it was recognised in Brabant province, with the breed standard being set in 1954. In 1956, it was recognised all over Belgium.

In 1955, it was exported to France; in 1958 the French Zootechnics Society was founded, and in 1963 a genealogic book for the breed established (Buxadé, 1984).

## **1.2 Morphologic characteristics of Piétrain pigs**

In terms of its morphology, the Piétrain pig can be characterised by the following traits:

- a. Strong musculature in the front and rear thirds.
- b. White skin with black and/or red spots and a small head with straight or sub-concave profile.
- c. A short, round appearance, with males weighing between 280 and 300 Kg, and females between 240 and 260 Kg, and a height ranging between 0.75 and 0.85 m. Its length is never more than 1.55 m (Buxadé, 1984).

### 1.3 Productive characteristics of Piétrain pigs

In terms of productive features, which account for the pig industry's great interest in this breed, the most important are:

- **Exceptional quality of the dressed carcass.** This characteristic is the one that has made the breed famous. It yields a high percentage of lean meat and low fat. The mean yield is about 72.5%, the percentage of ham and loin is approximately 57%, and the thickness of dorsal fat is about 20 mm.
- **Quality of its pork meat.** Although higher than that of the white Belgium pig, its quality is lower than that of the Large White breed.
- **Acceptable technical yields.** Normally up to 75 Kg of living weight. Beyond this threshold, the animal tends to fatten, increasing the conversion index.
- **Low reproductive performance.** Litter size is often not high and the number of weaned piglets is low (approximately 10 piglets are born alive, and between 7 and 8 are weaned).
- **Anatomic-functional disequilibrium.** The low heart/body ratio causes frequent heart failure in Piétrain pigs and leads to higher mortality than in other breeds. This disequilibrium goes some way towards explaining problems related with their breeding in Spain, where climatic conditions provoke stress in these pigs.

Finally, another characteristic of the Piétrain breed concerns the sows. Although Piétrain females are docile and good mothers, they are not used as reproductive sows because they do not produce much milk and their mammary glands are relatively under-developed.

At present, Piétrain boars are used in cross-breeding programmes in many countries (Spain, France, United Kingdom, Germany, Italy, Russia, Rumania, Poland, Denmark, Czech Republic, Hungary, Brazil and Argentina) with sows from other breeds, such as Hampshire, Duroc and various hybrids. This illustrates the relevance of the Piétrain breed as a contributor of pork meat in the male line (Buxadé, 1984).

## 2 Boar ejaculate and spermatozoon

### 2.1 The ejaculate

In pigs, first ejaculations occur at the beginning of puberty, between five and six months of age. Boars are considered to be post-pubertal from eight to twelve months, and as adults from

one year onward (Martín, 1982; Hugues and Varley, 1984; Sancho, 2002; Córdova-Izquierdo et al., 2004).

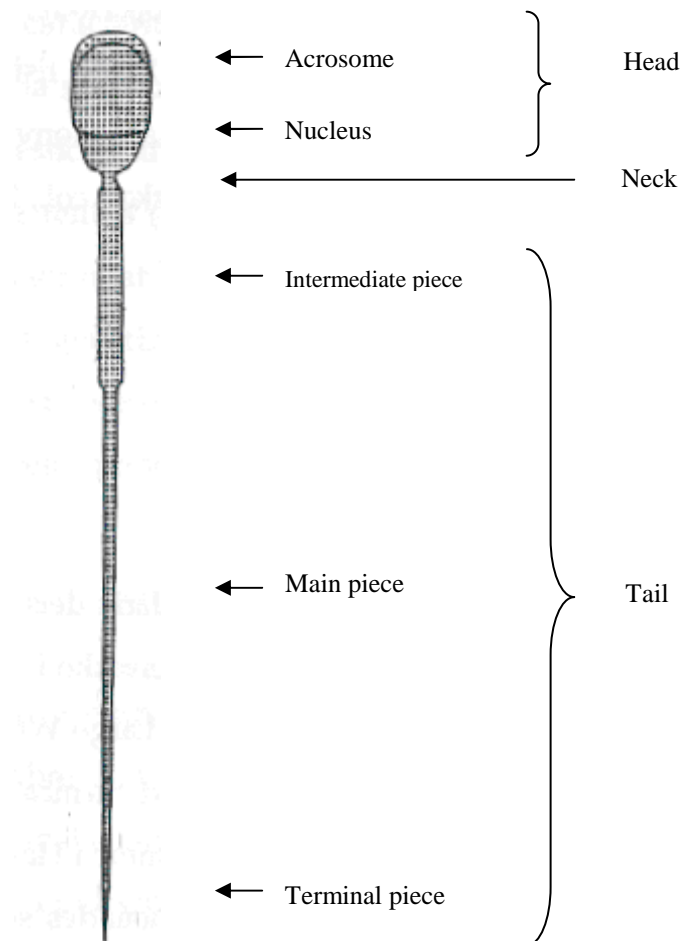
In terms of volume, boar ejaculate varies between 150 and 300 ml (Martín, 1982; Garner and Hafez, 1986; Rothschild, 1990; Pinart et al., 1999). The volume is subject to considerable variations as a result of individual characteristics and environmental conditions (Setchell, 1991). In comparative terms, it is much higher than for other species of domestic mammals. In goats, for example, it is between 0.2 and 2.5 ml (Setchell, 1991); in horses, it ranges from 30 to 150 ml (Rasbech, 1984; Bonadonna, 1989); in bulls it is between 5 and 30 ml (Garner and Hafez, 1986; Rasbech, 1984; Setchell, 1991); and in rams the range is from 0.8 to 1.2 ml (Garner and Hafez, 1986). As for humans, standard values vary between 2 and 6 ml (Ludwig and Frick, 1990; Andolz and Bielsa, 1995; WHO, 2000).

Three fractions can be distinguished in boar ejaculate, the result of testicular and epididymal activity as well as of different secretions coming from accessory sexual glands (Pond and Houpt, 1981; Fournier-Delpech and Thibault, 1993; Garner and Hafez, 1996; Sancho, 2002; Córdova-Izquierdo et al., 2004; Peña et al., 2006):

- **Pre-spermatic fraction.** This is formed by the secretions produced by prostate, seminal vesicles and Cowper or bulbourethral glands. The volume of this fraction is about 10-15 ml. It does not contain spermatozoa and normally presents a transparent or clear appearance.
- **Spermatic fraction rich in spermatozoa.** The volume of this fraction is between approximately 70 ml and 100 ml and is milky-white in appearance. Testicular activity produces a high sperm concentration, varying between  $0.5 \times 10^9$  and  $10^9$  spermatozoa per ml. This fraction also contains secretions produced by both the prostate and seminal vesicles. It is this fraction that is collected to prepare the seminal doses.
- **Post-spermatic fraction poor in spermatozoa.** The volume of this fraction is about 150-200 ml. It is pale white in appearance and contains little spermatozoa (the concentration is lower than  $10^6$  spermatozoa per ml). In addition, secretions of a gelatinous consistency coming from the prostate and Cowper glands are found in it. This fraction contains a large amount of seminal plasma that acts in such a way as to stimulate the spermatozoa. For this reason, its collection when preparing seminal doses to be used for artificial insemination (AI) is not recommended.

## 2.2 The spermatozoon

The spermatozoon (Figure I-4) is the male gamete and is the product of gametogenesis and later epididymal maturation. In porcine, the length of mature spermatozoon is 45  $\mu\text{m}$ , and three regions can be differentiated: the head, the connecting piece and the tail (Bonet et al., 2000). The tail consists of a mitochondrial or intermediate, main and terminal piece.



**Figure I-4** Schema of boar spermatozoa (Briz, 1994; Bonet et al., 2000)

### 2.2.1 The head

The head is flat and oval and measures 7  $\mu\text{m}$  in length; it is 3.7  $\mu\text{m}$  wide and 0.4  $\mu\text{m}$  thick. The two faces of the head are different: whereas one is flat, the other presents an apical protuberance like a half moon and is 0.4  $\mu\text{m}$  wide and 1.2  $\mu\text{m}$  long (Garner and Hafez, 1996; Bonet et al., 2000). The nucleus contains a highly condensed chromatin; in the acrosome, which is a specialised cellular organelle located on the nucleus, three regions can be



differentiated: the apical, principal and equatorial. Two acrosomal membranes are distinguishable: internal, in contact with the nucleus, and external, in contact with plasmalemma. Acrosome specificity is largely explained by the great variety and chemical heterogeneity of the molecules that it contains, such as mucopolysaccharides, proteins and lipids. The presence of hydrolytic enzymes must be emphasised. Thus, for example, hyaluronidase breaks up granulosa cells and acrosin is a very important protease at the moment of fertilisation because it breaks up the zona pellucida of oocytes (Knobil and Neil, 1994).

### *2.2.2 The neck*

The length of the neck or connecting piece is 0.7  $\mu\text{m}$  and its thickness is 0.5  $\mu\text{m}$ . It is cone-shaped, with the widest region of the neck being close to the head (1.3  $\mu\text{m}$ ) and the narrowest near the tail (0.6  $\mu\text{m}$ ). An annular protuberance near the head has a diameter of about 0.15  $\mu\text{m}$  (Bonet et al., 2000).

### *2.2.3 The tail*

The tail is filamentous and cylindrical and three regions or pieces may be distinguished: intermediate, main and terminal. The intermediate is 9  $\mu\text{m}$  long and 0.7  $\mu\text{m}$  in diameter. This piece contains the mitochondrial sheath that is responsible for providing the energy needed to move the flagellum (main and terminal pieces). Jensen's ring separates the intermediate and main pieces. The main piece is 26.2  $\mu\text{m}$  in length and its diameter is 0.4  $\mu\text{m}$ ; the terminal piece is 2.2  $\mu\text{m}$  in length and its diameter is 0.2  $\mu\text{m}$  (Briz, 1994; Bonet et al., 2000).

## **3 Sperm quality**

The sperm quality of seminal doses can be assessed by analysing both cell and biochemical parameters (Briz, 1994; Knobil and Neil, 1994; Sancho, 2002). In terms of cell parameters, sperm viability, motility, concentration, morphology and agglutination, as well as acrosome and mitochondrial sheath integrity and osmotic resistance (Osmotic Resistance Test, ORT) are usually evaluated. These assessments must be carried out using a large number of

spermatozoa because of the high level of variability in and between individual samples, and the subjectivity of the assays (Woelders, 1990).

### **3.1 Sperm viability and acrosome and mitochondrial sheath integrity**

Sperm viability is a very important parameter when testing the quality of an ejaculate, and basically describes the percentages of viable and non-viable spermatozoa.

#### *3.1.1 Nucleus*

To assess sperm viability, different methods can be used. On the one hand, specific stains for optic microscopy such as eosin-blue aniline (Shaffer and Almquist, 1948) or eosin-nigrosin (Dott and Foster, 1972; García-Artiga et al., 1994; WHO, 2000; Kvist and Björndahl, 2002; Sancho, 2002) can be carried out. The basis of this method is that the plasma membrane of viable spermatozoa is non-permeable to dyes, whereas in non-viable spermatozoa the membrane remains permeable.

However, as conventional staining methods have proved not good enough, other more effective techniques have been developed. Accordingly, fluorochrome stains and, subsequently, monitoring using either fluorescence optic microscopy or flow cytometry (O'Neill et al., 1997) have replaced conventional dyes. The fluorochromes used are able to not only stain the nucleus but also the acrosome, the mitochondrial sheath and other membrane proteins (Gravance et al., 2000). For example, acridine orange is a nuclear fluorochrome that has been used in a wide range of mammal species, such as human (Hoshi et al., 1996; Zini et al., 2000), bovine (Dobrinski et al., 1994) and porcine (Bonet et al., 1995; Pinart et al., 1999). This staining is based on the properties of acridine orange as an intercalating agent, binding to denaturised nuclear DNA (Lewin et al., 1999). When excited at a wave length of between 450 and 490 nm, this fluorochrome emits either green fluorescence if the DNA is not altered (double stranded DNA), meaning that the spermatozoon is viable, or red fluorescence if the DNA is denatured (single stranded DNA), meaning that the spermatozoon is non-viable (Zini et al., 2000). Interestingly, the degree of red acridine orange staining of sperm DNA has been shown to correlate with male infertility in the sperm chromatin structure assay (Silva and Gadella, 2006)

Since the half of ninety years, the use of double staining has become prevalent as a method for assessing cell viability, in both sperm and other somatic cells, not only in humans but also in porcine and other domestic animals (Garner et al., 1994; Garner and Johnson, 1995). When a double vital staining is used, one fluorochrome specifically stains viable cells, whereas the other is specific to non-viable cells (Nagy et al., 2003; Rowland et al., 2003). The basis of a fluorochrome for viable cells is that it specifically binds to enzymes that are only active when cells are alive, or emits fluorescence only when ionic pumps are working (Shapiro, 1998). The fluorochromes used most often for viable cells are SYBR-14 (Garner et al., 1994; Gravance et al., 2000; Huo et al., 2002; Love et al., 2003; see also Chapter IV), Hoechst 33342 (Cai et al., 2005; Hallap et al., 2006) and bisbenzimidazole Hoechst 33258 (Bussalleu et al., 2005; González-Urdiales et al., 2006; Pinart et al., 2006). Specifically, bisbenzimidazole Hoechst 33258 ( $C_{25}H_{24}N_6O \cdot 3 HCl$ ) is a membrane-permeable fluorescent chromosome stain that binds to DNA. It is a DNA-intercalating agent between Adenine-Thymine base pairs. When excited at 346 nm, it emits blue fluorescence at 488 nm when bound to DNA.

The fluorochromes specific for non-viable cells are based on their ability to pass through plasma membrane when cells are dead, and their plasmalemma is therefore permeable. The fluorochromes used most often for non-viable cells are ethidium homodimer (EthD-1) and propidium iodide (PI), which is a DNA-intercalating agent that is widely used as a vital dye (Garner et al., 2004). When intercalated with nucleic acid helix and irradiated at 488 nm, it emits fluorescence at 615 nm (Love et al., 2003; Nagy et al., 2003; Rowland et al., 2003).

In recent years, multiple staining techniques involving more than two fluorochromes have been developed with the aim of assessing not only the state of the nucleus but also other cell compartments (Bussalleu et al., 2005; Pinart et al., 2006), so that a more accurate prediction of spermatozoon fertilising ability can be obtained (Juonala et al., 1999; Nagy et al., 2003).

In the present thesis, most sperm viability assessments have been carried out using the multiple staining method described by Bussalleu and colleagues (2005), except in Chapter IV (Articles 4 and 6) where SYBR-14/EthD-1 was used. Such multiple staining allows us to know about not only the state of the nucleus but also acrosome and mitochondrial sheath integrity. This provides a more adequate method for assessing sperm function, by utilising specific fluorochromes for testing the acrosome and mitochondrial sheath.

### 3.1.2 Acrosome

Molecules for acrosome analysis consist of lectins, a family of glycoproteins that specifically recognises and binds to carbohydrates of plasma membrane, conjugated with fluorochromes. The lectins *Pisum sativum* agglutinin (PSA) (Farlin et al., 1992; Casey et al. 1993), peanut agglutinin (PNA) (Cheng et al., 1996; Fazeli et al., 1997), soybean trypsin inhibitor (SBTI) combined with biotine (Arts et al., 1994), and concanavalin A are conjugated either with the fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorochrome (Kinger and Rajalakshmi, 1995; Ozaki et al., 2002) or with the fluorochrome Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Bussalleu et al., 2005).

In general, these lectins recognise the proacrosin/acrosin enzyme, and spermatozoa appear less stained when an intact acrosome is present; a higher level of staining is observed when the acrosome is reacted (Ozaki et al., 2002). Proacrosin is the zymogen (inactive form) of acrosin and converts into the active form during an acrosome reaction (Goodpasture et al., 1980; Honda et al., 2002; Howes and Jones, 2002). Acrosin is a serine protease that is characteristically present in the mammal acrosome and plays a basic role in sperm penetration of the zona pellucida (ZP).

Lectin specificity to acrosin varies (Tao et al., 1993), and the highest resolution for distinguishing acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa is obtained when lectin SBTI is used (Tollner et al., 2000; Ozaki et al., 2002). Specifically, SBTI is an inhibitor of the catalytic activity of serine proteases that bind to and inhibit acrosin (Tollner et al., 2000; Fukami et al., 2003). In the protocol described by Bussalleu and her colleagues (2005), SBTI is used conjugated with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 in a commercial kit (Molecular Probes<sup>®</sup> Inc., Eugene, Oregon, USA) (Arts et al., 1994). This fluorochrome is excited at 490 nm and emits green fluorescence at 519 nm.

### 3.1.3 Mitochondrial sheath

With regard to the mitochondrial sheath, previous reports have used different fluorochromes to study the sperm of different species. In humans, Auger and co-workers (1993) and O'Connell and co-workers (2002) used rhodamine-123, while Poot and colleagues (1996) used chloromethyl-X-rosamine. In pigs, rhodamine-123 (Fraser et al., 2001) and iodide of 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine (JC-1) (Huo et al., 2002) have also been used. Since fluorochromes that stain the mitochondrial sheath are

cationic and lipophilic, they are able to passively diffuse across the plasma membrane and accumulate in the negatively charged mitochondrial matrix. Thus, depending on the membrane potential of mitochondria, fluorochromes are or not accumulated (Gilmore and Wilson, 1999; Fraser et al., 2001).

Another fluorochrome for staining the mitochondrial sheath is MitoTracker<sup>®</sup> Green FM, which has higher specificity than rhodamine-123, and whose emission wave length makes it a good candidate for being included in multiple staining protocols (Fazeli et al., 1997; Sutovsky et al., 1999; Ozaki, 2002; Kavak et al., 2003). In fact, the fluorochrome MitoTracker<sup>®</sup> Green FM (Molecular Probes<sup>®</sup> Inc., Eugene, Oregon, USA) has been shown to be the optimum for the identification and localisation of mitochondria, specifically because it binds to membranes of functional but not to those of altered mitochondria (Keij et al., 2000; Fraser et al., 2001). This selectivity is due to protein labelling, as MitoTracker<sup>®</sup> Green FM covalently binds some mitochondrial-matrix proteins after reacting with the free thiol groups (-SH) of cysteine residues (Presley et al., 2003). MitoTracker<sup>®</sup> Green FM is excited at 490 nm and emits green fluorescence of 516 nm.

#### *3.1.4 Sperm viability in standard conditions*

As far as percentages of viable sperm under standard conditions are concerned, porcine ejaculate contains between 65% and 85% of viable spermatozoa (Martín, 1982; Buxadé, 1984; Briz, 1994; Bonet et al., 1995, Briz et al., 1995; Pinart et al., 1999). When the proportion of viable spermatozoa does not reach the threshold of 65%, it is referred to as necrostermia or necrozoospermia.

### **3.2 Sperm motility**

Mature mammal spermatozoa have the ability to move by means of tail beats. Conventionally, sperm motility is one of the most frequently analysed and used parameters in production centres of seminal doses to assess the sperm quality of a given ejaculate (Flowers, 1997; Rigau et al., 2001; Sancho, 2002). However, the correlation between sperm motility and sperm fertilising ability, measured as the fertility rate and non-return rates to oestrus within 60 days (NRR<sub>60d</sub>), is a controversial subject (Berger et al., 1996; Pérez-Llano et al., 2001).

Sperm motility assessments usually consist of determining the percentages of motile and non-motile spermatozoa; amongst motiles, those presenting progressive motility are distinguished from the others (WHO, 2000). This process of determination can be performed in both an objective and subjective way. In recent years, the use of assisted computer systems to determine classical spermiogram parameters has much increased. Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) systems provide more precision and objectivity to the conventional assessment of sperm parameters, significantly reducing time consumed and the standard error of the analysis (WHO, 2000; Kvist and Björndahl, 2002). All sperm motility assessments in the present thesis have been performed in an objective, quantitative and qualitative way to determine at least the percentages of static, motile and progressive motile spermatozoa (Article 3). In the first, second and fourth papers, additional velocity parameters, such as - amongst others - straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), and percentage of linearity (LIN), have also been measured (see also Chapter II).

However, attention must be paid to the fact that boar spermatozoa easily lose their motility when they are subjected to small variations, such as slight temperature changes or even low speed centrifugations. Although this problem can be solved by incubating sperm samples at 37°C for between 15 and 20 minutes, which induces motility (Briz, 1994), or by stimulating the spermatozoa using compounds like caffeine (Vázquez et al., 1985), inter and intra-group variability is very high. In an attempt to explain this variability, different reports have recently studied the ejaculate structure by analysing the forming subpopulations of spermatozoa. In these studies, the cluster analysis of sperm motility parameters plays a basic role (Abaigar et al., 1999; Quintero-Moreno et al., 2004; Satake et al., 2006).

### **3.3 Sperm morphology**

The evaluation of the morphological characteristics of spermatozoa plays a principal part in semen analysis, especially in connection with the study of aberrant spermatozoa. For several researchers, sperm morphology is a good predictor for fertilising ability (Kruger et al., 1986, 1988; Jouannet et al., 1988; Oehninger et al., 1988, 1990; Boyle et al., 1992; Ombelet et al., 1995; Bonde et al., 1998; Martínez et al., 2000; Rigau et al., 2001; Alm et al., 2006).

Microscopic examination allows the percentages of mature, immature and aberrant spermatozoa to be determined. As with sperm viability, a threshold of 75-80% of mature

spermatozoa has been set as the standard value (Briz, 1994; Bonet et al., 1995, 2000; Pinart, 1998a; Pinart et al., 1998b; WHO, 2000; Kvist and Björndahl, 2002).

When the percentage of immature spermatozoa is higher than 30%, an epididymal dysfunction is assumed, mainly due to the absence of sperm maturation along the epididymis, and the velocity of the spermatozoa's transit. In fact, this absence of maturation is often caused by a rapid rate of ejaculations (Thibault et al., 1993; Pruneda et al., 2005).

Aberrant morphologies can affect the head and/or the tail of the spermatozoon. Depending on the origin, malformations can be primary, when produced in the testicle during the spermatogenesis, or secondary, when occurring in the epididymis (Bonet et al., 1995). In terms of the malformed structure, head and tail malformations are different. Head malformations can be in the form of number (two or more heads), shape (triangular, ovoid, pear-formed etc) or size (micro- or macro-cephalic). Tail malformations can be in the form of number (two or three tails), length or trajectory (folded or coiled tails).

In recent years, computer assisted systems have also been developed to assess sperm morphology, measuring the area, the perimeter, the length and the width of the spermatozoa's head. Using this method and the degree of intensity of chromatin fragmentation, it has been demonstrated that differences in sperm morphology among boars are not related to deviations in chromatin structure (Saravia et al., 2007).

As far as percentages of aberrant sperm in standard conditions are concerned, teratospermia or teratozoospermia occurs when the proportion of aberrant spermatozoa in an ejaculate is higher than 50% (OMS, 1999; WHO, 2000).

### **3.4 Sperm agglutination**

Sperm agglutination is observed when a spermatozoon binds to another spermatozoon by head to head or tail to tail contact. In normal conditions, agglutination should not occur and an immunological cause of infertility may be suggested when it is often present. It is well known that bivalent and trivalent cations in seminal plasma, as well as long storage, induce sperm agglutination (Sánchez, 1991; Yeste et al., 2007a).

# Chapter II

---

## Assessment of sperm parameters

### **1 Sperm viability**

1.1 Sperm viability (SYBR-14/EthD-1)

1.2 Sperm viability, mitochondrial sheath and acrosome integrity  
(triple-stain technique)

### **2 Sperm capacitation**

### **3 Sperm motility and concentration**

### **4 Sperm morphology**

### **5 Sperm agglutination**

### **6 Acrosome-reacted sperm by phase contrast**

### **7 Osmotic resistance test (ORT)**





---

# Assessment of sperm parameters

---

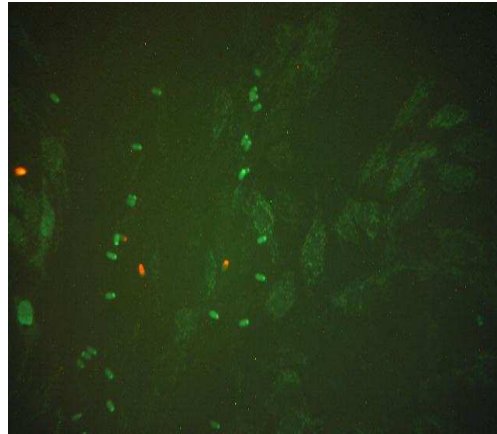
In this study, the following sperm parameters were assessed: sperm viability (two different methods), sperm capacitation, sperm concentration, sperm morphology, sperm agglutination and the osmotic resistance of spermatozoa.

## 1 Sperm viability

### 1.1 Sperm viability (SYBR-14/EthD-1)

In co-culture experiments (Chapter IV, Articles 4 and 6), sperm viability (both in bound and in unbound to epithelial cells populations) was assessed by a double staining method using two nuclear fluorochromes: SYBR-14 and ethidium homodimer (EthD-1), both purchased from Molecular Probes (Molecular Probes<sup>®</sup> Inc., Eugene, Oregon, USA). Before staining, a 10:1 working solution of SYBR-14 (final concentration: 100 nM) and EthD-1 (final concentration: 2  $\mu$ M) was prepared. In an aliquot containing 1 ml of sperm sample, 11  $\mu$ l of SYBR-14/EthD-1 working solution was added and the mixture was incubated at 37.5°C for 15 minutes. After that, a sample drop containing stained spermatozoa was deposited on a slide, and then covered with a coverslip.

The observation of samples was performed by using two fluorescence microscopes: Leica DMLR-XA (Leica, Wetzlar, Germany) in Article 4 and Axio Imager.Z1 (Zeiss, Oberkochen, Germany) in Article 6, at 400x magnification. In both cases, two filter cubes were employed: an I3 filter (excitation filter: bandpass (BP): 450-490 nm; dichromatic mirror: 510 nm; suppression filter: longpass (LP): 515) and an N2.1 filter (excitation filter: BP 515-560 nm; dichromatic mirror: 580 nm; suppression filter: LP 590 nm). Three counts of 100 spermatozoa each were carried out to distinguish viable spermatozoa (green fluorescence) from non-viable spermatozoa (red fluorescence) (Garner et al., 1994; Garner and Johnson, 1995) (Figure II-1).



**Figure II-1** Sperm viability (SYBR-14/EthD-1) at 200x magnification

## **1.2 Sperm viability, mitochondrial sheath and acrosome integrity (triple-stain technique)**

In almost all sperm viability assessments, except those in Article 6 (Chapter IV), sperm viability was assessed using the protocol described by Bussalleu and co-workers (2005). This method allows us to see the state of the three compartments of the spermatozoa, i.e. the nucleus, acrosome and mitochondrial sheath, and combines the use of four different fluorochromes:

- Two nuclear fluorochromes, bisbenzimidazole Hoechst 33258 DAPI (4'-6'-diamino-2-phenyl-indole) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, Missouri, USA) for viable cells, and propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) for non-viable cells.
- MitoTracker<sup>®</sup> Green FM (specifically for functional mitochondria; Molecular Probes<sup>®</sup>) to stain the mitochondrial sheath.
- The lectin *Trypsin inhibitor* from Soybean (SBTI) conjugated with the fluorochrome Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (specifically for proacrosin; Molecular Probes<sup>®</sup>).

The protocol distinguishes two steps: nucleus staining and mitochondrial sheath and acrosome staining:

### *a) Nucleus staining (Bisbenzimidazole Hoescht 33258 and PI)*

One  $\mu\text{l}$  of bisbenzimidazole Hoescht 33258 (5  $\mu\text{M}$ ) was added to a 2 ml Eppendorf<sup>®</sup> tube (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) containing 1 ml of sperm sample (sperm concentration should range from  $25\text{-}75 \times 10^6$  spermatozoa $\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Next, it was incubated at 37°C for 10

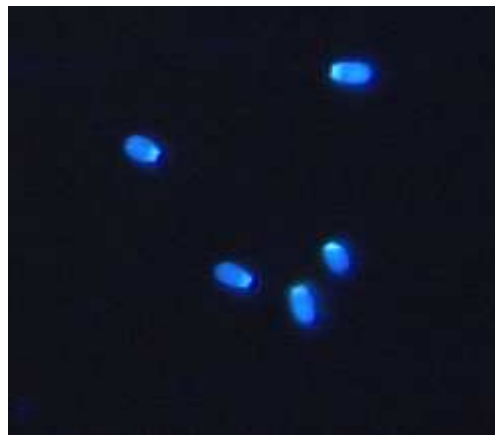
minutes. Ten  $\mu\text{l}$  of PI solution ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) was then added and samples were again incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 10 minutes. Subsequently, the samples were removed from the heater and centrifuged at  $400\times g$  for 10 minutes, after which the supernatant was discarded.

*b) Mitochondrial Sheath and acrosome staining (MitoTracker<sup>®</sup> Green FM and SBTI-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugate)*

Prior to staining, the remaining pellet was resuspended in a pre-warmed (to  $37^\circ\text{C}$ ) solution containing 1 ml of Mitotracker<sup>®</sup> Green FM (working solution at 100 nM) and 1 ml of Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Conjugate-SBTI (working solution 15  $\mu\text{M}$ ). This solution was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 20 min and then centrifugated at  $400\times g$  for 10 min. Supernatant was later discarded and the pellet was resuspended in a pre-warmed ( $37^\circ\text{C}$ ) Beltsville Thawing Solution (BTS) extender. Finally, samples were stored in the heater at  $37^\circ\text{C}$  until monitoring.

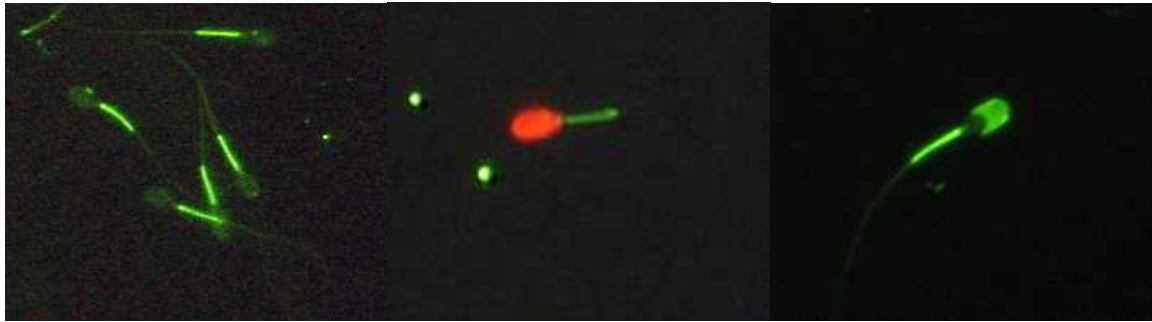
Spermatozoa were monitored under an epifluorescence microscope (Leica DMLR-XA) using a Leica 40x 1.32 HCX PL APO objective lens. Three filter cubes were used:

- **Filter A (DAPI)** to assess viable sperm (blue fluorescence), stained by bisbenzimidazole Hoescht 33258. (Excitation filter: BP 340-380 nm; dichromatic mirror: 400 nm; suppression filter: LP 425 nm) (Figure II-2).



**Figure II-2** Image of triple staining obtained with A (DAPI) filter at 400x magnification

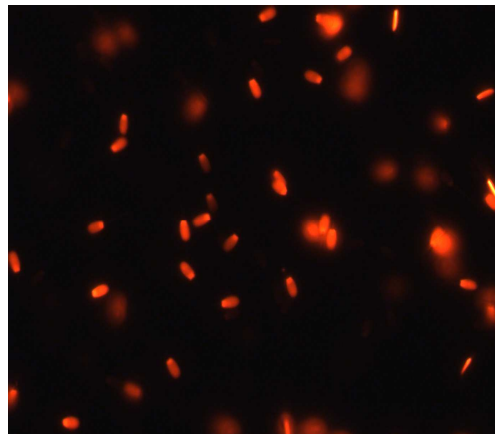
- **Filter I3 (FITC)** for the simultaneous observation of the samples that present green fluorescence, generated by MitoTracker<sup>®</sup> Green FM and SBTI-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Conjugate fluorochemicals, as well as the weak fluorescence of non-viable spermatozoa. (Excitation filter: BP 450-490 nm; dichromatic mirror: 510 nm; suppression filter: LP 515 nm) (Figure II-3).



**Figure II-3** Images of triple staining obtained with I3 (FITC) filter at 400x magnification

- **Filter N2.1 (Rhodamine)** to assess non-viable spermatozoa (which present a red nucleus), stained by PI. (Excitation filter: BP 515-560 nm; dichromatic mirror: 580 nm; suppression filter: LP 590 nm) (Figure II-4).

After observation, the spermatozoa were classified into eight categories (Table II-1) according to the fluorescence emitted by the four fluorochromes. However, in all analyses a spermatozoon was only considered as completely viable (VB) when it showed an intact nucleus, intact acrosome and intact mitochondrial sheath. When a spermatozoon presented any damage to at least one of these three cell components, it was considered non-viable.



**Figure II-4** Image of triple staining obtained with N2.1 (Rhodamine) filter at 200x magnification

## 2 Sperm capacitation

Chlortetracycline (CTC) co-staining with ethidium homodimer (EthD-1; Molecular Probes<sup>®</sup>) was used to assess sperm capacitation (Ward and Storey, 1984), following the procedure

described by Wang and colleagues (1995) and Mattioli and co-workers (1996), and adjusted to boar spermatozoa by Fazeli and co-workers (1999) and Funahashi (2002).

**Table II-1** Reading of triple staining technique

Fluorescence			Typology
Nucleus	Mitochondrial sheath	Acrosome	
Blue	Green	Green	Viable spermatozoon with intact acrosome and mitochondrial sheath (VB)
	Green	Non-stained Swollen and green	Viable spermatozoon with damaged acrosome and intact mitochondrial sheath
	Non-stained	Green	Viable spermatozoon with intact acrosome and damaged mitochondrial sheath
Red		Green	Non-viable spermatozoon with intact acrosome and mitochondrial sheath
	Green	Non-stained Swollen and green	Non-viable spermatozoon with damaged acrosome and intact mitochondrial sheath
	Non-stained	Green	Non-viable spermatozoon with intact acrosome and damaged mitochondrial sheath
	Non-stained	Non-stained Swollen and green	Non-viable spermatozoon with damaged acrosome and mitochondrial sheath

First, the CTC staining solution was prepared by mixing CTC (750 mM) (Sigma-Aldrich®), and D, L – cysteine (5 mM) (Sigma-Aldrich®) with a Tris-NaCl buffer (20 mM). After mixing, the staining solution was filtered through a filter of a diameter of 0.22 µm per pore (Millipore Corp., Spain), and pH was adjusted to 7.8.

In a 50 µl aliquot containing 18 µl of semen sample, 2 µl of EthD-1 (23.3 µM) were added and incubated at 37°C for 10 minutes. After that, 10 µl of CTC solution was added prior to adding 10 µl of fixative (2% paraformaldehyde in Phosphate-Buffered Saline, PBS; Gibco, Invitrogen Corp., Spain). A drop of 5 µl was placed on a slide and mounted with DABCO™ anti-fading medium (Sigma-Aldrich®) and a cover-slip.

Slides were then observed under an epifluorescent light microscope (Leica DMLR-XA) with blue-violet illumination (excitation 330-380 nm, emission 420 nm) using the Leica 40x

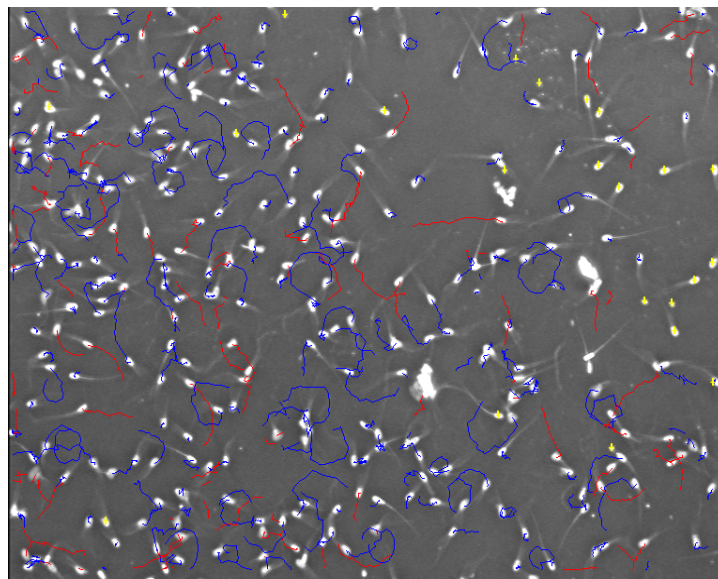
1.32 HCX PL APO objective lens and the H3 filter cube (Excitation filter: BP 420-490 nm; dichromatic mirror: 510 nm; suppression filter: LP 515 nm). Two hundred viable spermatozoa (EthD-1 negative) were counted, and differentiated among the three fluorescence patterns shown in Table II-2 (Wang et al., 1995).

**Table II-2** Reading of CTC staining technique

Abbreviation	State	Description
NC/F	Uncapacitated spermatozoa	Uniform fluorescence over the whole head
C/B	Capacitated spermatozoa	Fluorescence-free band in the post-acrosomal region
AR	Acrosome reacted sperm	No fluorescence over the head or a thin fluorescent band in the equatorial segment

### 3 Sperm motility and concentration

Sperm motility and concentration were assessed by a computer assisted sperm analyzer (CASA) system, consisting of a phase contrast microscope (Olympus BX41; Olympus Europe, Hamburg, Germany) with a heat plate (adjusted to 37°C), hardware and software (Sperm Class Analyzer; Microptic SL, Barcelona, Spain) formed by two different programs (SCA<sup>®</sup> production 2002 and SCA<sup>®</sup> motility modules). This system provides an objective means to assess sperm motility and concentration.



**Figure II-5** Image of sperm motility taken with SCA<sup>®</sup> production 2002 at 100x magnification

A sperm sample (15  $\mu\text{l}$ ), previously incubated at 37°C for 15 minutes, was placed in a pre-warmed Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel). Observation and monitoring were performed using an Olympus 10x 0.30 PLAN objective lens (negative phase-contrast field). At least 1000 spermatozoa were counted in each analysis, and several fields captured (Figure II-5).

In Article 3 (resistance of boar spermatozoa to osmotic changes and its correlation with fertility), the analyses of sperm motility and concentration were performed using SCA<sup>®</sup> production 2002, which only provided measures of overall motility (MOT), progressive motility (PMOT) and the percentage of immotile spermatozoa (EST) (Table II-3).

**Table II-3** Classification of sperm motility

Spermatozoa	Movement characteristics
Immotile	Static (EST)
Motile (MOT)	Non-progressive motility
	Progressive motility (PMOT)

**Table II-4** Sperm velocity parameters using SCA<sup>®</sup> motility module

Abbreviation	Parameter	Units	Description
VSL	Straight line velocity	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	Average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of a track. VSL measures the speed of a spermatozoon in a forwards progression
VAP	Average path velocity	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	Average velocity of the smoothed path of the sperm head
VCL	Curvilinear velocity	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	Average velocity measured over the actual point-to-point track followed by the sperm head
ALH	Amplitude of lateral head displacement	$\mu\text{m}$	Amplitude of lateral turn regarding intermediate piece. ALH is an important parameter because it affects the <i>in vitro</i> fertilisation (IVF) result and the ability of human spermatozoa to penetrate cervical mucus and fuse with oocytes. (Barlow et al, 1991)
BCF	Beat cross frequency	Hz	
LIN	Percentage of linearity	%	VSL/VCL
STR	Percentage of straightness	%	VSL/VAP
WOB	Motility parameter wobble	%	



By way of contrast, in the other papers, except in Article 4 (Chapter IV) and the analysis of motility in sperm bound to oviductal epithelial cells, motility and concentration were analysed using SCA<sup>®</sup> motility module. This software supplies more data than production module. Thus, after acquiring several fields, not only the percentages of motile, progressive motile and immotile spermatozoa but also the parameters shown in Table II-4 (according with the cut-off settings recommended by the manufacturer for analysis of boar sperm, see Tables II-5 and II-6) were assessed (Abaigar et al., 1999; Versteegen et al. 2002; Maes et al., 2003).

**Table II-5** Parameter settings for sperm motility assessment

Parameter	Settings
Frame rate	60 Hz
Frames acquired	25
Minimum contrast	18 pixels
Minimum cell size	10 $\mu\text{m}^2$
Maximum cell size	80 $\mu\text{m}^2$
Minimum static intensity gates	0.5
Maximum static intensity gates	2.5
Minimum static size gates	0.65
Maximum static size gates	2.6
Minimum elongation gates	10
Maximum elongation gates	100
<i>Characteristics of PMOT spermatozoa</i>	
VAP cut-off	> 45 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
STR	> 45%
Cell size	9 pixels
Cell intensity	125
<i>Characteristics of slow-static spermatozoa</i>	
VSL cut-off	10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
VAP cut-off	25 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$

On the basis of WHO classification (WHO, 2000) and using the motility module, the overall sperm population may also be subdivided into four categories, based on low VAP cut-off (LVV) and medium VAP cut-off (MVV) (Table II-7).

**Table II-6** Kinetic parameters' restrictions for sperm motility assessment

Parameter	Minimum	Maximum
VSL	1 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	500 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
VAP	1 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	500 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
VCL	1 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	500 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
ALH	0 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$
BCF	0 Hz	100 Hz
LIN	10%	98%
STR	10%	98%
WOB	10%	98%

**Table II-7** Sperm subpopulations depending on VAP

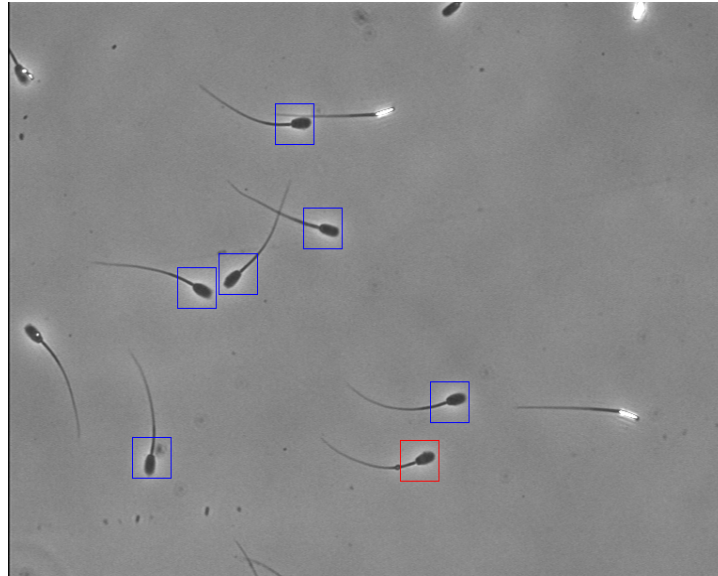
Sperm subpopulation	Relationship with VAP
Spermatozoa with fast velocity	VAP > MVV
Spermatozoa with medium velocity	LVV < VAP < MVV
Spermatozoa with slow velocity	VAP < LVV
Static spermatozoa	Cells that do not move during the analysis

## 4 Sperm morphology

Sperm morphology was determined by placing 5  $\mu\text{l}$  of sperm sample on a slide, later mounted with a coverslip. Prior to assessment, samples were incubated for 30 minutes in 100% humidity at 25°C to immobilise the spermatozoa.

A CASA system was also used, consisting of a phase contrast microscope (Olympus BX41) equipped with a Sperm Class Analyser provided by a production module (SCA<sup>®</sup> production 2002 module, Microptic S.L., Barcelona, Spain). Samples were observed at 200x magnification (Olympus 20x 0.40 PLAN objective lens, positive phase-contrast field) (Figure II-6).

Sperm morphology was assessed subjectively by counting three times one hundred spermatozoa, differentiating among mature, immature and aberrant spermatozoa (Table II-8) (Bonet, 1990; Bonet and Briz, 1991; Briz, 1994; Bonet et al., 1995, 2000; Pinart, 1997; Pinart et al., 1998; WHO, 2000; Kvist and Björndahl, 2002; Verstegen et al., 2002).



**Figure II-6** Image of sperm morphology taken with SCA<sup>®</sup> 2002 at 200x magnification

**Table II-8** Classification of sperm morphology

<b>Spermatozoa</b>	<b>Classification</b>
Mature	Normal
Immature spermatozoa	Proximal cytoplasmic droplet
	Medial cytoplasmic droplet
Aberrant head morphologies	Head morphology/size
	Isolated head
Aberrant tail morphologies	Tail folded at the connecting piece
	Tail folded at intermediate piece
	Tail folded at the Jensen's ring
	Coiled tail
Other abnormalities	Other aberrant spermatozoa

## 5 Sperm agglutination

Sperm agglutination was assessed by placing 5  $\mu$ l of each sample on a glass slide, mounted with a coverslip (Chapter III, Article 2). After that, samples were incubated at 25°C in 100% humidity for 30 minutes to immobilise the spermatozoa.

In each analysis, three counts of one hundred spermatozoa each were performed at random by distinguishing percentages of agglutinated (sticking to each other head-to-head or tail-to-tail) or non-agglutinated (free cells) spermatozoa. Observations were carried out using

a phase contrast microscope (Olympus BX41) under an Olympus 20x 0.40 PLAN objective lens (positive phase-contrast field). This method differs slightly from those previously reported (Harayama et al., 1994; Harayama et al., 2003).

## 6 Acrosome-reacted sperm by phase contrast

Percentages of acrosome-reacted spermatozoa (Chapter III, Article 3) were subjectively assessed by means of a phase contrast microscope (Olympus BX41) under an Olympus 40x 0.65 PLAN objective lens (positive phase-contrast field).

To accomplish this, 5  $\mu$ l of sperm sample were placed on a slide, then mounted with a coverslip, and later incubated at 25°C in 100% humidity for 30 minutes to immobilise the spermatozoa. Three counts of 100 sperm cells each were carried out, and the spermatozoa were classified into two categories according to the state of their acrosome: intact or reacted.

## 7 Osmotic resistance test (ORT)

The osmotic resistance of spermatozoa was carried out using a Schilling (1986) modified test, as described by Rodríguez-Gil and Rigau (1995). One hundred  $\mu$ l of sperm sample were added to two different Eppendorf tubes. Then, 900  $\mu$ l of a hypotonic solution containing 1% (w/v) sodium citrate, and adjusted to pH 7.4 (osmotic pressure:  $102 \pm 5$  mOsm·Kg<sup>-1</sup>), were added to one tube, and 900  $\mu$ l of an adjusted (pH 7.4) isotonic solution of 3.2% (w/v) sodium citrate (osmotic pressure:  $305 \pm 7$  mOsm·Kg<sup>-1</sup>) to the other. Aliquots were then incubated at 37°C for 1 hour, and subsequently stained by the eosin-nigrosin method (Rodríguez-Gil and Rigau, 1994; Rodríguez-Gil et al., 2006). Three counts of 100 spermatozoa were carried out, taking into account the viability and percentage of the altered acrosomes (AR).

The percentage of ORT was calculated by applying the formula described by Sánchez (1991):

$$ORT = 100 - \frac{AR_{isotonic} + AR_{hypotonic}}{2}$$



# Chapter III

---

## Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15°C

### **1 Introduction**

- 1.1 Pig reproduction: semen extenders and artificial insemination
- 1.2 Improvement of seminal doses and sperm quality
- 1.3 Concepts relating to osmolality

### **2 Objectives**

### **3 Material and methods**

- 3.1 Effects of the addition of prostaglandin F<sub>2α</sub> on sperm quality
- 3.2 Effects of the addition of hyaluronic acid and caffeine on sperm quality
- 3.3 Effects of osmolality changes on sperm quality and fertility prediction using osmotic resistance

### **4 Results**

Article 1

Article 2

Article 3

### **5 General Discussion**

### **6 Conclusions**



# Chapter III Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C

---

## 1 Introduction

### 1.1 Pig reproduction: semen extenders and artificial insemination

1.1.1 General concepts relating to semen extenders

1.1.2 Extender composition and functions

1.1.3 Refrigeration and cryopreservation extenders

1.1.4 Artificial insemination

### 1.2 Improvement of seminal doses and sperm quality

1.2.1 General concepts

1.2.2 Prostaglandin F<sub>2α</sub>

1.2.3 Hyaluronic acid

1.2.4 Caffeine

### 1.3 Concepts relating to osmolality

1.3.1 Osmosis, osmotic pressure and biologic membranes

1.3.2 Osmolality and molarity

1.3.3 Isotonic, hypotonic and hypertonic solutions

1.3.4 Osmotic resistance of spermatozoa

1.3.5 Effects of osmotic stress on spermatozoa





---

# 1 Introduction

---

## 1.1 Pig reproduction: semen extenders and artificial insemination

### 1.1.1 General concepts relating to semen extenders

The extender or diluent is defined as an aqueous solution that allows us to increase the volume of the ejaculate up to the required amount, for distribution as seminal doses, while preserving sperm function and maintaining a suitable fertility level. Spermatozoa are contained in the seminal plasma that provides them the nutrients required to maintain the high level of metabolic activity necessary for their transport along the female genital tract. From the time of the first studies concerning boar sperm preservation, it has been well known that semen ejaculate is only able to maintain this metabolic activity for a few minutes. For this reason, the metabolic activity of spermatozoa must be reduced if they are to be preserved for longer, by means of dilution in an appropriate medium and a reduction in their storage temperature (Gadea, 2003; Estienne et al., 2007).

Boar spermatozoa are very sensitive to cold shock due to their physico-chemical characteristics (Pursel et al., 1973). Specifically, the lipid composition of the plasma membrane explains this phenomenon. The lateral movements of plasma membrane phospholipids are reduced when the temperature decreases, causing a lipid-phase separation and involving irreversible changes to membrane proteins. These changes alter the function of the sperm membrane, thereby compromising cell viability (Buhr et al., 1989; White, 1993). This susceptibility to cold shock makes it necessary to keep sperm samples at between 15°C and 20°C, as a more extreme reduction in storage temperature may limit the viability of seminal doses (Paulenz et al., 2000, 2002; Kommisrud et al., 2002).

However, storage at these temperatures puts a limit on the length of time sperm samples can be kept, because cell metabolism is not sufficiently reduced and the control of microbiological contamination is not as effective as it would be at lower temperatures, such as

5°C. On the other hand, sperm dilution involves a reduction in the levels of certain ions and molecules that are present in the seminal plasma and play a key role in sperm viability, such as potassium ion ( $K^+$ ) (Harrison et al., 1978) and seminal plasma proteins. Since the reduction of these substances may alter sperm viability, a proper formulation of the extender is required. With this aim, bovine serum albumin (BSA) or some vegetal proteins have been added to extender as a means of improving its ability to preserve sperm, because it has been demonstrated that these proteins stimulate sperm motility (Waberski et al., 1989) and improve the reproductive performance of stored semen (Waberski et al., 1994).

### **1.1.2 Extender composition and functions**

In order to carry out its function, extender must provide nutrients needed to maintain spermatozoon's metabolism (monosaccharides such as glucose and fructose), to protect it from cold shock (BSA), to control environmental pH (Bicarbonate, Tris, HEPES) and osmotic pressure (NaCl, KCl, sodium citrate), and to inhibit microbiological growth (antibiotics such as kanamycin) (Estienne et al., 2007).

#### *1.1.2.1 Nutrients*

A spermatozoon is able to produce the energy required to maintain cell metabolism and to beat its tail, principally by glycolytic pathways. These processes occur in mitochondria, which are located in the intermediate, also known as mitochondrial, piece. In the extender, the source of energy is often glucose, even though other sources such as galactose, ribose and trehalose have also been used, without better results ever being observed than those obtained for glucose (Gadea, 2003).

#### *1.1.2.2 pH regulation*

Immediately after ejaculation, semen pH is approximately  $7.4 \pm 0.2$ , like other organic fluids. When pH decreases, the energetic metabolism of the spermatozoon and its motility are also reduced. The spermatozoon's glycolytic metabolism reduces the intracellular pH, and cell metabolism also decreases. Lactate is the main metabolite of this biological process, and its biochemical analysis has been used as a sperm quality index (Rigau et al., 1996). The addition

of buffers to the extender is therefore needed to control the pH. Various buffers are used, differentiating between simple systems, such as bicarbonate or sodium citrate, which both have only a limited ability to buffer pH, and more complex systems such as Tes, Hepes, Mops or Tris, that are able to regulate pH within a wider range, even if changes in temperature occur (Mops and Hepes) (Gadea, 2003).

The pH of commercial extenders usually ranges from 6.8 to 7.2 units, but two considerations must be taken into account. First, pH is not stabilised until 90 minutes after dilution of the powder in water; and second, different extenders present different patterns of pH values over time (Newth and Levis, 1999). For these reasons, care is needed when preparing the extender in order to avoid additional problems in the procedures for preserving the sperm

#### *1.1.2.3 Osmotic pressure*

Osmotic pressure varies among commercial extenders for refrigerated storage, ranging from 240 to 380 mOsm·Kg<sup>-1</sup>, a range of osmolality that boar spermatozoon is able to tolerate. In fact, various reports have studied spermatozoa tolerance against different osmotic pressures, and concluded that neither sperm motility nor viability are compromised when osmolality is ranged between 250 and 390 mOsm·Kg<sup>-1</sup> (Fraser et al., 2001). Conversely, damage occurs when osmotic pressure is lower than 200 mOsm·Kg<sup>-1</sup> (Gilmore et al., 1996, Fraser et al., 2001).

In any case, isotonic (300 mOsm·Kg<sup>-1</sup>) or slightly hypertonic extenders have been reported as the best diluents for maintaining sperm function and commercialising the seminal doses destined for artificial insemination (Schilling and Vengust, 1986). Halide salts such as sodium chloride (NaCl) and potassium chloride (KCl) are those most often used in semen extenders in order to regulate osmotic pressure.

#### *1.1.2.4 Antibiotics*

Antibiotics are added to avoid bacterial growth in the extender, because nutrients such as glucose and the storage temperature (15°C) of refrigerated semen doses allow the development of gram-negative bacteria like *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Pseudomonas sp.* Furthermore, bacterial contamination causes various alterations in sperm

function, i.e. a decrease in sperm motility, sperm agglutination, acrosome reaction and a decrease in pH to acidic levels of between 5.7 and 6.4 (Althouse et al., 2000), resulting in a reduction in the time that seminal doses can be stored in the proper conditions.

### **1.1.3 Refrigeration and cryopreservation extenders**

Depending on the aim, two types of extenders can be distinguished: diluents to store boar sperm at 15-20°C (refrigeration) or diluents to freeze/thaw sperm (cryopreservation).

Refrigeration extenders are divided into two groups based on the period of storage. Accordingly, there are short-term extenders, when semen is kept for between one and three days (Johnson et al., 1982); and long-term extenders, for keeping the semen for more than four days (Dubé et al., 2004; Vyt et al., 2004; Haugan et al., 2007). The former are usually used in Europe, where the distances between centres of dose production and artificial inseminations (AI) farms are small, or where dose production and AI even occur on the same farm. The latter are employed, for example, in the United States and Norway where the distances are considerably greater.

Cryopreservation extenders contain egg yolk (LEY) and glycerol (LEYGO) as cryoprotective agents, a high glucidic content, buffer systems (like Tris) and detergent agents (Royere et al., 1996; Gadea, 2003). As a result of this formulation, the method of sperm cryopreservation is based on two stages: a cooling step (up to 5°C) and the so-called freezing stage (Eriksson and Rodríguez-Martínez, 2000).

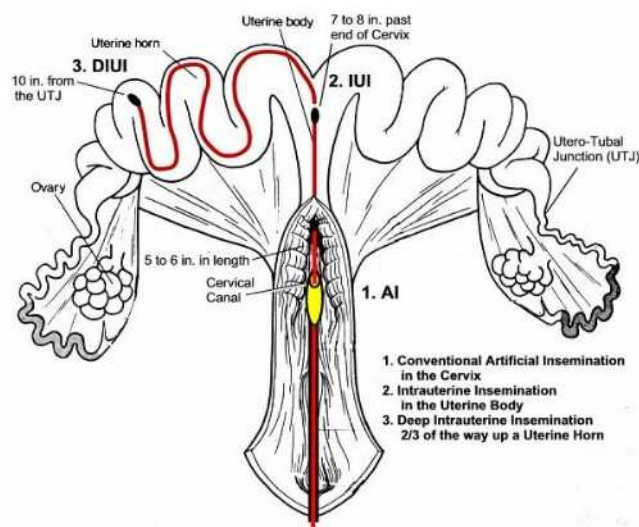
### **1.1.4. Artificial insemination**

The first artificial insemination (AI) was carried out by Ivanow in Russia at the beginning of the last century (Ivanow, 1907; 1922). Later, in the thirties, its use was extended around Russia (Rodin and Lipatov, 1935; Milovanow, 1938), and arrived in other countries such as the United States (McKenzie, 1931) and Japan (Ito, 1948). In the fifties, AI extended to the United Kingdom thanks to work developed by Polge (1956). This technique offers the advantage of using the genetic potential of the best boars with a large number of sows, making genetic improvement easier. However, AI was not generalised commercially until the eighties, when insemination protocols were standardised (Crabo, 1990; Johnson et al., 2000).

It is evident that the use and methods of AI have been improved since its beginning almost a century ago.

Currently, porcine artificial insemination with fresh and cooled semen is a widely used technique in the developed world, although its use is variable in different countries. In European countries (Spain, France, the United Kingdom, Germany, Netherlands, Norway etc.), AI is more widely used than in the United States. The most recent studies reported that 99% of AI is performed using sperm cooled to 15–20°C (Johnson et al., 2000). Of these inseminations, 85% are carried out within 24 hours of semen extraction. There are various reasons to explain the generalised character of AI in pigs, such as the dissemination of the best boar's phenotype and that results are better than with natural mating.

Conversely, frozen–thawed boar semen is rarely used for conventional (cervical) AI in commercial piglet production (Waterhouse et al., 2006), due to farrowing rates being lower than when cooled sperm is used. However, in recent years other AI techniques, such as post-cervical, intrauterine and deep intrauterine, have been developed with the aim of improving success rates (Figure III-1).



**Figure III-1** Diagram of the sow reproductive tract illustrating the site of semen deposition for three different types of artificial insemination (Belstra, 2002)

One of these procedures is known as deep intrauterine AI (Ekwall et al., 1996) and consists of placing spermatozoa near to the uterotubal junction. This is an advantage with regard to conventional AI because the population of spermatozoa that colonises the oviducts is higher in deep intrauterine AI, so that the number of spermatozoa that are able to fertilise

the oocyte is higher, and the volume and the sperm concentration of the seminal dose required to inseminate is lower.

## 1.2 Improvement of seminal doses and sperm quality

### 1.2.1 General concepts

Currently, the majority of artificial inseminations in porcine farms are performed using doses of cooled semen. Although different studies (Colenbrander et al., 2003; Christensen et al., 2004) have demonstrated that ejaculate characteristics only explain a low percentage (less than 10%) of the variance in fertility outcomes, measured as farrowing rates, the uses of seminal doses of high sperm quality has been set as a '*sine qua non*' condition (Correa et al., 1997; Vyt et al., 2004; Gillan et al., 2006). For this reason, the improvement of seminal doses and sperm quality is still a broad field of research when boars present poor semen quality.

Different techniques exist to improve sperm quality, mainly assessed by biochemical and cell parameters (sperm viability, motility and morphology). Among these methods, sometimes used as a step previous to the experimental manipulation of seminal doses in research laboratories (Petrunkina et al., 2003), the following can be distinguished:

- **Centrifugation with continuous or discontinuous density gradients.** These gradients can be made up of various different substances; the most commonly employed are Percoll, Ficoll and BSA (Vincent and Nadeau, 1984; Graham and Graham, 1990; Petrunkina et al., 2003). Specifically, after Percoll washing with a discontinuous gradient (35/70%), the procedure used to wash spermatozoa prior to co-culture with epithelial cells in Chapter IV, cytoplasmic droplets are located at the interface between the extender and the 35% Percoll, gel debris and aggregated sperm in gel material are located at the interface between 35% and 70%, and the great majority of the individual spermatozoa should have passed through the 70% layer.
- **Spermatozoa migration** that allows the separation of sperm cells according to their motility. On this basis, different techniques like swim-up, swim-down and their variants can be distinguished (Georgiou et al., 1998).
- **Gel-filtration of seminal doses** through columns containing matrices varying in their chemical nature and with different electric charges, such as Sephadex, wool and glass beads or Leucosorb (Centola et al., 1998; Adiga and Kumar, 2001; Bussalleu et al.,

2007). Although the sperm concentration of filtered doses is lower than for non-filtered ones, the matrix also retains non-viable and aberrant spermatozoa so that the sperm quality of filtered doses is higher than for the others.

- **The addition of different substances to extended seminal doses**, and the administration of numerous pharmacological agents to increase the speed of sperm transport (Traas and Kustritz, 2004). The improvement in cooling and freezing/thawing extenders, by adding different molecules, such as prostaglandin F<sub>2α</sub> or hyaluronic acid, has been performed both in human and other domestic animals species (Barkay et al., 1984; Fattouh et al., 1991; Ponce et al., 1999; López et al., 2000; Yeste et al., 2007a; Yeste et al., 2007b).

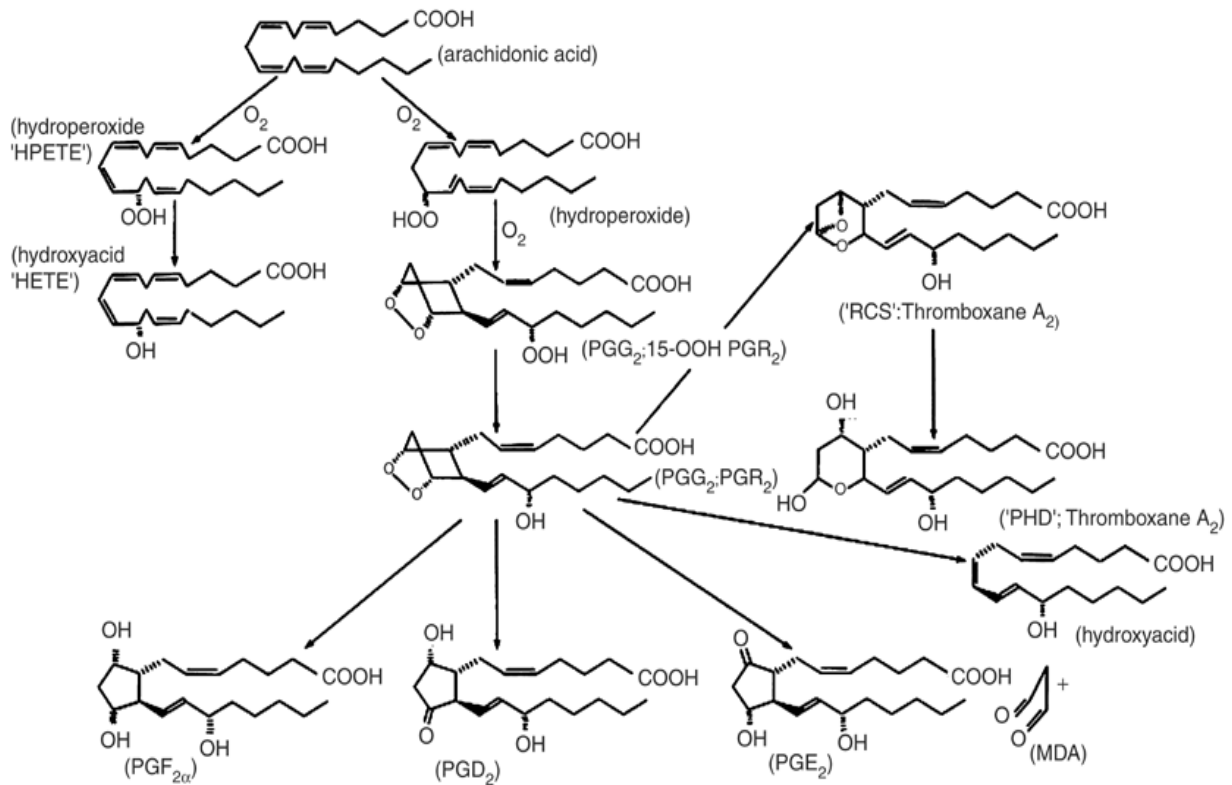
### 1.2.2 Prostaglandin F<sub>2α</sub>

Prostaglandins (PGs) are 20 carbon fatty acids (eicosanoids) that have a cyclopentane ring. They are widely distributed in vertebrate tissues and play several roles in a wide array of physiological processes (Kingsley et al., 2005). Prostaglandins are produced by the *bis*-dioxygenation of arachidonic acid (20:4) to form hydroperoxy endoperoxide (PGG<sub>2</sub>), followed by the reduction of the PGG<sub>2</sub> to hydroxyl endoperoxide (PGH<sub>2</sub>). These transformations are catalysed by cyclooxygenases (Figure III-2). Hydroxyl endoperoxide is then transformed by different enzymes to PGs and thromboxane A<sub>2</sub> (Kingsley et al., 2005). Such cyclooxygenases are present in the apical region of the head, the post-acrosomal region and the mid-piece of the tail of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa, as immunohistochemical studies have shown (Shalev et al., 1994).

Prostaglandins are related to several reproductive processes, being present in seminal fluid (Templeton et al., 1978) and in cervical mucus (Charbonnel et al., 1982), and Roy and Ratnam (1992) even showed that human spermatozoa are able to synthesise prostaglandins. These hormones produce different effects on tubal smooth muscle *in vitro*; thus, prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) increases tubal muscle contractility and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) inhibits the contraction of circular muscles (Lindblom, 1978). Gottlieb and co-workers (1988b) reported that the oral administration of PGE<sub>2</sub> had an effect on the contractile elements in the deferent duct, influencing cyclooxygenase activity. Recent studies suggest that the transport of the embryo and the communication between the embryo and the fallopian tube involve



prostaglandin action through PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> receptors, in addition to the effect of PGs on the vascular system and muscular contractility (Wanggren et al., 2006).

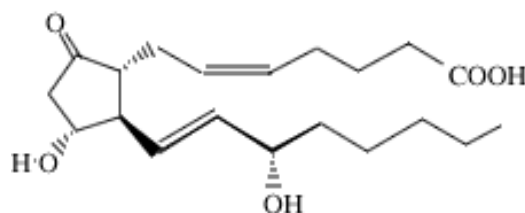


**Figure III-2** Prostaglandins syntheses from arachidonic acid (Flower, 2006)

In the research field of PGs and oviductal cells, Gimeno and colleagues (1985) studied the effect of follicular fluid containing PGs on the motility of isolated oviducts in sows. The role of PGs and other arachidonic acid metabolites in the events leading to acrosome reaction and fertilisation has been investigated (Joyce et al., 1987). Several papers regarding the study of prostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> (PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub>) and their effects on sperm function have also been delivered (Aitken and Kelly, 1985; Gottlieb et al., 1988a). Early on, Aitken and Kelly (1985) reported relevant results concerning human spermatozoa, such as a significant increase in both sperm velocity and penetrating ability. These authors also pointed out that certain PGs might change the functional competence of human spermatozoa. Other studies have shown that progesterone and follicular fluid cause an immediate increase in intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>) in human spermatozoa, and that some prostaglandins may stimulate acrosome reaction (Margalioth et al., 1988; Thomas and Meizel, 1988; Osman et al., 1989; Blackmore et al., 1990; Baldi et al., 1991). In line with this, Herrero and colleagues (1997) concluded that

PGE<sub>1</sub> is a capacitating factor *in vitro* for mouse spermatozoa, and Shimizu and co-workers (1998) studied the mechanisms by which prostaglandins exist in seminal fluid; they concluded that PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub> promoted Ca<sup>2+</sup>-influx in human spermatozoa.

On the other hand, the hormone PGF<sub>2α</sub> (Figure III-3) has been used in swine operations for the synchronisation and induction of farrowing and to increase the libido of boars (Estienne and Harper, 2004). It is thought that PGF<sub>2α</sub> added to boar semen for AI may increase reproductive performance. Moreover, the physiological role of PGF<sub>2α</sub> and other seminal components in a sow's reproductive tract contribute to the timing of ovulation in response to mating (Claus, 1990).



**Figure III-3** Chemical formula of Prostaglandin F<sub>2α</sub>

The effects of different types and amounts of prostaglandins (19-OH-PGE, 19-OH-PGF, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>1α</sub> and PGF<sub>2α</sub>) on human sperm function have also been reported (Bendvold et al., 1984). While the addition of PGF<sub>1α</sub> reduced sperm motility, 19-OH-PGE stimulated motility and penetration ability positively and 19-OH-PGF diminished ATP concentration in sperm. In contrast, the other assessed prostaglandins (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, and PGF<sub>2α</sub>) had no effect on sperm function (Gottlieb et al., 1988b).

It is well known that PGF<sub>2α</sub> improves fertility (Gustaffson et al., 1975; Gamcik, 1980; Hawk, 1983). Sperm transport is a combination of active and passive transport, and passive transport is mediated by uterus contractions; PGF<sub>2α</sub>, like other PGs, may enhance such contractions by inducing them. As has been previously mentioned, PGF<sub>2α</sub> is an important smooth muscle contractile agent that exerts a significant uterotonic effect via the specific PGF<sub>2α</sub>-receptor that has been identified in the myometrium of humans, sheep and rats (Friel et al., 2005). Prostaglandin F<sub>2α</sub> acts by binding to the PGF<sub>2α</sub>-receptor, and a signal transduction pathway that leads to the mobilisation of intracellular Ca<sup>2+</sup> is then activated (Olson et al., 2003). The role of this mechanism is so important that failure in parturition occurs when the PGF<sub>2α</sub>-receptor gene is knocked out (Sugimoto et al., 1997). Furthermore, the effects of

oxytocin are partially mediated by  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , which also augments the expression of an oxytocin receptor (Mirando et al., 1995).

Regarding the use of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in porcine reproduction, Cheng and colleagues (2001) added  $\text{PGF}_{2\alpha}$  to boar sperm doses 72 hours before AI without observing the inactivation of this hormone, and Kos and Bilkei (2004) also reported that  $\text{PGF}_{2\alpha}$  significantly improves reproductive performance when used to supplement extended sperm. The role of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in the sequence of ovarian events has also been studied (Madej et al., 2005). This report documented that significant changes in the plasma concentration of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  metabolite are observed 15-21 minutes after starting stimulation and AI, reaching a plateau after 30 minutes, thereby indicating the importance of this hormone.

As far as administering it is concerned,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  treatment has been used to expedite mounting behaviour and to restore libido, resulting in the display by boars of increased sex drive (Hawk, 1983; Szurop et al., 1985). Estienne and Harper (2004) studied the effects on boars' semen characteristics and libido of several treatments of injection with  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (10 mg) immediately before semen collection during a 16-week evaluation period. These authors reported there were no significant effects of long-term treatment with  $\text{PGF}_{2\alpha}$  either on boar sperm quality or on their libido. In cows, treatment with  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , when compared with no hormonal intervention, does not significantly improve the reproductive performance of postpartum dairy cows not detected in oestrus, but with a detectable corpus luteum (Rhodes et al., 2001). Finally, the postovulatory effect of repeated administration of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  on the endocrine status, ova transport, binding of accessory spermatozoa to the zona pellucida, and embryo development of recently ovulated sows has also been investigated (Mwanza et al., 2002).

Regarding the addition of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  to semen, Hashizume and Niwa (1984) reported that sperm concentration was improved, and Cheng and co-workers (2001) demonstrated that  $\text{PGF}_{2\alpha}$  supplementation in extended boar semen used in AI specifically increases myometrial contractility.

### **1.2.3 Hyaluronic acid**

Hyaluronic acid (or hyaluronan, HA) (Figure III-4) is a member of the glycosaminoglycans, a family of glucidic biomolecules. Glycosaminoglycans (GAGs) are a group of linear,

unbranched heteropolysaccharides consisting of characteristic disaccharide repeated sequences. Disaccharide unities are formed by an amino sugar and an uronic acid (Lindahl and Hook, 1978; Jackson et al., 1991).

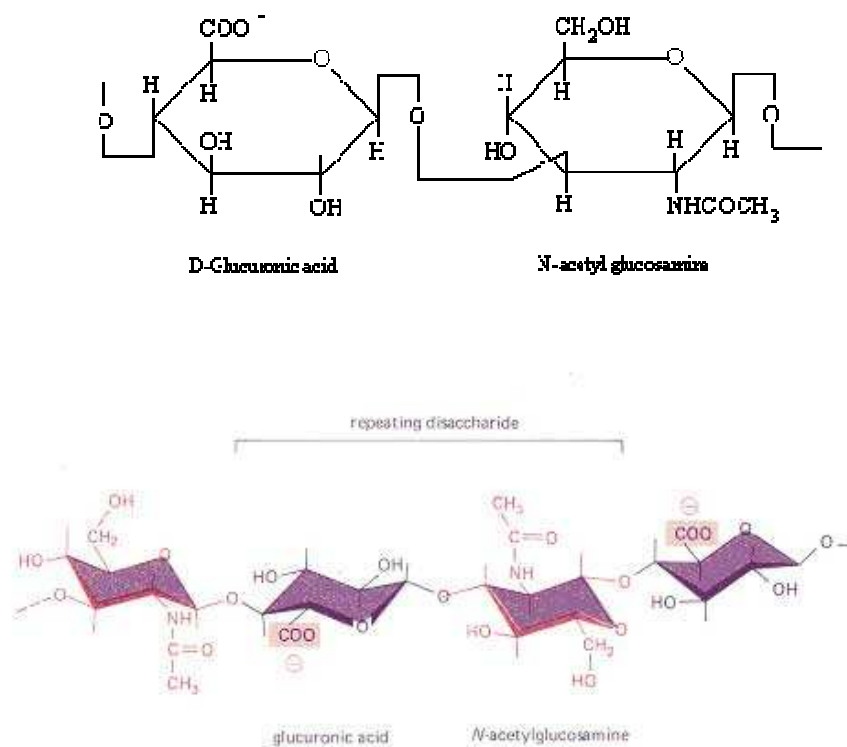
In mammals, there are four major types of GAGs: chondroitin sulphate, dermatan sulphate, heparin/heparan sulphate, and HA (Fernández-Bostrán et al., 2004). Specifically, HA is a high molecular mass (ranging from 1 to 10 million Da) and non-sulphated GAG (Crater et al., 1995), where the repeating disaccharide units consist of D-glucuronic acid (GlcUA) and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) joined alternately by beta 1-3 ( $\beta$ , 1 $\rightarrow$ 3) and beta 1-4 ( $\beta$ , 1 $\rightarrow$ 4) glycosidic bonds (Fuchs et al., 2005). Unlike other GAGs, HA is not generally covalently bound to proteins to form proteoglycans and is not sulphated (Knepper et al., 2003; Suh et al., 2005).

Hyaluronic acid is produced in the chorionic villi, foetal lung, and connective tissue fibroblasts located in the uterine cervix during parturition, by the addition of sugars to the reducing end of the polymer. Although HA is a component of the extra-cellular matrix of the connective tissue, it presents a high overall turnover rate (its half-life or  $T_{1/2}$  is from half a day to a few days). Naturally occurring HA may be found in the tissue of higher animals, whenever there is rapid tissue proliferation, regeneration and repair (Balazs, 1993). It is found in great concentrations in the vitreous humour of the eye, in the synovial fluid of articular joints, and in subcutaneous tissue where it functions as a cementing agent (O'Regan et al., 1994). The lower uterine segment and the amniotic fluid are also sources of HA (Kobayashi et al., 1999).

In respect of its functions, HA plays several physiological roles in bacteria and higher animals including humans, e.g. in water and plasma protein homeostasis, in cell development, differentiation and regulation (Lauren and Fraser, 1992), and in cell migration by interacting with its receptor (CD 44). The most important property of HA is its water binding capacity that gives structure to tissue and lubricates joints and muscles, and its anti-inflammatory and anti-oedematous roles. In osteoarthritis, changes in the HA level occur in cartilage, leading to its degradation (Balazs, 1993).

Different studies have shown that HA plays some role in mammal reproduction. It is able to improve the motility of mammal spermatozoa, when added to sperm (Huszar et al., 1990, Sbracia et al., 1997; Peña et al., 2004), and allows a decrease in polyspermy in *in vitro* fertilisation (IVF) procedures (Suzuki et al., 2000). Intriguingly, HA seems to induce an

acrosome reaction in several species, including humans (Slotte, 1993; Sabeur et al., 1998), monkeys (VandeVoort et al., 1997), hamsters (Stanley et al., 1986) and boars (Peña et al., 2004), although Rodríguez-Martínez and co-workers (2001) observed a delaying effect *in vivo*. Regarding sperm capacitation and the female reproductive tract, HA may also play a key role in releasing spermatozoa from the oviductal reservoir (Liberda et al., 2006).



**Figure III-4** Chemical formula of repeating disaccharide unit in HA

### 1.2.4 Caffeine

Caffeine is a 1, 3, 7-trimethylxanthine nitrogen heterocyclic purine analogue (Figure III-5) and a competitive antagonist at adenosine receptors. Since it binds to these receptors in the brain without activating them, it acts as a stimulant of the central nervous system.

Caffeine also inhibits competitively phosphodiesterase enzyme within the cell, resulting in an increased concentration of intracellular adenylyl cyclase-cyclic adenosine monophosphate (cAMP), a second messenger that increases sperm motility (Nassar et al., 1999). It has even been shown to have the ability to prevent some re-uptake of nor-

epinephrine (Combettes et al., 1994), and it has been demonstrated that it is rapidly absorbed and distributed in all body tissues and fluids including the central nervous system, foetal tissues, and breast milk.

In the field of mammal reproduction, caffeine is used to stimulate sperm motility and the capacitation of spermatozoa in humans (Rees et al., 1990), boars (Funahashi and Nagai, 2001) and bulls (Coscioni et al., 2001). In IVF procedures, caffeine is usually employed not only to induce sperm capacitation (Mattioli et al., 1989; Funahashi and Day, 1993; Funahashi and Nagai, 2001), but also to facilitate the penetration of cervical mucus (Aiken et al., 1983). However, reports on the effects of caffeine on human sperm morphology have been contradictory. Whereas Harrison and colleagues (1980) demonstrated that caffeine causes ultrastructural abnormalities, Barkay and co-workers (1984) reported that it did no damage.

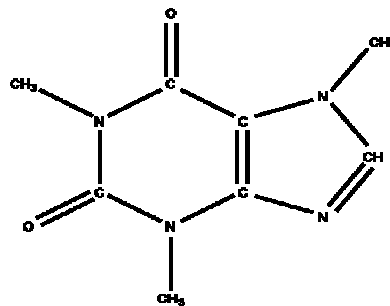


Figure III-5 Chemical formula of caffeine

## 1.3 Concepts relating to osmolality

### 1.3.1 Osmosis, osmotic pressure and biologic membranes

Osmosis is the phenomenon observed when a solution is separated from its solvent by a semi-permeable membrane, and consists of the solvent diffusion from a lower to a higher concentration through this semi-permeable membrane. Osmotic pressure is the pressure applied to the hyperosmotic compartment to prevent solvent movement.

Biological membranes offer different permeabilities in respect of different solutes; for this reason, biological membranes are often referred to as semipermeables because of the way they permit some small molecules to pass through, but prevent bigger ones (Sten-Knudsen, 2002).

### 1.3.2 Osmolality and molarity

Osmolality depends on molarity and whether the solute ionises or not. Ionisation increases the number of particles in solution, so the relation between osmolality and molarity is:

$$Osm = k \times M$$

Where:

*Osm* is the osmolality

*M* is the molarity

*k* is the number of particles with solute ionised in solution

Thus, for example, when 180 g of glucose are dissolved in a litre of water, the molarity is 1 M and the osmolality is 1 Osm·Kg<sup>-1</sup>, because glucose does not ionise in solution. Conversely, when 58.5 g of sodium chloride (NaCl), a salt that ionises in two ions (Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>), are dissolved in a litre of water, then molarity is 1 M but osmolality is 2 Osm·Kg<sup>-1</sup> (Table III-1).

**Table III-1** Osmolality and molarity

Type of solute	Example	Dissolution	Relationship Osm-M
Not ionises	Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6(s)</sub> + H <sub>2</sub> O → C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6(aq)</sub>	Osm = M
Ionises	Sodium chloride (NaCl)	NaCl <sub>(s)</sub> + H <sub>2</sub> O → Na <sup>+</sup> <sub>(aq)</sub> + Cl <sup>-</sup> <sub>(aq)</sub>	Osm = 2M

Therefore, osmotic pressure depends on the number of particles, but does not depend on electric charges or molecular mass. Thus, a big molecule such as haemoglobin, which has a high molecular mass and several charges, exerts the same osmotic pressure as an ion, like sodium cation (Na<sup>+</sup>) or chloride anion (Cl<sup>-</sup>) (Sten-Knudsen, 2002).

### 1.3.3 Isotonic, hypotonic and hypertonic solutions

The osmotic pressure of most body fluids is similar to an isotonic aqueous solution of 0.9% NaCl. In fact, a solution is isotonic in terms of a cell when change is neither produced in the water balance in the cell nor observed when the solution comes into contact with the cell.

In general, the osmolality of an isotonic solution is similar to that of blood plasma, i.e. about 300 mOsm·Kg<sup>-1</sup>. Most refrigeration extenders, such as Beltsville Thawing Solution (BTS), the one employed in this study that was purchased from Cidoso (Valencia, Spain), are

isotonic (Schilling and Vengust, 1986). On the other hand, the osmolality of a hypotonic solution is lower than  $300 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , and that of a hypertonic one higher than this threshold.

An increase in osmotic pressure of any solution can be accomplished by a variation in ionic concentration. However, the addition of these ions requires previous knowledge of their effects. Thus, for example, bivalent and trivalent cations induce sperm agglutination;  $\text{Ca}^{2+}$  induces sperm capacitation (Tulsiani et al., 2007) and acrosome reaction, and chloride anion ( $\text{Cl}^-$ ) activates  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Sodium and chloride ions play a principal role in the regulation of the osmotic pressure of epididymal fluid during sperm maturation (Rossato et al., 1996).

When studying the effects of osmolality changes on the environment, different media are used. Basically, these media consist of isotonic saline solutions, such as Krebs–Henseleit Ringer (KHR), supplemented with water or other molecules (e.g. sodium chloride, glucose, fructose, glycerol or sodium citrate) to modify the osmotic pressure (Caiza de la Cueva, 1997b). In order to determine whether the effects of osmotic changes on spermatozoa were only due to osmolality or also due to the substance added, two ionic molecules (NaCl and sodium citrate) and one non-ionic molecule (glucose) were used in Article 3, in accordance with previous reports (Fraser et al., 2001; Rigau et al., 2001; Agca et al., 2002; Pommer et al., 2002).

#### **1.3.4 Osmotic resistance of spermatozoa**

The integrity of spermatozoa plasma membrane can be measured by the hypoosmotic swelling (HOS) test. This test, first described in humans (Jeyendran et al., 1984; 1992), measures sperm cell resistance against hypotonic media, and consists of diluting 0.1 ml ejaculate with 0.9 ml hypotonic solution (containing fructose and sodium citrate and adjusted to  $150 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ). After dilution, sperm samples are incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 30 minutes and intact or plasmolysed acrosomes are monitored by a phase contrast microscope.

Some years later, Chan and co-workers (1993) described a method combining the HOS test with a supravital stain. While the HOS test mainly tells us about the stability (functional integrity) of the tail membrane, this test, known as the vHOS, is more specific to the integrity of the head membrane. Although the technique is easy to perform and provides information about the state of spermatozoon membranes, its use is restricted in routine clinical practice in humans, because of controversy about its correlation with fertility rates *in vivo* (Keel, 1990;



Weiske and Maleika, 1990; Van den Saffele et al., 1992; Takahashi et al., 1990, 1994). On the other hand, Lechniak and co-workers (2002) have used the HOS test to assess the sperm membrane function after capacitation.

In boars, the determination of osmotic resistance is an important test, especially in centres where AI seminal doses are produced. The osmotic resistance test (ORT), similar to HOST, was described by Schilling and co-workers (1986) and has been used as a predictor of the potential fertility and prolificacy of an ejaculate (Sánchez, 1991). This test consists of diluting 0.1 ml sperm sample with 0.9 ml of two different solutions of sodium citrate in double distilled water, one isotonic ( $300 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) and the other hypotonic ( $115 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) and then incubating it at  $37^\circ\text{C}$  for 1 or 2 hours. After counting, folded tails and reacted acrosomes in both solutions and the ORT index are calculated. Standard values of the ORT index ranged from 55 to 67 (depending on the incubation time of the sample). When the ORT index is lower than 50, the ejaculate is considered as poor quality semen and it is not usually commercialised (Schilling et al., 1986).

As with the HOS test, other studies have been developed to improve ORT. Rodríguez-Gil and Rigau (1994 and 1995), for example, introduced a modification by staining with a double vital method using trypan blue-giemsa dye following incubation (HRT). Pérez-Llano and co-workers (1998, 2003) reduced the incubation time and changed the anisotonic solution, maintaining the osmolality of the isotonic solution ( $300 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), but decreasing the osmolality of the hypotonic to  $75 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . Similarly, Rota and colleagues (2000) reduced the osmolality of the hypotonic solution to  $100 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  with bulls. Both solutions are made by adding fructose and sodium citrate to double distilled water. And finally, Nascimento and co-workers (2001) described a variant of the ORT, consisting of a reduction in the incubation period (called short ORT).

Regarding the ability of the osmotic tolerance of spermatozoa to predict ejaculate fertility in domestic species, Petrunkina and colleagues (2001b) found a relationship between sperm-cell volume (measured electronically) in response to hypo-osmotic changes, and 56-day non return rates ( $\text{NRR}_{56\text{d}}$ ) in bulls. Interestingly, Pérez-Llano and co-workers (2003) have found a relationship between hypoosmotic shock and fertility in boar spermatozoa, so that HOS test and ORT are jointly assessed along with other sperm quality parameters, such as sperm viability, motility and morphology, in sperm quality assessments and in experiments of IVF (Gadea and Matás, 2000; Gadea, 2005).

### 1.3.5. Effects of osmotic stress on spermatozoa

In general, osmotic shock affects the diffusion of phospholipids in the bilayer membrane of spermatozoa (Christova et al., 2002), and an increase in osmotic pressure in the environment reduces sperm motility and damages the acrosome (Curry and Watson, 1994; Liu and Foote, 1998, Rossato et al., 2002; Chantler and Abraham-Peskir, 2004).

It has been reported that the addition of raffinose to the media, in a range of osmolalities from 276 to 450 mOsm·Kg<sup>-1</sup>, induces volume changes in the vesicles of plasma membrane at the intermediate piece, and even damages them in the human spermatozoa of normozoospermic patients (Chantler and Abraham-Peskir, 2004). Citing this response by spermatozoa to osmotic stress, Chantler and Abraham-Peskir (2004) concluded that the presence of these vesicles in the intermediate piece plays a relevant role in sperm function in non-stressful conditions.

The properties of spermatozoa response to osmotic changes occurring in the environment have been used for studying sperm function (Pommer et al., 2002; Chantler and Abraham-Peskir, 2004), for improving sperm cryopreservation procedures (Gao et al., 1993; Curry and Watson, 1994; Gilmore et al., 1996; Liu and Foote, 1998; Rossato et al., 2002; Abraham-Peskir et al., 2002; Guthrie et al., 2002), and as a tool to predict fertility (Petrunkina et al., 2001b), not only in boar but also in human and other mammal species.

Osmotic tolerance is one of the most important mechanisms involved in sperm resistance to cryopreservation protocols (Mazur, 1984; Curry and Watson, 1994). Osmotic challenges due to cryopreservation protocols initially trigger sperm-cell shrinking because of the osmotic efflux of intracellular water. When this happens, the spermatozoa swell and return to normal volume (from isotonic conditions) when the cryoprotectant agent and water enter (Gao et al., 1997; Curry et al., 2000). In short, the freezing/thawing procedures cause extreme osmotic stress that potentially damages the function of the spermatozoon and its chances of survival (Pukazhenthil et al., 2000).



# **Chapter III** Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C

---

## **2 Objectives**



---

## 2 Objectives

---

The main objective of this chapter is to contribute to boar sperm preservation technology in storage at 15-17°C (Articles 1 and 2) and the development of other sperm parameters that will allow us to predict fertilising capacity (Article 3).

Nowadays, the use of artificial insemination has replaced natural mating in pigs and great efforts are being made to enhance reproductive performance by improving AI techniques, semen extenders, and the quality of seminal doses. Since the hormone PGF<sub>2α</sub> can increase reproductive performance when added to extended semen (Cheng et al., 2001; Kos and Bilkei, 2004), the **first objective** of this chapter is to demonstrate that the addition of this hormone alone or in combination with caffeine and hyaluronic acid does not cause any harm to sperm quality in storage at 15°C over a 10 day period.

Also with the aim of improving the quality of seminal doses, the **second objective** consists of assessing the effects on sperm parameters of the addition of hyaluronic acid in short-term storage at 15°C for three days, with special reference to sperm capacitation. Although the effects of hyaluronic acid are contradictory when refrigeration and incubation are compared (Rodríguez-Martínez et al., 2001; Peña et al., 2004), it does seem to delay sperm capacitation in the former case. Since caffeine stimulates sperm motility and induces sperm capacitation, this methylxanthine was used as a positive control in the experiment designed to achieve the second objective.

Finally, the last three objectives are related to the study focus of the third article. Thus, the **third objective** is to evaluate the response of boar spermatozoon, in terms of sperm quality, to osmotic stress (in a range of osmolalities from 100 to 4000 mOsm·Kg<sup>-1</sup>). The **fourth objective** is to find the relationship between conventional spermogram parameters and *in vivo* fertility and prolificacy trials, assessed as non-return rates within 60 days of first inseminations (NRR<sub>60d</sub>) and litter size (LS).

Since one of the goals in pig reproduction is to set down a method of predicting the fertilising capacity of an ejaculate (Rodríguez-Martínez, 2003) and some classical spermogram parameters are not good enough to predict such capacity, the **fifth objective** of this chapter is to use the tolerance of spermatozoa against a wide range of osmolality changes as a new parameter for assessing sperm function. For this reason, osmotic tolerance for sperm viability, morphology and percentages of acrosome-reacted sperm are later used in formulating optimised regression models, utilising  $NRR_{60d}$  and LS as dependent variables.

# Chapter III Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C

---

## 3 Material and methods

- 3.1 Effects of the addition of prostaglandin F<sub>2α</sub> on sperm quality
  - 3.1.1 Boars and sperm samples
  - 3.1.2 Treatments
  - 3.1.3 Experimental design
  - 3.1.4 Statistical analyses
- 3.2 Effects of the addition of hyaluronic acid and caffeine on sperm quality
  - 3.2.1 Boars and sperm samples
  - 3.2.2 Treatments
  - 3.2.3 Experimental design
  - 3.2.4 Statistical analyses
- 3.3 Effects of osmolality changes on sperm quality and fertility prediction using osmotic resistance
  - 3.3.1 Boars and sperm samples
  - 3.3.2 Preparation of osmotic solutions and treatments
  - 3.3.3 Experimental design
  - 3.3.4 Resistance to osmotic stress
  - 3.3.5 Sows and field fertility probes
  - 3.3.6 Statistical analyses





---

## 3 Material and methods

---

### 3.1 Effects of the addition of prostaglandin F<sub>2α</sub> on sperm quality

#### 3.1.1 Boars and sperm samples

In this study, sixteen ejaculates (n=16) from sixteen Piétrain boars were used. The boars were healthy and sexually mature, their age (mean ± standard error of the mean, SEM) was 20.9 ± 0.7 months and their average weight was 164.1 ± 4.2 Kg. They were housed in climate-controlled buildings (relative humidity and temperature) and fed twice with an adjusted commercial diet (2.3 Kg per day).

The boars were subjected to a twice-weekly extraction rate (with an interval of three days between collections) using the gloved-hand technique and mounting on a dummy sow (Hancock and Howell, 1959). The total volume of the sperm-rich fraction was filtered through gauze to remove the gelatinous fraction. After dilution 1:5 (v/v) in a BTS-based extender (Cidos; TecnoVit, Valencia, Spain; Johnson et al., 1988), samples were packaged in seminal doses of 80 ml and cooled to 15°C. These were then transported to the laboratory at 15°C.

#### 3.1.2 Treatments

Overall, eleven treatments were assayed. These treatments consisted of different concentrations of PGF<sub>2α</sub> (Dinolytic<sup>®</sup>, Pharmacia<sup>®</sup>, Barcelona, Spain; 5 mg PGF<sub>2α</sub>·ml<sup>-1</sup>) with three of them also combining PGF<sub>2α</sub> with hyaluronic acid (HA; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) or caffeine (Caf; Panreac<sup>®</sup>, Barcelona, Spain), as follows:

- 0.625 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml
- 1.25 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml
- 2.50 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml
- 5 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml

- 10 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml
- 12.50 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml
- 25 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml
- 50 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml
- 0.625 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml + 200 μg·ml<sup>-1</sup> HA
- 1.25 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml + 200 μg·ml<sup>-1</sup> HA
- 0.625 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml + 7.5 μM Caf

### 3.1.3 Experimental design

On arrival, the sperm samples were aliquoted in accordance with the treatment and cooling time to be tested. The negative control consisted of sperm in commercial diluent. Treatments were then added to sperm samples diluted in BTS-based extender and immediately after their addition (time 0), an aliquot was incubated at 37°C for 15 minutes. The sperm parameters (sperm viability, sperm morphology, sperm motility, sperm agglutination and osmotic resistance (ORT)) were then assessed. The rest of the aliquots were stored at 15°C and analysed at the following relevant time points: after one day, three days, six days and ten days. As a consequence of this procedure, the effects of PGF<sub>2α</sub> on boar sperm quality were tested in relation to the amount of added substance, binary combinations with two other compounds, and preservation time.

This study was carried out over eight weeks from mid-January to mid-March, in winter 2005. In the first, third, fifth and seventh weeks, four ejaculates from four different boars were received, and the analyses were performed at the time points that immediately followed, i.e. after the first and the third days. In the second, fourth, sixth and eighth weeks, the assessments were carried out after the sixth and tenth days of cooling. Each ejaculate was split into 60 aliquots (11 treatments + negative control, and 5 different preservation times; i.e., 12×5).

No contamination, assessed by phase contrast microscopy at 40x magnification, was observed at any time during the study.

### 3.1.4. Statistical analyses

Each ejaculate (every ejaculate coming from a boar) was considered as a statistical case (n=16). Data from all ejaculates were managed using Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2003

(Microsoft<sup>®</sup> Corporation, Redmond, Washington, USA) and SPSS<sup>®</sup> software (version 13.0) for Windows<sup>®</sup> (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Eighteen variables were subjected to statistical analysis: viable spermatozoa (VB), acrosome reacted spermatozoa, mitochondrial sheath damaged spermatozoa, PMOT, MOT, VCL, VAP, VSL, ALH, BCF, LIN, STR, WOB, mature, immature, aberrant, agglutinated spermatozoa and ORT.

Firstly, these variables were assessed in negative controls and compared to each other using either a one-way analysis of variance (ANOVA) or a Kruskal-Wallis test when, although transformed, the distribution of the variable was non-normal. In both tests, the boar was the factor. No significant differences ( $P>0.05$ ) were observed among them.

It was necessary to remove the effect of individual boars because the treatments were assessed within aliquots from the same sample (paired data). Therefore, ratios were calculated per variable and treatment with respect to control as follows:

$$\text{Ratio}_{(v,t)} = \frac{\text{V treatment}}{\text{V negative control}}$$

Ratio variables were then tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test and for homoscedasticity with Levene’s test (setting the significance level at 5%). When data ( $x$ ) were non-normal, three transformations were performed (square root ( $\sqrt{x}$ ),  $\log_{10}(x)$  and arcsine square root ( $\arcsin \sqrt{x}$ )) to achieve normal distribution and accomplish the assumptions of variance analysis.

Parametric statistics were used for transformed variables that reached normality (ALH, BCF, LIN, STR, WOB, percentages of mature, immature and aberrant spermatozoa, the percentage of agglutinated spermatozoa, and ORT). These tests consisted of one-way ANOVA for repeated measures (where the cooling time was the intra-subject factor, the treatment was the inter-subject factor and each ratio parameter was the dependent variable) with post hoc Dunnett’s test. Moreover, each treatment was compared with the control for each period of time using a Student’s t-test with Bonferroni correction.

Non-parametric statistical procedures were used when no transformation remedied the normality (viable spermatozoa, acrosome reacted spermatozoa, mitochondrial sheath damaged spermatozoa, PMOT, MOT, VCL, VAP and VSL). Friedman’s test was carried out as a non-parametric alternative to repeated measures ANOVA and the Wilcoxon matched pairs test

was used to evaluate differences between control and treatments as well as the effects of preservation time (Sheskin, 2000).

In all statistical analyses, the significant level was set at 5%.

## **3.2 Effects of the addition of hyaluronic acid and caffeine on sperm quality**

### **3.2.1 Boars and sperm samples**

In this study, twenty-eight sperm samples from twenty-eight healthy and post-pubertal Piétrain boars were used. The age (mean  $\pm$  SEM) of the boars was  $21.2 \pm 0.7$  months and the average weight was  $163.0 \pm 4.0$  Kg. These boars were housed in buildings with stable conditions of controlled temperature and humidity, and were fed an adjusted commercial diet (2.3 Kg per day).

Semen was collected twice a week, with an interval of three days between collections, by means of the gloved-hand method and mounting on a dummy sow (Hancock and Howell, 1959). The sperm-rich fraction was filtered through gauze to remove the gelatinous fraction and, after dilution 1:9 (v/v) in a BTS-based extender (Cidosa, TecnoVit; Johnson et al., 1988), split into 80 ml semen doses and used to assess sperm quality. These doses were later transported to the laboratory at 15°C and used within 24 hours after extraction.

No fertility problems were recorded by the AI station.

### **3.2.2 Treatments**

As a step prior to setting treatments to be assayed, preliminary trials were carried out using different concentrations of HA (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) and caffeine, the positive control (Caf; Panreac<sup>®</sup>). After that, the following eleven treatments were designed:

- HA 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
- HA 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
- HA 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
- HA 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
- HA 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
- CAF 0.25 mM
- CAF 0.5 mM

- CAF 1 mM
- CAF 2 mM
- CAF 4 mM
- CAF 8 mM

### 3.2.3 Experimental design

After arrival the sperm samples were aliquoted in accordance with the treatment and cooling time to be assessed. The negative control consisted of sperm in commercial diluent and treatments were added to sperm samples also diluted in the same extender. After preparation (time 0), an aliquot was incubated at 37°C for 15 minutes and then the sperm quality parameters (sperm capacitation, sperm viability, sperm morphology, sperm motility and ORT) were tested. The rest of the aliquots were stored at 15°C and analysed after one, two, and three days of storage.

This study was performed over seven weeks from December 2004 to January 2005. Four ejaculates obtained from four different boars were received per week, and each ejaculate was split into 48 aliquots (i.e. 11 treatments + negative control and four different cooling times, i.e. 12×4).

During this study, bacterial growth was never observed while using a phase contrast microscopy at 40x magnification.

### 3.2.4 Statistical analyses

Each of the twenty-eight ejaculates from twenty-eight boars was considered as a statistical case (n=28). The data were analysed using Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2003 (Microsoft<sup>®</sup> Corp.) and SPSS<sup>®</sup> for Windows<sup>®</sup> software (SPSS Inc.; version 14.0).

For each variable resulting from the assessment of sperm parameters (viability, capacitation, motility, morphology and ORT), a ratio, with the temporal axis (t), was calculated as follows:

$$\text{Ratio}_{(v,t)} = \frac{V \text{ treatment}}{V \text{ negative control}}$$

The aim of using ratios instead of raw data to perform statistical analyses was to remove any distortion due to individual effect in the analyses of the effects of treatments and preservation time on sperm quality. These ratios ( $x$ ) were then tested for normality and homoscedasticity using the Kolmogorov–Smirnov and Levene’s tests. Three transformations of data ( $\sqrt{x}$ ),  $\log_{10}(x)$  and  $\arcsin \sqrt{x}$ ) were effected when the distribution was not normal and/or heteroscedastic and the most suitable transformation was chosen. After transformation, data were analysed by means of one-way ANOVA for repeated measures (where the time was the intra-subject factor, the treatment was the inter-subject factor and each sperm quality parameter was the dependent variable) with the post hoc Dunnett’s test. Moreover, each treatment was compared with the negative control for each period of time, using a Student’s *t*-test with Bonferroni correction. In all statistical analyses, the significant level was set at 5%.

### **3.3. Effects of osmolality changes on sperm quality and fertility prediction using osmotic resistance**

#### **3.3.1. Boars and sperm samples**

In this study, ninety seminal samples from ninety different post-pubertal Piétrain boars were used. These boars were housed in buildings under stable, temperature-controlled conditions and fed an adjusted commercial diet (2.3 Kg per day). Their age (mean  $\pm$  SEM) was  $21.0 \pm 0.8$  months and their average weight was  $163.2 \pm 4.2$  Kg.

Ejaculates were obtained by the gloved-hand method into a 37°C glass container with males mounted on a dummy sow (Hancock and Howell, 1959), and collected twice a week, with an interval of three days between collections. The sperm-rich fraction was filtered through gauze to remove the gelatinous fraction and, after dilution 1:9 (v/v) in a BTS-based extender (Cidoso, TecnoVit; Johnson et al., 1988), split into 80 ml semen doses and then cooled at 15°C. From each ejaculate, a semen dose was transported at 15°C in an insulated container from the farm to the laboratory within 24 hours after extraction to assess the experimental design, while the others were used for AI (double inseminations), the fertility field probes being performed.

Upon arrival, sperm viability, motility, morphology and the percentage of acrosome-intact sperm in each seminal dose (diluted in commercial extender) were assessed (sperm evaluation before applying treatments).

### 3.3.2. Preparation of osmotic solutions and treatments

All osmotic pressure measurements were carried out using a freezing-point depression osmometer (1313 DR Autocal; Röbling, Berlin, Germany), which determines osmolality by conductivity. This machine was calibrated daily against 0 and 300 standards provided by Röbling.

Hypertonic solutions were prepared by adding NaCl, glucose or sodium citrate to Krebs–Henseleit Ringer (KHR) solution (103 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.56 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.13 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.15 mM NaHPO<sub>4</sub>, 2.8 mM glucose, 4.9 mM sodium pyruvate, 2.7 mM sodium fumarate, 4.9 M sodium glutamate, and 0.1% bovine serum albumin, buffered with 12.5 mM Hepes at pH 7.4). The osmolality of the KHR solution was experimentally measured as  $291 \pm 4 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  (KHR<sub>291</sub>).

A simple linear regression was worked out to investigate the relationship between the concentration of the compound added to the KHR solution (independent variable) and medium osmolality (dependent variable) (Table III-2). Hypotonic solutions were prepared by adding double distilled water (milli-Q<sup>®</sup> water, Millipore) to the KHR solution.

**Table III-2** Preparation of hypertonic treatments

Compound	Linear regression equation	Multiple R	R <sup>2</sup>
NaCl	Osmolality = 1842.8[NaCl] + 287.75	0.992	0.984
Glucose	Osmolality = 984.85[C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ] + 289.13	0.989	0.978
Sodium citrate	Osmolality = 960.65[Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ] + 290.84	0.993	0.987

Treatments consisted of a combination of osmolality, a compound used to prepare the anisotonic treatment, and the return or non-return to isotonic conditions after osmolality change (Table III-3). For NaCl, glucose and sodium citrate, six different osmolalities were prepared (500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000 and 4000 mOsm·Kg<sup>-1</sup>). With regard to hypotonic treatments, three different osmolalities were assessed (100, 150 and 200 mOsm·Kg<sup>-1</sup>).

### 3.3.3 Experimental design

Ten µl from a seminal dose (sperm diluted in the BTS-based extender at 15°C) were added to 200 µl of each of 24 different osmolalities (taking into account that three compounds were used to prepare the hypertonic treatments) or to 200 µl of KHR (the negative control).



Table III-3 Osmotic treatments

Treatment	Type	Osmolality	Compound	Modality
Hypo-NR-100	Hypotonic	100 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	milli-Q <sup>®</sup> water	Non-return
Hypo-R-100	Hypotonic	100 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	milli-Q <sup>®</sup> water	Return
Hypo-NR-150	Hypotonic	150 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	milli-Q <sup>®</sup> water	Non-return
Hypo-R-150	Hypotonic	150 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	milli-Q <sup>®</sup> water	Return
Hypo-NR-200	Hypotonic	200 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	milli-Q <sup>®</sup> water	Non-return
Hypo-R-200	Hypotonic	200 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	milli-Q <sup>®</sup> water	Return
NaCl-NR-500	Hypertonic	500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Non-return
NaCl-R-500	Hypertonic	500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Return
Gluc-NR-500	Hypertonic	500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Non-return
Gluc-R-500	Hypertonic	500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Return
NaCit-NR-500	Hypertonic	500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Non-return
NaCit-R-500	Hypertonic	500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Return
NaCl-NR-750	Hypertonic	750 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Non-return
NaCl-R-750	Hypertonic	750 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Return
Gluc-NR-750	Hypertonic	750 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Non-return
Gluc-R-750	Hypertonic	750 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Return
NaCit-NR-750	Hypertonic	750 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Non-return
NaCit-R-750	Hypertonic	750 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Return
NaCl-NR-750	Hypertonic	1000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Non-return
NaCl-R-750	Hypertonic	1000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Return
Gluc-NR-1000	Hypertonic	1000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Non-return
Gluc-R-1000	Hypertonic	1000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Return
NaCit-NR-1000	Hypertonic	1000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Non-return
NaCit-R-1000	Hypertonic	1000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Return
NaCl-NR-1500	Hypertonic	1500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Non-return
NaCl-R-1500	Hypertonic	1500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Return
Gluc-NR-1500	Hypertonic	1500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	No return
Gluc-R-1500	Hypertonic	1500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Return
NaCit-NR-1500	Hypertonic	1500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Non-return
NaCit-R-1500	Hypertonic	1500 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Return
NaCl-NR-2000	Hypertonic	2000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Non-return
NaCl-R-2000	Hypertonic	2000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Return
Gluc-NR-2000	Hypertonic	2000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Non-return
Gluc-R-2000	Hypertonic	2000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Return
NaCit-NR-2000	Hypertonic	2000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Non-return

**Table III-3** Osmotic treatments (continuation)

Treatment	Type	Osmolality	Compound	Modality
NaCit-R-2000	Hypertonic	2000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Return
NaCl-NR-3000	Hypertonic	3000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Non-return
NaCl-R-3000	Hypertonic	3000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Return
Gluc-NR-3000	Hypertonic	3000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Non-return
Gluc-R-3000	Hypertonic	3000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Return
NaCit-NR-3000	Hypertonic	3000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Non-return
NaCit-R-3000	Hypertonic	3000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Return
NaCl-NR-4000	Hypertonic	4000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Non-return
NaCl-R-4000	Hypertonic	4000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	NaCl	Return
Gluc-NR-4000	Hypertonic	4000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Non-return
Gluc-R-4000	Hypertonic	4000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Glucose	Return
NaCit-NR-4000	Hypertonic	4000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Non-return
NaCit-R-4000	Hypertonic	4000 mOsm·Kg <sup>-1</sup>	Sodium citrate	Return

Samples were then incubated at 37°C for 15 minutes. Next, sperm viability, motility and morphology and the percentage of acrosome-intact sperm were assessed for non-return treatments (NR).

For return treatments (R) to isotonic media, 40 µl of each sample were added to a tube containing 2 ml of KHR (iso-osmotic conditions) previously warmed to 37°C, and the solution incubated for 15 minutes at 37°C. Then, sperm viability, motility and morphology and the percentage of acrosome-intact sperm were assessed.

For each treatment (n=48), the parameters of osmotic resistance parameters (see Section 3.3.4) were also calculated. These parameters were then correlated with data from fertility probes (see Section 3.3.5) using linear regression methods (see Section 3.3.6) (Figure III-6).

The present study was performed over nine weeks, from October to December 2004, with 10 ejaculates being received per week. The inseminations were carried out during the same period, each ejaculate being used for inseminating four sows.

### 3.3.4 Resistance to osmotic stress

The resistance to osmotic stress was defined for each spermatological parameter (P) (i.e. sperm viability, motility, and morphology, and acrosome-intact sperm) as a value in osmotic

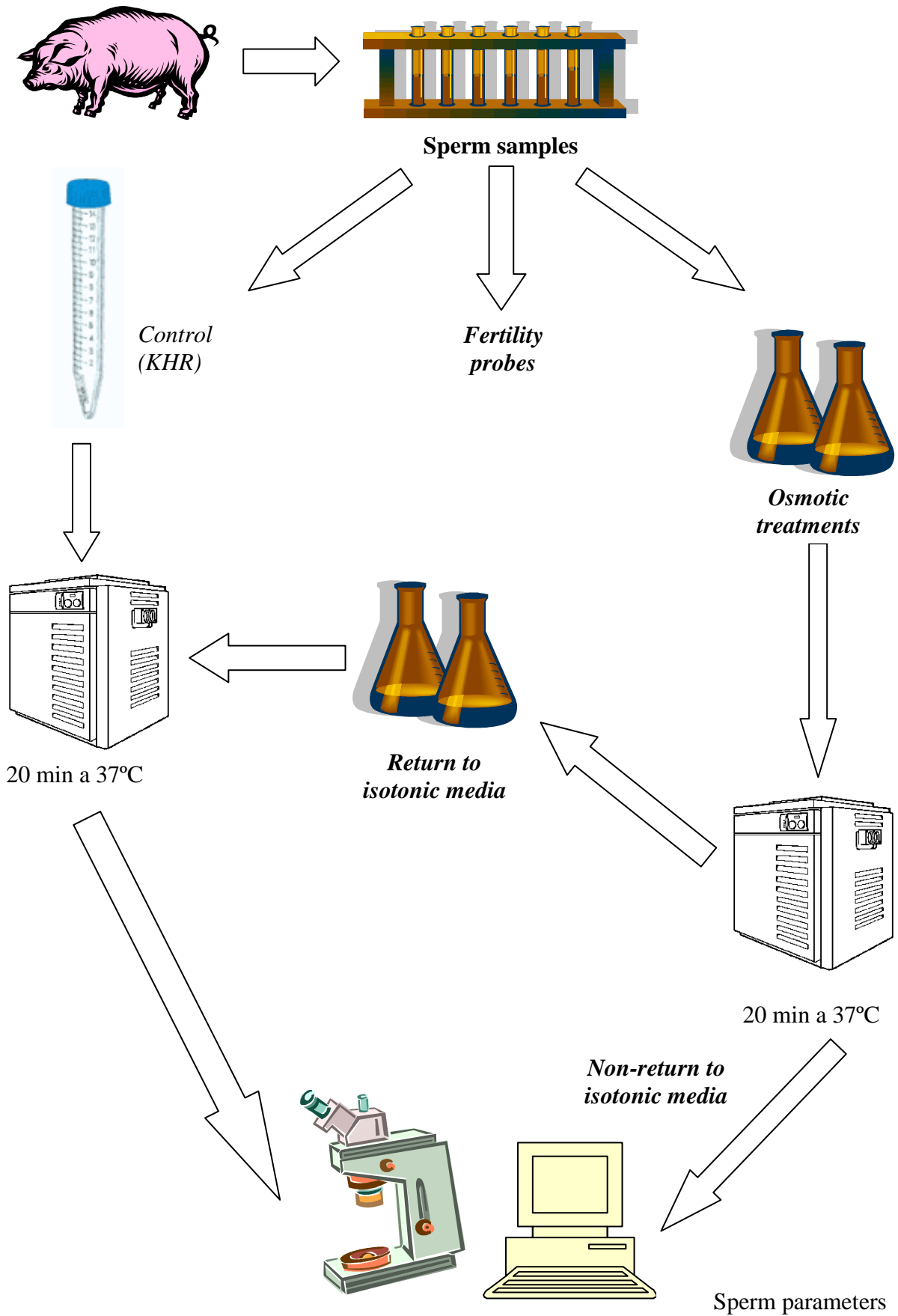


Figure III-6 Experimental design of Article 3

treatment (T) (from 100 to 200 and from 500 to 4000 mOsm·Kg<sup>-1</sup>) divided by the value in isotonic KHR<sub>291</sub> as follows:

$$\text{Resistance of } P_{(T)} = \frac{P_{(T)}}{P_{(KHR)}} \times 100$$

Where:

*P* is the spermatological parameter

*T* is the osmotic treatment

Table III-4 shows the osmotic resistance parameters assessed and their description.

**Table III-4** Osmotic resistance parameters (spzoa=spermatozoa)

Parameter	Description	Calculation
VB <sub>r</sub>	Osmotic resistance in sperm viability	VB <sub>r</sub> =(VB <sub>treatment</sub> /VB <sub>KHR</sub> )×100
PMOT <sub>r</sub>	Osmotic resistance in sperm progressive motility	PMOT <sub>r</sub> =(PMOT <sub>treatment</sub> /PMOT <sub>KHR</sub> )×100
MOT <sub>r</sub>	Osmotic resistance in sperm motility	MOT <sub>r</sub> =(MOT <sub>treatment</sub> /MOT <sub>KHR</sub> )×100
MR <sub>r</sub>	Osmotic resistance in percentage of mature spzoa	MR <sub>r</sub> =(MR <sub>treatment</sub> /MR <sub>KHR</sub> )×100
ACR <sub>r</sub>	Osmotic resistance in percentage of intact acrosome	ACR <sub>r</sub> =(ACR <sub>treatment</sub> /ACR <sub>KHR</sub> )×100

### 3.3.5 Sows and field fertility probes

The sows (n=360) used in the fertility trial were multiparous (sow parity, mean ± SEM: 3.1 ± 0.6), aged between 1.5 and 2.5 years old, and fed with a commercial adjusted diet (2.2 Kg per day). They were housed in a commercial pig farm in Girona (Spain).

These females were weaned at 21 days, and the ovulation was then hormonally synchronized. With this aim, 1250 IU of equine chorionic gonadotrophin (eCG, Folligon<sup>®</sup>; Intervet S.A., Salamanca, Spain) 24 hours after weaning, followed by 750 IU of human chorionic gonadotrophin (hCG, Veterin Corion<sup>®</sup>; Divasa, Farmavic S.A., Barcelona, Spain) 72 hours later, were administrated by intramuscular injection to every sow. After 24 hours of administering eCG, the oestrus detection was carried out by an expert technician, with the standing reflex being tested once a day.

Sows were inseminated twice per oestrus, within an interval of four hours, in the presence of a boar and AI was performed with seminal doses (every dose had a concentration of 3×10<sup>9</sup> spermatozoa·ml<sup>-1</sup> and a volume of 90 ml) within 12 hours of semen extraction. Artificial

inseminations were carried out using a conventional AI method with a cervical catheter (Magapor S.L., Zaragoza, Spain) lubricated with mineral oil (Fertilube<sup>®</sup>, Magapor S.L.), the sows being kept under the usual farm conditions.

The field fertility of a given boar was determined by the non-return rate to oestrus after the first insemination, which is defined as the proportion of sows that are inseminated and do not return for another service within 60 days (NRR<sub>60d</sub>). Pregnancy diagnosis was also verified by ultrasonography with an Echoscan T-100 scanner (Import-vet S.A., Barcelona, Spain). Litter size (LS) was recorded at parturition, by total number of the piglets born per litter. Every ejaculate was used to inseminate twice four different sows.

Fertility data were collected and transferred to a database for correlation with treatment data. The farmers provided us the NRR<sub>60d</sub>, which ranged from 81.8% to 87.9%, and the LS, which ranged from 11.8 to 12.6 piglets born per litter, only after the experiments had been performed. The average NRR<sub>60d</sub> (mean  $\pm$  standard error of the mean, SEM) of the sows used to evaluate boar fertility was  $84.5 \pm 2.1\%$  and the average of LS was  $12.0 \pm 0.5$ .

### 3.3.6. Statistical analyses

All statistical analyses were performed by means of Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2003 (Microsoft<sup>®</sup> Corp.) and SPSS<sup>®</sup> for Windows<sup>®</sup> software (SPSS Inc.; version 14.0) with a significant level of  $P < 0.05$ .

#### 3.3.6.1 *Effects of osmotic shocks on sperm viability, motility, morphology and acrosome-intact sperm*

For each sperm quality parameter subjected to statistical analyses, a ratio per ejaculate (x) was calculated as a quotient between the value in osmotic solution (depending on the compound: double distilled water, NaCl, Glucose, Sodium citrate, and the osmolality: 100, 150, 200, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000 and 4000 mOsm·Kg<sup>-1</sup>) and the value of the same parameter in BTS, as follows:

$$\text{Ratio}_{(P,T)} = \frac{P_T}{P_{\text{BTS}}}$$

The results obtained were analysed using a one-way ANOVA with an independent factor (the treatment) and a dependent variable (the sperm quality parameter) and post hoc Tukey's test. Each ejaculate (n=90) was considered as a statistical case. Before applying the ANOVA test, the ratios (x) were tested for normality and homoscedasticity using the Kolmogorov–Smirnov and Levene's tests. When necessary, the data were transformed using either square root ( $\sqrt{x}$ ),  $\log_{10}(x)$  or arcsine square root ( $\arcsin \sqrt{x}$ ).

### 3.3.6.2 Correlations between sperm viability, motility, morphology and acrosome-intact sperm with $NRR_{60d}$ and LS

Firstly,  $NRR_{60d}$  were transformed using logit transformation, the log-odds being used for subsequent calculations (i.e. correlation and multiple regression).

$$\text{Logit}(NRR_{60d}) = \ln\left(\frac{NRR_{60d}}{1 - NRR_{60d}}\right)$$

Sperm viability, motility, morphology and acrosome-intact sperm measured in BTS-based extender were correlated with logit ( $NRR_{60d}$ ) and LS by means of Pearson correlation using previously linear transformed data when necessary.

### 3.3.6.3 Regression between osmotic tolerance and $NRR_{60d}$ and LS

Linear regression analyses (Pearson correlation and multiple regression) were used to determine the resistance capacity to osmotic changes of spermatological parameters (VBr, OTr, PMOTr, MORFr and ACRr) to predict logit( $NRR_{60d}$ ) and LS.

The procedure used (Forward stepwise model) consisted in optimising the regression equation to increase the  $R^2$  (Holt et al., 1997; Petrunkina et al., 2001a). The significance level for introducing each parameter in the multiple regression model was 0.10 and the significance level ( $\alpha$ ) for the model was 0.05.



# Chapter III Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C

---

## 4 Results

- 4.1 **Article 1** Boar spermatozoa and prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  to the short-term extender over cooling time
  - 4.1.1 Introduction
  - 4.1.2 Material and Methods
  - 4.1.3 Results
  - 4.1.4 Discussion
  - 4.1.5 References
- 4.2 **Article 2** Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15°C
  - 4.2.1 Introduction
  - 4.2.2 Material and Methods
  - 4.2.3 Results
  - 4.2.4 Discussion
  - 4.2.5 References
- 4.3 **Article 3** The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its correlation with fertility and prolificacy
  - 4.3.1 Introduction
  - 4.3.2 Material and Methods
  - 4.3.3 Results
  - 4.3.4 Discussion
  - 4.3.5 References





# **Chapter III** Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C

---

## **4 Results**

---

### **Article 1**

Boar spermatozoa and prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  to the short-term extender over cooling time

*(Animal Reproduction Science, doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.08.008)*



## **Chapter III** Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C

---

### **4 Results**

---

#### **Article 2**

Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15°C

(*Animal Reproduction Science*, doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.003)



## **Chapter III** Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C

---

### **4 Results**

---

#### **Article 3**

The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its correlation with fertility and prolificacy

*(Theriogenology, under review)*



# **Chapter III** Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C

---

## **5 General Discussion**





---

## 5 General Discussion

---

The use of AI with fresh and cooled semen has become a routine practice in the swine industry, and in developed countries it has replaced natural mating (Johnson et al., 2000). Attempts to improve AI techniques (Ekwall et al., 1996) and the quality of seminal doses (Correa et al., 1997; Vyt et al., 2004) have been going on for a long time, with the aim of increasing reproductive performance. In relation to the latter, much of the effort has focused on boar sperm preservation technology, even though sperm quality only explains a small percentage (less than 10%) of the variance in fertility trials (Vyt et al., 2004; Gillan et al., 2006). For example, Christensen and co-workers (2004) have demonstrated that variation in litter size is mainly due to herd effects and residual variations, and have shown that the effect of an individual male and an ejaculate on fertility outcome is limited.

Because only 5.5% of variation in fertility is due to sperm quality (according to the report mentioned above), and in view of the studies reporting its minor role, it is very difficult to see how methods of assessing its quality can be improved. However, farms only commercialise ejaculate of high sperm quality. It is for this reason that some different methods have been developed in an effort to find such an improvement, for example centrifugation with density gradients, swim up, and gel-filtration of seminal doses (Georgiou et al., 1998; Adiga and Kumar, 2001; Bussalleu et al., 2007).

Another strategy for increasing fertility outcomes consists of adding different substances to cooled or frozen seminal doses in order to improve their storage. Depending on the substance added, the effects on sperm quality vary and affect different sperm parameters, i.e. sperm viability, capacitation and motility, as shown by previous reports on humans and domestic animals (Dougherty et al., 1976; Barkay et al., 1984; Fattouh et al., 1991; López et al., 2000).

As has been previously explained, sperm quality can be assessed by evaluating cell and/or biochemical parameters (Knobil and Neil, 1994; Briz, 1994; Sancho, 2002). In Articles 1, 2, 3

and 4, sperm quality has been assessed by means of cell parameters. Thus, sperm viability was assessed by staining with a multiple fluorochrome-staining test (Bussalleu et al., 2005), and sperm motility and morphology were determined by using a CASA system, because CASA systems have been validated in different mammalian species (human, dog and boar) (Maes et al., 2003).

In the present chapter, two studies (Articles 1 and 2) have been carried out to improve boar semen preservation technology by adding two different substances, namely  $\text{PGF}_{2\alpha}$  and HA, with in both cases an evaluation of the effects of caffeine addition, and also the effects of long-term (ten day) and short-term (three day) storage. In Article 1, the effects of the addition of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  to seminal doses in a BTS-based extender have been evaluated over a 10-day preservation period at 15°C. As is well known, the addition of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  improves fertility outcomes (Gustaffson et al., 1975; Gamcik et al., 1980) by increasing uterus contractions and thus performing a role in sperm transport. The main goal of Article 1 was therefore to investigate whether the addition of this hormone caused any damage to sperm quality during this period.

In fact, this is not the first time that the effects of different concentrations of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  on sperm parameters have been studied (Maes et al., 2003). However, the original contribution of the study described in Article 1 is that different  $\text{PGF}_{2\alpha}$  treatments and different preservation time points are assessed, and that sperm quality is not only evaluated in terms of sperm motility (Maes et al., 2003), but also in terms of sperm viability and mitochondrial sheath and acrosome integrity, sperm morphology, agglutination and sperm osmotic resistance.

Concentrations of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  have been revealed as cytotoxic when equal to or higher than 12.5 mg/100 ml. At these concentrations, sperm viability drops dramatically and the reduction in sperm motility and cinematic parameters (VSL, VCL, and VAP), and also in osmotic resistance, is very significant. Moreover, preserving sperm in BTS for more than six days is considered harmful for sperm storage, since BTS is a short-term extender. Interestingly, a dramatic reduction in sperm viability is observed in many treatments and negative controls after six days' preservation at 15°C, but not when an addition of 5 mg of  $\text{PGF}_{2\alpha}$ /100 ml and treatments with HA and caffeine (see Material and methods section of this chapter) have previously been made at day 0. This result is surprising because the first hypothesis in this study did not predict changes in sperm quality after an addition of  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , but only no harmful effect. Data for different sperm parameters (i.e. viability, motility and osmotic resistance) are

correlated, and significant increases compared with the negative control at the sixth and tenth days are found. From this we can conclude there is a treatment (PGF<sub>2α</sub> 5 mg/100 ml) that may be used to improve the BTS extender, but since BTS is a short-term extender, further research might be needed to assess the effects of such treatment on sperm quality using long-term extenders (Dubé et al., 2004; Haugan et al., 2007).

On the other hand, the added substances (PGF<sub>2α</sub>, HA and caffeine) cause no damage to sperm morphology as no decrease in the percentage of mature spermatozoa and no increase in the percentage of aberrations, such as coiled tails or big head, are shown in either study.

In general, impairments to sperm viability, motility, agglutination and osmotic resistance are not caused by treatments but by preservation time, as observed after ten days of preservation. Even though the use of long-term extenders is controversial because of pathogen contamination when preserving sperm for more than three days, no bacterial contamination was observed during the cooling period. This finding is consistent with a previous study dealing with short (BTS) and long-term commercial extenders (e.g. Mulberry III, Androhep™ and Acromax™) (Vyt et al., 2004). Specifically, one of the consequences of preserving sperm in BTS for a too-long period is sperm agglutination, as observed after six days of storage, and matching previous reports (Sánchez, 1991).

The study of the addition of PGF<sub>2α</sub> (with or without low concentrations of caffeine and HA) allows us to conclude that this hormone can be added to seminal doses to increase sperm transport by inducing contractions in the myometrium (Gil et al., 1998; Kos and Bilkei, 2004; Friel et al., 2005), without damaging sperm quality so long as its concentration level is less than 10 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml. These substances, therefore, can be added to sperm doses diluted in BTS-based, and perhaps to long-term extenders, and produce beneficial effects for AI.

The effects of HA and caffeine on sperm quality have also been compared in short-term (over three days) preservation at 15°C in a BTS-based extender, principally focusing on the effects of these substances on sperm capacitation (assessed with CTC staining). Although the addition of HA has been shown to improve velocity and the retention of motility in both fresh (Huszar et al., 1990) and cryopreserved/thawed human (Sbracia et al., 1997) and boar spermatozoa (Peña et al., 2004), and it has been demonstrated that HA also induces an acrosome reaction of spermatozoa in humans (Slotte et al., 1993; Sabeur et al., 1998), monkeys (VandeVoort et al., 1997), hamsters (Stanley et al., 1986) and boars (Peña et al.,

2004), it is not clear what the effects are of HA on sperm capacitation. Indeed, while some reports (Suzuki et al., 2002) reported an inducing effect *in vitro*, others (Rodríguez-Martínez et al., 2001) documented a delaying-effect *in vivo*. Since the effects of caffeine on sperm capacitation are clearer than those of HA, because of its nature as a cAMP-phosphodiesterase inhibitor acting as a stimulator of sperm capacitation (Rees et al., 1990; Funahashi and Nagai, 2001), this methylxanthine was used as the positive control in Article 2.

Caffeine, as expected, increases the proportions of capacitated and acrosome-reacted spermatozoa both immediately after its addition and over the storage period. Conversely, HA has no effect on sperm capacitation immediately after its addition. After three days of storage at 15°C, two HA treatments (50 and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) have been revealed as delayers of capacitation, because the percentages of capacitated spermatozoa are lower than those of the negative control. This result, which suggests an interaction between treatments and cooling, is in disagreement with the study by Bergqvist and co-workers (2006), which reported a significant increase in the percentages of capacitated spermatozoa after incubation with HA, albeit in this report spermatozoa were incubated rather than preserved at 15°C, and the species and the experimental conditions were different.

Since caffeine is used as the positive control, the exact effects of HA on sperm capacitation in refrigeration are more evident. Thus, HA appears to play an opposite role in respect of caffeine. Whereas the latter clearly induces sperm capacitation, the former seems to delay this process throughout the three days of preservation at 15°C. Moreover, in accordance with a previous report on humans (Sabeur et al., 1998), the addition of HA without progesterone or solubilised zona pellucida (ZP) in the medium containing the male gametes does not induce the acrosome reaction. Similar controversy about the effects of HA on sperm capacitation and acrosome reaction is even observed within the different treatments assessed. Thus, when the HA concentration is 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , the proportions of reacted acrosome sperm increase relative to the negative control. This result, in disagreement with the report of Sabeur and colleagues (1998), matches the study by Slotte and co-workers (1993), who documented that sperm prepared in culture medium with HA induces acrosome reaction in humans. Also in disagreement with our results, both in terms of percentages of capacitated and acrosome-reacted spermatozoa, Suzuki and co-workers (2002) observed that high concentrations of HA (500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) in Tyrode's medium induces sperm capacitation, but not acrosome reaction after incubation at 37°C. The fact that in our study the opposite is observed may be explained by

the concentrations, the media and the incubation conditions assayed being quite different to those set by Suzuki and his colleagues.

The effect of caffeine as an inducer of sperm capacitation and acrosome reaction, and as a stimulator of sperm motility, because of its chemical properties, is widely known. Thus, Ain and co-workers (1999) observed that caffeine mobilises enough intracellular calcium from sperm to increase the levels of cAMP. However, there are also reports, such as the one by Funahashi and Nagai (2001) in cryopreserved sperm, showing that the sperm capacitation induced by caffeine is not directly related to the increase in the percentage of acrosome-reacted in frozen-thawed boar spermatozoa, but it is due to “capacitation-like processes” that occur in freezing/thawing (Watson, 1995).

To our knowledge, the study carried out in Article 2 is the first to be performed on storing at 15°C that allows us to make clear what HA’s exact role in sperm capacitation is. Some studies have suggested HA is both an inducer of capacitation *in vitro* (Suzuki et al., 2002) and a delayer *in vivo* (Rodríguez-Martínez et al., 2001), and two treatments in Article 2 (50 µg·ml<sup>-1</sup> and 100 µg·ml<sup>-1</sup>) with cooling at 15°C have confirmed the last hypothesis.

Regarding sperm viability, a small decrease is observed over the period of cooling, becoming statistically significantly different only by the third day. This again raises the suggestion that the nature of BTS-based extenders is able to maintain sperm characteristics for up to three days (Dubé et al., 2004). As for the effects of HA and caffeine on sperm viability, high concentrations of both substances (HA 200 µg·ml<sup>-1</sup> and caffeine 8 mM) cause a decrease in the percentage of viable spermatozoa with an intact acrosome and mitochondrial sheath, similar to what was observed for concentrations of PGF<sub>2α</sub> (see Article 1). In fact, high concentrations of PGF<sub>2α</sub>, HA and caffeine tend to damage acrosome integrity more than the mitochondrial sheath. The acrosome is a Golgi/endoplasmic reticulum derived acidic secretory organelle (Silva and Gadella, 2006) that triggers acrosome reaction after spermatozoa bind to the zona pellucida (ZP). However, early acrosome reactions (a false or degenerative acrosome reaction) can occur, causing spermatozoa to lose their fertilising ability (Cross and Meizel, 1989). The effects of high concentrations of these three chemically different substances provoke a general impairment in sperm quality, including increases in immotility and in the percentage of spermatozoa unable to resist osmotic changes, so they do appear to be treatments that cannot be used to improve boar sperm preservation methods.

Whereas  $\text{PGF}_{2\alpha}$  does not affect sperm motility (see Article 1), a binary treatment (1.25 mg  $\text{PGF}_{2\alpha}$ /100 ml + HA 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) significantly increases sperm progressive motility, in accordance with the report by Peña and colleagues (2004) who used HA as a stimulator of sperm motility in post-thawed boar spermatozoa. However, lower concentrations of HA, such as those assessed in Article 2, do not affect sperm motility. Conversely, again as expected, caffeine significantly increases sperm progressive motility after its addition as well as after one day's storage at 15°C, when used in a range of concentrations between 0.25 and 2 mM, which matches the results obtained by Funahashi and Nagai (2001). In a concentration range of 0.5-2 mM, caffeine significantly increases VSL, VAP and ALH after one day of cooling, and decreases VCL immediately after its addition. On the other hand, at such concentrations the percentages of LIN and STR significantly increase over the cooling period.

Sperm kinematics and sperm capacitation are related, and García-Herreros and colleagues (2005) were the first researchers to investigate boar sperm kinetics in capacitating and non-capacitating conditions (see also Chapter IV and Article 4). According to these authors, a positive relationship between the proportions of capacitated spermatozoa and the percentages of linearity and straightness in the analysis of sperm kinetic parameters have been observed in caffeine treatments. Moreover, according to them caffeine also increases ALH, but does not decrease LIN as documented by other authors (Cancel et al., 2000; Kinakuwa et al., 2003) for other species. The increases in sperm motility and in the percentage of LIN as well as in the percentage of capacitated spermatozoa are similar to those observed by Holt and Harrison (2002) after stimulating sperm with bicarbonate. The relationship between sperm capacitation and sperm kinematics is also observed in the results provided by HA treatments, in that no significant changes in the percentages of LIN and STR, or in the percentage of capacitated spermatozoa, are observed after the addition of HA.

The study described in Article 2 is the first to determine the effects of HA on sperm capacitation, viability, motility, morphology, and osmotic resistance as a whole over three-days at 15°C, using caffeine as the positive control. Although the results obtained differ from those obtained by other authors for both boars and other species (Ponce et al., 1999), various reasons (such as the media and the conditions of incubation and preservation) can be found to explain these differences.

In summary, HA at 50-100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  seems to delay sperm capacitation after 3 days of storage at 15°C, without causing any harm at this level to the other sperm parameters. At these

concentrations it appears that HA can be added to BTS-based extenders thereby improving boar sperm preservation technology and even having a positive effect on monospermic penetration rates in IVF (Suzuki et al., 2000). Since a delaying effect on sperm capacitation is only observed after three days of preservation, the maximum time recommended for keeping sperm in BTS, more research is required, with experiments using long-term extenders and other storage conditions, in relation to both time and temperature.

Apart from improving the quality of seminal doses, another important question that arises in reproductive biology, especially in pig industry, is predicting the fertilising ability of a given ejaculate (for review, see Rodríguez-Martínez, 2003). It is for this reason that so much effort has been put into evaluating the relationship between ejaculate characteristics and field fertility.

In boars, as in other domestic species such as stallions (Colenbrander et al., 2003), the certainty in predictions of fertility and prolificacy using sperm assessment is still low. However, most studies continue to investigate semen quality assessment methods (Juonala et al., 1999; Christensen et al., 2004; Bussalleu et al., 2005; Sutkeviciene et al., 2005; Turba et al., 2007), demonstrating the difficulty of identifying the more fertile boars (Gadea, 2005). In addition, Quintero-Moreno and his colleagues (2004) reported that as fertilisation is a complex process and that a multivariate analysis is needed to properly assess sperm quality.

Conventionally, farms determine sperm quality by using the classical spermogram parameters of seminal doses before they are commercialised, these being sperm viability, concentration, motility, morphology, and acrosome-reacted sperm. However, such classical parameters are often not good enough to predict the fertilising ability of a given ejaculate, and fail to identify the sub-fertile samples (Ruiz-Sánchez et al., 2006; Turba et al., 2007). For this reason, other methods based on sperm function (e.g. sperm capacitation, the *in vitro* fertilisation of homologous oocytes, zona binding ability, and the response of spermatozoa to osmotic changes of media) (Gadea, 2005; Collins, 2007) or that consist of determining the concentrations of some molecules in seminal plasma (e.g. heparin-binding proteins, clusterin or reactive oxygen species (ROS)) (Braundmeier and Miller, 2001) have been developed to determine sperm characteristics.

Among such methods, the assessment of the spermatozoa's resistance to changes in media osmolality has been set as a parameter for assessing sperm function. The utility of this



parameter has proved controversial, and sometimes no relationship has been found with *in vivo* fertility and prolificacy (Jeyendran et al., 1984). The hypoosmotic swelling test (HOS) and osmotic resistance test (ORT) are examples of such assessments. The HOS test, first developed for human sperm in the eighties by Jeyendran and his colleagues (1984) and then employed in domestic animals (dogs, pigs, and cattle), studies the biochemical activity of the plasmalemma of spermatozoa, based on water transport across the spermatozoon's tail membrane. Some modifications to the original formulation of this test have been made. Thus, for example, Pérez-Llano and colleagues (2003) in boars and Rota and co-workers (2000) in bulls submitted spermatozoa to hypoosmotic solutions at 75 and 100 mOsm·Kg<sup>-1</sup> respectively, and Chan and colleagues (1993) described a method which combines the HOS test with a supravital stain (vHOS test). On the other hand, Nascimento and co-workers (2001) described a variant of the ORT described by Schilling and Vengust (1986), consisting of a reduction in the incubation period (called short ORT). Finally, Lechniak and co-workers (2002) used the HOS test to assess the sperm membrane function after capacitation in an effort to gain a better understanding of this physiological process.

Apart from HOS and ORT and their modifications, other studies using osmotic tolerance as a tool to predict fertility have been carried out in several different species. Thus, for example, Petrunkina and co-workers (2001b) have documented a relationship between sperm-cell volume (measured electronically) in response to hypo-osmotic changes and fertility trials (assessed as 56-day non return rates, NRR<sub>56d</sub>) in bulls.

Due to its relation with sperm function, the evaluation of spermatozoa tolerance to changes in media osmolality is often jointly assessed with sperm viability, motility and morphology and spermatozoa concentration in IVF procedures (Gadea and Matás, 2001) and in cryopreservation protocols (Mazur, 1984; Curry and Watson, 1994). In relation to the latter, osmotic challenges due to cryopreservation protocols initially trigger sperm-cell shrinking because of the osmotic efflux of intracellular water. Then, the spermatozoa swell and return to normal volume (from isotonic conditions) as cryoprotectant agents and water enter (Gao et al., 1997; Curry et al., 2000). In short, the freezing/thawing procedures cause extreme osmotic stress that potentially damages the function of the spermatozoon and threatens its survival (Pukazhenthii et al., 2000).

Different media and molecules can be used when making up anisotonic solutions, and it needs to be noted that the addition of molecular ions requires previous knowledge about the

effects they provoke. In the study described in Article 3, three solutes have been assayed, two ionic (sodium chloride and sodium citrate) and one non-ionic (glucose), and two types of treatments, hypotonic (100, 150 and 200 mOsm·Kg<sup>-1</sup>) and hypertonic (500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000 and 4000 mOsm·Kg<sup>-1</sup>), have been assessed. In order to better determine the resistance of spermatozoa in respect of osmotic changes, the treatments differentiate two modalities, depending on whether spermatozoa are not returned to isotonic media (non-return treatments) or whether they are first exposed to anisotonic solutions and later returned to isotonic conditions (return treatments) (Caiza de la Cueva et al., 1997a; 1997b). Following this, three hypotheses were formulated:

- 1) Variation in the medium osmolarity impairs boar sperm parameters.
- 2) The impairment may be produced not only by osmotic change but also by the medium composition in hypertonic treatments (osmotic pressure being increased by means of three different compounds: sodium chloride, glucose and sodium citrate).
- 3) There may be a relationship between fertility and prolificacy with osmotic resistance.

The management of data in Article 3 includes an assessment of the effects of osmolality changes on spermatozoa by means of an evaluation of sperm viability, motility and morphology, and the correlation of classical spermiogram parameters and osmotic resistance parameters with *in vivo* fertility and prolificacy data provided by farms. This consisted of non-return rates within 60 days after the first inseminations (NRR<sub>60d</sub>) and litter sizes (LS), respectively. Further, to properly determine how far the parameter described as osmotic resistance (i.e. the quotient relating proportions of each sperm parameter in anisotonic treatment – from 100 to 200 mOsm·Kg<sup>-1</sup> in hypotonic, and equal to or higher than 500 mOsm·Kg<sup>-1</sup> in hypertonic – and in isotonic treatment (KHR, 291 mOsm·Kg<sup>-1</sup>)) was able to predict the fertilising ability of a given ejaculate, the NRR<sub>60d</sub> and the LS of the ninety boars that were used were different, ranging between 81.8% and 87.9% and between 11.8 and 12.6 piglets born per litter, respectively.

The first question arising in this experimental design is the effects of changes in the media on spermatozoa. Such changes (when lower than 200 mOsm·Kg<sup>-1</sup> and higher than 500 mOsm·Kg<sup>-1</sup>) negatively affect sperm viability, matching the results obtained by Caiza de la Cueva and co-workers (1997a) for horses. This impairment is observed both in return and non-return treatments, and is higher in the former than in the latter. The effects of anisotonic media on sperm viability are different, depending on the compound added; thus, glucose

provokes more impairment in sperm viability than sodium citrate and sodium chloride. Interestingly, changes in the osmolality of the spermatozoa's environment particularly affect the integrity of the acrosome, assessed by multiple stain technique and phase-contrast microscopy, in accordance with previous reports that found the same effect (Guthrie et al., 2002; Walters et al., 2005). Comparatively, the resistance of the acrosome in boar spermatozoa in relation to osmolality changes is lower than in other mammal species, such as bulls and goats (Petrunkina et al., 2001a). This fact is largely explained by the composition of the acrosome membrane, which contains a high percentage of unsaturated phospholipids, a low level of cholesterol molecules and a few potassium channels activated by osmotic changes (Gilmore et al., 1998). Some changes in the volume of membrane vesicles at the mitochondrial sheath have been reported as a response to media in which osmolality varies to  $450 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  in human spermatozoa (Abraham-Peskir et al. 2002, Chantler et al. 2004). And some of the effects of osmotic stress at  $389 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  have been published, showing that this stress affects lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa (Christova et al. 2002; 2004).

Sperm motility is more affected than sperm viability by osmolality changes, the impairment in this sperm parameter again being higher in glucose than in sodium citrate and sodium chloride treatments. These results are in accordance with previous experiments involving pigs and other mammalian species (Caiza de la Cueva et al., 1997b; Pukazhenthii et al., 2000; Fraser et al., 2001) and are explained because damage to the plasma membrane due to anisotonic conditions (Christova et al., 2002) produces a rapid reduction in adenosine triphosphate (ATP) intracellular levels (Kordan et al., 1997; 1998). Since the levels of ATP play a significant role in maintaining sperm motility (Yavetz et al., 1992; Fraser et al., 2001), spermatozoa become immotile because of the impairments in the plasma membrane (Guthrie et al. 2002; Pommer et al. 2002). In summary, and matching the findings of previous studies (Curry and Watson, 1994; Liu and Foote, 1998; Rota et al., 2000; Chantler et al., 2004), the increases in osmotic pressure reduce sperm motility and affect acrosome integrity.

As expected, sperm morphology is affected by osmolality changes in the media, because an increase in the percentages of spermatozoa with coiled tails and folded tails is observed in extreme osmolality conditions ( $<200 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  and  $>1500 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), as other reports have documented (Zou and Yang, 2000; Chantler and Abraham-Peskir, 2004).

Previous studies have shown that spermatozoa are sensitive to osmotic changes in the environment, with changes occurring in cell osmole content and volume (Petrunkina et al. 2000). In other studies involving porcine and other domestic mammalian species, osmotic shocks were carried out in order to find out the resistance spermatozoa have against these changes (Fraser et al. 2001). These studies have demonstrated that the best level of osmolality for maintaining sperm quality is  $300 \pm 50 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . Thus, when the media is isotonic, sperm viability, motility and morphology are better than in anisotonic conditions. As is pointed out in Article 3, the greatest reduction in sperm quality is more important when the osmotic conditions are harder (i.e.  $100 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  for hypotonic, and  $3000\text{-}4000 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  for hypertonic treatments), as has also been observed in pigs (Zeng et al., 2001) and other species such as cats (Pukazhenthil et al., 2000), horses (Pommer et al., 2002), sheep (Curry and Watson, 1994), bulls (Guthrie et al., 2002), mice (Willoughby et al., 1996), dogs (Rigau et al., 2001; 2002) and humans (Rota et al., 2000).

The effects of osmolality changes are evaluated using anisotonic solutions that are made up by adding different compounds to an isotonic solution (e.g. double distilled water, sodium chloride, sodium citrate, glucose, fructose, glycerol, or ethylene glycol) (Gilmore et al., 1996; Caiza de la Cueva et al., 1997b; Gilmore et al., 1998; Fraser et al., 2001; Rigau et al., 2001; Agca et al., 2002; Guthrie et al., 2002; Koshimoto and Mazur, 2002). Although a greater reduction in sperm viability and motility is observed in glucose treatments, both non-return and return, compared to sodium chloride or sodium citrate, spermatozoa are also affected by the latter two treatments. This may mean that the effects of osmotic treatments on spermatozoa are largely but not only due to osmolality, but to both ion concentration and the kind of added chemical compound as well. With regard to the modalities of treatments, returning to isosmotic conditions causes more damage to spermatozoa than remaining at anisotonic solutions, in agreement with a previous report on boars (Caiza de la Cueva et al., 1997b).

Apart from the effects of osmolality on sperm parameters, the study described in Article 3 also aimed to discover the nature of the relationship between conventional spermogram parameters (i.e. sperm viability, motility and morphology) and reproductive performance, which would later lead to an understanding of how such parameters could be used to predict the fertility and the prolificacy of a given ejaculate. In Article 3, correlations have been observed between fertility (assessed by  $\text{NRR}_{60\text{d}}$ ) and prolificacy (assessed by LS) probes with

sperm viability and morphology, but not with sperm motility. Thus, even though sperm motility is one of the most routinely assessed parameters in conventional spermograms, our results have shown that is not a good predictor of fertilising ability, thereby matching the findings of other studies (Berger et al., 1996; Pérez-Llano et al., 2001). Conversely, as we expected, sperm morphology is significantly correlated with  $NRR_{60d}$  and with LS, as other authors have previously reported (Alm et al., 2006). In fact, different studies dealing with sperm osmotic resistance have demonstrated that sperm viability and morphology are better correlated with fertility than sperm motility (Christensen et al., 2005).

Resistance to hypotonic changes, assessed by the hypoosmotic swelling test (HOS) and osmotic resistance test (ORT), is often used as a sperm parameter (Pérez-Llano et al., 2003). In the third article, different multivariate regression equations have been constructed using the parameters described, such as the resistance of spermatozoa to osmotic changes in sperm viability, morphology and the percentages of acrosome-intact spermatozoa, and observing the highest determination coefficients ( $R^2$ ) values in the three following treatments: hypotonic non-return to isotonic conditions at  $150 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , hypotonic with return at  $200 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  and hypertonic non-return at  $500 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$  with sodium citrate. Interestingly, regression models always exclude the resistance of sperm motility and include the resistances of sperm viability and percentages of reacted acrosome, but do not always include resistance in sperm morphology. However, preparing the three treatments mentioned above and submitting spermatozoa to them can be used as a predictor of the fertilising ability of an ejaculate. In summary, spermatozoa sensitivity to osmotic stress is an additional criterion on which to base the selection of ejaculates which can be marketed. Not only are phenotypic characteristics considered in genetic selection centres, but also the transfer ability of these characteristics, i.e. the fertility outcomes (Thibault et al., 1993).

The assessment of spermatozoa-osmotic tolerance can be also used in cryopreservation techniques. Nowadays, boar sperm cryopreservation is a very important field in reproductive biology (Gilmore et al., 1996) but porcine spermatozoa are particularly difficult to freeze because their plasma membrane is composed of many unsaturated phospholipids and low rate cholesterol-proteins, and presents membrane flip-flop dynamics. Spermatozoa are submitted to hard osmolality conditions during freezing/thawing procedures, so that sperm resistance to osmotic changes may give us the semen most resistant to cryopreservation.

Finally, another application of the response of spermatozoa to osmolality changes is the study of ejaculate subpopulations. Pérez-Llano and colleagues (2001, 2003) have reported that the plasma membranes of spermatozoa reacting positively to sHOST are more resistant to changes in environmental conditions than those reacting negatively, the higher resistance being observed during a period of seven days of storage at 15°C. These authors have also observed different subpopulations depending on sHOST values, and the three previously mentioned treatments (hypotonic non-return at 150 mOsm·Kg<sup>-1</sup>, hypotonic with return at 200 mOsm·Kg<sup>-1</sup> and hypertonic non-return at 500 mOsm·Kg<sup>-1</sup> with sodium citrate) could be assessed bearing this in mind.

It can be concluded from the data obtained in Article 3 that boar spermatozoa are sensitive to osmotic changes in the environment, because both hypotonic and hypertonic treatments impair sperm parameters, albeit treatments with glucose more than those with sodium chloride and sodium citrate, and return treatments more than non-return treatments. In the light of our results, sperm viability, morphology, and the percentage of reacted acrosome spermatozoa are seen to be significantly correlated with NRR<sub>60d</sub> and with LS, and the resistance to osmotic changes (assessed as VBr, MRr and ACRr) introduced into multiple regression models could be included in sperm classical parameters in order to better predict the fertility of a given ejaculate.



# **Chapter III** Behaviour of boar spermatozoa in storage at 15-17°C

---

## **6 Conclusions**





---

## 6 Conclusions

---

1. Sperm function can be maintained in cooling conditions for up to 3 days in short-term extenders (e.g. BTS).
2. The addition of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  at concentrations of 2.5, 5 and 10 mg/100 ml does not harm sperm quality, so this hormone can be used with no ill effects at these concentrations to contract the uterus myometrium, and improve AI procedures.
3. The addition of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  at 5 mg/100 ml appears to be better, compared to an un-supplemented extender, at preserving sperm viability and motility after 6 days' storage at 15°C in BTS.
4. Since BTS is a short-term extender, the addition of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  at 2.5, 5 and 10 mg/100 ml should also be made to long-term extenders in order to make clearer its effects on sperm function.
5. Hyaluronic acid at 50-100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  delays sperm capacitation after 3 days of storage at 15°C in BTS, without either damaging sperm viability or affecting sperm motility.
6. Hyaluronic acid at these concentrations may be added to BTS, without excessive cost, to preserve sperm better during short-term cooling.
7. The different effects of hyaluronic acid on the function of spermatozoa in refrigeration, incubation and co-culturing should be addressed in further studies.
8. Boar spermatozoa are sensitive to changes in osmolality in the environment (from 100 to 4000  $\text{mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ).
9. Hypotonic, hypertonic and glucose treatments impair sperm quality more than treatments with NaCl and sodium citrate.
10. Return treatments to isotonic conditions after hypo and hypertonic conditions cause more damage to spermatozoa than non-return treatments.
11. In contrast to sperm motility, sperm viability, sperm morphology, and the percentage of acrosome reacted spermatozoa are spermogram parameters correlated with fertility

and prolificacy probes, assessed in terms of non-return rates within 60 days of first insemination ( $\text{NRR}_{60\text{d}}$ ) and litter size (LS), respectively.

12. The tolerance of spermatozoa to osmotic changes in their environment, determined as the resistance of sperm viability, morphology and the percentage of acrosome-reacted sperm, could be introduced into multiple regression models and jointly assessed with conventional sperm parameters in order to better predict the fertility and the prolificacy of a given ejaculate.

# Chapter IV

---

## Spermatozoa and oviductal epithelial cells (OEC) in co-culture

### 1 Introduction

1.1 The oviduct

1.2 Heat shock proteins, clusterin and the reproductive function

1.3 Gene silencing

### 2 Objectives

### 3 Material and methods

3.1 Culture methods

3.2 Co-culture and co-incubation methods

3.3 DNA and RNA techniques

3.4 *In vitro* effects of OEC co-culture and cell-CM on boar spermatozoa

3.5 *In vitro* effects of spermatozoa on the gene expression of OEC

3.6 Effects on sperm viability of *HSP90AA1*-silencing in OEC using siRNA

### 4 Results

Article 4

Article 5

Article 6

### 5 General Discussion

### 6 Conclusions



# Chapter IV Spermatozoa and OEC

---

## 1 Introduction

### 1.1 The oviduct

#### 1.1.1 Introduction

#### 1.1.2 Oviduct anatomy

#### 1.1.3 Oviduct functions

#### 1.1.4 Oviductal fluid

#### 1.1.5 Musculature of the oviduct and related ligaments

#### 1.1.6 OEC culture

#### 1.1.7 Co-culture with spermatozoa

#### 1.1.8 Incubation of spermatozoa with OEC-CM and APM

### 1.2 Heat shock proteins, clusterin and the reproductive function

#### 1.2.1 Introduction

#### 1.2.2 Heat shock proteins: main functions

#### 1.2.3 The superfamily of heat shock proteins

#### 1.2.4 Steroid receptors and regulation by heat shock proteins

#### 1.2.5 The human endometrium and heat shock proteins

#### 1.2.6 Clusterin

### 1.3 Gene silencing

#### 1.3.1 Introduction to gene silencing

#### 1.3.2 Antisense technology

#### 1.3.3 RNA interference: an introduction

#### 1.3.4 Mechanism of RNA interference

#### 1.3.5 Induction of RNAi by small regulatory RNAs

#### 1.3.6 Methods of synthetic siRNAs delivering

#### 1.3.7 Antisense versus RNAi

#### 1.3.8 Advantages of using anti-mRNA techniques in studying profiles

#### 1.3.9 RNAi applications



---

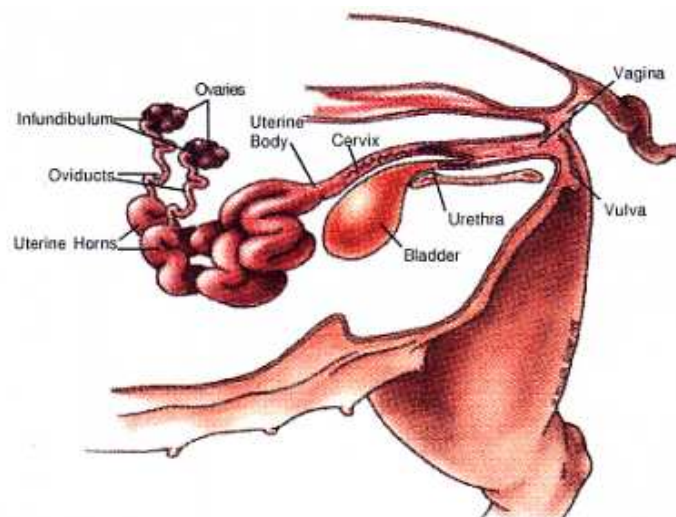
# 1 Introduction

---

## 1.1 The oviduct

### 1.1.1 Introduction

The role of the oviduct (or fallopian tube in humans) in reproductive processes in mammal species is fundamental, in terms of providing an appropriate microenvironment for gamete transport and support, fertilisation and early embryonic development (Abe, 1996; Romar et al., 2001; Hunter, 2005). The anatomic relationship between the oviduct and the ovary is important (Figure IV-1 and IV-2). In domestic animals, the ovary is located in an open ovarian bag, while in other mammal species, such as rats or mice, it is located in a closed bag. In domestic animals, this bag consists of a thin peritoneal fold of mesosalpinx, joined to a hanging handle in the superior region of the oviduct (Hafez, 1996). In porcine, the ovarian bag is well developed and, even though open, contains most of the ovary.



**Figure IV-1** Sow reproductive tract (<http://www.ansc.purdue.edu/swine/porkpage/repro/sow2.htm>)

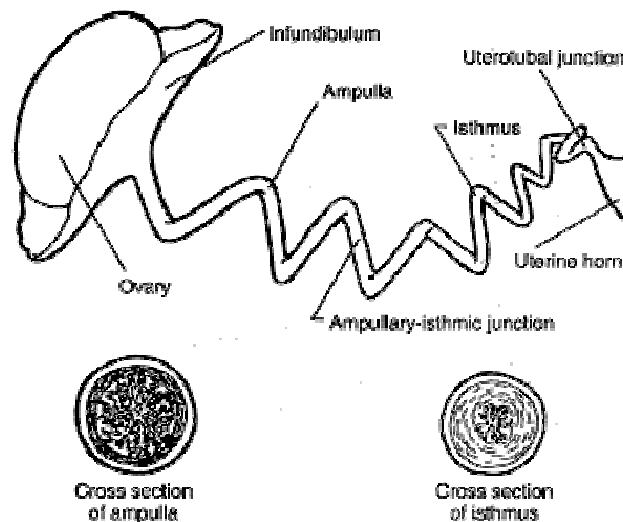


Each oviduct is supported by a peritoneal, the mesosalpinx, and is bordered in front by the round ligament and behind by the ovarian ligament and mesovarium. It is attached medially to the uterine fundus and laterally to the infundibular pelvic ligament and to the ovary by means of an elongated mucosal fold, called the fimbria-ovarica.

### 1.1.2 Oviduct anatomy

Oviducts hang in the mesosalpinx, a peritoneal folding derived from the wide ovarian ligament. The length of the oviduct and its degree of coiling are two features that vary among domestic mammals. In sows, for example, the length ranges between 15 and 30 cm, while in ewes it is from 15 to 19 cm, and in cows it is about 25 cm (Hafez, 1996).

The oviduct can be divided into four functional segments (Figure IV-2): fimbriae, infundibulum, ampulla and isthmus. Fimbriae are small finger-like extensions of the infundibulum that constantly beat, creating a vortex that sweeps the released egg into the oviduct. Since the ovary is not directly attached to the fallopian tube; the current made by the fimbriae is necessary in order to make sure the egg gets into the ampulla, where fertilisation will occur if spermatozoa are present in the tube.



**Figure IV-2** Oviduct anatomy (I) – Parts of the oviduct (<http://nongae.gsnu.ac.kr>)

The infundibulum is an abdominal overture in a funnel form and is near to the ovary. Its size varies depending on the species and the age of the animal.

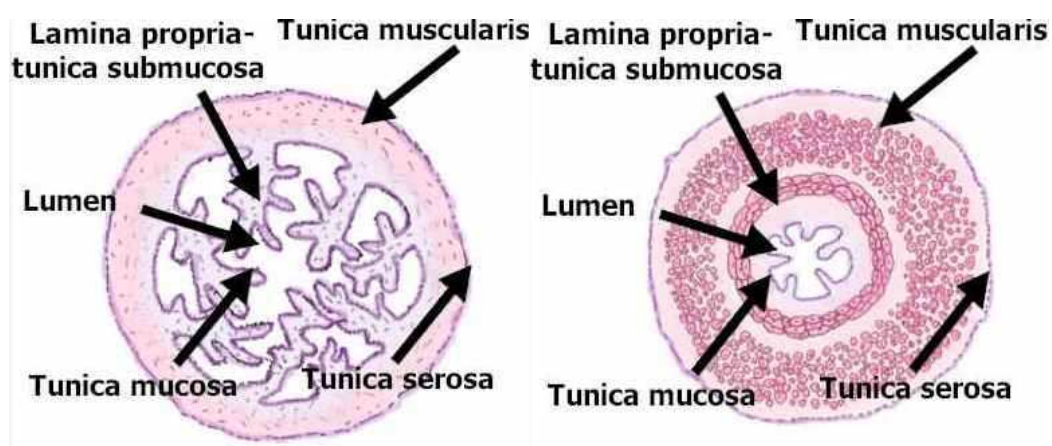
After the infundibulum, there is the ampulla, which is more dilated and distal, and covers half the length of the oviduct. This is the region of the oviduct where fertilisation takes place. Between the ampulla and the isthmus, there is the ampullary-isthmic junction, which does not exhibit any especial feature and whose existence is defined by its function as a temporary barrier to ovum transport rather than by some tissue particularity.

The isthmus, which is the proximal and narrowest section of the oviduct and forms the sperm reservoir (Suárez et al., 1991), directly connects with the uterus at the utero-tubal junction, which varies according to species and in sows is surrounded by a fold of digitiform mucosa (Töpfer-Petersen et al., 2002). This utero-tubal junction and the posterior part of the isthmus regulate the transport of spermatozoa in pigs, as early studies using scanning electron microscopy around ovulation showed (Fléchon and Hunter, 1981).

There are also muscles that cover the area from these epithelial layers to the connective tissue of mucosa foldings. The thickness of this musculature increases from the ovarian to the uterine ends of the oviduct.

#### 1.1.2.1 Oviduct mucosa

Oviduct mucosa consists of primary, secondary and tertiary foldings. Ampullary mucosa is arranged in tall folds that get shorter towards the isthmus (Figure IV-3). The complex configuration of these ampullary mucosa folds largely fills the fluid conducting lumen.



**Figure IV-3** Oviduct anatomy (II) – Infundibulum and ampulla (left) and isthmus (right)  
(<http://instruction.cvhs.okstate.edu/Histology/fr/hifrp12.htm>)

The tubal mucosa consists of a simple cylindrical epithelium lying on a richly vascular conjunctive stroma. The folds are of variable height and complexity, depending on the segment, the species and the stage of the oestrous cycle (Beck and Boots, 1974). They are tall and complex in the infundibulum and the ampulla, becoming shorter and simpler in the isthmus. In sows, the mucosa fold at the utero-tubal junction extends into the uterine cavity forming a valve-like structure that can limit passage of the uterine contents into the oviduct (Fléchon and Hunter, 1981).

The mucosa consists of a layer of cylindrical epithelial cells, and the adjoining mucosa, or submucosa, is formed by smooth musculature fibres and connective tissue and is highly vascularised. This epithelium consists of secretory and ciliated cells.

#### 1.1.2.1.1 Ciliated cells

Ciliated cells of oviduct mucosa present thin and motile cilia that become extended to the oviductal lumen. The beat frequency of these cilia depends on the concentration of ovarian hormones, and their activity is greatest at the moment of ovulation, when cilia movement in the fimbriated region of the oviduct is highly synchronised and leads in the direction of the infundibulum aperture.

It seems that ciliary beating allows oocyte to leave the follicular surface and go to the infundibulum. The relationship between ciliary and secretory cells along the oviduct varies, and is highly relevant (Abe, 1996; Hafez, 1996). Whereas ciliary cells are more abundant in the fimbriae and infundibulum, where the oocyte is harvested, secretory cells are more plentiful in the regions of the oviduct where oviductal fluid plays a relevant role in sperm-oocyte interaction, such as the ampulla.

Cilia beat their way to the uterus. This activity, jointly with oviduct contractions, is basic because fertilisation takes place and it results in the implantation of fertilised oocyte in the oviduct. However, oviducts vary in those mammal species that, unlike pigs, are subjected to an oestral cycle. As a result, they atrophy and lose their cilia in the anoestrous stage, hypertrophy, recover their cilia in the proestrous and oestrous stages, and atrophy again, losing their cilia in gestation (Hafez, 1996).

#### 1.1.2.1.2 Secretory cells

The secretory cells of the oviduct are not ciliated and characteristically contain secretory granules. The number and the size of these granules depend on both the species and the stages of the oestrous cycle. There are a large number of microvilli on the apical surface. Secretory granules accumulated during the follicular phase are released to the fluid conducting lumen after ovulation, so that the height of the epithelium is reduced.

Secretory cells produce and release into the oviduct lumen several macromolecules (Abe, 1996), such as oviductal secretory glycoproteins (OSPs) that are present in many species of mammals (Buhi et al., 2000; Killian, 2004). Secreted proteins from OECs, observed both *in vivo* and *in vitro*, provide a suitable environment for the events that occur in the oviductal lumen, such as fertilisation and embryo development, and maintain sperm function *in vitro* (Lippes and Wagh, 1989; Abe et al., 1995; Abe, 1996; Quintero et al., 2005).

Different studies have reported regional variations within the mammalian oviduct in both the morphological and ultrastructural features of these secretory cells in some species (Abe, 1996). However, Eyestone and co-workers (1991) found no effect of cycle stage in OEC culture in early bovine embryo development, and Fazeli and colleagues (2003) did not observe such differences when comparing apical plasma membrane preparations (APM) coming from the isthmus and ampulla regions, after co-incubation with spermatozoa in pigs.

#### *1.1.2.2 Vascularisation*

Uterine and ovarian arteries supply the oviduct. The increase in the number of blood vessels is largely regulated by ovarian estrogens, and is related to an increase in the secretory activity of the oviduct (Hafez, 1996).

#### *1.1.2.3 Innervation*

Short adrenergic neurons partially innervate the oviduct, similar to what happens in other segments of the female reproductive tract. In fact, the oviduct is mainly innervated by prevertebral and paravertebral ganglia (long adrenergic neurons), and by adrenergic ganglia formations in the uterovaginal region (short adrenergic neurons).

The degree of innervation varies, depending on the muscular layers and oviductal regions. Adrenergic innervation is particularly abundant in the circular musculature of the isthmus and at the isthmic-ampullary junction, where adrenergic terminations connect with smooth musculature. Dense adrenergic innervation allows the isthmus to act as a physiological sphincter that is important to the transport of oocytes.

### **1.1.3 Oviduct functions**

The oviduct plays a fundamental role in gametes transport, in maintaining its function, and in embryo development (Abe, 1996). With regard to gametes, oocyte and spermatozoa advance simultaneously in opposite directions along the oviduct. Although this is a single function, the oviductal structure is well adapted to its roles. Fimbriae allow the transport of released oocytes from the ovarian surface to the infundibulum. Later, oocytes are transported to the ampulla, where the fertilisation and the first divisions of the embryo occur (Hafez, 1996). The most proximal region of the oviduct, the utero-tubal junction, controls the transport of sperm cells from the uterus to the isthmus, and is a kind of mechanical valve that severely limits the number of spermatozoa penetrating the oviduct (Fléchon and Hunter, 1981).

In addition, OECs also maintain sperm function. In fact, the direct contact between spermatozoa and OECs has been described as the final phase of maturation that gives spermatozoa the ability to penetrate oocytes (Hunter, 1984). Interestingly, in pig and in other mammal species, a short segment of the isthmus forms a reservoir for sperm, so that only a few spermatozoa can be released from the reservoir at the time of ovulation (Suárez et al., 1991; Töpfer-Petersen et al., 2002). In fact, this release, which allows spermatozoa to progress towards the ampullary-isthmic junction around ovulation, occurs after sperm capacitation, another physiological process that takes place in the sperm reservoir (Tienthai et al., 2004). Thus, the reservoir basically serves two functions: to insure that sperm are available in the oviduct at the time of ovulation and to prevent polyspermy (Hunter, 1990).

With regard to embryo development, embryos remain in the oviduct about three days before being transported to the uterus. Two aspects of oviduct physiology are important for early embryonic development: the oviduct environment and the active components. The oviduct environment includes temperature, pH, osmotic pressure, nutrients and oxygen tension, amongst others. The active components of the oviductal fluid, namely stimulatory

and regulatory molecules and growth factors, regulate the fertilisation process and the first differentiative steps (Gandolfi, 1995).

Finally, the functions of the oviduct depend on the regulation of smooth muscle contractility, epithelial ciliated cells and oviductal secretions. Several studies have shown that ovarian hormones, nitric oxide, cytokines and endothelial growth factors relax or contract oviductal smooth muscle and modulate the oviductal ciliated cells (Pérez-Martínez et al., 2006).

#### **1.1.4 Oviductal fluid**

The oviduct provides the optimum medium for gamete union, for accomplishing fertilisation and early embryonic division, for inducing sperm capacitation and hyperactivation, which occurs quickly in porcine unlike in other species (Yanagamachi et al., 1994), and for the early development of the embryo. For these reasons, this environment is both nutritive for and protective of spermatozoa, oocytes and embryos (Gandolfi, 1995).

Using different catheterisation techniques to obtain a continuous supply of oviductal fluid, it has been demonstrated that the accumulation and the volume of this liquid via the oviduct depends on the oestral cycle. Thus, volume is low during the luteal phase, then increases at the beginning of oestrus, reaching a plateau one day later, and finally diminishes down to characteristic levels of atretic ovarian follicles (Hafez, 1996). The volume of tubal secretion reaches its maximum during ovulation and for the following three days. The volume of liquid secreted by the isthmus is much lower than that secreted by the ampulla and the infundibulum, due to the presence of fewer epithelial cells. The biochemical analysis of tubal fluid indicates that the oviductal secretions consist of a complex mixture of components of plasma origin and specific products derived from tissue metabolism. Since the isthmus completely or partially blocks the progress of fluids to the uterus, the direction of oviductal fluid is towards the ovary.

Different physiologic factors can contribute to creating currents or cross-currents of the fluid, such as:

- a) In humans, quantitative and qualitative changes of oviductal secretions during the menstrual cycle and as a response to contraceptives.

b) Variations in the size and the morphology of ciliary beats in the oviduct compartments.

c) Constant change in the diameter of oviduct lumen in different segments as a result of muscular contraction and mucosal fold reorientation.

The oviductal fluid is formed by serum and molecules coming from the granules produced by the secretory cells of oviduct epithelium (Oliphant et al., 1984), which are regulated by estrogens (Xia et al., 1996). The oviductal cells have a specific secretory activity, because there are some proteins that are present in the oviductal fluid but not in the serum.

Although conditioned medium obtained from *in vitro* oviduct culture and oviduct fluid obtained via catheterisation contain oviduct secretions, their compositions are not identical. Oviduct fluid collected via a catheter contains some molecules that are not present in the conditioned medium produced by cultured oviduct tissue. Nevertheless, both oviduct fluid collection (Oliveira et al., 1999) and oviduct culturing have been used to study the oviduct, the composition of its fluid and the effect of oviduct secretions on gamete function and embryo development (Killian, 2004). In this connection, several studies have reported that the binding of oviductal fluid proteins to the sperm membrane facilitate fertilisation and has a beneficial effect on sperm function, by capacitating and hyperactivating the spermatozoa and by avoiding premature acrosome reaction in the absence of female gamete. These studies have been carried out not only in humans (Wagh and Lippes, 1989; Lippes and Wagh, 1989; Quintero et al., 2005) but also in other mammal species, such as bovine (Parrish et al., 1989; McNutt and Killian, 1991; King and Killian, 1994; McNutt et al., 1994; Abe et al., 1995; Lapointe and Sirard, 1996) and equine (Ellington et al., 1993).

### **1.1.5 Musculature of the oviduct and related ligaments**

Throughout the length of the oviduct, there is a circular muscular layer under the mucosa. This layer is thicker in the isthmus, increasing from the ampullary-isthmic junction to the utero-tubal junction. It is lined with an external layer of longitudinal bands (or peritoneal muscle), separated at the ampullary level but confluent around the isthmus to form a complete layer. An internal longitudinal layer, terminating in the myometrium, is located in the proximal isthmus (Rousseau and Ménézo, 1993).

Oviduct contractions homogenise the secretions, make fertilisation easier, and in part regulate oocyte transport. Oviductal peristalsis tends to stay the oocyte on, instead of contributing its movement as different as occurring in intestinal peristalsis.

#### *1.1.5.1 Pattern of oviduct contractions*

Oviduct musculature presents different kinds of complex contractions: located peristaltic contractions, previously originating from isolated segments or handles that only cover a short distance; segment contractions and lumbricoid movements of the overall oviduct. Abovarian contractions are more common than adovarians, and the ampulla is generally less active than the isthmus in terms of muscular activity.

Since longitudinal muscular fibres (which shorten) and circular muscular fibres (which produce annular constrictions) are constantly activated, the pattern of oviductal contractions is complex. Other factors contributing to the complexity of this pattern are the contractile activity of mesosalpinx, myometrium and supporting ligaments, as well as ciliary movement.

The pattern and amplitude of contractions varies among oviductal segments. In the isthmus, peristaltic and antiperistaltic contractions are segmentary and continuous. In the ampulla, intense peristaltic segmentary waves advance to the middle of the organ. The variability of contractile patterns is associated with cyclical changes in the glycogen content of oviduct musculature, which is more abundant in circular (internal) musculature than in the longitudinal (external) layer.

#### *1.1.5.2 Prostaglandins and oviduct contractions*

The effect of prostaglandins on oviductal contractility depends on the chemical nature of these molecules. Thus, prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) and PGE<sub>2</sub> fulfil a characteristic effect on oviduct longitudinal musculature, by contracting the proximal part while relaxing the rest of the organ. Conversely, prostaglandin E<sub>3</sub> (PGE<sub>3</sub>) unleashes oviduct relaxation completely, and prostaglandins F<sub>1</sub> (PGF<sub>1</sub>) and PGF<sub>2α</sub> act as contractility stimulants in humans (Lindblom et al., 1978) and in rats (Pérez-Martínez et al., 1998), without changes being observed during the menstrual cycle.

It has been reported that oviductal motility is mediated by the plasma levels of estrogens and progesterone (Spilman et al., 1978; Mwanza et al., 2000). In this sense, 17β-estradiol and



PGF<sub>2α</sub> are closely related because it has been demonstrated that 17β-estradiol stimulates prostaglandin synthesis (Saksena et al., 1975).

Recently, Kodithuwakku and co-workers (2007) have shown that motile but not dead spermatozoa increase the biosynthesis and secretion of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> in OECs. This study has been performed using real-time RT-PCR in homologous bovine co-culture and has demonstrated for the first time that live spermatozoa may accelerate their own transport towards the fertilisation site by upregulating the expression of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> (both enhance the contractions of the oviduct as has been already noted).

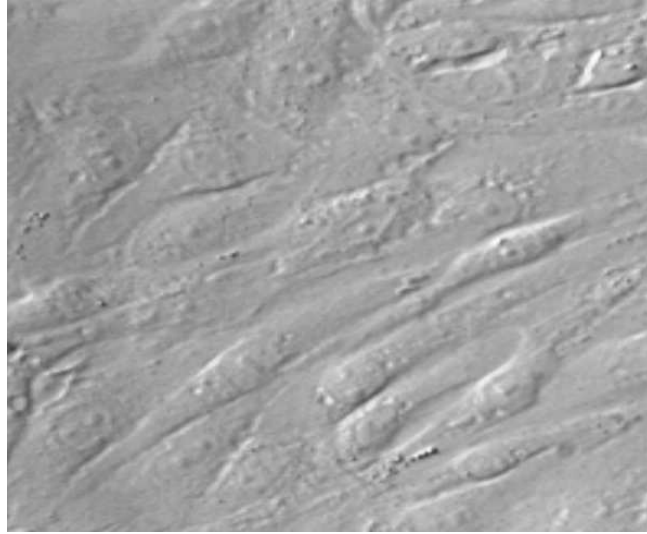
#### *1.1.5.3 Uterovarian ligaments*

Uterovarian ligaments contain smooth muscle fibres mainly arranged in longitudinal bundles. These muscle fibres are also present in the myometrium and inside ovarian stroma. The smooth musculature, consisting of mesovaries and different mesentery ligaments attached to the ovaries and fimbriae, intermittently contracts. These rhythmic muscular contractions ensure that the fimbriae remain in a constant position regarding the ovarian surface (Hafez, 1996).

#### **1.1.6 OEC culture**

Primary culture of oviductal epithelial cells (OEC) has been developed both to study OECs and develop IVF protocols in human (Vlad et al., 1996; Saridogan et al., 1997) and other mammal species, such as equine (Thomas et al., 1995a), rabbit (Dickens et al., 1996), goat (Rodríguez-Dorta et al., 2007), bovine (Walter and Miller, 1996; Xia et al., 1996; Cox and Leese, 1997; Reischl et al., 1999; Rottmayer et al., 2006), porcine (Romar et al., 2001), monkey (Rajagopal et al., 2006), mouse (Tan et al., 2007) and canine (Vannucchi et al., 2006) (Figure IV-4).

Different studies performed on cattle (Eyestone et al., 1989; 1991; Xu et al., 1992) and sheep (Gandolfi et al., 1987) showed that OEC co-culture and the conditioned medium produced by OECs in culture (OEC-CM) promote embryo development *in vitro*. In pigs, OEC in culture (Figure IV-5) secrete products that provide suitable conditions for reducing polyspermy and increasing IVF fertilisation rates (White et al., 1989; Nagai and Moor, 1990; Kano et al., 1994; Vatzias and Hagen, 1999).



**Figure IV-4** *In vitro* culture of porcine OEC (100x magnification; phase-contrast microscopy)

### 1.1.7 Co-culture with spermatozoa

Sperm-OEC co-culture systems have been performed on several species, such as human (Bongso et al., 1993; Kervancioglu et al., 1994; Morales et al., 1996; Ellington et al., 1998; Yao et al., 1999), cattle (Lefebvre and Suarez, 1996; Gualtieri and Talevi, 2000; Gualtieri and Talevi, 2003), dog (Ellington and Meyers-Wallen et al., 1995; Kawakami et al., 2001), horse (Ellington et al., 1993, Thomas et al., 1994; Thomas et al., 1995b; Dobrinski et al., 1999), pig (Suárez et al., 1991; Petrunkina et al., 2001c; Fazeli et al., 2003), rat (Cortés et al., 2004), sheep (Gutiérrez et al., 1993) and wallaby (Sidhu et al., 1998).

In humans, several authors have shown that OECs prolong sperm survival and enhance its viability and motility by stabilizing the acrosome, inducing sperm capacitation, and modifying tail beat frequency by using OEC-sperm co-culture (Kervancioglu et al., 1994; Yeung et al., 1994; Morales et al., 1996). It has also been observed that co-culturing fresh or cryopreserved/thawed human sperm with bovine OECs stabilises sperm chromatin structure (Ellington et al., 1998).

The effects of OECs on sperm function in co-culture depend on the ovarian state of the oviduct used to perform the primary culture and are controversial. Thus, whereas in pigs no difference has been found in sperm-OEC binding when comparing follicular and luteal states (Petrunkina et al., 2001c), in dogs Kawakami et al. (2000, 2001) have observed that the percentages of both hyperactivated and acrosome-reacted spermatozoa were significantly

higher in follicular than luteal OECs. This difference was attributed to glycosaminoglycans (GAGs) and/or glycoproteins secreted by the follicular-OEC.



**Figure IV-5** *In vitro* homologous porcine co-culture (200x magnification; phase-contrast microscopy)

### **1.1.8 Incubation of spermatozoa with OEC-conditioned media and apical plasma membrane fractions**

Reports of the effects of OECs on sperm function have not been limited to co-culture; the effect of OEC-CM *in vitro* and the incubation of apical plasma membrane (APM) fractions coming from the oviduct have also been studied. Concerning the former, OEC-CM prolongs both motility and viability in fresh (Ijaz et al., 1994; Abe et al., 1995) and cryopreserved (Zhu et al., 2001) spermatozoa, and induces sperm capacitation (Chian et al., 1995). Furthermore, King and colleagues (1994) showed that treatment with  $17\beta$ -estradiol enhances the ability of OEC-CM for prolonging sperm motility.

With regard to APM, Smith and Nothnick (1997) reported that the viability of rabbit spermatozoa incubated in the presence of APM vesicles is enhanced as a result of direct contact between spermatozoa and OECs. In pigs, Fazeli and co-workers (2003) observed that sperm survival was extended after incubation with APM, demonstrating that the factors involved in this prolongation were not integral OEC membrane proteins but peripheral membrane proteins. Recently, several protein components of the solubilised APM fraction (sAPM) that binds to boar spermatozoa have been identified (Elliott et al., personal

communication); related with this, knowledge about which APM proteins extend the life of sperm may be useful for developing long-term semen diluents.

## **1.2 Heat shock proteins, clusterin and the reproductive function**

### **1.2.1 Introduction**

As previously noted, OECs present secretory activity both *in vivo* and *in vitro* (see Section 1.1.2.1.2 concerning oviduct secretory cells). There are reports in the literature about the effects of oviductal secreted proteins on spermatozoa in some mammal species (McCauley et al., 2003; Quintero et al., 2005; Zhang et al., 2006; Kumaresan et al., 2006; Lachance et al., 2007). In addition, there have been studies of how spermatozoa affect the gene expression of OECs (Fazeli et al., 2004; Georgiou et al., 2005; Sostaric et al., 2006; Kodithuwakku et al., 2007). Related with their findings, Fazeli and co-workers (2004) demonstrated that when spermatozoa arrive at the oviduct, they trigger a signal transduction pathway that modulates gene expression in OECs. This study was performed after insemination in mice, using microarrays. In boars, Georgiou and colleagues (2005) documented that oocytes and spermatozoa alter the expression of some specific oviductal proteins after the co-incubation of gametes with oviduct fragments. While studying the effects of spermatozoa on OEC gene expression in co-culture, Kodithuwakku and co-workers (2007) have shown that motile spermatozoa upregulate the expression of PGs (see also 1.1.5.2) in bovine OECs. However, since there are only a few similar reports in pigs (Sostaric et al., 2006), the aim of Article 5 was to study the effects of spermatozoa on OEC expression of some heat shock proteins and clusterin, all of them identified in a sAPM that binds to boar spermatozoa (Elliot et al., personal communication), using  $\beta$ -actin (*ACTB*) as a housekeeping gene in a similar way to other studies, e.g. Pedersen and co-workers (2005).

### **1.2.2 Heat shock proteins: main functions**

Heat shock proteins (HSPs) have been observed in all kinds of cells and organisms and are members of highly conserved protein families consisting of both constitutive and inducible components (Jeremias et al., 1997). These proteins act as molecular chaperones (Arrigo, 2005; Calderwood et al., 2007; Voellmy and Boellman, 2007) and are mainly involved in

protein folding in a wide range of physiological processes (Ciocca et al., 1993; Hendrick and Hartl, 1993; Jakob and Buchner, 1994; Mariani et al., 2000; Brown et al., 2007; Javid et al., 2007), as well as in the regulation of the function of steroid receptors (Burel et al., 1992; Rajapandi et al., 2000). In recent years, HSPs have also become therapeutic targets in pharmacology (Söti et al., 2005; Arrigo et al., 2007).

To begin with, HSPs activate the transcription of several genes related to environmental stress, cell growth control and developmental signals (Morano and Thiele, 1999), and their expression can be induced as result of cell exposure to different physicochemical stresses (Burg et al., 2007). For this reason, HSPs are expressed at a relatively low level under normal conditions but are inducible by a number of several signals, including stress, steroid hormones, temperature changes, heavy metals, oxidative stress, viral or bacterial infection and cytokines (Jäättelä and Wissing, 1992; Baniahmad and Ming-Jer, 1993; Jeremias et al., 1999). As already noted, HSPs function as molecular chaperones. This term is applied to proteins that prevent incorrect interactions of proteins and participate in their assembly without being part of their structure (Ellis, 1987; Craig et al., 1994). Different studies have demonstrated that the members of the HSP family, such as heat shock protein 60 kDa (HSPD1) and heat shock protein 70 kDa (HSPA1A), act in this way by participating in the folding and unfolding of cellular proteins (Jäättelä and Wissing, 1992).

Secondly, HSPs synthesised constitutively are involved in the regulation of the function of steroid receptors (Burel et al., 1992; Rajapandi et al., 2000; Havarinen et al., 2001; Azuma et al., 2004; Al-Madhoun et al., 2007). In this particular case, these factors are expressed at a relatively low level under normal conditions but are inducible by a number of signals, including stress and cytokines (Jäättelä and Wissing, 1992; Baniahmad and Ming-Jer, 1993).

Finally, HSPs are involved in the reproductive function. In point of fact, seminal fluid is rich in prostaglandins, polyamines, zinc, proteases and other enzymes that create stressing conditions, so that some HSPs are induced in endocervical cells in the female genital tract (Hang et al., 1994; Al-Madhoun et al., 2007).

### **1.2.3 The superfamily of heat shock proteins**

Several proteins constitute the HSP superfamily: the highly conserved HSP70 family (Hunt and Morimoto, 1985), the conserved heat shock protein 90 kDa (HSP90) family (Bardwell

and Craig, 1987; Knoblauch and Garabedian, 1999), the nucleolar heat shock protein 110 kDa (HSPH1) (Subject et al., 1983), the mitochondrial HSPD1 (Jindal et al., 1989), the collagen-binding heat shock protein 47 kDa (SERPINH1) (Hirayoshi et al., 1991), and the heterogeneous family of low molecular weight HSPs, ranging from 16 to 40 kDa (Arrigo and Welch, 1987; Lindquist and Craig, 1988; Miller et al., 2005; Sun and MacRae, 2005; Al-Madhoun et al., 2007; Shemetov et al., 2007), all of them involved in a wide variety of physiological processes.

#### *1.2.3.1 Heat shock protein 70 family*

The HSP70 family is the most highly conserved HSP family and comprises several proteins that are localised in distinct cellular compartments with overlapping and distinct functions (Hunt et al., 1985; Daugaar et al., 2007), including HSPA1A, heat shock cognate protein 70 kDa (HSPA8) and glucose-regulated protein 78 kDa (HSPA5), amongst others.

The HSPA1A is implicated in the mechanism of cell reaction to a variety of cytotoxic factors, and its protective function is related to its ability to promote the folding of nascent polypeptides and to remove denatured proteins (Guzhova and Margulis, 2006).

The HSPA8 (or HSC70) is the constitutive form of HSPA1A and is localised in the nuclei and the cytosol of cells. However in most animal species, except in primates, the most inducible members of the family of HSP70 proteins are not found in the cytosol or in the nuclei of cells (Shaner and Morano, 2007).

Glucose-regulated protein 78 kDa, also known as immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP) or heat shock 70 kDa protein 5 (HSPA5), is the most abundant and the best characterised among glucose-regulated proteins (Munro et al., 1986; Lee, 1992; Ma and Hendershot, 2004). This protein is a major calcium-binding protein that resides in the endoplasmic reticulum (Macer et al., 1988), where it functions as a molecular chaperone (Little et al., 1994) and in the translocation of nascent proteins across the membrane of endoplasmic reticulum (Kim et al., 1998). However, it is believed that HSPA5 not only acts as a molecular chaperone, assisting in the proper folding of *de novo* synthesised proteins, but also protects cells against a variety of physiological stresses. For this reason, HSPA5 can be induced in response to a multitude of stimuli including the interruption of proper protein folding, transport, or processing, the deprivation of glucose and oxygen, and the perturbation

of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores (Little et al., 1994). In relation to this feature and using transgenic mice, Mao and co-workers (2006) demonstrated that the HSPA5 promoter is highly activated not only in early embryonic development but also as a consequence of others factors, such as low glucose levels, acid pH or hypoxia. All of these factors are known as creators of a microenvironment in which tumours grow (Jamora et al., 1996). Following this, a large number of studies have demonstrated a correlation between induced expression of HSPA5 and resistance to apoptotic death in somatic cells, particularly in progressively growing tumours (Reddy et al. 2003; Miyake et al. 2000). The induction of HSPA5 has been used widely as an indicator of endoplasmic reticulum stress and the start of the unfolded protein response, a defence mechanism that cells have developed and conserved (Mao et al., 2006).

Regarding the reproductive function, Georgiou and co-workers (2005) showed that HSPA1A might have a beneficial effect on gamete development. These authors observed an up-regulated releasing in response to sperm in the oviduct that maintains the viability and function of spermatozoa. For this reason, HSPA1A not only acts as an inflammatory activator of innate and adaptive immunity (Javid et al., 2007) and as a cytoprotector in a variety of cell types, but is also involved in gamete function.

Another member of this family, the heat shock 70 kDa protein 1B (HSPA1B or HSP70-2) is down-regulated in semen from infertile men with idiopathic oligoteratozoospermia, suggesting that such anomalies of gene expression may be associated with some subtypes of male infertility (Cedenho et al., 2006).

The HSPA5 is present in the uterus and the oviduct (Boilard et al., 2004) and it seems that it is required for the efficient biosynthesis and secretion of proteins related with the onset of uterine sensitisation in rats (Simmons and Kennedy, 2000). On the other hand, Boilard and co-workers (2004) identified HSPA5 as one of the six major proteins in APM extracts isolated from bovine OEC. According to these authors, this protein is located in the luminal/apical surface of bovine OECs and binds to spermatozoa. However, even though a beneficial effect of oviductal-APM has been observed on the maintenance of sperm viability and integrity, and HSPA5 forms part of the APM-proteins, its exact role on the maintenance of sperm function is still unknown.

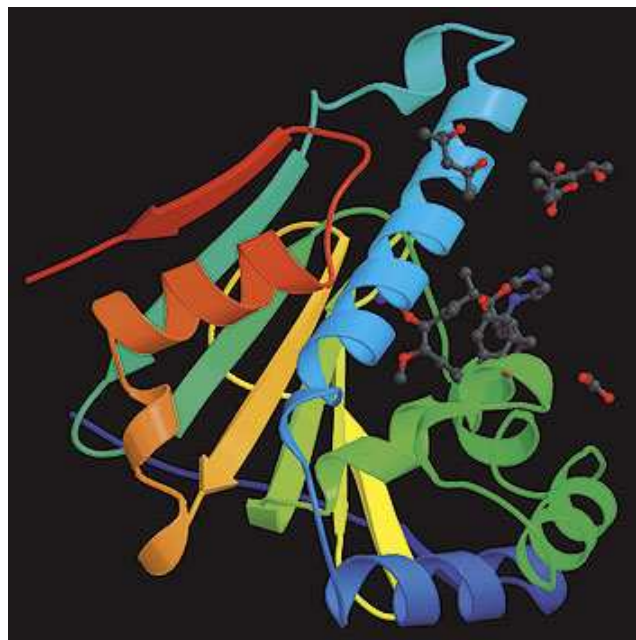
Although incubation with exogenous HSPA5 does not affect sperm viability, motility or acrosomal integrity, this protein seems to be involved in the sperm capacitation (Lachance et al., 2007). Furthermore, HSPA5 appears to perform an important function in the process of

spermatogenesis, as a differential expression of this protein was observed in the physiological process of spermatogenesis (Huo et al., 2004).

### *1.2.3.2 Heat shock protein 90 family*

The HSP90 family of proteins is abundant and comprises constitutively synthesised cytosolic proteins that are moderately stress-inducible (Neckers and Ivy, 2003). The HSP90 alpha A.1 (HSP90AA1) (Figure IV-6) interacts with steroid receptors (Catelli et al., 1999), actin, tubulin, and several protein kinases and prevents the aggregation of citrate synthase and casein kinase II (Tabibzadeh and Broome, 1999). It plays a key role in the stabilisation and conformational maturation of many signalling proteins that are deregulated in cancers (Kamal et al., 2004; Powers et al., 2006).

In regard to the reproductive function, the expression of HSP90AA1 is higher in proliferative than in the secretory phase in the endometrium (Komatsu et al., 1997). Ecroyd and colleagues (2003) showed that HSP90AA1 is involved in sperm capacitation both in humans and rats, and Huang and co-workers. (1999) reported a decrease in HSP90AA1 before a reduction in sperm motility in boar sperm cooling. In boars, Hou and colleagues (2007) have shown that geldanamycin, an HSP90AA1-specific inhibitor, induces sperm capacitation.



**Figure IV-6** Human HSP90AA1 (Jez et al., 2003)



### *1.2.3.3 Other heat shock proteins*

As already pointed out, this superfamily includes a large number of proteins. The HSP60 family consists of proteins that are constitutively expressed, but are also moderately stress-inducible (Tabibzadeh and Broome, 1999).

Alpha crystallin is an HSP, consisting of two types of highly homologous 20/22-kDa alphaA and alphaB subunits. Both chains are non-covalently associated to form a large macromolecular complex of approximately 40 kDa (Quax-Jeuken et al., 1985; Bhat et al., 1991). Although in the beginning it was believed that the expression of the alpha crystallin was strictly confined to the lens, this protein has also been found in a variety of normal tissues (Klemenz et al., 1993). Subsequent research identified it as a molecular chaperone (Horwitz, 1992; Jakob et al., 1993) and allowed its classification as a small HSP (Klemenz et al., 1991; Nakamoto and Vigh, 2007).

### **1.2.4 Steroid receptors and regulation by heat shock proteins**

Steroid hormones act by binding to their receptors, which regulate the transcription of the target genes in tissues responsive to these hormones (Smith and Toft, 1993). These steroid receptors regulate a wide variety of physiological processes and their mode of action is well known: after hormone binding, they undergo a conformational change, translocating to the nucleus, where they modulate the transcription of target genes (Kakar et al., 2006; Grad and Picard, 2007).

Indeed, steroid receptors are transcription factors and their function is regulated by ligand-binding (Haverinen et al., 2001). A large number of receptor-interacting proteins (co-activators and co-repressors) have been identified in several studies, suggesting that such cofactors act by mediating the regulation of transcription (Weigel, 1996). The binding to ligands regulates their association and dissociation by modifying the structure of the receptors, and thereby affecting the surface properties of the receptor (Renaud et al., 1995; Wurtz et al., 1996; Pratt and Toft, 1997; Moras and Gronemeyer 1998; Torchia et al., 1998). In addition to these receptor-interacting proteins, several other proteins are associated with receptors in hypotonic cell extracts and in the reticulocyte lysate, forming an oligomeric complex (Dougherty et al., 1984; Catelli et al., 1985; Kost et al., 1989; Smith et al., 1990; Johnson et al., 1994). Following on from this, the proteins associated with the oligomeric

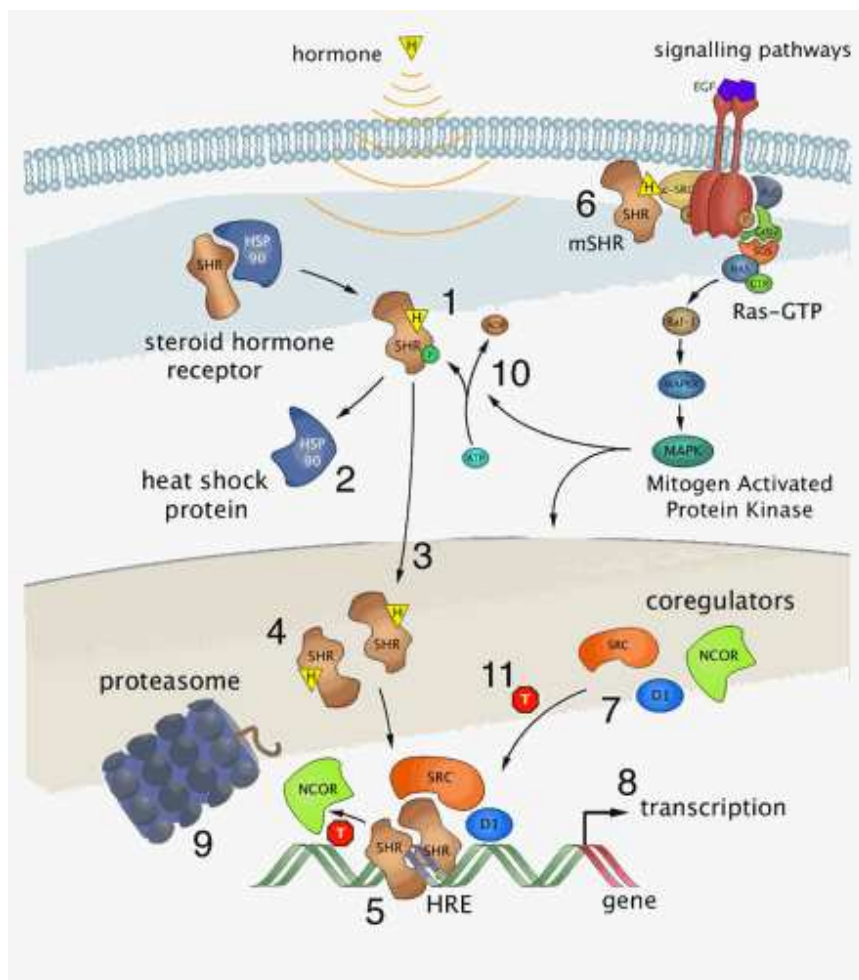
form of steroid receptors have been the aim of subsequent studies (Tuohimaa et al., 1993; Pratt and Toft 1997; Ylikomi et al., 1998).

The HSP90AA1 was the first identified receptor-associated protein (Dougherty et al., 1984), and it was initially suggested that it functioned as a repressor, because its association stopped DNA binding (Kost et al., 1989; Onate et al., 1991). Later studies confirmed this repressing function on non-ligand binding domains, by showing that its deletion generated active receptors that did not form a stable oligomeric complex with HSP90AA1 (Scherrer et al., 1993). Conversely, Lee and co-workers (1996) and White and colleagues (1997) established disagreement with the study of Scherrer and co-workers (1993) when they observed that even though the non-ligand binding domains of the estrogens receptor did not interact with HSP90AA1, some mutants of estrogen-receptors did. The relevance of HSP90AA1 as a regulator of the activity of steroid receptors has been widely studied in several different experiments, for example using HSP90AA1-deficient yeast strains (Picard et al., 1990; Bohlen and Yamamoto, 1993), and observing that ligand binding to a glucocorticoid receptor is compromised when HSP90AA1 is dissociated from the receptor complex (Bresnick et al., 1989).

Most receptor-associated proteins act as chaperones, as demonstrated by Inano and co-workers (1994) after they observed that HSP90AA1 can restore the DNA binding ability of partially denatured estrogen receptors *in vitro*. However, oligomeric complex formation *in vitro* does not correlate with the biological activity of HSP90AA1 *in vivo* (Dalman et al., 1991; Holley and Yamamoto, 1995). Apart from HSP90AA1, other members of the HSPs, such as HSPA1A, FKBP4 (FK506 binding protein 4 59kDa, also known as HSP56 or p59) and cyclophilin-related protein 40 kDa form complexes with non-liganded forms of steroid hormone receptors (Renoir et al., 1990; Bagchi et al., 1991; Baniahmad and Ming-Jer, 1993; Ratajczak et al., 1993; Kakar et al., 2006; Grad and Picard, 2007).

Most nuclear proteins enter the nucleus via a process that requires energy and involves the recognition of specific sequences, known as nuclear localisation signals (Richardson et al., 1988). Steroid receptors, which present multiple proto-signals for nuclear targeting (Ylikomi et al., 1992), shuttle between cytoplasm and the nucleus (Goldstein, 1958; Guiochon-Mantel et al., 1991, 1994; Perrot-Appianat et al., 1992). The mechanism of the nucleocytoplasmic shuttling of steroid receptors may be due to a distinct biological function of a nuclear compared with a cytoplasmic receptor (Verdi and Campagnoni, 1990; Migliaccio et al.,

1996), which looks to use mechanisms that involve nuclear localisation signals instead of nuclear export signals (Tyagi et al., 1998; Weis, 1998). Different experiments have shown that HSPs, such as receptor-associated proteins, are involved in the nuclear translocation of nuclear proteins. These experiments concerned different HSPs such as FKBP4 (Czar et al., 1995), HSPA1A (Jeoung et al., 1991; Imamoto et al., 1992; Yang and DeFranco, 1994), and HSP90AA1 (Yang and DeFranco, 1996).



**Figure IV-7** Heat shock proteins and steroid receptors (Griekspoor et al., 2007)

### 1.2.5 The human endometrium and heat shock proteins

In response to steroid hormones, the human endometrium undergoes characteristic cycles of proliferation and secretory changes, and expresses a molecular repertoire of proteins, including some HSPs such as heat shock 27 kDa protein 1 (HSPB1), HSPD1, HSPA1A,

HSP90AA1, and alpha crystallin B chain (Koshiyama et al., 1995). The expression of HSPB1, HSPD1, and HSPA8 shows a peak after ovulation (Nip et al., 1994; Koshiyama et al., 1995) and the maximal expression of the alpha crystallin B chain is observed during the secretory phase. In view of the known functions of HSPs, these proteins appear to be involved in the protection of endometrial proteins against factors with the potential to lead to protein denaturation. Since tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is a cytotoxic cytokine that is produced in progressive amounts during the secretory phase, the function of the HSPs seems to be to protect the cells against the cytotoxic damage of TNF- $\alpha$ , especially during the implantation window (Tabibzadeh and Broome, 1999).

Although different HSPs are expressed by the human endometrium, the expression of some is constant while for others it varies. For example, while the expressions of HSPA1A and HSP90AA1 show minimal changes during the menstrual cycle, the expression of HSPB1, HSPD1, and HSPA8 increases progressively during the late proliferative and early secretory phases and diminishes in the mid to late secretory and menstrual phases (Tabibzadeh et al., 1996). The expression of heat shock-related protein 20 kDa (HSPB6) is reduced during late pregnancy and labour in rat (Cross et al., 2007) and a reduction of HSP90AA1 in human decidua and placenta tissues is also observed during the course of normal gestation (Shah et al., 1998).

With the exception of HSPA1A, which is found in the epithelial cells, HSPs are located in both the stroma and the epithelium. The HSPB1 has been found in the lymphoid aggregates within the endometrial stroma, and both HSPB1 and HSP90AA1 have been found in the endothelial cells. However, the expression of HSPA1A has also been found to be stronger in the epithelium than the stroma, whereas HSP90AA1 is present in both the epithelium and stroma (Tabibzadeh et al., 1996).

### **1.2.6 Clusterin**

Clusterin (CLU) is a multifunctional glycoprotein protein widely expressed in a variety of tissues undergoing apoptosis. It is a constituent of cell-adhesion complexes and is involved in the interactions between cell and cell, and cell and extracellular matrices (Lemansky et al., 1999; Jones et al., 2002; Valdés-González et al., 2005; Wang et al., 2007).

Although its role in reproduction is not yet clear, it has been localised in human spermatozoa and in the male reproductive tract (Atlas-White et al., 2000; Plotton et al., 2006), and is also expressed by accessory sex glands in bulls (Moura et al., 2007). Also in bulls, Ibrahim and co-workers (2000) found that clusterin-positive spermatozoa sorting is a better way to predict fertility than sperm motility and morphology, and that in swine, clusterin gene expression increases when luteolysis is induced (Forni et al., 2003).

Han and colleagues (2007) have shown that styrene, which is a chemical product, may produce infertility in male rats by repressing the expression of clusterin in the testis and by inducing the expression of another five genes (testis-specific expressed gene 101, protein kinase C, H<sup>+</sup>-ATPase isoform 2, peroxiredoxin 1, and aquaporin 9). The infertility provoked by styrene could hence be due to the suppression of clusterin gene expression.

## 1.3 Gene silencing

### 1.3.1 Introduction to gene silencing

Gene silencing is a powerful strategy for experimental analysis in determining the function of a given gene. When a gene is repressed, it is possible to study a protein and its role in the cell. Whereas ‘gene knockout’ removes the DNA sequence encoding a gene, ‘gene knockdown’ procedures reduce gene expression by inactivating messenger RNA (mRNA) transcripts, so that the latter cannot totally abolish gene expression (Kurreck, 2003).

Different technologies have been used in an attempt to mediate the down-regulation of gene expression. In gene knockdown strategies, three anti-RNA procedures can be distinguished (Thomson, 2002; Bantounas et al., 2004):

- **Antisense technology**, using single stranded antisense oligonucleotides (AODNs).
- Triggering RNA cleavage via catalytically active oligonucleotides referred to as **ribozymes**.
- **RNA interference** (RNAi) induced by small regulatory RNAs.

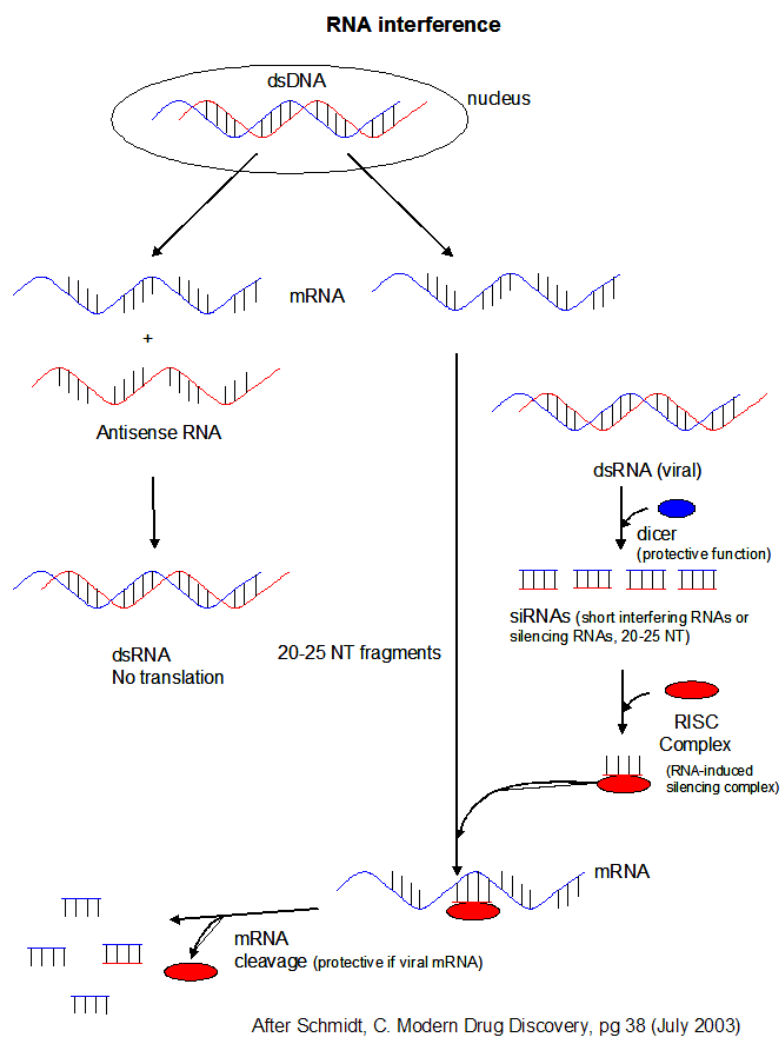
Among these technologies, antisense technology and RNAi have been the most used. The two methods share many practical problems, such as site selection, toxicity at high concentration, and the difficulty of transfection in certain cell types (Nesterova and Cho-Chung, 2004). However, even though AODNs and ribozymes have been used for years to target specific mRNA for gene silencing, and these methods worked satisfactorily in some

simple experimental models, they are not effective enough in complex mammalian systems (Bantounas et al., 2004).

### 1.3.2 Antisense technology

The antisense approach to gene silencing consists of injecting a single-stranded RNA sequence complementary to mRNA transcribed from a target gene into a cell (Figure IV-8). The antisense RNA and sense mRNA hybridise, thereby blocking translation and the production of an encoded protein.

At the end of seventies, AODNs were applied in cell culture for the first time (Zamecnik and Stephenson, 1978) and like most emerging technologies, it has experienced its share of growing pains (Stein, 1995; Wagner, 1995).

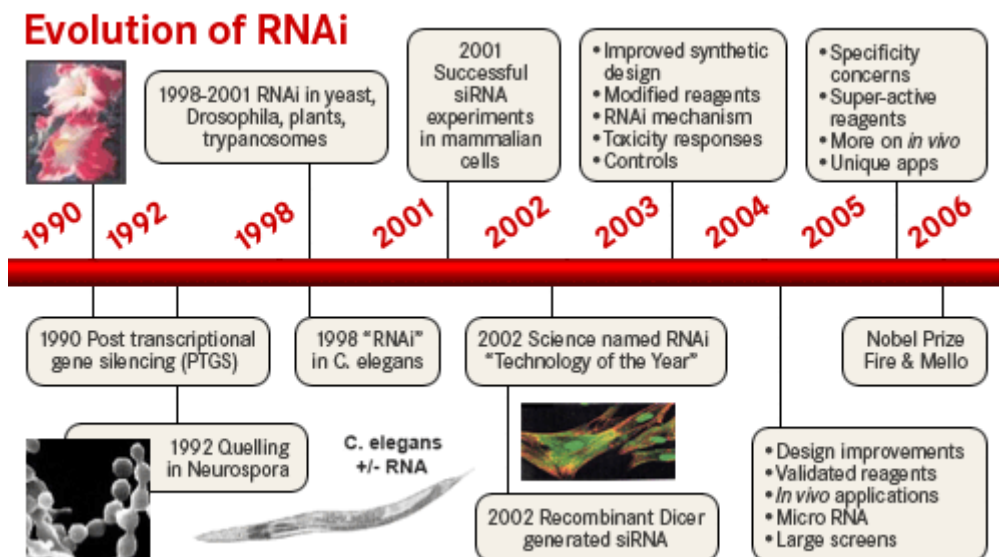


**Figure IV-8** Antisense mRNA and RNAi (Schmidt, 2003)

Two types of AODNs, cleavers and blockers, are distinguished according to their mechanism-of-action. Cleavers bind to their targeted mRNAs via Watson–Crick base pairing, leading to the activation of intracellular nucleases that degrade the target mRNA. The most common types of cleavers activate ribonuclease H (RNase H) (Bennett, 1998; Bennett and Cowser, 1999; Baker et al., 2001) and RNase L (Adah et al., 2001). In contrast, blockers bind to a target mRNA by Watson–Crick base pairing, but inhibit protein translation via steric hindrance by acting as roadblocks to ribosomes. The most common blockers used are peptide nucleic acids (Nielsen et al., 1991), morpholinos (Iversen et al., 2001), locked nucleic acids (Orum and Wengel, 2001) and methylphosphonates (Hogrefe, 1999).

### 1.3.3 RNA interference: an introduction

Antisense mRNA was described first, but the presence of a dsRNA duplex led to the recognition of an RNA interference (RNAi) effect and subsequently, in 1998, allowed the discovery of RNAi technique by Fire and Mello (Fire et al., 1998; Li and Cha, 2006; Montgomery, 2006) (Figure IV-9). Since then, this technique has become an effective and powerful tool for elucidating a target gene function by inhibiting its expression at a post-transcriptional level induced by a dsRNA molecule (Yu, 2007).



**Figure IV-9** Evolution of RNAi (<http://www.invitrogen.com>)

RNAi is a natural mechanism of gene silencing present in plant and mammalian cells. In the beginning it was discovered in simpler organisms, such as nematodes and some insects (Fire et al., 1998; Sharp, 2001; Plasterk, 2002; Zamore, 2002; Sen and Blau, 2006). The first attempt at using RNAi to study gene function was performed by Napoli and colleagues (1990) in plants. Their aim was to determine whether or not chalcone synthase, a key enzyme related to the biosynthesis of flavonoids, was the rate-limiting enzyme in anthocyanin biosynthesis.

Another example was reported by Romano and Macino (1992) in *Neurospora crassa*. These authors observed that the introduction of homologous RNA sequences suppressed the expression of the endogenous gene. Finally, the first work on RNAi in animals was documented in *Caenorhabditis elegans* by Guo and Kemphues (1995), who observed that the introduction of sense or antisense RNA to mRNA encoding *PAR-1* resulted in a degradation of the *PAR-1* message (Guo and Kemphues, 1995).

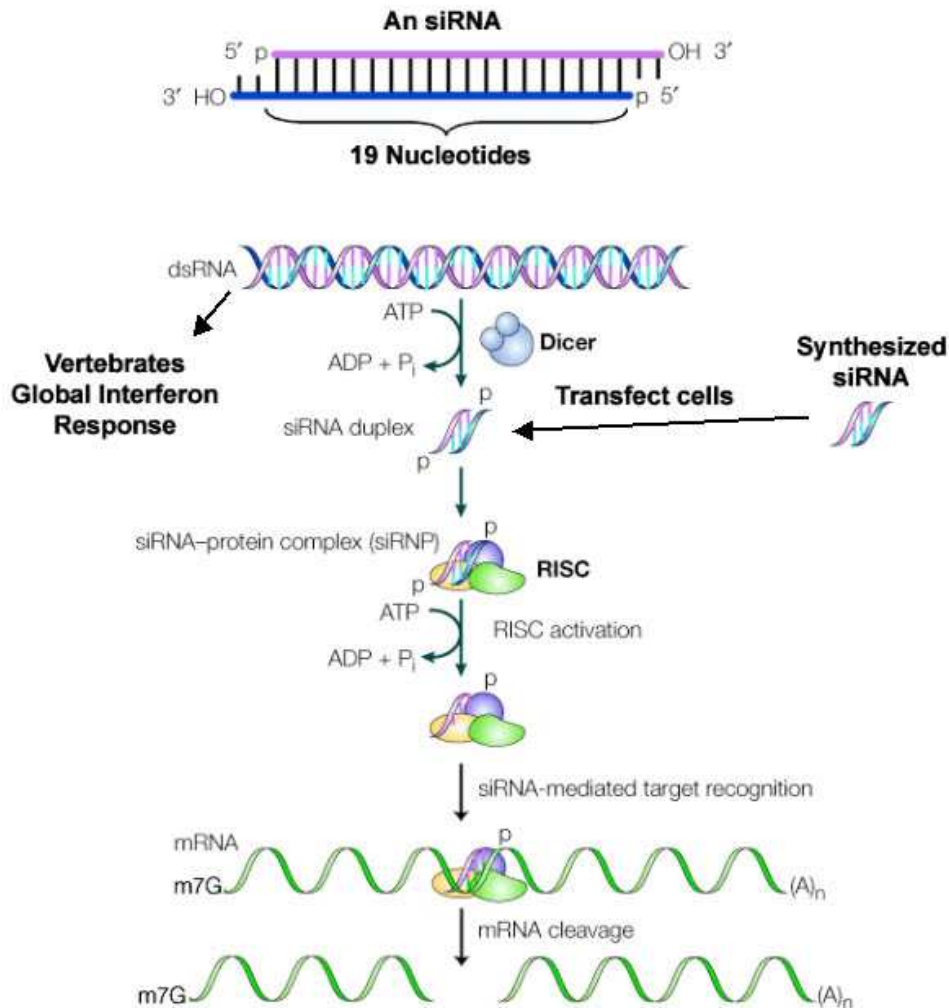
#### 1.3.4 Mechanism of RNA interference

The RNAi pathway starts with the ATP-dependent cleaving of a large molecule of dsRNA into small double-stranded RNA molecules (siRNA) of a length between 20 and 23 nucleotides (Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001; Stewart et al., 2003) (Figure IV-10). These siRNAs possess 3'-hydroxyl and 5'-phosphate groups and a 3' overhang of two unpaired nucleotides on each. Early studies carried out in *Drosophila megalongaster* showed that the processing of dsRNA to siRNA is due to a specific RNase III enzyme, later named Dicer (Bernstein et al., 2001). After this discovery, other works allowed the identification of Dicer complexes in both simple and complex organisms, such as *Caenorhabditis elegans* (Ketting et al., 2001), *Arabidopsis thaliana* (Golden et al., 2002), *Dictyostelium discoideum* (Martens et al., 2002), fission yeast (Provost et al., 2002b), mice (Nicholson and Nicholson, 2002) and humans (Provost et al. 2002a, Zhang et al., 2002).

A proposed model for the action of Dicer involves ATP-dependent translocation of the enzyme along its dsRNA target. The efficiency with which Dicer snips a particular dsRNA is directly proportional to the length of the target; thus, a longer the dsRNA produces a greater amount of siRNA and the silencing effect is, hence, more potent (Bernstein et al., 2001). This size limitation may impede Dicer from binding to small intramolecular base-paired regions of endogenous mRNAs. In humans, the cleavage of dsRNA mediated by the Dicer enzyme



occurs sequentially, beginning at the termini of the dsRNA, and is achieved by the excision of small dsRNA fragments of a defined length (Ketting et al. 2001, Zhang et al. 2002; Sandy et al., 2007).



**Figure IV-10** Mechanism of RNAi (Dykxhoorn et al., 2003)

The second stage of the RNAi pathway occurs after the processing of dsRNA to siRNAs and consists of the incorporation of the resulting siRNAs into a multi-protein complex with nuclease activity, known as RISC (RNA-induced silencing complex), which targets and cleaves mRNA complementary to the siRNAs. This event takes place in the cytoplasm of a given cell and involves the separation of the two strands of siRNA by this enzyme (Hammond et al., 2000). Then, the RISC complex is guided to its target mRNA by siRNA, it having been observed that siRNA only leads the way to the recognition and degradation of an mRNA with a homologous sequence (Hamilton and Baulcombe, 1999; Elbashir, 2001), without altering

the rest of the RNA in the cell. Two forms of RISC complex (inactive and active forms) have been described. The activation of RISC to active RISC form (RISC\*) is an ATP-dependent step (Nykanen et al., 2001) and only one of the two RNA strands (the antisense strand) remains bound to this RISC\* complex (Martínez et al., 2002). This siRNA-RISC\* complex locates target mRNA within the cytoplasm with homologous nucleotide sequences and induces the cleavage of mRNA, thereby preventing its translation into protein (Li et al., 2006; Li and Cha, 2006; Vázquez-Ortíz et al., 2006). Therefore, even though the siRNA needs to be dsRNA in order to be easily recognised and to be able to bind to RISC, the two siRNA strands must unwind before the RISC becomes active. Furthermore, the efficient cleavage of the target mRNA by RISC depends on the phosphorylation of the 5'-end of siRNA duplex (Nykanen et al., 2001, Martínez et al., 2002).

Interestingly, the RNAi machinery, namely Dicer and RISC complexes, seems involved in mediating hetero-chromatic and transposon silencing (Ketting et al. 1999, Volpe et al., 2002, Schramke and Allshire, 2003; Sandy et al., 2005). For this reason, Dicer and RISC are two key points where several molecular pathways that control gene expression converge.

In summary, two distinct steps can be distinguished in the RNAi pathway (Hutvagner and Zamore, 2002; McManus and Sharp, 2002). Firstly, the Dicer enzyme cleaves long dsRNA into siRNA molecules with a length of 20–23 nucleotides. Then, RISC uses siRNA to guide the sequence-specific cleavage of the mRNAs coming from the target gene transcription. In cells or simpler organisms, specific dsRNAs have been introduced to silence a targeted gene, studying its function. However, the application of RNAi strategy in higher organisms is more difficult than in simpler ones, because the former present another dsRNA pathway that activates the interferon pathway (Kumar et al., 1998). For this reason, silencing gene expression by this mechanism in higher organisms needs to deliver chemically synthesised small RNAs (about 20-22 nucleotides) into host cells, avoiding the first step of the RNAi mechanism (Elbashir et al., 2001; McManus and Sharp, 2002). These synthetic small regulatory RNAs do not activate the interferon pathway in mammals and have the correct structure for activating the RNAi pathway (Elbashir et al., 2002). By using this strategy, later research has been able to successfully use this pathway in mammalian cells to study the function of targeted genes both *in vivo* and in cell culture (Paroo and Corey, 2004; Corey, 2007).

### 1.3.5 Induction of RNAi by small regulatory RNAs: siRNAs, shRNAs and miRNAs

Small regulatory RNAs can artificially induce the RNAi cellular pathway which leads to specific hybridisation and subsequent translational repression of target mRNAs.

These small regulatory RNAs include the following three species:

- Synthetic double-stranded small interfering RNAs (siRNAs).
- Short hairpin RNAs (shRNAs).
- Intron-derived microRNAs (miRNAs).

The efficacy of RNAi varies from transient effects to long-lasting gene silencing, depending on which is the small regulatory RNA used (Vázquez-Ortíz, 2006; Scherr and Eder, 2007).

#### *1.3.5.1. Synthetic double-stranded small interfering RNAs (siRNAs)*

As noted previously, the induction of RNAi using long dsRNA is useful in plants and simpler organisms but is not suitable for the study of gene function in mammalian cells, because it triggers the activation of the interferon system, which is a mechanism of defence against viral infections that inhibits protein translation (Kumar et al., 1998; Provost et al., 2002a). In fact, the interferon system can activate about one hundred genes, some of which encode relevant dsRNA-binding proteins such as protein kinase R, which inhibits mRNA translation by inactivating eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (Manche et al., 1992). Since a method is needed of activating the RNAi pathway in mammals without inducing an interferon system response, synthetic siRNAs have been unveiled as capable of avoiding the first step of the pathway by retaining their ability to mediate exogenous and endogenous gene silencing. This first step consists of the cleavage from dsRNA to siRNA using the Dicer enzyme.

When using the siRNA technique, the identification of the best target sequence of a particular mRNA is a critical issue. In this respect, avoiding the first 100 nucleotides of any mRNA as a potential target is recommended, due to the fact they can contain protein-binding regulatory sequences that could interfere in the action of siRNA (Elbashir et al., 2002; Kumar and Clarke, 2007). In synthetic siRNAs design, it should be taken into account that the RISC\* active complex only incorporates one strand of the siRNA, preferentially the antisense strand. Related with this, Reynolds and colleagues (2004) and Ui-Tei and co-workers (2004) have observed that when siRNA duplexes are thermodynamically unstable (being rich in

adenine/uracil nucleotides) or when they contain mismatches towards the 5' end of the antisense strand, the RISC\* complex uses the antisense strand, which means more efficient gene silencing.

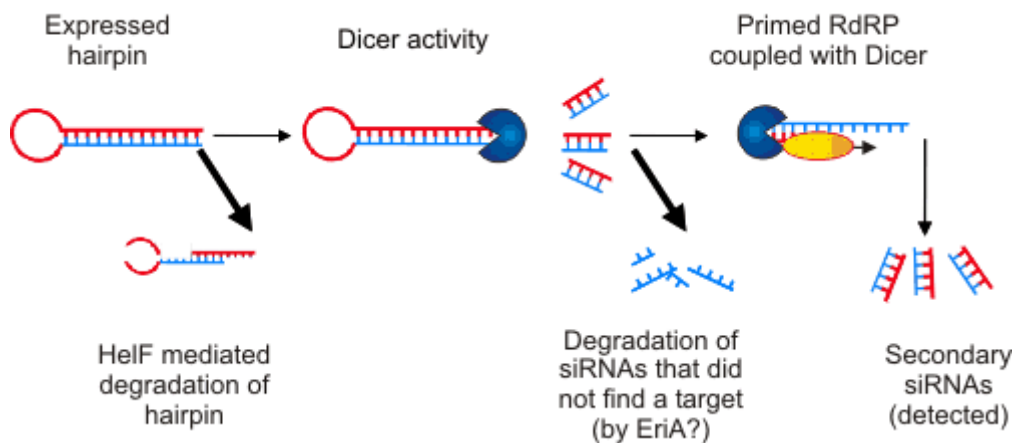
A given siRNA can be synthesised either chemically or by using a method-based *in vitro* transcription of the two siRNA strands from DNA templates (Donze and Picard, 2002). These oligonucleotide templates consist of a sequence complementary to the T7 RNA polymerase promoter followed by a sequence complementary to either the sense or antisense siRNA strand. A second oligonucleotide consisting of the T7 promoter and coding sequence is then annealed, and by this mechanism the T7 region becomes double stranded. This enables the transcription of the sense or antisense siRNA strand by T7 RNA polymerase and, finally, the two transcribed strands are annealed to form the siRNA duplex (Sohail et al., 2003).

The synthesis of a given siRNA must be perfectly complementary, because a single nucleotide difference between the siRNA antisense strand and the target mRNA cannot trigger the RNAi (Chiu and Rana, 2002). Moreover, how effective the gene silencing of a given siRNA is depends on the position of the mismatch (Jackson et al., 2003; Miller et al., 2003). Following various studies (Bridge et al., 2003; Doench et al., 2003; Kim et al., 2004), it has been suggested the optimal siRNA presents a double strand of 19 nucleotides with 2-deoxy-thymidine/uridine overhangs at the 3'-end of each strand, so that the target sequence always begins with two adenine residues, because it is complementary to the double uridine overhang of the antisense strand (Kurreck, 2006).

#### 1.3.5.2 Short hairpin RNAs (*shRNAs*)

One of the problems of using synthetic siRNAs is that they are short-lived after delivery into the cell, so that their ability to silence the target genes is not much great. For this reason, promoters of eukaryotic RNA polymerase III have been used to express siRNAs from expression cassettes, and hence to enhance their efficacy. With this purpose, a sequence encoding for the sense strand of a given siRNA, then a spacer, and finally the antisense strand sequence, ending with a five uracil tail, is cloned. The rationale of including this spacer is that it mediates the formation of a hairpin structure, which then allows the pairing of the sense and antisense sequences (Brummelkamp et al., 2002a) (Figure IV-11).

By using this mechanism, the structure transcribed from shRNAs is similar to that of the siRNA, but sense and antisense strands are linked by a spacer sequence, forming a hairpin. This system has been used to successfully inhibit gene expression in mammalian cell lines, with an efficiency comparable with that of synthetic siRNAs. Following a slightly different approach, the two siRNA strands can be transcribed separately using cassettes in the same or in two different U6-based RNAi vectors. Then, after delivery, the two strands form the siRNA duplex in the cell (Lee et al., 2002). Furthermore, Miyagishi and Taira (2003) documented findings that the shRNA method is more effective than cloning siRNAs sequences in cassettes without the spacer.



**Figure IV-11** Small hairpin RNA (Miska and Ahringer, 2007)

Different studies have been performed to optimise the cassette design and effectiveness of shRNA method (Brummelkamp et al., 2002a, Xia et al, 2003; van de Wetering et al., 2003; Boden et al., 2004), and shRNA libraries formed by ligating a large number of shRNA-expressing inserts have been constructed (Berns et al. 2004; Miyagishi et al., 2004). These libraries allow the creation of multiple vectors expressing shRNAs against target sites, so that the most efficient shRNAs can be selected (Luo et al., 2004; Shirane et al., 2004).

Different expression vectors for delivering shRNA can be used, such as the U6 and H1 (TetO2) promoters, or pSiRPG. pSiRPG is one of the most effective when transducing into some mammal epithelial cells that are hard-to-transfect using conventional plasmid vectors (Størvold et al., 2007).

### 1.3.5.3. Intronic microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous or artificial single stranded siRNAs capable of interfering with mRNA (RNAi) via complete or partial complementarities (Lagos-Quintana et al., 2001). Initially, miRNAs were named small temporal RNAs after being discovered in *Caenorhabditis elegans* and in *Drosophila melanogaster* as regulators of gene expression (Lee et al., 1993; Olsen and Ambros, 1999; Reinhart et al., 2000).

Different types of miRNAs have been observed in diverse species. One class of these miRNAs are intron-derived miRNAs, which are derived from intron sequences, and differ from the other intergenic miRNAs in that they require RNA II polymerases and spliceosomal components for their biogenesis (Lin et al., 2007). Intron-derived miRNAs are firstly transcribed from introns as hairpin structures (primary miRNAs) and then matured as single-stranded by Dicer enzyme (mature miRNAs) in several organisms (Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001; Lau et al., 2001, Mourelatos et al., 2002; Tabara et al., 2002). Then, the mature miRNA binds to the three prime-untranslated region (3'-UTR) of its corresponding mRNAs (Provost et al., 2002b). As a general mechanism of RNAi, RISC-like is also involved in the miRNA pathway (Hutvagner and Zamore, 2002).

### 1.3.6 Methods of synthetic siRNAs delivering

Both *in vitro* and *in vivo* experiments can deliver synthetic siRNAs (Aigner, 2006). However, one of the biggest handicaps in the use of synthetic siRNA is the difficulty of predicting its efficiency, and ensuring its delivery (Li and Cha, 2006). Of course, siRNA must reach the cytoplasm of the target cell to induce gene silencing, but naked siRNAs are not able to penetrate biological membranes (Li et al., 2006). Specifically, therefore, siRNA must be delivered by using one of the following techniques:

- Transfection with chemical agents
- Electroporation
- Viral transduction

### 1.3.6.1 Transfection

Chemical transfection is a suitable method for transfecting immortalised cell lines (Ovcharenko et al., 2005). This method consists of using lipid-based or polyamine-based reagents that form complexes with siRNAs at the time of transfection, and provides high levels of gene knockdown by directly adding siRNAs at low concentrations to cells at the time of seeding.

Other advantages offered by this method are that high levels of transfection can be attained and that minimal optimisation is required (Borawski et al., 2007). Although the optimisation of siRNA transfection is difficult, especially when siRNA delivering is accomplished in primary cultured cells (see also Article 6), mammalian cells can be successfully loaded with exogenous siRNA when the right conditions are chosen, which includes the method and the matrix of transfection.

### 1.3.6.2 Electroporation

Nevertheless, chemical transfection is not an adequate method for all types of cell; primary cultured and hard-to-transfect cells cannot be transfected by using this method. As these cells are often used in experiments, an alternative is needed (Ovcharenko et al., 2005).

Electroporation (EP) consists of applying an electric field pulse to induce the formation of microscopic pores (electropores) in the plasma membrane, so that the molecules and the ions are then able to traverse the membrane and get into the cell through these pores. After EP, cells will recover and grow if pulse conditions are appropriate. Furthermore, EP presents two advantages: it is independent of cell division and the knockdown of gene expression is quickly observable (a few hours after siRNA delivery).

The EP method has been used for years for delivering nucleic acids and has often been associated with high cell mortality. In the beginning, EP protocols were only used for large plasmid DNA delivery (Sato, 2005), being critical for the survival of electroporated cells. Conversely, the EP of siRNA, which is used both *in vivo* (Shoji et al., 2005) and *in vitro* (Rebersek et al., 2007) systems, requires milder conditions than those of DNA, so that much less cell toxicity is observed. This reduction in cell toxicity is achieved thanks to the buffers designed specifically for siRNA delivery under field pulse conditions (Kurreck, 2006). Some reports have demonstrated that these buffers allow gene silencing efficiency of about 90%, by

maintaining between 85% and 90% of cell viability in primary cell cultures (Ui-Tei et al., 2004).

### *1.3.6.3 Viral transduction*

Finally, another method of delivering small regulatory RNAs is viral transduction (Borawski et al., 2007). This method consists of using vector constructions from viruses that express siRNAs and shRNAs within vector-transduced cells, and produce long-term knockdown in gene expression (Barton et al. 2002; Brummelkamp et al. 2002b; Devroe and Silver 2002; Paddison and Hannon 2002).

Although viral vectors have been employed in gene therapy for over a decade, their use in RNAi is relatively recent. The method can be used in a wide variety of cells and is efficient and cost-effective, since viruses function as vectors because of their intrinsic mechanism for gene transduction. Five viral vectors are currently used for siRNA and shRNA delivery: retrovirus, lentivirus, adenovirus, adeno-associated virus, and baculovirus. One of the most used is retrovirus, where different designs have permitted the development of a versatile system that efficiently delivers stem-loop cassettes (Theng-Ong et al., 2005).

### **1.3.7 Antisense versus RNAi**

Antisense and RNAi technologies have many similarities. Both have been revealed as post-transcriptional strategies, reducing the level of a target protein, and both use similar delivery methods in cell-culture experiments (Lebedeva et al., 2000; Hugues et al., 2001).

Since the AODN technique has been used for longer, antisense reagents are much more resistant to nucleases than those used in RNAi, making the use of antisense easier in mammals (Henry et al., 1997; Fraser et al., 2000; Achenbach et al., 2003). For the same reason, strict controls have been established in antisense strategy to avoid misleading results (Stein, 2001).

Another difference between antisense and siRNAs is the place where they act. Whereas AODN accumulate in the nucleus (Fisher et al., 1993) and can modify the splicing of precursor mRNAs (Sierakowska et al., 2000; Kole and Sazani, 2001), siRNAs accumulate in the cytoplasm (Billy et al., 2001) and probably cannot gain access to precursor mRNAs.



During mRNA maturation in the nucleus, introns are spliced out from an mRNA precursor. It is well known that alternative splicing provides a mechanism that produces more than one protein from a single gene (Pfeffer et al., 1996), and it has been estimated that about half of all human genes produce multiple proteins by using such a mechanism (Lander et al., 2001; Venter et al., 2002). Cleavers and blockers, the two AODN types, and siRNAs can act on alternative splicing, but in a different way. Thus, while AODN cleavers and siRNAs can be used to inhibit expression of certain splice variants by binding to exon–exon junctions in mature mRNAs, AODN binders can be designed to block the splice acceptor sites by binding to splice donor sites, thereby providing more accurate regulation of splicing events (Sierakowska et al., 2000; Kole and Sazani, 2001).

The concentrations needed for carrying out antisense and RNAi reagents are also different, so that siRNAs are required in a lower concentration than AODN to achieve a similar level of gene knockdown. Such a reduced requirement for chemical modifications reduces the cell toxicity in RNAi experiments as well (Hough et al., 2003).

However, cell lines presenting a stable and sustained knockdown of a target gene can be produced by RNAi technology. This fact, which may allow the production of transgenic animals, is due to an intracellular expression of siRNAs from RNA polymerase III promoters (Lee et al., 2002; Miyagishi and Taira, 2002; Paul et al., 2002).

Since it was described, RNAi has been more used than traditional antisense because of its efficiency in gene silencing. Thus, unlike single-stranded RNA (antisense mRNA), duplex RNA (siRNA) is quite stable and does not require chemical modifications to achieve a satisfactory half-life in cell-culture media (Braasch et al., 2003). Another reason for the rapid adoption of siRNA is that research aimed at optimizing traditional AODN had previously solved many important problems. For example, cellular uptake of oligonucleotides is a major pitfall for efficient gene inhibition inside cells, and difficulties in transfecting cells with AODN seriously threatened the field (Hogrefe, 1999). However, by the time siRNA appeared a wide variety of efficient delivery systems for nucleic acids had been developed and were commercially available. In addition, researchers using traditional AODN had already described potential obstacles and developed criteria for the essential control experiments required to produce convincing results (Crooke, 2000). Finally, biodistribution studies of single-stranded antisense oligonucleotides have also been performed, and have provided

suggestions for potential target tissues for siRNA (Sands et al., 1994; Geary et al., 2001a, 2001b; Paroo and Corey, 2004).

### **1.3.8 Advantages of using anti-mRNA techniques in studying profiles of gene expression**

The profile of gene or protein expression is a good tool for studying gene function. In research, different experimental treatments ensue in different expression profiles (Marton et al., 1998; Hugues et al., 2001; van't Veer et al., 2002), and in recent years arrays have become a very useful tool with which to evaluate the status of many genes in a single experiment (Brown and Botstein, 1999). To evaluate the effects of gene knockdown in cell culture, expression profiling is performed together with AODN or RNAi.

Antisense and RNAi are faster and more specific than other technologies (Bennett, 1998; Bennett and Cowser, 1999; Baker et al., 2001), due to their high specificity (in some cases, a single point mutation can remove the silencing effect), versatility (interfering RNA can be designed against virtually any gene), and efficiency (in many cases, over 90%) (Fu et al., 2007). Thus, these technologies perform a rapid screening of candidate target genes, which allows knowledge of gene function.

Concerning the specificity of anti-mRNA technologies, several proteins have similar three-dimensional conformations when folded, so that sometimes it is difficult to study their function. However, anti-mRNA techniques silence gene expression by binding to the mRNAs, which are quite different among proteins that present similar three-dimensional structures (Baker et al. 2001). In fact, the AODN reagents and the siRNAs can distinguish a mere nucleotide difference in a targeted region, allowing them to distinguish between sequences that are up to 95% identical (Giles et al., 1995; Yamada et al., 2000; Elbashir, 2001).

### **1.3.9 RNAi applications**

Since its discovery in 1998, RNAi has been observed in both simpler and higher organisms. Potential uses include the examination of specific gene function in living organisms and in culture cells (Liu et al., 2004; Vázquez and Ortíz, 2006), the development of anti-viral and anti-cancer therapies, and genome-wide screens (Campbell and Choy, 2005). Thus, the applications of RNAi are wide, especially concerning future perspectives in biomedical research into malignant diseases, such as infectious and autoimmune diseases and cancer

therapy (Li and Cha, 2006; Gewirtz, 2007; Grimm and Kay, 2007), from reverse genetics to high throughput screening of drug targets, including the development of siRNAs as therapeutic agents (Kumar and Clarke, 2007; Martín and Caplen, 2007). This means that siRNAs can be added to chemical inhibitors and inhibitory antibodies when defining their specific roles in gene regulation, drug metabolism and transport, and drug-drug interaction (Yu, 2007).

## **Chapter IV Spermatozoa and OEC**

---

### **2 Objectives**



---

## 2 Objectives

---

Whereas the study focus of the previous chapter is basically boar spermatozoa in semen extenders and storage at 15°C, this chapter studies certain aspects of porcine reproduction in the female reproductive tract, including *in vitro* co-culturing of boar spermatozoa and oviductal epithelial cells (OECs). The first and second objectives were the basis of Article 4, the third and fourth of Article 5, and the fifth and the sixth of Article 6.

In mammalian reproduction, the oviduct plays a key role because it is the region of the female reproductive tract where fertilisation takes place, and it provides a suitable microenvironment for gamete transport, fertilisation and early embryonic development (Romar et al., 2001; Hunter, 1984; 2002; 2005). For this reason, **the first objective** of this chapter was to study the effects on functional sperm parameters of OEC *in vitro* co-culturing with spermatozoa over a 24 hour period, especially in terms of sperm viability and capacitation, by separately analysing sperm populations unbound and bound to OECs and using a non-reproductive epithelial cell line (LLC-PK1) as a positive control.

Previous studies (Bureau et al., 2000) have shown the benefits of a medium conditioned by cultured OECs in *in vitro* fertilisation. Moreover, OECs present secretory activity both *in vivo* and *in vitro* (Lippes and Wagh, 1989; Quintero et al., 2005). Following on from this, the **second objective** was to determine the effects of the incubation of media conditioned by OECs and LLC-PK1 cells on different functional sperm parameters over 24 hours.

Previous reports have demonstrated no effect of ovarian stages on the ability of OECs to affect sperm function. To elucidate whether or not there are differences between follicular and luteal stages in cultured OECs, **the third objective** was to investigate the changes in the expression of four relevant genes – clusterin (*CLU*), heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (*HSP90AA1*), heat shock cognate protein related 70 kDa (*HSPA8*), and glucose regulated protein 78 kDa (*HSPA5*) – previously identified in solubilised apical plasma membrane

extracts (sAPM) from OEC (Sostaric et al., 2006; Elliot et al., personal communication), in primary *in vitro* OEC culturing.

As other reports have shown, sperm function is modulated by direct contact with OECs and by proteins secreted within oviductal fluid (McCauley et al., 2003; Zhang et al., 2006; Lachance et al., 2007). However, since there are few reports documenting the effect of the presence of spermatozoa on OEC function (Fazeli et al., 2004; Georgiou et al., 2005; Sostaric et al., 2006; Kodithuwakku et al., 2007), **the fourth objective** was to determine how spermatozoa influence the expression of these four genes in OECs after homologous co-culturing over a 24 hour period.

RNA interference is a powerful technique with which to study gene function. The **fifth objective** of this chapter was to optimise this method in primary OEC culturing by using chemical transfection and *in vitro* electroporation and different small interfering double stranded RNAs (siRNAs). Finally, as heat shock protein 90 kDa alpha A.1 is upregulated by the presence of spermatozoa in co-culturing, and it has been identified as a protein in solubilised apical plasma membrane extracts, which prolong sperm survival in pigs (Fazeli et al., 2003), **the sixth objective** was to determine the effects on sperm viability of the silencing of gene encoding for this protein in cultured OECs.

# Chapter IV Spermatozoa and OEC

---

## 3 Material and methods

### 3.1 Culture methods

3.1.1 Culture media

3.1.2 Primary OEC culture (Article 4)

3.1.3 Primary OEC culture (Articles 5 and 6)

3.1.4 Indirect immunocytochemistry of OECs to check their epithelial nature

3.1.5 LLC-PK1 culture

3.1.6 Trypsinisation of OECs and LLC-PK1

3.1.7 Cryopreservation of OECs

### 3.2 Co-culture and co-incubation methods

3.2.1 Co-culture medium

3.2.2 Sperm preparation: Percoll washing

3.2.3 Co-culture with spermatozoa

3.2.4 Incubation of sperm with cell-conditioned medium

### 3.3 DNA and RNA techniques

3.3.1 DNA extraction

3.3.2 RNA extraction

3.3.3 Primers design for PCR

3.3.4 Reverse transcription (RT)

3.3.5 Polymerase chain reaction (PCR)

3.3.6 Agarose gel electrophoresis

3.3.7 Purification of PCR products

3.3.8 Sequencing PCR products



- 3.4 *In vitro* effects of OEC co-culture and cell-CM medium on boar spermatozoa
  - 3.4.1 Boars and sperm samples
  - 3.4.2 Experimental design
  - 3.4.3 Statistical analyses
- 3.5 *In vitro* effects of spermatozoa on the gene expression of OEC
  - 3.5.1 Boars and sperm samples
  - 3.5.2 Experimental design
  - 3.5.3 Statistical analyses
- 3.6 Effects of *HSP90AA1*-silencing in oviductal epithelial porcine using siRNA on sperm viability after *in vitro* co-culture
  - 3.6.1 Boars and sperm samples
  - 3.6.2 RNAi medium
  - 3.6.3 Small interfering RNAs (siRNAs)
  - 3.6.4 HSP90AA1 immunostaining
  - 3.6.5 Optimising of *ACTB* and *HSP90AA1* -siRNAs delivery
  - 3.6.6 Experimental design
  - 3.6.7 Statistical analyses

---

## 3 Material and methods

---

### 3.1 Culture methods

#### 3.1.1 Culture media

##### *3.1.1.1 Culture medium for oviductal epithelial cells (OECs)*

Porcine oviductal epithelial cells were cultured in tissue culture medium 199 (TCM199; Earle's; L-glutamine; N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes) 25 mM and L-aminoacids; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated foetal calf serum (FCS; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), 1% penicillin G, streptomycin and 0.5% fungizone amphotericin B (Gibco). The culture medium was filtered with 0.2 µm filters (Pall-Gelman Laboratory, Ann Arbor, USA) and stored at 4°C.

##### *3.1.1.2 Culture medium for pig kidney epithelial cells (LLC-PK1)*

Pig kidney epithelial cells (LLC-PK1; American Tissue Type Culture Collection (ATCC)-LGC Promochem, UK) were used as a positive control in the culture experiments of Articles 4 and 5. The growth medium for these cells consisted of TCM199 (Earle's; L-glutamine; Hepes 25 mM and L-aminoacids; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) supplemented with 3% (v/v) heat inactivated FCS (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), 1% penicillin G, streptomycin and 0.5% fungizone amphotericin B (Gibco). The culture medium was filtered with 0.2 µm filters (Pall-Gelman Laboratory) and stored at 4°C.

#### 3.1.2 Primary OEC culture (Article 4)

In Article 4, OEC culture was set following the procedure described by Ouhibi and co-workers (1989, 1991) and modified by Romar and her colleagues (2003), without

distinguishing between either the oviductal region (isthmus and ampulla) or the ovarian state (follicular and luteal), because previous studies showed that the ovarian state and the oviductal region do not influence the ability of OECs to effect boar sperm function (Suárez et al., 1991; Petrunkina et al., 2001c; Fazeli et al., 2003). Oviducts were obtained from cycling gilts, their age being between 8 and 9 months old, immediately after slaughter at a local abattoir and transported back to the laboratory in serum.

In the laboratory, the oviducts were rinsed once with 0.04% cetrimide in serum and twice with Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; Gibco) supplemented with 4 mg·ml<sup>-1</sup> PVA (warmed to 37°C) and transferred to a Petri dish (of 150 mm in diameter) under sterile conditions (Nange Nunc, LabClinics, Barcelona, Spain). Maintaining sterile conditions, the oviducts were trimmed of surrounding connective tissue and then oriented using tweezers from the isthmus to the ampulla. Later, the oviducts were closed at one end with a knot, filled with a trypsin-EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) solution, closed at the other end and incubated in a Heracell<sup>®</sup> 150 incubator (Heraeus<sup>®</sup>, Germany) at 37.5°C in 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub> for 45 minutes.

After incubation, trypsinised cells were collected into a Petri dish containing 10-15 ml of pre-equilibrated OEC culture medium by applying pressure along the length of the oviduct. Cell clusters were separated by pipetting gently and repeatedly. Cell suspensions were then centrifuged at 100×*g* for 4 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in pre-equilibrated OEC culture medium. Samples were centrifuged again at 100×*g* for 4 min. Cell concentration was then estimated by using a Neubauer hemocytometer (Brand, Wertheim, Germany) under a Zeiss Axiovert 25 Inverted Microscope for Phase Contrast (Zeiss), diluting if necessary prior to counting. Calculations were made to obtain a suspension with 10<sup>6</sup> cells·ml<sup>-1</sup>. After this, 50 µl of the cell suspension was seeded into Petri dishes, individual wells of either a 24-well plate or a 4-well chamber slide (Nange Nunc) containing fresh pre-equilibrated OEC culture medium. Petri dishes, 24-well plates and 4-well chamber slides were incubated at 37.5°C in 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub>, until confluence was reached (typically after 6-7 days).

The culture medium was replaced every 48 hours. These cultures, without passages, were used for co-culture and cell-conditioned media experiments (Article 4).

### 3.1.3 Primary OEC culture (Articles 5 and 6)

In Articles 5 and 6, OECs were cultured using the method described by Fazeli (1999). Oviducts with ovaries were collected at a local abattoir from cycling gilts, aged between 8 and 10 months old, and the follicular oviducts separated from the luteals. They were then washed with PBS (Gibco), stored at room temperature (about 22°C) and transported to the laboratory in serum at 27-30°C within 2-3 hours post-mortem. After that, the oviducts were trimmed from the ovaries, and the connective tissue separated, flushed and washed with PBS lacking calcium and magnesium (PBS – CaCl<sub>2</sub> – MgCl<sub>2</sub>; Gibco). The oviducts were then filled with collagenase (Sigma-Aldrich®) 0.25% (w/v) in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Life Technologies, Paisley, UK) and the extremes closed on a Petri plate 150 mm in diameter (Nange Nunc International, Naperville, Illinois, USA) and incubated at 37.5°C and CO<sub>2</sub> for 2 hours using a Heracell® 150 incubator (Heraeus®, Germany).

The oviducts were milked, and the cells recovered, washed and centrifuged three times (for 5 minutes at 100×g and 20°C, each time), and the pellet resuspended twice with 2 ml of red blood cell lysing buffer (Sigma-Aldrich®) to remove blood cells, and once with HBSS (10×). Finally, the cells were resuspended in growth medium (TCM199 supplemented with 10% FCS, 1% Penicilline/Streptomycine and 0.5% fungicide). Cell concentration was determined using a Neubauer hemocytometer (Brand) under an Axiovert 25 Inverted Microscope for Phase Contrast (Zeiss). The cells were seeded at 10<sup>6</sup> cels·ml<sup>-1</sup> into flasks, individual wells of either a 24-well plate or 6-well plate, or a 4-well chamber slide (Nalge Nunc) and cultured at 37.5°C and 5%CO<sub>2</sub> until confluence (after about 7 days).

The culture medium was refreshed every 48 hours.

### 3.1.4 Indirect immunocytochemistry of OECs to check their epithelial nature

The epithelial cell nature of the OECs was determined by immunocytochemistry using a cytokeratin primary antibody. Cytokeratins are protein components of the intermediate filaments of the cytoskeleton and their expression is a characteristic of epithelial cells (Lehtonen et al., 1985; Steinert et al., 1988; Dobrinski et al., 1999).

Oviductal cultures grown for 20 hours in 24-well culture dishes were fixed at 4°C in 3% formaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) and 60 mM saccharose (Merck) in 0.1 M PBS (Gibco) for 30 minutes. After this, the cells were washed three times with 10 mM PBS and

permeabilised for 10 minutes in a solution of 10 mM PBS containing 0.1% Tris X-100. Following another 10 mM PBS wash (5 minutes), the cells were incubated for 10 minutes in a blocking solution (10 mM PBS supplemented with 20 mM glycine (Serva, Innogenetics, Gent, Belgium) and 1% BSA (Merck)).

The cells were then incubated with a mouse monoclonal anti-cytokeratin pan antibody recognizing cytokeratins 4, 5, 6, 8, 10, 13 and 18 (1:20 dilution; Chemicon, Pacisa-Giralt, Barcelona, Spain) for 45 minutes at 37°C, rinsed twice in PBS for 10 minutes and incubated with a rabbit anti-mouse IgG FITC-conjugated secondary antibody (1:50 dilution; Dako Diagnostics SA, Barcelona, Spain) for 30 minutes at 37°C. After washing twice for 10 minutes in PBS, the nuclei of the cells were counter-stained with 5 µM bisbenzimidazole (Hoechst 33258) for 7 minutes. Finally, the cells were mounted (mounting medium: Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, containing sodium phosphate and citric acid in glycerol), and observed under a fluorescence microscope (Leica DMR-XA, Leica, or Axio Imager.Z1, Zeiss).

A total of 200 cells were counted and classified as epithelial (positive cytokeratin immunoreactivity) or non-epithelial (absence of cytokeratin immunoreactivity).

### **3.1.5 LLC-PK1 culture**

For LLC-PK1 culturing, a cryogenic vial (Nalgene, Rochester, Minnesota, USA) containing LLC-PK1 cells and stored at -80°C was firstly thawed at 37°C for 2 minutes by gentle agitation. The outside of the cryogenic vial (Nalgene) was then cleaned with ethanol 70%, to prevent possible contamination and centrifuged for 7 minutes at 100×g.

The supernatant was discarded and the pellet resuspended with LLC-PK1 culture medium (as described above) previously equilibrated (at 37.5°C for 15-20 minutes). Cells were then seeded into 75 cm<sup>2</sup> culture flasks, 24-well plates or 4-well chamber slides (Nange Nunc) and incubated (Heracell<sup>®</sup> 150 incubator, Heraeus<sup>®</sup>, Germany) at 37.5°C in 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub> until confluence was reached.

The LLC-PK1 culture medium was refreshed every 48 hours and, prior to co-culture with sperm or incubations with cell-conditioned medium, replaced with TALP medium.

### 3.1.6 Trypsinisation of OECs and LLC-PK1

Cultured cells, both OECs and LLC-PK1, were trypsinised to preserve the LLC-PK1 line (Articles 4, 5 and 6) or to cryopreserve OECs prior to further co-cultures, DNA and RNA extraction (Articles 5 and 6) or optimisation of siRNA experiments (Article 6). With this purpose, the growth medium was removed from confluent cultures using a Pasteur pipette, and cells were then washed for one minute with pre-warmed PBS lacking  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$ . This washing sought to dispose of the remains of the culture medium, as the serum contained in it inhibits the activity of proteases (such as trypsin). Three ml per flask or 300  $\mu\text{l}$  per well of trypsin-EDTA solution (0.5 g porcine trypsin and 0.2 EDTA 4 Na/l; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) were added and the cells were incubated at 37.5°C and 5%  $\text{CO}_2$  for 30 minutes in order for the cells to be digested.

The reaction was checked every 7-8 minutes under an inverted phase contrast microscope (Axiovert 25; Zeiss). Later, 10 ml of OEC or LLC-PK1 media were added to stop the digestion. This mixture was centrifuged at  $100\times g$  and 20°C for 5 minutes. Supernatant was discarded and the pellet resuspended using culture medium or cryopreservation medium (see Section 3.1.7).

### 3.1.7 Cryopreservation of OECs

After standard trypsinisation, approximately  $10^6$  OECs were harvested for cryopreservation in freezing medium that consisted of 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) in FCS. The supernatant was discarded and the cell pellet gently resuspended with 1 ml of freezing medium (described above), and transferred to a labelled cryogenic vial (Nalgene) and frozen for 30 minutes at -20°C. After that, the cryovials containing the frozen cells were stored at -80°C.

When needed, frozen cryogenic vials of OECs and LLC-PK1 were taken from the freezer at -80°C and incubated in a water bath for 2 minutes at 37°C until thawed. The vial content was added to a tube containing 10 ml of culture medium (described above; see Section 3.1.1.1). Samples were centrifuged at  $100\times g$  and 20°C for 5 minutes and the supernatant then discarded. The pellet was resuspended with culture medium and cells were seeded into a flask containing 10 ml culture medium.

## 3.2 Co-culture and co-incubation methods

### 3.2.1 Co-culture medium

Co-cultures of sperm with either OECs or LLC-PK1 were carried out using a modified TALP medium (Parrish et al., 1988; Fazeli et al., 1999). This contained modified Tyrode's medium (2 mM CaCl<sub>2</sub>, 3.1 mM KCl, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 110 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 21.6 mM sodium lactate, 10 mM HEPES), 1 mM sodium pyruvate and 6 mg·ml<sup>-1</sup> bovine serum albumin (BSA) at pH=7.2.

### 3.2.2 Sperm preparation: Percoll washing

When co-cultured or co-incubated with OEC or LLC-PK1 conditioned media, spermatozoa had been previously isolated from the diluted semen by sedimentation through a two-step Percoll gradient (35%/70%) (Petrunkina et al., 2003).

#### 3.2.2.1 Making up the Percoll solutions

For Percoll washing, two solutions (35% Percoll-saline and 70% Percoll-saline) were required (Graham and Graham, 1990; Petrunkina et al., 2003; Satake et al., 2006). Percoll™ (a polyvinylpyrrolidone-coated silica gel particle) has a finite volume, so that when nine volumes of stock Percoll™ suspension as purchased from Pharmacia® (Pharmacia®, Barcelona, Spain) are diluted with one volume of "10x concentrated" PBS (Gibco), the resultant mixture is very hyperosmotic (approximately 360 mOsmol·Kg<sup>-1</sup>), because the PBS has not been diluted into 10 volumes, but into "10 volumes less the volume occupied by the Percoll™ particles". For this reason, the solutions used in Percoll washing had to be made up with the aid of an osmometer, following the procedure described by Vincent and Nadeau (1984).

The "10x saline-HEPES" medium was prepared in advance by mixing 8.00 g NaCl, 4.77 g HEPES, 1.80 g glucose and 2.5 ml KOH 1M. This mixture was then dissolved in 70 ml milli-Q® water and the pH adjusted to 7.4 with NaOH. After that, the solution was made up to close to 100 ml in a volumetric flask, the volume adjusted to 100 ml and the pH to 7.6. Following this, the stock solution was checked to see that when 10.8 g was diluted to 100 ml, the pH was

7.4, the density  $1.0762 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and the osmolality  $295 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . This stock solution “10x” was stored at  $-4^\circ\text{C}$  until needed.

Then, 10.8 g of “10x” stock medium were weighed via a  $0.22\text{-}\mu\text{m}$  Millipore filter (Millipore Corp.) into a 100-ml volumetric flask and made up to 100 ml with milli-Q<sup>®</sup> H<sub>2</sub>O. This solution was called “M”.

Next, 5.4 g of “10x” stock medium (that is, 5 ml) and 50.9 g undiluted Percoll<sup>™</sup> as supplied by the provider (Pharmacia) were weighed out via a  $0.22\text{-}\mu\text{m}$  Millipore filter into a 50 ml stoppered measuring cylinder, and then mixed. This solution was called “I + 9P”.

The osmolalities of undiluted Percoll<sup>™</sup> stock (called “p”, approximately  $15 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), of “M” (called “m”, approximately  $295 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) and of “I + 9P” (called “dp”, approximately  $350 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) were measured using a 1313 DR Autocal osmometer (Röbling, Berlin, Germany), and  $O_a$ ,  $R$  and  $V_p$  calculated by means of the following equations:

$$O_a = 0.1 (10m + 9p)$$

$$R = \frac{O_a - (0.1 dp)}{0.9 dp} \text{ (approximately } 0.85\text{)}$$

$$V_p = \frac{10m - 295}{R(295 - p)} \text{ (approximately } 11\text{)}$$

In this last formula,  $V_p$  represents the volume of undiluted stock Percoll<sup>™</sup> to be added to 1 volume of “10x” stock medium, so that the osmolality of the resultant mixture is  $295 \text{ mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . Fifty ml of “I+9P” and a further  $[(V_p - 9) \times 1.130 \times 5]$  g of stock Percoll<sup>™</sup> were added and mixed. At the end of this step, a final and iso-osmotic Percoll-saline mix of 1: $V_p$  was obtained. After checking the osmolality, this solution was considered as 100% Percoll-saline. To obtain the solutions used in the washing procedure (35% Percoll-saline and 70% Percoll-saline), the 100% Percoll-saline solution was divided into two 50 ml measuring cylinders, so that the relationship between volumes were 2:1 (v/v) (approximately 42 ml and 21 ml). These volumes were noted as V and 2V, respectively, and then “M” solution and  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanamycin (Gibco, Invitrogen Corp., Spain) were added to each cylinder; kanamycin was added because Percoll-solutions can easily become contaminated. After this step, the final volumes in both 50-ml cylinders were the same (i.e.  $2V \times 100/70$  for 70% Percoll-saline,



and  $V \times 100/35$  for 35% Percoll-saline). Both solutions were mixed thoroughly and stored at 2°C.

### *3.2.2.2 Washing procedure*

Firstly, 35% Percoll-saline and 70% Percoll-saline solutions were incubated at room temperature for 30 minutes.

In a conical-bottomed glass tube (approximately 100×16 mm), 2 ml of 35% Percoll-saline were layered over the same volume of 70% Percoll-saline. Then, 7 ml of diluted sperm were layered on top. Samples were subsequently centrifuged at room temperature and  $200 \times g_{max}$  for 15 minutes, using a swing-out rotor. After that, the centrifuge was slowly accelerated up to  $1000 \times g_{max}$ , to avoid disturbing the layers. When this speed was reached, samples were centrifuged for a further 15 minutes. Finally, the supernatant was carefully discarded by aspiration, leaving the loose sperm pellet in 0.5 ml of fluid. The sperm was resuspended by agitation in this residual volume. These preparations (final concentration being approximately  $4 \times 10^8$  spermatozoa·ml<sup>-1</sup>) presented a sperm viability higher than 90%; they were kept at room temperature protected from draughts and used within two hours of Percoll washing.

### **3.2.3. Co-culture with spermatozoa**

Washed sperm using Percoll gradient were diluted to  $1.87 \times 10^6$  spermatozoa·ml<sup>-1</sup> in TALP medium, using a Neubauer hemocytometer (Brand). Culture media were removed from 7-8 day old OEC and LLC-PK1 cultures in 24-well plates or 4-well chamber slides and cells were washed with 1 ml D-PBS lacking Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> (D-PBS – CaCl<sub>2</sub> – MgCl<sub>2</sub>; Gibco). After washing, 1 ml of washed spermatozoa in TALP medium was added to each well, and 1 ml of washed spermatozoa in TALP was also placed into empty wells (negative controls).

Co-cultures were incubated at 37.5°C in 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub> using a Heracell<sup>®</sup> 150 incubator (Heraeus<sup>®</sup>, Germany). At the relevant times, the TALP medium was removed from the co-cultures and negative controls. The functional parameters of the spermatozoa that bound to or remained unbound from the cells in the negative controls were then assessed (Articles 4 and 6), or RNA from the OECs and LLC-PK1 was extracted (Article 5), the co-cultures having been previously washed with 1 ml D-PBS – CaCl<sub>2</sub> – MgCl<sub>2</sub>.

### 3.2.4 Incubation of sperm with cell-conditioned medium

Culture media were removed from confluent OEC and LLC-PK1 cultures and replaced with TALP medium. After 48 hours of incubation, the media conditioned by OECs and LLC-PK1 (OEC-CM and LLC-PK1-CM, respectively) were collected.

Percoll-washed spermatozoa were then resuspended in either OEC-CM, LLC-PK1-CM or unconditioned medium (negative controls) to a final concentration of  $1.87 \times 10^6$  sperm cells·ml<sup>-1</sup>, placed into 24-well plates or 4-well chamber slides and incubated at 37.5°C in 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. At the relevant time points, sperm functional parameters were assessed.

## 3.3. DNA and RNA techniques

### 3.3.1. DNA extraction

Cells saved from routine subculture after trypsinisation were centrifuged at  $100 \times g$  for 5 minutes at 20°C. Next, 250 ml of the remaining supernatant were used to thoroughly resuspend the pellet. Samples were then transferred to a nucleic acid free tube (Ambion Inc.) and stored at -20°C until use. Genomic DNA (gDNA) was extracted using Puregene<sup>TM</sup> DNA Isolation Kit (Gentra<sup>®</sup> systems, Minnesota, USA), following the protocol for tissue culture cells.

Samples destined for DNA extraction were taken from the freezer and spun down by a centrifugation pulse using, like all further centrifugations mentioned in this Section, an Eppendorf<sup>®</sup> microcentrifuge (model 5424; Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The supernatant was removed by decantation and vortexed for 20 seconds. Three µl of pre-warmed cell lysis solution (Gentra<sup>®</sup> systems) were added to each sample and then the samples were thoroughly mixed and heated on a plate for 10 min at 37°C. After that, 1 µl of RNasin solution (Gentra<sup>®</sup> systems) was added to each sample, mixed by vortexing for 20 seconds and heated on a plate for 5 minutes at 37°C. Samples were vortexed again and 100 µl of protein precipitation solution (Gentra<sup>®</sup> systems) were added, followed by a centrifugation step for 1 minute at 13000 rpm. The pellet was checked if it was tight enough; if not, 100 µl of protein precipitation solution was again added, and another centrifugation step performed.

The pellet was discarded and the supernatant transferred to a new tube containing 300 µl of 100% isopropanol, and then this was gently mixed for 20 minutes. Another centrifugation

step (for 1 minute at 13000 rpm) was carried out, removing the supernatant by decantation and resuspending the pellet with 300  $\mu\text{l}$  of ethanol 70%. Samples were centrifuged for 1 minute at 13000 rpm, the supernatant discarded and a waiting period of 10 minutes allowed until the ethanol had evaporated. Finally, 100  $\mu\text{l}$  of milli-Q<sup>®</sup> water was added and the samples were incubated at room temperature for 3 hours

After extraction, DNA concentration was determined using quartz cuvettes (Hellma, Müllheim, Germany) and a spectrophotometer (GENESYS<sup>™</sup> 10 UV/Vis Spectrophotometer, Thermo Spectronics, UK) at wavelengths of 260 nm and 280 nm. It was calculated that DNA concentration in  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  is equal to  $\text{Abs}_{260}\times 50\times\text{dilution factor}$ , assuming that 1  $\text{UAbs}_{260}$  is 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (or 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) (Sambrook et al., 1989), as follows:

$$[DNA] = (\text{Abs}_{260})(50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1})(\text{dilution factor})$$

### 3.3.2 RNA extraction

Cells saved from routine subculture after trypsinisation were centrifuged at  $100\times g$  for 5 minutes at 20°C. The supernatant was discarded and the pellet washed in PBS. Samples were then centrifuged at  $100\times g$  for 5 minutes at room temperature. Supernatant was discarded and 250  $\mu\text{l}$  of RNeasy<sup>®</sup> (RNA stabilisation solution; Ambion Inc., Austin, Texas, USA) added to resuspend the pellet. Finally, the content was transferred to a nucleic acid-free tube (Ambion Inc.) and samples were stored at -20°C until extraction.

The extraction of total genomic RNA (gRNA) was carried out using RNeasy<sup>®</sup>-4PCR kit (DNA-free RNA isolation for RT-PCR; Ambion Inc.). To extract RNA, each sample was thawed from -20°C (prepared as described above) to room temperature and 250  $\mu\text{l}$  of PBS lacking  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  added, to remove the RNeasy<sup>®</sup> solution. Previously, 70  $\mu\text{l}$  of Elution Solution per sample had been heated to 75°C on a heat plate. After that, a centrifuge pulse at 13000 rpm (Eppendorf<sup>®</sup> microcentrifuge model 5424) had been used, and the supernatant then discarded by decantation. Cell pellets were lysed by adding 500  $\mu\text{l}$  of guanidinium thiocyanate containing Lysis/Binding solution (Ambion Inc.). Cell lysates were mixed thoroughly by pipeting. Next, 500  $\mu\text{l}$  of ethanol solution 64% were added and the sample mixed gently but thoroughly by inverting the tube several times.

The lysate/ethanol 64% mixture was applied to a spin column (Ambion Inc.), which contains a silica-based filter that selectively and quantitatively bind separate RNA species,

including mRNA. The spin column containing the mixture was centrifuged at 13000 rpm for 1 minute. As RNA was retained in the filter, the volume contained in the collection tube was removed. After that, 700  $\mu\text{l}$  of Wash Solution #1 (Ambion Inc.) were placed upon the filter and another centrifugation (for 1 minute at 13000 rpm) was carried out. The volume contained in the collection tube was again discarded and 500  $\mu\text{l}$  of Wash Solution # 2/3 (Ambion Inc.) subsequently added to the filter cartridge. Samples were centrifuged at 13000 rpm for 1 minute. This step was performed twice, and then another centrifugation was carried out without any reagent being added to the filter cartridge.

The collection tube was subsequently replaced by a new tube and 30  $\mu\text{l}$  of Elution solution, previously heated, were gently deposited in the centre of the filter. This was followed by a centrifugation step of 1 minute at 13000 rpm. Thirty  $\mu\text{l}$  of Elution solution were again deposited in the centre of the filter and this was again centrifuged at 13000 rpm for 1 minute. After that, the filter cartridge was discarded and one  $\mu\text{l}$  of DNase 1 enzyme was added, and the sample spun by means of a centrifugation pulse. Six  $\mu\text{l}$  of DNase 1 buffer were then added and samples incubated for 1 hour at 37°C, to develop DNA-digestion. The reaction was stopped by adding 6  $\mu\text{l}$  of DNase inactivation reagent and incubating it for 2 minutes at room temperature. Next, samples were centrifuged for 1 minute at 10000 rpm. The RNA-containing supernatant was pipetted, transferred to a new nucleic acid-free tube and stored at -20°C until required.

After extraction, the amount of RNA and its purity was determined by spectroscopy (GENESYS™ 10 UV/Vis Spectrophotometer) at wavelengths of 260 nm and 280 nm. Absorbances were measured using RNase-free cuvettes (previously washed with 0.1M NaOH, 1mM EDTA and RNase-free water; Promega UK, Southampton, UK).

Afterwards, RNA concentration ( $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) was estimated according to the following mathematical formula, assuming that 1  $\text{UAbs}_{260}$  is 40  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (or 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

$$[RNA] = (\text{Abs}_{260})(40 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1})(\text{dilution factor})$$

The purity of the RNA was estimated by forming the quotient of the absorbances at 260 nm and 280 nm ( $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ ). The RNA extracted was only used when this ratio was higher than 1.8 and the absorbance reading higher than 0.15.

### 3.3.3 Primers design for PCR

Coding DNA Sequences (CDS) were obtained from Genbank (Entrez Nucleotide database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Gene sequences for pigs (*Sus scrofa*), humans (*Homo sapiens*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*) were searched, and their alignment carried out using ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw.htm>). The primer design took also into account the following three criteria:

- That the percentage of G/C was higher than 50%.
- That the length (N) of the primer was about 20 nucleotide bases.
- That the annealing temperature ( $T_m$ ) was between 55°C and 65°C. This temperature was calculated by the following mathematical formula:

$$T_m = 64.9 + [(0.41)(\% G + C)] - \frac{600}{N}$$

This equation assumes that the annealing occurs under standard conditions of 50 nM primer, 50 nM Na<sup>+</sup>, and pH 7. For each CDS, two primers were designed, forward and reverse (Tables IV-1, and A5-1 and A6-1). Primer pairs were ordered from MWG Biotech AG (UK) and diluted in accordance with the manufacturer's information to a working solution of 50 pmol·μl<sup>-1</sup>.

### 3.3.4 Reverse transcription (RT)

Copy DNA (cDNA) was produced by the Reverse Transcription System kit (Promega; Madison, USA). This kit produces first strand cDNA by reverse transcription of mRNA using Avian Myeloblastosis Virus reverse transcriptase (AMV-RT) and oligo-dT primers. Prior to preparing the master mix (4 μl MgCl<sub>2</sub>, 2 μl buffer, 2 μl dNTPs, 0.5 μl recombinant RNase inhibitor<sup>®</sup> and 0.5 μl Oligo-dT (500 μg·ml<sup>-1</sup>)), the concentration of RNA-extracted samples was determined. Since the final RNA amount for RT reaction had to be 800 ng, the μl needed for a given concentration of RNA-extracted sample was estimated. The volume of nuclease-free water (Promega) that was added was up to 20 μl of the final volume.

In a PCR tube containing extracted RNA, the master mix was added as well as 0.6 μl of Reverse Transcriptase enzyme (AMV-RT; 25 U·μl<sup>-1</sup>). For each RNA sample in an experiment,

a parallel reaction excluding Reverse Transcriptase enzyme was set up to screen for contaminating gDNA. For each reverse transcription experiment a negative control, consisting of a reaction without any DNase-treated total RNA, was also set up.

Reverse transcription reactions were developed for 2 hours at 42°C to produce cDNA by using a GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Following RT, the cDNA template was diluted to 100 µl by adding 80 µl of nuclease-free water (Promega). The cDNA was stored at 4°C.

The concentration of cDNA was determined using quartz cuvettes (Hellma, Müllheim, Germany) and a spectrophotometer (GENESYS™ 10 UV/Vis Spectrophotometer, Thermo Spectronics, UK) at wavelengths of 260 nm and 280 nm, applying the following formula and assuming that 1 UAbs<sub>260</sub> is 33 µg·ml<sup>-1</sup> (Sambrook et al., 1989).

$$[cDNA] = (Abs_{260})(33 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1})(\text{dilution factor})$$

### 3.3.5 Polymerase chain reaction (PCR)

The polymerase chain reaction was carried out by means of specific primers (designed as described previously), using a GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler. Reaction mixtures (final volume: 50 µl) contained 200 ng·µl<sup>-1</sup> of DNA template or 10 µl of cDNA, 5 µl of X10 NH<sub>4</sub> (no Mg<sup>2+</sup>) buffer, 1.5 µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 µl of 100 mM total dNTPs, 0.5 µl (50 pmol·µl<sup>-1</sup>) of forward primer, 0.5 µl (50 pmol·µl<sup>-1</sup>) of reverse primer and 0.5 U BioTAQ DNA polymerase (5 U·µl<sup>-1</sup>). All these reagents, except the primers, were provided by Bioline® (London, UK).

The PCR program consists of a DNA denaturation step at 95°C for 5 minutes prior to performance of the amplification cycles. These cycles consisted of three steps: denaturation (incubation at 94°C for 30 seconds), annealing (incubation at the T<sub>m</sub> of the primer for 30 seconds) and elongation (incubation for 30 seconds at 72°C). After that, there was a final extension step at 72°C for 7 minutes. The PCR products were then stored at 4°C.

The number of cycles was optimised for each gene after accomplishing saturation curves. For each probe set, three negative controls were also amplified by PCR: RT-no template, non-reverse transcribed total RNA treated with DNase I (as a control for contamination by genomic DNA) and PCR-no template, to control for any contamination of the reagents.

**Table IV-1** Sequences, annealing temperatures, and fragment sizes of the primers used

Gene	Type	Primer sequence	Amplicon size (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	Cycles number	Sequences and species used in designing the primers (EMBL accession number)
β-actin ( <i>ACTB</i> )	Forward	5'-GCCATGTACGTGGCCATCCAGGC-3'	455	63	30	AJ312183 ( <i>Sus scrofa</i> ) NM_001009784 ( <i>Ovis aries</i> ) M10277 ( <i>Homo sapiens</i> )
	Reverse	5'-CTTAGCGGTCCCCCGTGCAA-3'				
Clusterin ( <i>CLU</i> )	Forward	5'-CCTGGAGGAAGCCAAAGAAGAAG-3'	181	55	35	NM_213971 ( <i>Sus scrofa</i> ) NM_013492 ( <i>Mus musculus</i> ) NM_053021 ( <i>Rattus norvegicus</i> ) NM_001831 ( <i>Homo sapiens</i> )
	Reverse	5'-GGAGCTCTGGTTCAGGAACCTCT-3'				
Heat shock cognate protein related 70 kDa ( <i>HSPA8</i> , <i>HSC70</i> )	Forward	5'-GGACCTGCAGTTGGCATTGATCT-3'	362	60	35	NM_174345 ( <i>Bos Taurus</i> ) CX062900 ( <i>Sus scrofa</i> ) CX061052 ( <i>Sus scrofa</i> )
	Reverse	5'-TAGCCTGACCGCTGAGAGTCCGTTA-3'				
Heat shock protein 90 kDa alpha A.1 ( <i>HSP90AA1</i> )	Forward	5'-TTCAGCCTAGATGCCCGAGGAAA-3'	219	61	35	NM_213973 ( <i>Sus scrofa</i> ) U94395 ( <i>Sus scrofa</i> ) X15183 ( <i>Homo sapiens</i> )
	Reverse	5'-ATGTGCAGCTCTTTCCCGGAGTC-3'				
Glucose-regulated protein 78 kDa ( <i>HSPA5</i> , <i>GRP78</i> )	Forward	5'-GAAGGAGAAGACTTCTCCGAGAC-3'	574	59	35	DQ_029323 ( <i>Ovis aries</i> ) XM867578 ( <i>Bos taurus</i> ) NM_022310 ( <i>Mus musculus</i> ) NM_013083 ( <i>Rattus norvegicus</i> ) NM_005347 ( <i>Homo sapiens</i> )
	Reverse	5'-TGCCTGTACCTTTGTCTTCAGC-3'				

All PCR products were stored at 4°C before being processed for agarose gel electrophoresis, or purified for sequencing.

### 3.3.6 Agarose gel electrophoresis

The PCR products were analysed using agarose gel 2% (w/v). For this purpose, 2 g of agarose (Multipurpose Molecular Grade Agarose; Bioline) were diluted in 100 ml of 1× TAE buffer (TrisAcetat-EDTA; 90 mM Tris, 90 mM acetate, and 2 mM EDTA; Gibco) in an appropriately sized Duran<sup>®</sup> bottle (Schott Duran, Germany). The mixture was heated to boiling using a microwave to completely dissolve the agarose powder. Finally, 6 µl of Ethidium Bromide (10 µg·ml<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), an intercalating dye visible in ultraviolet light, were added.

Each gel was poured into a gel mould and allowed to set with a comb, to create a horizontal row of individual lanes. Next, each polymerised gel was transferred to a tank containing 1× TAE buffer. Samples were prepared by adding 6 µl of agarose gel loading dye 6× (0.09% bromophenol blue, 0.09% xylene cyanol FF, 60% Glycerol; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) to 20 µl of PCR product. Then, 20 µl of PCR product containing the loading dye were added into an individual lane in the gel and 6 µl of a 100 bp-DNA ladder (250 UG·ml<sup>-1</sup>; New England BioLabs<sup>®</sup> UK Ltd., Hitchin, Hertfordshire, UK) was also loaded into an individual lane. After running at 100 V for approximately 90 minutes, the gels were visualised under UV light and images acquired using a CCD camera and the SynGene GeneSnap software (SynGene Gene Genius system, Synoptics Ltd., Cambridge, UK).

### 3.3.7 Purification of PCR products

A QIAquick<sup>®</sup> PCR purification kit (Qiagen Ltd, Crawley, UK) was used for purifying the PCR products prior to sequencing.

Firstly, 5 volumes of PB buffer (Qiagen) were added to each sample and the mixture resuspended. It was then transferred to a spin column and centrifuged for 1 minute at 13000 rpm. The flow-through from the collection tube was discarded and 750 µl of PE buffer (Qiagen) were added. This was followed by a centrifugation step of 1 minute at 13000 rpm performed twice, with the flow-through being discarded from the collection tube. The spin column was then transferred to a new eppendorf tube and 50 µl of milli-Q<sup>®</sup> water, with a 2-



minute delay prior to a centrifugation step of 1 minute at 13000 rpm. The content of the eppendorf was the purified PCR product, which was finally checked with 2% agarose gel electrophoresis.

### **3.3.8 Sequencing PCR products**

The PCR purified products were then sequenced in both directions using the ABI BigDye<sup>®</sup> Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems Ltd., Warrington, Cheshire, UK) and the same primers ( $0.8 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) used in the PCR.

#### *3.3.8.1 First step: Big Dye<sup>®</sup> reaction*

The concentration of purified PCR products was previously assessed using a spectrophotometer (GENESYS<sup>™</sup> 10 UV/Vis Spectrophotometer).

Firstly, primers were diluted to  $0.8 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (previous working solution was at  $50 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ). After taking readings with a spectrophotometer, the PCR products were also diluted to get a concentration of  $20 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Three  $\mu\text{l}$  of either forward or reverse primer ( $0.8 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) were added to  $1 \mu\text{l}$  of PCR product (at  $20 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) in a PCR plate (MicroAmp<sup>®</sup> 96-Well Support Base, Applied Biosystems Ltd.). After that, a master mix ( $7 \mu\text{l}$ ), created by mixing  $1 \mu\text{l}$  of Big dye<sup>®</sup>,  $5 \mu\text{l}$  of Better Buffer<sup>®</sup> and  $1 \mu\text{l}$  of nuclease-free water, was added. The reaction was developed in a GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) under the following conditions: one step of 3 minutes at  $96^\circ\text{C}$ , 30 cycles (15 seconds at  $96^\circ\text{C}$ , 10 seconds at  $50^\circ\text{C}$  and 4 minutes at  $60^\circ\text{C}$ ) and a last step of 5 minutes at  $60^\circ\text{C}$ .

#### *3.3.8.2 Second step: Cleanup of sequencing reaction products*

Products from the sequencing reaction were cleaned by centrifuging the samples at  $100\times g$  for 60 seconds. Five  $\mu\text{l}$  of EDTA 125 mM and then  $60 \mu\text{l}$  of 100% ethanol were added to each well. The plate was then sealed and inverted 4 times prior to incubation for 5 minutes at room temperature. The PCR plate was spun at  $3000\times g$  for 30 minutes at  $4^\circ\text{C}$  using a refrigerated Eppendorf<sup>®</sup> centrifuge (model 5810 R). The adhesive plate sealer was subsequently removed and the plate inverted on a tissue paper. Following that, a centrifugation step of  $100\times g$  for 1

minute at 4°C was carried out, with 60 µl of 70% ethanol being subsequently added to each well. The PCR plate was again sealed and centrifuged at 1650×g for 15 minutes at 4°C. The adhesive plate sealer was again removed and the plate inverted on a tissue paper. Another centrifugation step of 100×g for 1 minute at 4°C, with the plate inverted, was carried out.

Finally, incubation at 55°C for 2 minutes was performed in order to evaporate any remaining ethanol. The pellet was stored frozen (-20°C), ready for readings to be taken in the sequencer.

#### *3.3.8.3. Third step: Loading samples into sequencer*

The plate containing the frozen pellets was taken from the freezer and resuspended with 10 µl of Formamide (Applied Biosystems). A denaturation step was carried out by incubation at 95°C for 2 minutes. The plate was then put on ice (snap cool) prior to loading in the Abi Prism<sup>®</sup> 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems). Files provided were analysed using Sequencher<sup>™</sup> 4.1 software for Apple<sup>®</sup> Macintosh (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan, USA).

### **3.4 *In vitro* effects of oviductal epithelial cell co-culture and cell-conditioned medium on boar spermatozoa**

#### **3.4.1 Boars and sperm samples**

Sperm samples used in Article 4 were collected using the gloved hand technique (Hancock and Howell, 1959) from eleven healthy and sexually mature Piétrain boars, which served as biological replicates for all experiments. Each ejaculate came from one boar. These boars were housed in climate-controlled buildings (relative humidity and temperature) and fed an adjusted commercial diet (2.3 Kg per day). Their age (mean ± SEM) was 20.7 ± 0.8 months and their average weight was 162.7 ± 4.2 Kg. The rate of semen collection was twice-weekly, with three-day intervals between collections. No fertility problems in the boars were recorded by the AI station.

After collection, sperm rich fractions were filtered through gauze and subsequently diluted to 1:9 (v/v) in a BTS-based extender (Cidoso, TecnoVit; Johnson et al., 1988). Semen

diluted samples were packaged in doses of 80 ml and cooled at 15°C. Finally, the cooled doses were transported to the laboratory at 15°C and used within 24 hours after collection.

### **3.4.2 Experimental design**

On arrival, sperm viability (using both the SYBR-14/EthD-1 and the triple stain techniques), capacitation status, motility, concentration and morphology were assessed. Following this, the semen was washed through a two-step gradient of 35 and 70% iso-osmotic Percoll-saline (Vincent and Nadeau, 1984; Petrunkina et al., 2003). After removal of the supernatant, the remaining sperm pellet was resuspended in about 0.5 ml of residual 70% Percoll (see Section 3.2.2).

Oviductal epithelial cells (see Section 3.1.2) and LLC-PK1 (see Section 3.1.5) were cultured and indirect immunocytochemistry was performed to check that the epithelial nature of the OECs was set up (see Section 3.1.4). When confluent cultures were obtained, two experiments with washed spermatozoa were performed.

The first experiment (see Section 3.2.3) investigated the effects of OEC co-culture with spermatozoa on the functional parameters of bound (viability, motility and capacitation status) and unbound cells (viability, acrosome and mitochondrial sheath integrity, motility and capacitation status) over 24 hours. The evaluation of sperm parameters was carried out after 5, 30, 60, 90, 120, 180 minutes and 24 hours of co-culturing.

The second experiment assessed the effect of OEC-CM (see Section 3.2.4) on sperm quality and capacitation over 24 hours. Sperm evaluation was also carried out after 5, 30, 60, 90, 120, 180 minutes and 24 hours of incubation with CM.

In both experiments TALP medium was used as co-culture medium (see Section 3.2.1), LLC-PK1 was used as a positive control and TALP medium with washed spermatozoa but without epithelial cells as a negative control.

### **3.4.3 Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2003 (Microsoft<sup>®</sup> Corp.) and SPSS<sup>®</sup> for Windows<sup>®</sup> software (SPSS Inc., Version 13.0). Firstly, the data from the sperm parameters assessment obtained after the arrival of the samples were compared among boars using either a one-way ANOVA or a Kruskal-Wallis test when after transformation the

distribution of the variable was non-normal. No significant differences ( $P>0.05$ ) were observed among the boars.

Next, the data obtained from the analysis of all sperm parameters in co-culture and incubation with cell-CM experiments were tested for normality and homoscedasticity, using the Kolmogorov–Smirnov and Levene's tests. When necessary, the data were transformed using  $\arcsin \sqrt{x}$  prior to a repeated measures ANOVA, where the incubation time (5, 30, 60, 90, 120, 180 minutes and 24 hours) was the intra-subject factor, the treatment (OECs, LLC-PK1 and a negative control) was the inter-subject factor and each sperm functional parameter was the dependent variable. One-way ANOVA and a post hoc Tukey test were also used to examine the effects of treatment or incubation time on sperm function. A Student's t-test with Bonferroni correction was also used to compare LLC-PK1 and a negative control with OECs. The level of significance was defined as  $P<0.05$ .

### **3.5 *In vitro* effects of spermatozoa on the gene expression of oviductal epithelial cells**

#### **3.5.1 Boars and sperm samples**

Semen samples used in the fifth Article were collected using the gloved-hand technique and mounting on a dummy sow (Hancock and Howell, 1959), and came from eleven healthy and post-pubertal Piétrain boars, which served as biological replicates for all experiments. The age of these boars (mean  $\pm$  SEM) was  $20.9 \pm 0.9$  months and their average weight was  $161.5 \pm 4.0$  Kg. They were housed under stable conditions in climate-controlled buildings (relative humidity and temperature), and fed an adjusted commercial diet (2.2 Kg per day). The rate of semen extraction was twice-weekly, with an interval of three days between successive collections. No fertility problems in the boars were recorded by the AI station.

After collection, sperm rich fractions were filtered through gauze and subsequently diluted 1:9 (v/v) in a BTS-based extender (Cidoso, TecnoVit; Johnson et al., 1988). Sperm diluted samples were packaged in doses of 80 ml, cooled at 15°C and transported at the same temperature (via Royal Mail Special Delivery, arriving the day after semen collection) from the commercial artificial insemination station (JSR Healthbred Ltd.; Thorpe Willoughby, Yorkshire, UK) to the laboratory. Semen samples were used within 24 hours after extraction.

### 3.5.2 Experimental design

This study consisted of two experiments. The first studied the expression of the following genes: clusterin (*CLU*), *HSP90AA1*, *HSPA8* and *HSPA5* in primary OEC and LLC-PK1 cultures, comparing in particular follicular and luteal ovarian states. The second tested the effect of spermatozoa on the expression of those genes by OECs and LLC-PK1 after co-culture. For these purposes, OECs (see Section 3.1.3) and LLC-PK1 (see Section 3.1.5) were cultured in 6-well plates, until confluency, and indirect immunocytochemistry for checking the epithelial nature of OECs was assessed (see Section 3.1.4).

To compare the expression of *CLU*, *HSP90AA1*, *HSPA8* and *HSPA5* (first experiment), two-day-old follicular and luteal OEC and LLC-PK1 cultures were trypsinised. The RNA was then extracted (see Section 3.3.2) and a RT-PCR (see Sections 3.3.4 and 3.3.5) using designed primers performed (Section 3.3.3). Furthermore, the PCR products were purified and sequenced (see Sections 3.3.7 and 3.3.8).

For the second experiment, sperm viability (using the triple stain technique; see Chapter II, Section 1.2), motility, concentration and morphology were assessed when the semen samples arrived. Prior to co-cultures, the spermatozoa were isolated from the diluted semen by sedimentation through a two-step Percoll gradient (see Section 3.2.2). After removal of the supernatant, the remaining sperm pellet was resuspended in about 0.5 ml of residual 70% Percoll. Spermatozoa (final concentration of  $1.87 \times 10^6$  spermatozoa·ml<sup>-1</sup>) were co-cultured (see Section 3.2.3) with confluent follicular or luteal OEC, or with LLC-PK1, in TALP medium. The co-cultures were incubated at 37.5°C in 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. At the relevant time points (0, 3, 6, 12 and 24 hours), the TALP medium was removed from the co-cultures (follicular OECs, luteal OECs and LLC-PK1) and the wells washed with 1 ml D-PBS lacking Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. After that, the cultured cells were trypsinised and the RNA extracted. Negative controls consisted of adding 1 ml of washed spermatozoa in TALP (final concentration of  $1.87 \times 10^6$  spermatozoa·ml<sup>-1</sup>) to follicular or luteal OEC or LLC-PK1 confluent cultures, just before each relevant time point, followed by trypsinisation and RNA extraction. After this step, RT (see Section 3.3.4) and conventional PCR using designed primers (see Sections 3.3.3 and 3.3.5) were carried out prior to analysing the PCR products by means of agarose gel electrophoresis (see Section 3.3.6).

### 3.5.3 Statistical analyses

Data (x) from mRNA relative abundances (each replicate was considered as a case; n=11) were analysed using SPSS<sup>®</sup> 14.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Transcript relative amounts were tested for normality (Kolmogorov–Smirnov test) and for equal variance (Levene’s test) before employing parametric or non-parametric statistics. When necessary (as in cases of non-normal data), arcsin  $\sqrt{x}$  transformation was carried out prior to analysis to stabilise error variance. Parametric statistics were used for variables with normal distribution and consisted of one-way ANOVA for repeated measures, where the incubation time was the intra-subject factor, the type of cultured cells (OEC follicular, OEC luteal, LLC-PK1 and negative control) the inter-subject factor and each mRNA relative abundance was the dependent variable. This was followed by multiple pairwise comparisons using a Tukey test.

For non-normal data, the Friedman test was used as a non-parametric alternative to repeated measures ANOVA followed by the Wilcoxon test for multiple pairwise comparisons. Additionally, types of cultured cells were compared for the same period of time using chi-square or a Student’s t-test with Bonferroni correction.

In all statistical analyses, the significant level was set at 5%.

## 3.6 Effects of *HSP90AA1*-silencing in oviductal epithelial porcine using siRNA on sperm viability after in vitro co-culture

### 3.6.1 Boars and sperm samples

Sperm samples used in Article 6 were obtained from nine healthy and post-pubertal Piétrain boars, which served as biological replicates for all experiments. These samples were collected by using the gloved-hand method and mounting on a dummy sow (Hancock and Howell, 1959). The age of the boars (mean  $\pm$  SEM) was  $21.2 \pm 0.9$  months and their average weight was  $162.0 \pm 4.1$  Kg. Boars were housed under stable conditions in climate-controlled buildings (relative humidity and temperature) and were fed an adjusted commercial diet (2.2 Kg per day). The rate of semen collection was twice-weekly, with an interval of three days between extractions. No fertility problems in the boars were recorded by the AI station.

After collection, sperm rich fractions were filtered through gauze and subsequently diluted to 1:9 (v/v) in a BTS-based extender (Cidosa, TecnoVit; Johnson et al., 1988).

Extended semen was split up into doses of 80 ml and cooled to 15°C. These seminal doses were subsequently transported to the laboratory at 15°C and used within 24 hours after collection.

### 3.6.2 RNAi medium

RNA interference (RNAi) experiments were carried out in OptiMEM<sup>®</sup> I media (Gibco) supplemented with different concentrations of FCS (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) in chemical transfection and siPORT<sup>™</sup> siRNA Electroporation Buffer (Ambion Inc.) in *in vitro* electroporation.

### 3.6.3. Small interfering RNAs (siRNAs)

#### 3.6.3.1 *β-actin (ACTB) and HSP90AA1 siRNAs*

After sequencing, *ACTB* and *HSP90AA1* sequences were sent to Ambion and three siRNAs Silencer<sup>®</sup> pre-designed siRNAs were designed for each gene. Upon arrival, 250 µl of nuclease-free water (Promega) was added to each siRNA, and they were stored at -20°C.

#### 3.6.3.2 *siRNA-negative control construction*

Negative-antisense and negative-sense RNAi constructions were made using a commercial kit (Silencer<sup>®</sup> RNAi construction kit, Ambion Inc.). Briefly, oligonucleotides (provided by Ambion Inc.) were resuspended by adding nuclease-free water (Promega) (94 µl nuclease-free water to Neg-antisense and 151.5 µl to Neg-sense to get a concentration of 200 µM). Both constructions were formed by a 21-base sequence and an eight-base tail (5'-CCTGTCTC-3'). A random sequence was obtained by randomizing the bases from the original sequence of *ACTB* gene (this gene had previously been sequenced following the procedure described above and sent to the provider). One microliter of each oligonucleotide (200 µM) was resuspended with 250 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) to get a working solution of 1:250 (v/v). Finally, the absorbance at 260 nm ( $Abs_{260}$ ) of each oligonucleotide was assessed by spectroscopy (GENESYS<sup>™</sup> 10 UV/Vis Spectrophotometer), prior to calculation of the concentration ( $[Oligonucleotide], ng \cdot \mu l^{-1}$ ) using this mathematical formula:

$$[Oligonucleotide] = \frac{(Abs_{260} \times 5000)}{9.7}$$

The concentration of the antisense oligonucleotide resulted in 185.1 ng·µl<sup>-1</sup>, while that of the sense oligonucleotide was 107.2 ng·µl<sup>-1</sup>.

At this point, the transcription template was prepared as follows. Oligonucleotides (either sense or antisense) were diluted at 100 µM/each using TE buffer. In two separate tubes (one for sense, the other for antisense), the following mixture was prepared: 2 µl of T7 Promoter Primer, 6 µl of DNA hybridisation buffer and 2 µl of either sense or antisense template oligonucleotide. The tubes were heated for 5 minutes at 70°C, and afterwards incubated for 5 minutes at room temperature. After that, the following was added to each hybridised oligonucleotide: 2 µl of 10x Klenow Reaction Buffer, 2 µl of 10x dNTP mix, 4 µl of Nuclease-free water and 2 µl of Exo-Klenow enzyme. The content of the tubes was gently mixed by pipetting and then incubated for 30 minutes at 37°C, thereby creating single-stranded siRNAs that could be used directly, developing the transcription reaction, or stored at -20°C until needed.

The last step was double-stranded siRNA synthesis. To this end, the single-stranded RNAs templates were incubated for two hours at 37°C. The contents of sense and antisense strands were then mixed and incubated overnight in order to anneal both strands. Next, constructed double-stranded siRNA was digested with RNase and DNase. Binding and wash buffers were prepared according to the manufacturer's instructions and digestion buffer was thawed at room temperature, the contents being thoroughly mixed by means of a vortex. Afterwards, 6 µl of Digestion Buffer, 48.5 µl of nuclease-free water, 3 µl of RNase and 2.5 µl of DNase were added to the tube containing the double-stranded siRNA. The mixture was incubated for two hours at 37°C and 400 µl of siRNA-binding buffer were added to the nuclease digestion reaction and incubated for 5 minutes at room temperature.

The following steps concerned double-stranded siRNA purification. A filter cartridge was placed in a 2 ml tube (both provided by the Silencer<sup>®</sup> siRNA construction kit, Ambion Inc.) and then prewetted with 100 µl of siRNA Wash Buffer. Double-stranded siRNA in the Binding Buffer was added to the prewet filter cartridge, and centrifuged for 1 minute at 10000 rpm (Eppendorf<sup>®</sup> microcentrifuge model 5424), with the flow-through being discarded from the collection tube. The filter cartridge was washed twice with 500 µl of siRNA Wash Buffer, and centrifuged for 1 minute at 10000 rpm. After that, the filter was placed in a new 2



ml tube. Subsequently, 100  $\mu\text{l}$  of nuclease-free water (previously pre-heated to  $75^{\circ}\text{C}$ ) were added to the filter cartridge to elute the siRNA. Next, incubation for 2 minutes at room temperature and finally spinning for another 2 minutes at 12000 rpm took place. Following this procedure, the siRNA remained in the eluate (in the 2 ml tube) and was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until transfection.

Since siRNA concentration ( $[\text{siRNA}]$ ,  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) is critical for successful gene silencing, siRNA diluted 1:25 (v/v) into buffer TE was quantified by spectroscopy ( $\text{Abs}_{260}$ ) and estimated by applying the following formula:

$$[\text{siRNA}] = \frac{(\text{Abs}_{260} \times 40 \times 25 - \text{fold})}{9.7}$$

The molar concentration of the siRNA was determined by dividing  $[\text{siRNA}]$  by 14, because it was assumed that there were 14  $\mu\text{g}$  of RNA in 1 nmol of an average 21-mer dsRNAi. As the mean of  $\text{Abs}_{260}$  readings was 0.518, the concentration of the siRNA-negative control, experimentally measured, was  $518 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  and  $37 \mu\text{M}$ . Finally, the siRNA-negative control was resuspended in RNase-free water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6.4 HSP90AA1 immunostaining

Following siRNA delivery (see Section 3.6.5), the media was removed and the cells washed twice by agitating the slides slowly in PBS for 5 minutes, before the blocking agent was applied. Non-specific sites were blocked by incubating with a mixture of  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  BSA and 100 mM glycine in PBS for 20 minutes at room temperature. Next, rabbit polyclonal anti-HSP90AA1 antibody (Abcam, UK) was applied to the cells with a dilution factor of 1/4000 (in blocking agent) for 1 hour at room temperature.

Cells were then washed three times by slowly agitating in PBS (5 minutes each wash) before the secondary antibody was applied. After that, cells were incubated with chicken anti-rabbit IgG antibody conjugated to Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes<sup>®</sup>) for 1 hour at room temperature, using a dilution of 1/1000 ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) in blocking agent. Cells were then washed twice by agitating slowly in PBS (5 minutes each wash), and 400 ml of blocking agent were added prior to putting a coverslip on top. Samples were mounted with fluorescent Vectashield<sup>®</sup> Mounting Medium (Vector laboratories Ltd., Burlingame, California, USA) containing  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  DAPI (4, 6 diamidino-2-phenyl-indole) to counter-stain the nuclei.

Slides were viewed under an Axio Imager.Z1 fluorescence microscope (Zeiss) with the Zeiss EC Plan-NEOFLUAR 40x 0.75 objective lens and using two filter cubes: I3 (excitation filter: BP 450-490 nm; dichromatic mirror: 510 nm; suppression filter: LP 515) and N2.1 (excitation filter: BP 515-560 nm; dichromatic mirror: 580 nm; suppression filter: LP 590 nm).

### 3.6.5 Optimising of *ACTB* and *HSP90AA1* -siRNAs delivery

The optimisation of siRNA delivery was carried out according to the algorithm developed by Cenix BioScience and licensed to Ambion Inc., using the Silencer<sup>®</sup> siRNA Transfection II Kit (Ambion Inc.). For each transfection optimising experiment, five replicates were made, two plates serving for RNA extraction and the others for cell viability assessment. For optimising transfection, different media, concentrations of transfection agent, delivery methods (reverse transfection or neofection, plated transfection and *in vitro* electroporation) and three different pre-designed siRNA per gene (*HSP90AA1* and *ACTB*) were used (See Results, Table A6-2).

#### 3.6.5.1 Cell cytotoxicity, HSP90AA1 immunostaining and RNA extraction assessments after siRNA delivery experiments

At the end of all the optimising experiments, the cytotoxicity effects of siRNA transfection on OECs, as well as gene and protein expression, were assessed. For this purpose, cells were trypsinised with 1 ml trypsin per well (in accordance with the procedure previously described). The pellet was resuspended in 400 µl of growth medium, and then 11 µl of a working solution 10:1 (v/v) prepared from stock solution SYBR-14/EthD-1 was added, the final concentrations being 100 nM and 2 µM, respectively (Molecular Probes<sup>®</sup>). Samples were then incubated for 15 minutes at 37.5°C and OEC viability assessed by placing 10 µl on a slide. Four counts of 200 epithelial cells (alive/dead) were carried out using an Axio Imager.Z1 fluorescence microscope (Zeiss) at 400x magnification (Zeiss EC Plan-NEOFLUAR 40x 0.75 objective lens) and two filter cubes: I3 (excitation filter: BP 450-490 nm; dichromatic mirror: 510 nm; suppression filter: LP 515) and N2.1 (excitation filter: BP 515-560 nm; dichromatic mirror: 580 nm; suppression filter: LP 590 nm).

To analyse gene expression after siRNA transfection, cells were trypsinised and then washed with PBS. RNA was immediately extracted in the same way as in previous RNA

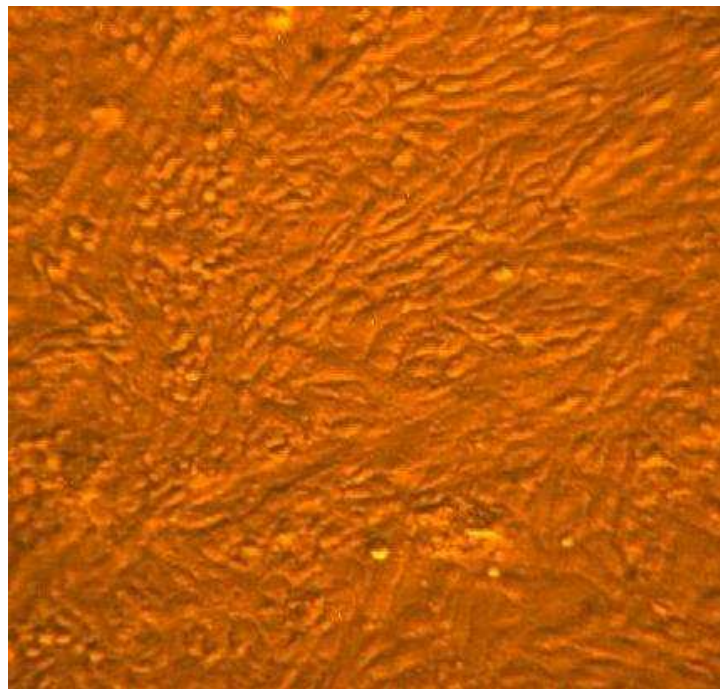
extractions (Ambion kit, see Section 3.3.2) and then a RT-PCR and an agarose electrophoresis were carried out (see Sections 3.3.4 to 3.3.6).

Finally, transfected and non-transfected OECs were stained using a rabbit polyclonal anti-HSP90AA1 antibody (see Section 3.6.4).

#### 3.6.5.2 Experiment 1: Neofection using siPORT™ Amine

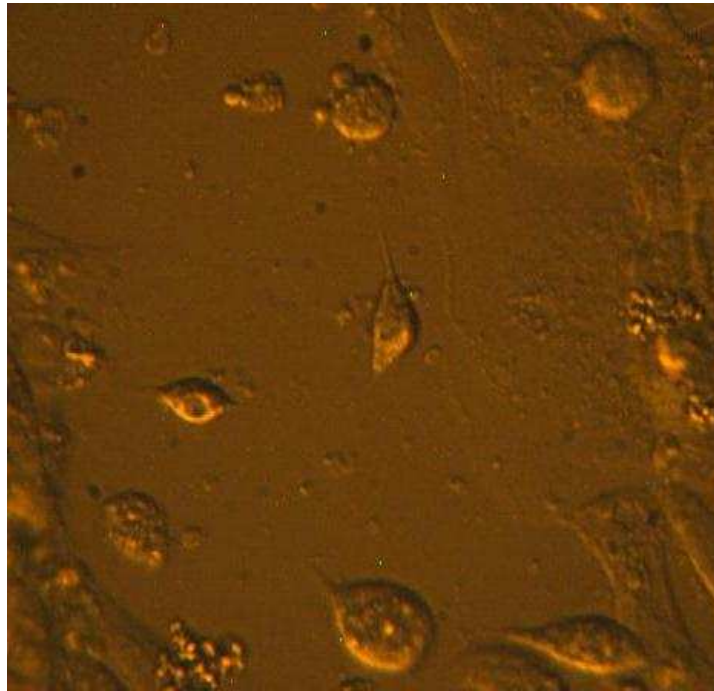
The optimisation probes (steps 1 to 7, Table A6-3) were started using a polyamine-based tranfection agent (siPORT™ Amine, Ambion Inc.) and the reverse transfection (neofection) method, following the recommendations of the Cenix Algorithm. Cryogenic vials (Nalgene) containing follicular-OEC frozen cells (passage I) were thawed and seeded to flasks according to the procedure described. After 48 hours of incubation, cells reached confluence and were trypsinised and resuspended in 4 ml of OptiMEM® I media (Gibco).

Cell suspensions from different cryogenic vials were mixed, and then cell concentration was assessed by means of a Neubauer hemocytometer (Brand), with six counts being carried out. The cell suspension was subsequently diluted with OptiMEM® I media to get a concentration of  $10^5$  cells·ml<sup>-1</sup>.



**Figure IV-12** Image of OECs in OptiMEM® I without transfection agent after 24 h (100x magnification)

Six-well plates (Corning Costar, High Wycombe, UK) were used for assessing cell viability, RT-PCR and HSP90AA1 immunostaining under the following conditions: six different transfection agent concentrations (0, 1, 2, 4, 6 and 8  $\mu$ l), two different concentrations of 20  $\mu$ M siRNA (0 and 3.8 $\mu$ l) and three incubation times (24, 48 or 72 hours) (see Section 3.6.5.1) (Figures IV-12 and IV-13).



**Figure IV-13** Image of OECs in OptiMEM<sup>®</sup> I with 6  $\mu$ l transfection agent after 24 h (400x magnification).

Note cells become unattached

### 3.6.5.3 Experiment 2: Plated transfection with siPORT<sup>™</sup> Amine

Since the cytotoxicity was too high and many cells remained unattached (Figure IV-13), forming complexes, (see Article 6), a pre-plating step was added to the protocol (step 8, Table A6-3), following the recommendations suggested by the Cenix Algorithm. To this end, cells in growth medium (TCM199 + 10% FCS, but lacking penicillin/streptomycin and fungizide) were seeded ( $2.3 \times 10^5$  cells per well) before starting siRNA delivery. After 24 hours, confluence was reached and transfection carried out, assessing six concentrations of transfection agent (0, 1, 2, 4, 6 and 8  $\mu$ l), three different compositions of OptiMEM<sup>®</sup> I medium (0%, 2% and 4% FCS) and three incubation times (24, 48 and 72 hours). A further

step, adding fresh growth medium after 24 hours of transfection, was also added, and cell confluence and cell viability were assessed after 48 hours of incubation (see Section 3.6.5.1).

#### 3.6.5.4 Experiment 3: Plated transfection with siPORT™ NeoFX™

Due to cytotoxicity results following the performance of transfection experiments with siPORT™ Amine in accordance with the Cenix Algorithm, many attempts were made with a cationical liposomal agent (siPORT™ NeoFX™, Ambion Inc.), keeping plated transfection as the transfection method (steps 10 and 11, Table A6-3).

The experimental conditions were the same as in the second experiment, except for the transfection agent (six concentrations of siPORT™ NeoFX™: 0, 1, 2, 4, 6 and 8 µl).

#### 3.6.5.5 Experiment 4: In vitro Electroporation (EP)

The cytotoxicity was high in the previous three experiments and non *HSP90AA1* knockdown was observed (see Article 6). For this reason, other attempts with changes to the delivery method were made. To this end, cryogenic vials (Nalgene) containing frozen follicular-OECs were thawed and seeded in growth medium. When confluence was reached, cells were trypsinised and transferred to a siPORTer-96 Electroporation Chamber (Ambion Inc.) filled with solution containing  $10^6$  OECs and siRNA at a concentration of 20 µM, both in 45 µl siPORT™ siRNA Electroporation Buffer.

The electroporation chamber was then loaded into a Bio-Rad Gene Pulser Xcell electroporator (Bio-Rad, Hercules, California, USA) and, after optimisation (steps 11 and 15, Table 1) four square pulses (25 V) with a loading period of 35 ms per pulse and 965 ms intervals were applied. Electroporated cells were then transferred to four-well chamber slides and cultured at 37.5°C in growth medium (TCM199 + 10% FCS) without penicillin/streptomycin as described previously. Antibiotics (1% penicillin/streptomycin) were added six hours after EP.

Forty-eight hours after EP, total RNA was isolated and assessed for *ACTB* and *HSP90AA1* using RT-PCR and immunostaining, and cell viability was also determined.

### 3.6.6 Experimental design

Two experiments constituted this study. The first consisted of optimising *HSP90AA1*-silencing and the second analysed the effects of *HSP90AA1*-silenced OECs on sperm viability after co-culture. *ACTB* and *HSP90AA1* silencing were optimised in accordance with the algorithm created by Cenix BioScience and licensed to Ambion Inc.

Briefly, OECs were cultured and then cryopreserved until needed (see Sections 3.1.3 and 3.1.7). Cryogenic vials containing follicular and luteal OECs were thawed and the cells seeded. Using Silencer<sup>®</sup> pre-designed siRNAs (*ACTB* and *HSP90AA1*) and negative siRNA (see Section 3.6.3), cells were transfected using reverse and plated transfection with two chemical agents, namely siPORT<sup>™</sup> Amine and siPORT<sup>™</sup> NeoFX<sup>™</sup> (Ambion Inc.), using *in vitro* electroporation (siPORT<sup>™</sup> siRNA Electroporation Buffer; Ambion Inc.). After all the optimising experiments, the cytotoxicity effects of siRNA transfection on OECs, as well as gene (RT-PCR and agarose gel electrophoresis,  $\beta$ -actin acting as housekeeping gene; see Sections 3.3.3 to 3.3.6) and protein expression (*HSP90AA1* immunostaining; see Section 3.6.4) were assessed.

For the second experiment, which was repeated eight times using sperm samples from eight different boars, electroporated OECs were cultured at 37.5°C in 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub> (Heracell<sup>®</sup> 150 incubator, Heraeus<sup>®</sup>), and sperm samples (see Section 3.6.1) were washed through a two-step Percoll gradient (35/70%) (see Section 3.2.2). After removal of the supernatant, the remaining sperm pellet was resuspended in about 0.5 ml of residual 70% Percoll.

After 48 hours of EP, the growth medium was removed from the 4-well chamber slides, the cells were washed with 1 ml D-PBS lacking Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, and 400  $\mu$ l of washed spermatozoa in TALP medium (final concentration of  $1.87 \times 10^6$  spzs·ml<sup>-1</sup>) was added. The negative control consisted of sperm in TALP medium in empty wells. Washed spermatozoa (final concentration of  $1.87 \times 10^6$  spzs·ml<sup>-1</sup>) were co-cultured (see Section 3.2.3) with electroporated follicular or luteal OECs at 37.5°C in 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub>, and sperm viability using SYBR-14/EthD-1 (see Chapter II, Section 1.1) was assessed after 30, 60, 120, and 180 minutes, 24 and 48 hours.

### 3.6.7 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS<sup>®</sup> for Windows software (SPSS Inc., Version 14.0). Differences in immunostaining were analysed by performing a one-way ANOVA.

For assessing sperm viability, data were tested for normality and homoscedasticity using the Kolmogorov–Smirnov and Levene’s tests. When necessary, the data were transformed using arcsine square root ( $\arcsin \sqrt{x}$ ) prior to a repeated measures analysis of variance (ANOVA), where the co-culture time (24 hours and 48 hours) was the intra-subject factor, the treatment (non-transfected cells, siRNA-negative control or siRNA-*HSP90AA1*) was the inter-subject factor and each sperm functional parameter was the dependent variable and post hoc comparisons were made with the Tukey test.

The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

# Chapter IV Spermatozoa and OEC

---

## 4 Results

- 4.1 **Article 4** Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival *in vitro*
  - 4.1.1 Introduction
  - 4.1.2 Material and Methods
  - 4.1.3 Results
  - 4.1.4 Discussion
  - 4.1.5 References
- 4.2 **Article 5** Boar spermatozoa alter the gene expression of Heat Shock Proteins during *in vitro* homologous oviductal epithelial cell co-culture
  - 4.2.1 Introduction
  - 4.2.2 Material and Methods
  - 4.2.3 Results
  - 4.2.4 Discussion
  - 4.2.5 References
- 4.3 **Article 6** *HSP90AA1* silencing in porcine oviductal epithelial cells and its effects on sperm viability after co-culture
  - 4.3.1 Introduction
  - 4.3.2 Material and Methods
  - 4.3.3 Results
  - 4.3.4 Discussion
  - 4.3.5 References





## **Chapter IV Spermatozoa and OEC**

---

### **4 Results**

---

#### **Article 4**

Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival *in vitro*

(*Animal Reproduction Science*, doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.08.018)



## **Chapter IV Spermatozoa and OEC**

---

### **4 Results**

---

#### **Article 5**

Boar spermatozoa alter the gene expression of Heat Shock Proteins during *in vitro* homologous oviductal epithelial cell co-culture

*(Molecular Reproduction and Development, under review)*



## **Chapter IV Spermatozoa and OEC**

---

### **4 Results**

---

#### **Article 6**

*HSP90AA1* silencing in porcine oviductal epithelial cells and its effects on sperm viability after co-culture



## **Chapter IV Spermatozoa and OEC**

---

### **5 General Discussion**





---

## 5 General Discussion

---

The three reports in the previous chapter principally concern boar semen preservation technology and an examination of new insights into predicting the fertilising ability of ejaculates. However, a lot of research into pig and other mammalian reproduction deals with the female reproductive tract, in relation to the physiology of the oviduct (Hunter, 2005) and the uterus (Tabizadeh and Broome, 1999), and IVF procedures (Romar et al., 2001). Specifically, the oviduct (or Fallopian tube) has a significant role in the events leading to fertilisation, by providing an appropriate microenvironment for gamete transport leading to the ampulla, the region of the oviduct where fertilisation occurs, and for early embryonic development (Romar et al., 2001; Hunter, 2005). In fact, in most mammalian species, including pigs, sperm-oviductal epithelial cell (OEC) contact appears to be one of the final phases of maturation that gives spermatozoa the ability to penetrate oocytes (Hunter, 1984). Thus, it is well known that reproduction involves a significant coordination of different processes, including the interactions between spermatozoa and oviductal epithelial cells (Hunter and Rodríguez-Martínez, 2004). For these reasons, the present chapter is focused on the study of the pig oviduct and the relationship between spermatozoa and OECs, determined by cell and molecular parameters.

The mammalian oviduct is formed by secretory and ciliated cells (Hafez, 1996). Sperm cells bind to OECs (Petrunkina et al., 2001c), and in pigs and other mammalian species a short segment of the isthmus forms a reservoir for sperm during the oestrous period (Suárez et al., 1991; Töpfer-Petersen et al., 2002). Since OECs play such a key role in mammals' reproduction, the latest research includes several reports on their primary culturing in order to understand their structure and ultrastructure (Eslaminejad et al., 2007), to set IVF systems, to assess sperm parameters after homologous or heterologous co-culturing and to determine the effects of cell conditioned medium on sperm function.

With regard to IVF procedures, several studies have been carried out regarding human (Vlad et al., 1996; Saridogan et al., 1997; Tse et al., 2007) and other mammalian species, such as the equine (Thomas et al., 1995a), rabbit (Dickens et al., 1996), goat (Rodríguez-Dorta et al., 2007), bovine (Walter and Miller, 1996; Xia et al., 1996; Cox and Leese, 1997; Reischl et al., 1999; Rottmayer et al., 2006), porcine (Romar et al., 2001), monkey (Rajagopal et al., 2006), mouse (Lee and Yeung, 2006; Tan et al., 2007) and canine (Vannucchi et al., 2006).

As for the co-culturing of OECs with spermatozoa, experiments have been performed involving many species, such as the human (Bongso et al., 1993; Kervancioglu et al., 1994; Morales et al., 1996; Ellington et al., 1998; Yao et al., 1999), pig (Suárez et al., 1991; Fazeli et al., 1999; Petrunkina et al., 2001c; Yeste et al., 2007c; 2008), wallaby (Sidhu et al., 1998), sheep (Gutiérrez et al., 1993), dog (Ellington and Meyers-Wallen et al., 1995; Kawakami et al., 2001), rat (Cortés et al., 2004), cattle (Lefebvre and Suarez, 1996; Gualtieri and Talevi, 2000; Gualtieri and Talevi, 2003) and horse (Ellington et al., 1993, Thomas et al., 1994; Thomas et al., 1995b). In most of these studies, it has been demonstrated that OECs specifically influence sperm by prolonging their viability, by stabilising the acrosome and by inducing capacitation, amongst other physiological processes (Kervancioglu et al., 1994; Yeung et al., 1994; Morales et al., 1996; Ellington et al., 1998). Later, these findings will be addressed again, and discussed in relation to what has been observed in the case of pigs.

Finally, the last aspect of the state-of-the-art about OECs is the effects of oviductal fluid proteins and conditioned medium produced by OECs in culture on sperm function. It is known that in the oviductal physiology, glycoproteins are secreted and accumulated in the caudal isthmus, the site of the preovulatory reservoir. These secretions prevent uterine and ampullary tubal fluids from entering the functional sperm reservoir and remove residual male secretions from the sperm's surface (Hunter, 2002). They also reveal a specific effect of these proteins on spermatozoa (Wagh and Lippes, 1989; Abe et al., 1995; Lapointe and Sirard, 1996; Zhu et al., 2001; Quintero et al., 2005).

Since several reports have demonstrated that OECs have some effect on sperm viability, capacitation and motility in pigs (Fazeli et al., 1999), human (Ellington et al., 1998; Yao et al., 1999) and other mammalian species such as stallions (Thomas et al., 1995b; Dobrinski et al., 1999), dogs (Kawakami et al., 2001), cattle (Kodithuwakku et al., 2007), and rats (Cortés et al., 2004), the study described in Article 4 (Yeste et al., 2008) aimed to assess the effects of homologous OEC co-culture and conditioned medium on the following spermatozoa function

parameters: viability, motility, acrosome, mitochondrial sheath integrity and capacitation status over a 24 hour period. Two sperm subpopulations were studied, bound and unbound to OECs in co-cultures, and using pig kidney epithelial (LLC-PK1) cells as the positive control.

When these experiments had been performed, it was observed that OEC co-culture and cell conditioned medium affect spermatozoa by maintaining their viability, inducing capacitation and changing their motility parameters. These three findings will be discussed separately.

Co-culture and CM from non-reproductive pig kidney epithelial (LLC-PK1) cells also extend sperm viability when compared with a medium without epithelial cells, although not as significantly as OECs. Thus, non-reproductive cells showed an ability to prolong sperm survival, albeit not to the same extent, and the results obtained in Article 4 are in accordance with previous observations in co-culture with OECs and Vero cells (non-reproductive green monkey kidney epithelium cells) (Kervancioglu et al., 1994). They are also in accordance with Akhondi and co-workers (1997) who showed that co-incubation of sperm with both epididymal and OECs in humans prolongs their survival, concluding that epithelium of the reproductive tract is the most advantageous for spermatozoa.

Viability, assessed with SYBR-14/EthD-1, is higher in bound than in unbound sperm populations, and also in OECs compared to LLC-PK1 co-cultures. For up to 24 hours of incubation, viability in bound spermatozoa is maintained in OECs, but not in LLC-PK1 cells, which is in keeping with the fact that reproductive cells specifically bind to sperm and promote their survival. The studies dealing with sperm-OEC co-culture allow us to understand what the role of these epithelial cells on the function of male gametes is. It is very important to highlight the role of sperm-OEC binding on the formation of the sperm preovulatory reservoir. This cell-to-cell contact takes places in the isthmus, the region of the oviduct where sperm is stored, where their motility is reduced and their viability prolonged (Töpfer-Petersen et al., 2002). The sperm reservoir is formed in the isthmus due to carbohydrate-protein interaction between mannosyl-oligosaccharides exposed by OECs and spermadhesins that are produced by seminal vesicles and associated with the sperm surface at the moment of ejaculation (Töpfer-Petersen et al., 2002). It has also been demonstrated that spermadhesin AQN1, which is one of the dominant porcine carbohydrate-binding sperm proteins, is involved in sperm binding to OECs and plays some a role in the formation of the

oviductal sperm reservoir (Ekhalsi-Hundrieser et al., 2005). In short, *in vivo*, spermatozoa are stored in the isthmus under specific conditions that maintain viability and suppress early capacitation steps until ovulation occurs (Töpfer-Petersen et al., 2002).

Apart from OEC-sperm direct contact, previous reports in rabbits (Smith and Nothnick, 1997) and pigs (Fazeli et al., 2003) have shown that the binding of spermatozoa with some proteins of apical plasma membrane (APM) fractions also maintain their viability. In pig APM, it seems that the peripheral rather than integral proteins are the components prolonging sperm viability (Fazeli et al., 2003).

In unbound sperm populations (co-cultured with OECs and LLC-PK1 cells) and CM, a triple staining method that assesses, amongst other things, the state of the acrosome has been developed. From the results obtained, it can be seen that the proportion of spermatozoa with intact acrosomes is higher in OEC co-cultures and OEC-CM than in LLC-PK1 co-cultures, LLC-PK1-CM and medium without cells. This finding reveals that OECs stabilise the acrosomal membranes of spermatozoa in pigs, as has also been observed in humans (Yao et al., 1999), thereby preserving sperm integrity and decreasing the percentage of false or degenerative acrosome reactions. Related with this, the integrity of the acrosome is very important at the moment of fertilisation, because previous studies in bovine and humans have shown that acrosome-intact spermatozoa are significantly more able to bind to the ZP than acrosome-reacted spermatozoa (Nishikimi et al., 1997; Liu et al., 2006).

Maintaining sperm viability in co-culture systems with OECs has previously been observed in pigs (Fazeli et al., 1997; 1999), humans (Kervancioglu et al., 1994; Yeung et al., 1994; Akhondi et al., 1997; Yao et al., 1999), cattle (Ellington et al., 1991; Pollard et al., 1991), sheep (Gutiérrez et al., 1993) and horses (Ellington et al., 1991; Thomas et al., 1994). In Article 4, viability is maintained in sperm populations that remained both unbound from and that bound to OECs, albeit differentially, with the latter surviving better than the former population. At 24 hours, the viability of spermatozoa bound to the OECs had decreased by only 10%, while the viability of spermatozoa that remained unbound from the OECs had decreased by 50%. Viability is maintained to a greater extent in sperm populations bound to OECs than those bound to LLC-PK1 cells, and in sperm populations unbound from OECs compared with those unbound from LLC-PK1 cells, and this finding suggests that both secretions from and binding to OECs influence sperm function. Moreover, sperm viability is maintained better in co-incubation with CM by OECs than in co-incubation with CM by LLC-

PK1 cells, and in the latter better than in unconditioned medium, 60 minutes after the start of the experiment. These data are partially in accordance with similar reports on bovine and humans in which OEC-CM was shown to prolong sperm viability (Ijaz et al., 1994; King et al., 1994; Abe et al., 1995; Zhu et al., 2001). When all the data relating to bound and unbound sperm populations from co-cultures and co-incubation CM is analysed together, it appears that OEC-CM affects sperm viability and motility less intensively than the combination of sperm-OEC binding and secretion during co-culture. This is in accordance with previous studies concerning the role of OEC secretions (Yeung et al., 1994; Abe et al., 1995; Yao et al., 1999) and sperm-OEC binding (Dobrinski et al., 1997; Smith and Nothnick, 1997; Töpfer-Petersen et al., 2002; Petrunkina et al., 2004) on sperm function.

Co-culturing with OECs also plays an enhancer role in some sperm kinetic parameters (such as straight line, curvilinear and average-path velocities and the percentage of linearity) and maintains the percentage of progressive motile unbound spermatozoa up to 180 minutes, compared with an unbound population in co-culture with LLC-PK1 cells and the negative control. In agreement with these findings, Bongso and co-workers (1993) reported that co-culture with ampulla epithelial cell lines in humans significantly increased sperm curvilinear velocity (VCL) and the mean amplitude of lateral head displacement (ALH). In relation to sperm progressive motility, our data matches that obtained for humans (Yao et al., 1999) and sheep (Gutiérrez et al., 1993), where the percentage of progressive motility of ram spermatozoa was higher after homologous or heterologous co-culturing with OECs than in co-culture with non-reproductive cells (IBRS-2 cell line) and in medium without epithelial cells. Also related with sperm motility, the percentage of progressive motile spermatozoa was somewhat higher after incubation with OEC-CM than with LLC-PK1-CM or with unconditioned medium. Since there is no a clear effect of OEC-CM in respect of LLC-PK1-CM, these findings are only in partial accordance with other similar reports in humans and other species, where it has been documented that OEC-CM prolongs sperm motility (Ijaz et al., 1994; King et al., 1994; Abe et al., 1995; Zhu et al., 2001).

Another key physiological process that involves OECs at the isthmus and affects spermatozoa is capacitation. The process of sperm capacitation is characterised by the influx of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and the tyrosine-phosphorylation of spermatozoa proteins (Töpfer-Petersen

et al., 2002). During sperm capacitation, an increase in the tyrosine-phosphorylation of tail proteins and later of sperm head proteins in unattached sperm populations is observed (Petrunkina et al., 2004). Conversely, when spermatozoa are bound to OECs, they present low calcium uptake and their proteins do not become phosphorylated (Töpfer-Petersen et al., 2002).

In Article 4, decreases in the percentages of uncapacitated spermatozoa and increases in the percentages of capacitated spermatozoa are observed in an unbound sperm population after 30 minutes of incubation. However, this induction effect is not observed in LLC-PK1 cells or medium without cells after this time. Similar results were previously observed in pigs (Fazeli et al., 1999) and humans (Kervancioglu et al., 1994), where co-culture with OECs, but not with non-reproductive cell types, induced sperm capacitation. This seems logical since capacitation is a physiological process that *in vivo* takes place in the isthmus (Petrunkina et al., 2004).

This result also matches previous reports in pigs (Fazeli et al., 1999) and dogs (Petrunkina et al., 2004) where the tyrosine-phosphorylation of heads was observed in unbound sperm populations, but not in bound suspensions. Interestingly, the study by Petrunkina and co-workers (2004) demonstrates that the rate of tyrosine phosphorylation of sperm tail proteins is higher in cells bound to oviductal explants than in unbound cells or in those incubated in medium without explants, which confirms that spermatozoa with non-phosphorylated heads preferentially bind to epithelial cells. This means that tyrosine phosphorylation of sperm head proteins and capacitation would be delayed in spermatozoa in close contact with the oviductal epithelium. Since it has been observed in heterologous and homologous co-culturing that dog spermatozoa bind in a similar way to homologous and heterologous explants (Petrunkina et al., 2004), it seems that the binding of uncapacitated sperm to OECs is a species-independent phenomenon.

In the bound-to-OEC population, the percentage of uncapacitated spermatozoa decreases and that of capacitated spermatozoa increases, although less than in the case of unbound spermatozoa. This could be related to the suggestion that in pigs uncapacitated spermatozoa bind preferentially to OEC, and then capacitate quickly (Fazeli et al., 1999). Conversely, Petrunkina and colleagues have described that sperm-OEC binding is selective (Petrunkina et al., 2001c) and delays capacitation in dogs (Petrunkina et al., 2003). Yanagimachi (1994) reported that the release of spermatozoa from the oviductal reservoir is dependent on

capacitation and hyperactivation. Interestingly, although bound spermatozoa remained more uncapacitated than unbound sperm throughout incubation, because in principle sperm bound to OEC should remain uncapacitated, the increase in capacitated spermatozoa reveals that a complex mechanism is involved in sperm-OEC binding and the sperm capacitation process. In line with this, capacitation is not induced when sperm is bound to LLC-PK1 cells, as has been discussed in Article 4. In fact, like other authors (Fazeli et al., 1999), we propose that most sperm bound to OECs is probably uncapacitated and capacitated sperm do not bind OECs leading to oocytes, or else the transport of spermatozoa would be impossible through the oviduct. However, the data on this point are not very clear.

The effects of CM on sperm capacitation are also dependent on reproductive cells, since the percentage of capacitated spermatozoa is higher after incubation with OECs than with LLC-PK1 cells or unconditioned medium. This finding is seen to be more marked in an unbound sperm population from co-culture, being only observed 60 minutes after the start of the experiment in CM. In line with this data, it seems that the OEC-CM components are neither identical to the LLC-PK1-CM and the unconditioned medium, nor to the medium to which the unbound sperm population is exposed during OEC co-culturing. This result is in line with a previous report (Abe et al., 1995), where it was found that incubating sperm with CM is better than incubating sperm in unconditioned medium.

Capacitation, hyperactivation and some motility parameters are related, as García-Herreros and her colleagues (2000) have reported. In our study, incubations with OEC-CM also increased the percentage of capacitated sperm as well as curvilinear velocity and the percentage of linearity after 180 minutes of incubation, even though both were less enhanced than unbound sperm in the co-culture experiment. This data, which will be referred to again later, corroborate our hypothesis that secretions released by OECs play a role in sperm function, because, although less than co-culture, CM had an effect that was different from the negative control. These findings agree with a previous report (Yeung et al., 1994) in humans where it was documented that both co-incubation and cell-conditioned medium maintained sperm hyperactivation.

Specifically, as the percentages of uncapacitated sperm decrease and those of capacitated increase in both systems (i.e. freely swimming spermatozoa in co-culture and sperm in CM), it appears that the specific secretory activity of OECs influences sperm capacitation. This is in accordance with the finding that in pigs (Rodriguez-Martinez et al., 2001; Tienthai et al.,



2004) and in cattle (Parrish et al., 1989; McNutt and Killian, 1991; McNutt et al., 1994; Abe et al., 1995) oviductal fluid plays a basic role in sperm capacitation. In fact, it is likely that OEC secretions are involved in sperm capacitation, even this effect is clearer in unbound sperm in co-culture than in CM experiments. The epithelium of mammalian oviducts is constituted by secretory and ciliated cells. Secretory cells produce and release into the oviduct lumen several macromolecules, such as oviductal secretory glycoprotein (OSP), which is conserved across many mammalian species (Buhi et al., 2000; Killian, 2004). Secreted proteins support embryo development and maintain sperm function *in vitro* (Abe, 1996; Pérez-Martínez et al., 2006). On the other hand, intraluminal fluid from the oviduct is involved in boar sperm capacitation (Rodríguez-Martínez et al., 2001; Tienthai et al., 2004).

According to Hunter and Rodríguez-Martínez (2004), capacitation represents an active and specific coordination process within succeeding regions of the female tract and its completion is synchronised with the events of ovulation for those sperm cells involved in fertilisation, so that the uterus and the oviducts cooperatively influence sperm capacitation (Hunter and Rodríguez-Martínez, 2004). Furthermore, capacitation appears as a controlled and integrated process *in vivo* whose completion is a periovulatory event. During the pre-ovulatory period and the formation of the sperm reservoir, the suppression of completion of capacitation is a strategy for storing the spermatozoa. Sperm capacitation is also affected by local and systemic ovarian control mechanisms, acting to coordinate the final maturation and meeting of spermatozoon and oocyte (Hunter and Rodríguez-Martínez, 2004) and it seems that both capacitation and the acrosome reaction in a fertilising spermatozoon would be terminated in the specific fluids at the ampullary-isthmic junction (Hunter, 2002).

Chlortetracycline staining tells us about the state of the acrosome. In sperm bound to OECs and to LLC-PK1 cells, no changes in the percentages of reacted acrosome spermatozoa were observed, in contrast to what occurs in unbound sperm. This is consistent with the fact that in bovine only acrosome-intact sperm bind to OECs and the acrosomes of bound sperm are preserved intact over time, so that binding to OECs is essential for preserving sperm fertilisation ability during the interval between the start of oestrus and ovulation (Gualtieri and Talevi, 2000).

The role of inducers of capacitation has also been studied. The effects of HA appear to be in conflict with the literature because, as previously discussed (Chapter III), it delays capacitation in storage at 15°C after three days (Yeste et al., 2007b) and *in vivo* (Rodríguez-

Martínez et al., 2001), but also seems to induce it *in vitro* (Bergqvist et al., 2006). Amidst this controversy, heparin and dermatan sulphate, both glycosaminoglycans like HA, have been considered as inductors of sperm capacitation, but they increase the number of dead spermatozoa without increasing the percentage of capacitated spermatozoa in frozen-thawed bull spermatozoa (Bergqvist et al., 2007). Other studies have suggested that HA plays a role in this process because it is a strong inhibitor of sperm-oviduct interactions and induces capacitation *in vitro* without acrosome exocytosis (Tienthai et al., 2000). Recently, Liberda et al. (2006) reported that oviductal fluid is the strongest inhibitor of boar seminal plasma protein binding to the oviductal epithelium. According to these authors, oviductal fluid contains glycoproteins and glycosaminoglycans which might induce the release of sperm from the sperm reservoir or be inhibitors of sperm attachment to the oviductal epithelium. In addition, seminal plasma acts as a decapacitating factor, but HA and freshly conditioned medium present capacitation action in boar spermatozoa *in vitro* (Suzuki et al., 2002).

In a previous report (Cancel et al., 2000), sperm hyperactivation and capacitation have been shown to be associated with motility parameters, such as curvilinear velocity and percentage of linearity, with a positive relationship between the percentage of capacitated spermatozoa and percentages of linearity and straightness (García-Herreros et al., 2005). Another report (Satake et al., 2006) has shown that proteins from oviductal-APM affect the velocity parameter of boar sperm. It was found that different sperm subpopulations exist within a given ejaculate and oviductal-APM proteins act on the fast-linear subpopulation by suppressing their motility. In Article 4, the percentage of linearity and the percentage of capacitated sperm were higher in sperm unbound from OECs than unbound from LLC-PK1 cells and medium without epithelial cells; this finding seems to match that in pigs, where APM proteins exert a positive dose-response relationship upon linearity (Satake et al., 2006).

As discussed below, uncapacitated sperm bind preferentially to OECs and LLC-PK1 cells, sperm-OEC binding being a basic process in forming a sperm reservoir and in the reproductive events leading to fertilisation. A significant feature of sperm integrity, making it able to bind to OECs and fertilise the oocyte, is the integrity of the plasma membrane. As previous reports have shown (Khalil et al., 2006) in frozen-thawed bull spermatozoa, this organelle is related to sperm-OEC binding capacity (Khalil et al., 2006), because the ability of spermatozoa to modify their swelling in response to hypo-osmotic stress (volume regulatory ability) is related to their binding and further fertilising abilities. Sub-fertile bulls present a

damaged plasma membrane because spermatozoa have lower binding indices and deficiencies in volume recovery after hypotonic challenges are observed (Khalil et al., 2006). In line with this, Pérez-Llano and her co-workers (2001) have demonstrated that the relationship between sHOST and fertility depends on the plasmalemma integrity of spermatozoa

Analysing together the three parameters assessed in Article 4, sperm viability, motility and capacitation, it can be concluded that OEC co-culturing maintains sperm viability, especially when bound to OECs, affects sperm velocity parameters, and induces capacitation. This is consistent with previous reports in humans (Kervancioglu et al., 1994; Yeung et al., 1994; Morales et al., 1996; Yao et al., 1999), pigs (Fazeli et al., 1999; Yeste et al., 2007c), dogs (Petrunkina et al., 2003), cattle (Ellington et al., 1991; Pollard et al., 1991; Gualtieri and Talevi, 2000), sheep (Gutierrez et al., 1993) and horses (Ellington et al., 1991; Thomas et al., 1993; Thomas et al., 1995b) where it has been observed that OECs have a promoting effect on sperm survival, enhance sperm motility, stabilise the acrosome, modify the frequency of tail beat and induce sperm capacitation and the hyperactivation that follows, so that the maintaining of sperm function appears to be a common characteristic of co-culture systems with OECs. Also matching results from Article 4, the beneficial effects of OECs have even been observed in the heterologous co-culturing of human sperm with bovine OECs, which reveals the stabilising effect of OECs on sperm chromatin structure in both fresh and cryopreserved semen (Ellington et al., 1998).

When separately unbound and bound sperm populations in co-culture experiments are analysed after 24 hours, the percentages of immotile and dead spermatozoa significantly increase in unbound populations, compared with time 0, whereas bound sperm remain live and motile. At 24 hours, the viability of bound sperm was only reduced by 10% while the viability of unbound sperm was reduced from 80% to 30% in all treatments. As differences between the negative control and OECs in unbound sperm viability and between LLC-PK1 cells and OECs in bound sperm viability were observed, it may be concluded that both OEC secretions and sperm-OEC binding preserve sperm viability. Other authors reported this event in OEC secretions (Yeung et al., 1994; Abe et al., 1995; Yao et al., 1999), in OEC-sperm binding (Dobrinski et al., 1997; Smith and Nothnick, 1997), and in proteins derived from the oviductal epithelium (Boquest et al., 1998) that regulate bull sperm function, by promoting viability and delaying acrosomal damage. Related to this, Lapointe and colleagues (1998)

have proposed that the presence of catalases in oviductal fluid may play a key role in sperm function preservation within the mammalian female tract.

A differential effect is observed in sperm motility when sperm parameters in an unbound sperm population are compared with co-cultured and sperm incubated with CM. Co-culturing revealed a greater ability to maintain this sperm parameter than incubating with conditioned medium. In fact, conditioned medium is not identical to the medium of co-culture experiment containing spermatozoa in suspension. Our findings are in agreement with those of Gutiérrez and co-workers (1993) in rams and Kervancioglu and colleagues (1994) in humans. They reported that while OECs positively affected sperm survival, cell-CM did not have the same effect on spermatozoa. In line with a previous report (Abe et al., 1995), incubations with cell-conditioned medium are better than those with culture medium alone. Although previous reports in bovine and humans showed that OEC-CM prolonged both sperm motility and viability (Ijaz et al., 1994; King et al., 1994; Abe et al., 1995; Zhu et al., 2001), only a slight tendency to prolong sperm survival when incubated with OEC-CM has been observed in Article 4, but not significant differences. In cattle, several papers have shown that oviductal fluid regulates sperm function to facilitate fertilisation, capacitating spermatozoa and inducing their hyperactivation (Parrish et al., 1989; McNutt and Killian, 1991; McNutt et al., 1994; Abe et al., 1995). However, the model with which to study the effect of oviductal secretions on sperm may be improved by using oviduct fluid, because it contains some molecules that are not present in the conditioned medium produced by cultured oviduct tissue (Oliveira et al., 1999; Killian, 2004).

From the study of sperm-OEC co-culturing, it can be concluded that OEC co-culturing and CM specifically affect sperm function in the pig, but not to the same extent, with OEC co-culturing rather than OEC-CM being more able to influence boar sperm function. Thus, although OEC-CM also induces sperm capacitation and selectively maintains sperm viability, this effect is not as significant as with co-culturing. However, even though the last cited report assessed sperm capacitation by means of CTC staining, like our study, others (e.g. Bergqvist et al., 2007) used other methods, such as merocyanine-540, which seem more sensitive. For this reason, further studies in sperm-OEC co-culturing should perhaps study sperm capacitation merocyanine-540 rather than CTC.

As already mentioned, OECs present significant secretory activity both *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, the oviductal fluid contains proteins secreted by OECs that have been revealed as beneficial for human spermatozoa (Lippes and Wagh, 1989) where, for example, they prevent the triggering of an acrosome reaction when the oocyte is absent (Quintero et al., 2005). Recently, the effect of two oviductal heat shock proteins, heat shock protein 60 kDa (HSPD1) and glucose regulated protein 78 kDa (HSPA5), on human sperm function has been studied (Lachance et al., 2007). State-of-the-art research into OECs documents that OECs affect sperm cell parameters (as previously discussed) by binding to sperm (Fazeli et al., 1999; Yeste et al., 2008) and by releasing secretory products (McCauley et al., 2003; Quintero et al., 2005; Zhang et al., 2006; Kumaresan et al., 2006). However, there are only a few reports studying the effects of the presence of spermatozoa in the gene expression of oviductal cells (Fazeli et al., 2004; Georgiou et al., 2005; Sostaric et al., 2006; Kodithuwakku et al., 2007; Lachance et al., 2007).

It has been observed that APM extracts prolong sperm viability in pigs (Fazeli et al., 2003) and some proteins within these solubilised extracts (sAPM) that bind to boar spermatozoa have recently been identified (Elliot et al., personal communication). Against this background, the study described in the fifth article sought to determine how the expression of these genes varies between the follicular and luteal stages, and also how spermatozoa affect the expression of the genes encoding the four APM-identified proteins, using a culture and a homologous co-culture system with Percoll-washed spermatozoa over a 24 hour period. These four relevant genes are clusterin (*CLU*), heat shock cognate protein related 70 kDa (*HSPA8*, also *HSC70*), heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (*HSP90AA1*) and glucose regulated protein 78 kDa (*HSPA5*, also *GRP78*) (see the Introduction of the present chapter) and their expression is analysed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using  $\beta$ -actin (*ACTB*), a housekeeping gene, as internal standard. Again, LLC-PK1 cells are used as a positive control and spermatozoa in co-culture medium (TALP) are employed as a negative control.

Briefly, clusterin is a multifunctional glycoprotein that constitutes cell-adhesion complexes and is involved in interactions between cell-cell and cell-extracellular matrix (Valdés-González et al., 2005; Wang et al., 2007). Although its role in reproduction is not very clear, it has been localised in human spermatozoa (Atlas-White et al., 2000) and in the male reproductive tract (Plotton et al., 2006; Moura et al., 2007).

Heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (HSP90AA1), heat shock cognate protein related 70 kDa (HSPA8) and glucose regulated protein 78 kDa (HSPA5) are constitutive and inducible heat shock proteins. The role of heat shock proteins in reproduction has been observed in steroid receptors, whose ligand binding domain includes a ligand recognition site and regions for receptor dimerisation interaction with heat shock proteins, nuclear localisation and ligand dependent transactivation. Also related with reproductive physiology, changes in the amounts of heat shock proteins have been observed during the menstrual (Wu et al., 1996) and the endometrial cycles (Komatsu et al., 1997; Tabibzadeh and Broome, 1999). Furthermore, HSP90AA1 appears to be involved in sperm motility (Huang et al., 1999) and capacitation (Ecroyd et al., 2003; Hou et al., 2007). Heat shock cognate protein related 70 kDa (HSPA8) is the constitutive form of heat shock protein 70 kDa (HSPA1A), a protein that is upregulated-expressed in OECs in response to sperm (Georgiou et al., 2005). Finally, HSPA5 has been identified as one of the six major proteins in APM extracts isolated from bovine OECs (Boilard et al., 2004), being present in the oviduct and uterus and binding to bovine and human spermatozoa.

In the light of results from Article 5, it seems there are no differences in the expression of these four genes when comparing follicular and luteal OEC cultures. This is consistent with previous reports studying other aspects of OECs, since the ability of OECs in *in vitro* culture to affect sperm function depends on the ovarian state and oviduct region (Suárez et al., 1991; Fazeli et al., 1999; Petrunkina et al., 2001c). However, other studies *in vivo* referring to the human endometrium have shown differences depending on the menstrual cycle in gene expression patterns in HSPA8 and other HSPs, such as HSPB1 and HSPD1. Further, the human endometrium, in response to steroid hormones, undergoes characteristic cycles of proliferation and secretory changes expressing different HSPs such as HSPB1, HSPD1, HSPA1A, and alpha crystallin B chain. Specifically, the expression of HSPB1, HSPD1, and HSPA8 shows a sharp increase in the human endometrium after ovulation (Tabibzadeh and Broome, 1999). Interestingly, Shah and co-workers (1998) showed that HSP90AA1 in humans decreases in decidual and placenta tissues during the course of normal gestation. On the other hand, although no changes in *CLU* expression have been observed when comparing both ovarian states, an increase in clusterin gene expression has been observed in corpus luteum when luteolysis is induced (Forni et al., 2003).

From the data obtained in OEC culturing experiments it therefore seems that the expression profiles of these four genes *in vitro* do not depend on the ovarian state. However, as changes in protein patterns have been observed in other organs *in vivo*, it is not clear whether the lack of the differences between the follicular and luteal stages is due to the nature of oviduct epithelium in respect of the endometrium, or is the result of the cell dedifferentiation of *in vitro* culturing itself, since this has been documented in other reports on *in vitro* culturing, as for example in porcine epididymal culture (Bassols et al., 2004; 2007). More research, including proteomic analyses, is therefore needed to better address this conclusion *in vitro* and understand changes in gene expression during the ovarian cycle.

The expression of two genes, *HSP90AA1* and *HSPA5*, is significantly greater in LLC-PK1 than in OEC cultures. They are both inducible heat shock proteins and this may explain these differences, as they are related to the different nature of primary cultures and cell lines. Again, more research is required using primary culturing of non-reproductive cells to achieve better understanding of these differences.

The presence of spermatozoa appears to upregulate the genes encoding the three heat shock proteins (*HSP90AA1*, *HSPA8* and *HSPA5*) as observed in *in vitro* co-culturing with OECs and LLC-PK1 cells, but this does not apply to the expression of clusterin. Its role in reproductive processes is not as clear as that of heat shock proteins, which interact with steroid receptors. The upregulation of these proteins by spermatozoa is more significant in OECs than in LLC-PK1s, and in inducible than constitutive heat shock proteins. This, together with other reports (Tabibzadeh and Broomen, 1999; Georgiou et al., 2005; Sostaric et al., 2006), suggests a certain role for heat shock proteins in the female reproductive tract.

Heat shock protein 90 kDa alpha A.1 has been described as a protein involved in sperm capacitation (Ecroyd et al., 2003; Hou et al., 2007), a physiological process that occurs in the oviduct. In pigs, as in other species, uncapacitated spermatozoa preferentially bind to OECs and then capacitate quickly (see Article 4 and Fazeli et al., 1999). Since sperm binding to LLC-PK1 cells does not induce sperm capacitation, and spermatozoa upregulate the expression of *HSP90AA1* in OECs more intensely than in LLC-PK1, both phenomena could be related.

Another gene encoding an inducible heat shock protein, *HSPA5*, is also upregulated in OECs after co-culturing with spermatozoa, in similar fashion to *HSP90AA1*. This protein is a molecular chaperon (Little et al., 1994) that is induced under conditions of stress and plays a

protective role. In Article 5, it is demonstrated that this protein is specifically induced in OECs by spermatozoa, in contrast to LLC-PK1 cells, suggesting that it could play some role in the physiological processes occurring within the oviduct. In line with this finding, HSPA5 has been identified as one of the six major proteins in APM extracts isolated from bovine OEC (Boilard et al., 2004). Furthermore, this protein is also involved in spermatogenesis in mice (Huo et al., 2004) and in the onset of uterine sensitisation in rats (Simmons and Kennedy, 2000).

The other heat shock protein studied in Article 5 is HSPA8, which is the constitutive form of HSPA1A. In contrast to what occurs with *HSP90AA1* and *HSPA5*, the upregulation of *HSPA8* is not as important as that of the inducible heat shock proteins, although spermatozoa upregulate their expression after six hours of co-culturing. Unfortunately, there are no reports studying this protein in the oviduct, the inducible form (HSPA1A) being the only one that has been documented in mammalian reproduction. Spermatozoa induce the expression of HSPA1A in co-culture with a cultured human cervical cell line (HeLa cells) or with cells from the endocervicals of sexually active women (Jeremias et al., 1997). Also in relation to HSPA1A, Georgiou and co-workers (2005) have demonstrated that this protein family is released by OECs in response to sperm. Nevertheless, in other reports studying both HSPA8 and HSPA1A in the human endometrium, it has been observed that the changes in the expression of both proteins are different. Thus, whereas the levels of HSPA8 vary, increasing progressively during the late proliferative and early secretory phases and decreasing in the mid- to late secretory and menstrual phases, those of HSPA1A remain constant (Tabibzadeh and Broome, 1999). Our data and previous reports about *HSPA8* indicate that the protein encoded by this gene is involved in reproductive processes and its upregulation is different from that of inducible heat shock proteins (*HSP90AA1* and *HSPA5*), but more experiments concerning proteomics should further be addressed, since gene expression analyses are not sufficient enough to explain changes in protein expression patterns.

Prior to the study described in the fifth article, other approaches had been designed to assess OEC gene expression in response to sperm. Fazeli and colleagues (2004) demonstrated that after insemination in mice spermatozoa trigger a signal transduction pathway that modulates gene expression in OECs when they arrive at the oviduct. In pigs, Georgiou and co-workers (2005) reported that gametes (i.e. oocytes and spermatozoa) alter the expression of some specific oviductal proteins after their co-incubation with oviduct fragments. Recently,



a similar study to ours has been performed using bovine homologous co-culture, and has shown that motile spermatozoa increase the expression of OEC prostaglandins (Kodithuwakku et al. 2007).

As has previously been noted for rabbits (Smith and Nothnick, 1997), pigs (Fazeli et al., 2003) and bovine (Boilard et al., 2004), when spermatozoa are incubated with sAPM extracts from the oviduct their viability is maintained. In pigs, these sAPM extracts have been partially characterised (Elliot et al., personal communication), in an effort to identify which protein or proteins are responsible for modulating sperm function. In fact, more knowledge about which sAPM proteins extend the life of sperm may facilitate the development of long-term semen diluents, benefiting both agricultural industries and conservation practices. In the light of the results obtained in Article 5, it appears that HSP90AA1, HSPA8 and/or HSPA5 could be sAMP components involved in the modulation of sperm function. However, to better determine the exact role of these proteins in sperm viability, more research using real-time RT-PCR and western-blotting after *in vitro* co-culturing or gene silencing is needed.

In connection with this, the study described in Article 6 sought to elucidate whether HSP90AA1 is one of these APM proteins influencing the survival of boar sperm, after observing that spermatozoa upregulates its expression in *in vitro* co-culture. With this aim, RNA interference (RNAi) is used to inhibit its expression, later testing whether or not gene silencing is achieved by RT-PCR and HSP90AA1-immunostaining. After optimising gene silencing, sperm viability is assessed in co-culture with *HSP90AA1*-silenced OECs, using two controls: non-RNAi-delivered cells and RNAi-delivered cells with a negative-siRNA, which due to a random sequence does not silence any gene, and *ACTB* as a housekeeping gene.

RNA interference is a form of knockdown gene silencing, acting at the post-transcriptional level and induced by the introduction of small double-stranded interfering RNA (siRNA). Briefly, gene knockdown is a useful strategy in mammalian and cultured cells for studying the function of a given gene (Liu et al., 2004; Paroo and Corey, 2004). RNAi is induced by siRNA together with the delivery of single stranded antisense oligonucleotides (AODN), the most widely used anti-mRNA strategies (Kurreck, 2003; Yu, 2007). In the recent years, the use of RNAi has progressively replaced the use of AODN (Elbashir et al., 2001; Ovcharenko et al., 2005), due to the advantages of the former in respect of the latter (Hogrefe, 1999; Lee et al., 2002; Achenbach et al., 2003; Hough et al., 2003).

One inconvenience of RNAi, like other anti-mRNA strategies, is the siRNA-delivery, because the technique used to accomplish this sometimes compromises cell viability, and it is often difficult to deliver the siRNAs in primary cultures cells (Ovrachenko et al. 2005), like those utilised in Article 6. Different methods (e.g. chemical transfection, transduction or *in vitro* electroporation) can be used to deliver siRNA, with chemical transfection being useful for immortalized cell lines but not for primary cells (Rebersek et al., 2007). In Article 6, attempts to deliver siRNA by using chemical transfection failed, so *in vitro* electroporation (EP) was used as an alternative approach, even though the use of *in vitro* EP has been associated with high cytotoxicity, especially in large plasmid DNA-delivery (Sato, 2005).

In Article 6, the levels of cell viability are higher in chemical transfection than in *in vitro* EP, but the gene knockdown of *HSP90AA1* and *ACTB* is only observed in EP. After optimising siRNA-delivery, electroporated OECs are co-cultured with spermatozoa and then the sperm viability is determined. The results obtained confirm the prolonging of sperm viability by OECs (see Article 4; Yeste et al., 2008), since sperm viability is higher after co-culturing with non-electroporated cells than electroporated cells, whose confluence is lower due to the *in vitro* EP method.

The data on sperm viability demonstrate that *HSP90AA1* is not involved in the maintaining of sperm survival, because similar results are obtained in cells electroporated with *HSP90AA1*-siRNA and negative control-siRNA. It has been reported that OECs affect sperm viability differently, depending on whether or not spermatozoa bind to epithelial cells (Fazeli et al., 1999; Yeste et al., 2007c). However, no differences due to *HSP90AA1*-silencing in sperm viability are observed within either population, so these results confirm the role of OECs in maintaining sperm survival but at the same time show that *HSP90AA1* is not a protein involved in prolonging the viability of spermatozoa. It has been observed in Article 5 that spermatozoa induce the expression of *HSP90AA1* in OECs after three hours of co-culturing, and this could mean that this protein plays some role in a sperm function parameter different to sperm viability. Since it seems that *HSP90AA1* is involved in sperm capacitation (Ecroyd et al., 2003; Hou et al., 2007), RNAi may be used to make this role clear, as there is no rationale for the presence of sperm capacitation-inducers in short and long-term extenders. On the other hand, *HSPA8* and *HSPA5* are also upregulated in OECs by spermatozoa after *in vitro* co-culture, so that RNAi could also be performed on OECs in order to study the role of these two genes in sperm function. Finally, the use of RNAi technology raises a cytotoxicity

problem with the transfected cells, and it is not clear whether cells that are nonviable due to EP can influence the results in some way. Other methods of siRNA-delivery, such as transduction, should therefore be used in order to settle this point.

## **Chapter IV Spermatozoa and OEC**

---

### **6 Conclusions**



---

## 6 Conclusions

---

1. The co-culturing of porcine oviductal epithelial cells (OECs) and spermatozoa prolongs sperm viability and stabilises the acrosomal membrane.
2. The prolonging of sperm survival is more significant in populations bound to OECs than it is in those that remain unbound. This is consistent with the formation, the nature and the role of the sperm reservoir.
3. Co-culturing with OECs maintains motility parameters better in unbound spermatozoa than co-culturing with non-reproductive epithelial (LLC-PK1) cells and incubation with a medium with no epithelial cells.
4. LLC-PK1 cells maintain sperm viability and motility better than incubation with a medium with no cells, albeit not to the same extent as is the case with OECs.
5. Uncapacitated spermatozoa preferentially bind to OECs and LLC-PK1 cells, whereas capacitated spermatozoa remain in unbound populations.
6. The percentage of capacitated spermatozoa is higher in bound and unbound to OEC sperm populations than in bound and unbound to LLC-PK1 ones. This suggests that OECs specifically induce sperm capacitation.
7. The progress of the percentages of uncapacitated and capacitated spermatozoa in bound to OEC populations accords with the proposition that uncapacitated spermatozoa bind preferentially, and then capacitate quickly.
8. The incubation of spermatozoa with a medium conditioned by OECs affects sperm functions, although OEC co-culture has more influence on sperm viability, motility and capacitation.
9. No changes in the expression of *CLU*, *HSP90AA1*, *HSPA8* and *HSPA5* are observed when comparing follicular and luteal cultured OECs.

10. Spermatozoa do not modify the expression of clusterin either in OECs or in LLC-PK1 cells, but they do upregulate the expression of *HSP90AA1*, *HSPA8* and *HSPA5*, which all belong to the HSPs family.
11. Spermatozoa also induce the expression of *HSP90AA1*, *HSPA8* and *HSPA5* in co-culturing with non-reproductive LLC-PK1 cells, but later than with OECs. This suggests an effect on OEC gene expression specific to spermatozoa.
12. In siRNA delivery, the cytotoxicity observed in chemical plated transfection is lower than the application of *in vitro* electroporation.
13. Since chemical transfection does not result in either *ACTB* or *HSP90AA1* knockdown in transfected OEC cultures, *in vitro* electroporation is an alternative for optimising RNAi silencing in primary cultured OECs.
14. No changes in sperm viability are observed after co-culturing with electroporated OECs with *HSP90AA1*-siRNA. Thus, HSP90AA1 appears not to be a protein involved in prolonging the viability of spermatozoa.
15. Since HSP90AA1 is involved in sperm capacitation, further research could usefully study the effects of RNAi on this sperm parameter.
16. Other studies could be developed using RNAi to elucidate the role of HSPA8 and HSPA5 in sperm function, as well as utilising alternative delivery methods to chemical transfection and *in vitro* electroporation.

# **Concluding remarks**

---





---

## Concluding remarks

---

1. The addition of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  at concentrations of 2.5, 5 and 10 mg/100 ml does not harm sperm quality, so this hormone can be used with no ill effects at these concentrations to contract the uterus myometrium, and improve AI procedures. Moreover, the addition of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  at 5 mg/100 ml appears to be better, compared to an un-supplemented extender, at preserving sperm viability and motility after 6 days' storage at 15°C in BTS.
2. Hyaluronic acid at 50-100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  delays sperm capacitation after 3 days of storage at 15°C in BTS, without either damaging sperm viability or affecting sperm motility.
3. The tolerance of spermatozoa to osmotic changes in their environment, determined as the resistance of sperm viability, morphology and the percentage of acrosome-reacted sperm, could be introduced into multiple regression models and jointly assessed with conventional sperm parameters in order to better predict the fertility of a given ejaculate.
4. The prolonging of sperm survival is more significant in populations bound to OECs than it is in those that remain unbound. This is consistent with the formation, the nature and the role of the sperm reservoir.
5. The percentage of capacitated spermatozoa is higher in bound and unbound to OEC sperm populations than in bound and unbound to LLC-PK1 ones. This suggests that OECs specifically induce sperm capacitation.
6. The incubation of spermatozoa with a medium conditioned by OECs affects sperm functions, although OEC co-culture has more influence on sperm viability, motility and capacitation.
7. No changes in the expression of clusterin (*CLU*), heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (*HSP90AA1*), heat shock cognate protein related 70 kDa (*HSPA8*) and glucose

regulated protein 78 kDa (*HSPA5*) are observed when comparing follicular and luteal cultured OECs.

8. Spermatozoa do not modify the expression of *CLU* either in OECs or in LLC-PK1 cells, but they do upregulate the expression of *HSP90AA1*, *HSPA8* and *HSPA5*, which all belong to the HSPs family.
9. No changes in sperm viability are observed after co-culturing with electroporated OECs with *HSP90AA1*-siRNA. Thus, even though HSP90AA1 appears not to be a protein involved in prolonging the viability of spermatozoa, further research using RNAi could address the effects of *HSP90AA1*-silencing on other sperm function parameters.

# Appendix in Catalan

---



# Capítol I

---

## Introducció general

### **1. L'espècie porcina i la raça Pietrain**

- 1.1. Introducció
- 1.2. Característiques morfològiques de la raça Piétrain
- 1.3. Característiques productives de la raça Piétrain

### **2. L'ejaculació i l'espermatozoide de porcí**

- 2.1. L'ejaculació
- 2.2. L'espermatozoide

### **3. La qualitat espermàtica**

- 3.1. Viabilitat espermàtica, integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma
  - 3.1.1. El nucli
  - 3.1.2. L'acrosoma
  - 3.1.3. La beina mitocondrial
  - 3.1.4. La viabilitat espermàtica en condicions estàndard
- 3.2. Motilitat espermàtica
- 3.3. Morfologia espermàtica
- 3.4. Aglutinació espermàtica



### 1. L'espècie porcina i la raça Pietrain

#### 1.1. Introducció

L'espècie porcina (*Sus domesticus*) té una gran importància en l'economia mundial, especialment a Europa i al continent americà, on les races més utilitzades en les explotacions ramaderes de multiplicació són tres: Landrace, Piétrain i Duroc (figures I-1, II-2 i II-3).



**Figura I-1.** Mascler reproductor porcí de la raça Landrace.



**Figura I-2.** Mascler reproductor porcí de la raça Piétrain.





**Figura I-3.** Mascle reproductor porcí de la raça Duroc.

Malgrat que se sap amb exactitud quan va aparèixer aquesta raça en les explotacions ramaderes europees, hi ha nombrosos dubtes sobre l'origen d'aquests animals, caracteritzats per la seva elevada capacitat de produir carn. Els darrers estudis que s'han publicat en aquest àmbit suggereixen la hipòtesi que la raça Piétrain deu procedir de l'encreuament de porcs Yorkshire amb porcs de la raça Bayeux (importats durant la Primera Guerra Mundial des de Normandia), els quals, al seu torn, havien estat creuats amb porcs Berkshire.

La raça Piétrain no va adquirir una certa importància i extensió fins a la dècada dels cinquanta del segle passat. L'any 1953 es reconeixia la raça a la província de Brabant, el 1954 es va establir l'estàndard racial i el 1956 la raça va ser reconeguda arreu de Bèlgica.

L'any 1955, la raça va ser exportada a França i el 1958 es va fundar el denominat *zootècnic francès*, llibre que es convertiria en el llibre genealògic de la raça el 1963 (Buxadé, 1984).

## **1.2. Característiques morfològiques de la raça Piétrain**

Des d'una perspectiva morfològica, la raça Piétrain es caracteritza perquè:

- a. Presenta una musculatura forta en els terços posterior i anterior.
- b. Té una capa blanca amb taques negres i/o vermelles i un cap relativament petit amb perfil recte o subcòncav.
- c. És un animal d'aparença curta i arrodonida. Els mascles pesen entre 280 i 300 kg i les femelles entre 240 i 260 kg. L'altura a la creu oscil·la entre 0,75 i 0,85 m i la seva longitud no supera els 1,55 m.

### 1.3. Característiques productives de la raça Piétrain

Pel que fa a les seves característiques productives, que expliquen l'interès que té aquesta raça per al sector ramader, les més importants són les següents:

- **Qualitat excepcional de la canal.** Aquest és un dels caràcters que ha fet famosa aquesta raça. La canal dels exemplars Piétrain té un percentatge elevat de parts nobles, amb poc greix. El seu rendiment mitjà és del 72,5 %, el percentatge de pernil i llom és del 57 % i l'espessor del greix dorsal és d'aproximadament uns 20 mm.
- **Qualitat mediocre de la seva carn.** Encara que és millor que la del porc blanc belga, aquesta és inferior a la dels porcs Large-White.
- **Rendiments tècnics acceptables.** Sobretot fins als 75 kg de pes viu. A partir d'aquest pes lllindar, l'animal tendeix a engreixar-se i l'índex de conversió augmenta.
- **Índexs reproductius baixos.** La mida de la ventrada no sol ser gran i, a més, el nombre de garrins deslletats és baix (aproximadament deu garrins nascuts vius i entre set i vuit garrins deslletats).
- **Disharmonia anatomicofuncional.** La relació cor-cos és molt petita, la qual cosa implica que la mortalitat sigui més gran que en d'altres races i que en els exemplars de la raça Piétrain es produeixin amb freqüència parades cardíques. Aquesta disharmonia explica la problemàtica de la seva cria a Espanya, on les condicions climàtiques provoquen l'estrès d'aquests porcs.

Finalment, cal destacar que les femelles Piétrain no s'utilitzen com a femelles reproductores, perquè encara que són dòcils i bones mares, presenten unes mames recollides i produeixen poca llet.

Actualment, els mascles de la raça Piétrain s'utilitzen en programes d'encreuament en un gran nombre de països (Espanya, França, Alemanya, Regne Unit, Itàlia, Rússia, Romania, Polònia, Dinamarca, República Txeca, Hongria, Brasil i Argentina) amb femelles d'altres races, com la raça Hampshire, la Duroc i races híbrides. Això posa de manifest la importància que aquesta raça té com a aportadora de quantitat de carn en la línia mascla (Buxadé, 1984).

## 2. L'ejaculació i l'espermatozoide de porcí

### 2.1. L'ejaculació

A l'espècie porcina, les primeres ejaculacions es produeixen a l'inici de la pubertat, entre els cinc i sis mesos d'edat. Entre els vuit i els dotze mesos d'edat, els mascles es consideren postpuberals i es creu que són completament madurs o adults a partir de l'any d'edat (Martín, 1982; Hugues i Varley, 1984; Sancho, 2002).

Pel que fa al volum, l'ejaculació del mascle reproductor porcí varia entre 150 i 300 ml (Martín, 1982; Garner i Hafez, 1986; Rothschild, 1990; Pinart i col·l., 1999). Tanmateix, aquest volum està sotmès a variacions considerables com a conseqüència dels efectes individu i ambient (Setchell, 1991). En termes comparatius, el volum de l'ejaculació en porcí és molt elevat quan es compara amb el d'altres espècies de mamífers domèstics. Així, per exemple, en bocs, s'han observat volums d'entre 0,2 i 2,5 ml (Garner, 1991; Setchell, 1991); en cavalls, el volum oscil·la entre 30 i 150 ml (Rasbech, 1984; Bonadonna, 1989); en toros, entre 5 i 30 ml (Garner i Hafez, 1986; Rasbech, 1984; Setchell, 1991), o en bous, entre 0,8 i 1,2 ml (Garner i Hafez, 1986). Pel que fa a l'espècie humana, els valors de referència oscil·len entre 2 i 6 ml (Ludwig i Frick, 1990; Andolz i Bielsa, 1995; WHO, 2000).

En l'ejaculació del mascle reproductor porcí s'hi poden distingir tres fraccions, com a resultat tant de les secrecions procedents de les diferents glàndules sexuals accessòries com de l'activitat testicular i epididimària (Pond i Houpt, 1981; Fournier-Delpech i Thibault, 1993; Garner i Hafez, 1996; Sancho, 2002; Córdova-Izquierdo i col·l., 2004; Peña i col·l., 2006):

- **Fracció preespermàtica.** Està formada per les secrecions de la pròstata, les vesícules seminals i les glàndules bulbouretrals o de Cowper. Aquesta fracció té un volum aproximat de 10 ml, presenta un aspecte pràcticament transparent i no conté espermatozoides.
- **Fracció espermàtica o rica en espermatozoides.** Aquesta fracció té un volum d'aproximadament 70 ml, és de color blanquinós i té un aspecte lletós. Presenta una elevada concentració d'espermatozoides, que oscil·la entre  $0,5 \cdot 10^9$  i  $10^9$  espermatozoides·ml<sup>-1</sup>, procedents de l'activitat del testicle. D'altra banda, les secrecions que conté aquesta fracció procedeixen tant de la pròstata com de les vesícules seminals.

- **Fracció postespermàtica o pobra en espermatozoides.** El seu volum és d'uns 150 ml; presenta un color lleugerament blanquinós i conté pocs espermatozoides (la concentració és inferior a  $10^6$  espermatozoides/ml). En aquesta fracció, a més, s'hi troben secrecions de consistència gelatinosa procedents de la pròstata i de les glàndules bulbouretrals o de Cowper.

## 2.2. L'espermatozoide

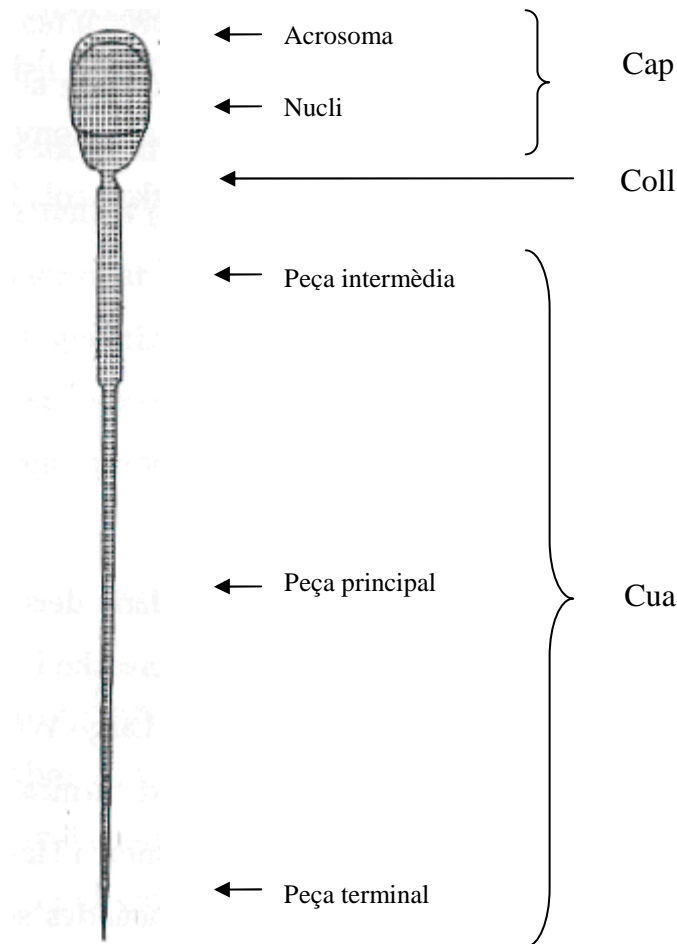
L'espermatozoide és el gàmeta reproductor masculí i el producte de la gametogènesi i la posterior maduració epididimària. L'espermatozoide madur de porcí té una longitud de 45  $\mu\text{m}$  i s'hi poden diferenciar tres regions: el cap, la peça de connexió i la cua (Bonet i col·l., 2000). La cua està constituïda per la peça intermèdia o mitocondrial, la peça principal i la peça terminal.

El cap és ovalat i aplanat, té una longitud de 7  $\mu\text{m}$ , una amplada de 3,7  $\mu\text{m}$  i un gruix de 0,4  $\mu\text{m}$ , i comprèn el nucli i l'acrosoma. Ambdues cares són diferents. Així, mentre que una és plana, l'altra presenta una protuberància apical semilunar, que té 0,4  $\mu\text{m}$  i una llargària de 1,2  $\mu\text{m}$  (Garner i Hafez, 1996; Bonet i col·l., 2000). El nucli conté la cromatina, que es troba molt condensada, i en l'acrosoma, que és un orgànul cel·lular especialitzat que es localitza sobre el nucli, s'hi distingeixen tres segments: apical, principal i equatorial. Es distingeixen, a més, dues membranes acrosòmiques: la interna, en contacte amb el nucli, i l'externa, en contacte amb el plasmalemma. L'especificitat de l'acrosoma s'explica en part pel nombre i l'heterogeneïtat química de substàncies que conté, com ara mucopolisacàrids, proteïnes i lípids. Cal destacar la presència d'enzims hidrolítics, com la hialuronidasa, que produeix el trencament de les cèl·lules de la granulosa, i l'acrosina, una proteasa molt important en el moment de la fecundació, perquè trenca la zona pel·lúcida de l'òcit.

El coll o peça de connexió té una longitud de 0,7  $\mu\text{m}$  i un gruix de 0,5  $\mu\text{m}$ . De forma cònica, presenta una base més ampla, d'1,3  $\mu\text{m}$  i en contacte amb el cap, i una regió més estreta, de 0,6  $\mu\text{m}$ , en contacte amb la peça intermèdia. També s'observa una protuberància anular de 0,15  $\mu\text{m}$  de diàmetre (Bonet i col·l., 2000).

Finalment, la cua és filamentosa i cilíndrica i s'hi distingeixen tres regions: la peça intermèdia, la peça principal i la peça terminal. La peça intermèdia o mitocondrial té una longitud de 9  $\mu\text{m}$  i un diàmetre de 0,7  $\mu\text{m}$ . Aquesta regió de la cua, que conté la beina

mitocondrial, és la que proporciona l'energia necessària per al batec del flagel. L'anell de Jensen és la zona que separa les peces intermèdia i principal. La peça principal, de 26,2  $\mu\text{m}$  de longitud, presenta un diàmetre de 0,4  $\mu\text{m}$ ; i la peça terminal té 2,2  $\mu\text{m}$  de llargària i 0,2  $\mu\text{m}$  de diàmetre (Briz, 1994; Bonet i col·l., 2000).



**Figura I-4.** Representació esquemàtica de l'espermatozoide de porcí (Briz, 1994; Bonet i col·l., 2000).

### 3. La qualitat espermàtica de l'ejaculació

La qualitat espermàtica de les dosis seminals es pot valorar analitzant diferents tipus de paràmetres tant cel·lulars com bioquímics (Knobil i Neil, 1994; Briz, 1994; Sancho, 2002). Pel que fa als paràmetres cel·lulars, se solen determinar la viabilitat, la motilitat, la morfologia i l'aglutinació espermàtiques, així com la integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma i la resistència osmòtica dels espermatozoides (test de resistència osmòtica, ORT). El nombre

d'espermatozoides que es recompta en cadascuna d'aquestes anàlisis ha de ser elevat, atesa la variabilitat intra- i interindividual de la mostra i la subjectivitat de l'assaig (Woelders, 1990).

### **3.1. Viabilitat espermàtica, integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma**

La viabilitat espermàtica és un paràmetre molt important en la valoració de la qualitat espermàtica i descriu el percentatge d'espermatozoides viables i d'espermatozoides no viables.

#### *3.1.1. El nucli*

Per dur a terme aquesta valoració de la viabilitat espermàtica es poden aplicar diferents mètodes. D'una banda, es poden utilitzar diferents tincions específiques, com la de l'eosina - blau d'anilina (Shaffer i Almquist, 1948) o l'eosina-nigrosina (Dott i Foster, 1972; Garcia-Artiga i col·l., 1994; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002; Sancho, 2002). El fonament d'aquestes tincions és que la membrana dels espermatozoides viables és impermeable als colorants, mentre que la dels espermatozoides no viables és permeable.

Atès que sovint aquestes tincions no són prou acurades per dur a terme aquesta determinació, s'han desenvolupat altres mètodes de marcatge amb fluorocroms, que després són observats amb el microscopi òptic de fluorescència o amb el citòmetre de flux (O'Neill, 1997). Un exemple de fluorocrom utilitzat per valorar la qualitat espermàtica és el taronja d'acridina, que ha estat emprat en humà (Hoshi i col·l., 1996; Zini i col·l., 2000), boví (Dobrinski i col·l., 1994) i porcí (Bonet i col·l., 1995; Pinart i col·l., 1999). Aquest marcatge es fonamenta en les propietats d'aquest agent intercalant, que, després d'haver estat excitat a una longitud d'ona de 450-490 nm, emet fluorescència de color verd si està unit al DNA cel·lular no alterat o fluorescència de color taronja si resta unit al DNA desnaturalitzat (Zini i col·l., 2000). Malgrat tot, Hoshi i col·laboradors (1996) han posat en dubte la utilitat d'aquesta tècnica per predir la fertilitat.

A partir de la segona meitat dels anys noranta es va generalitzar l'ús del doble marcatge com a mètode de determinació de la viabilitat espermàtica, no només en porcí sinó també en humà i en altres espècies d'animals domèstics. En aquest doble marcatge, un fluorocrom és específic per a les cèl·lules viables i l'altre ho és per a les cèl·lules no viables (Nagy i col·l., 2003; Rowland i col·l., 2003). Els fluorocroms per a cèl·lules viables o bé s'uneixen

específicament a enzims que només són actius quan les cèl·lules són vives, o bé només emeten fluorescència quan les bombes iòniques estan en funcionament (Shapiro, 1998). Els fluorocroms per a cèl·lules viables més utilitzats són l'SYBR-14 (Garner i col·l., 1994; Gravance i col·l., 2001; Huo i col·l., 2002; Love i col·l., 2003; vegeu també el capítol IV), el Hoechst 33342 (Cai i col·l., 2005; Hallap i col·l., 2006) i el bisbenzimidà Hoechst 33258 (Bussalleu i col·l., 2005; González-Urdiales i col·l., 2006; Pinart i col·l., 2006).

El principi dels fluorocroms específics per a cèl·lules no viables, el més conegut dels quals és el iodur de propidi (IP) (Garner i col·l., 1994; Love i col·l., 2003; Nagy i col·l., 2003; Rowland i col·l., 2003), és que aquests no travessen la membrana plasmàtica de les cèl·lules viables, de manera que només marquen les cèl·lules no viables.

Altres tècniques d'immunomarcatge, que combinen més de dos fluorocroms, pretenen obtenir no només informació sobre l'estat del nucli, sinó també sobre altres compartiments (Bussalleu i col·l., 2005; Pinart i col·l., 2006), la qual cosa permet una predicció més acurada de la capacitat fecundant dels espermatozoides (Juonala i col·l., 1999; Nagy i col·l., 2003). Així, mitjançant les tècniques de triple marcatge, es pot conèixer la viabilitat del nucli al mateix temps que l'estat de l'acrosoma i el de la beina mitocondrial.

### 3.1.2. L'acrosoma

L'anàlisi de l'acrosoma es duu a terme mitjançant lectines conjugades amb fluorocroms, com la PSA (*Pisum sativum agglutinin*) (Farlin i col·l., 1992; Casey i col·l., 1993), la PNA (*Peanut agglutinin*) (Cheng i col·l., 1996; Fazeli i col·l., 1997) i la concanavalina A, combinades amb el fluorocrom FITC (isotiocianat de fluoresceïna) (Kinger i Rajalakshmi, 1995; Ozaki i col·l., 2002), o l'inhibidor de tripsina de la beina de soja (SBTI, *trypsin inhibitor from soybean*) combinada amb biotina (Arts i col·l., 1994).

L'acrosina, molècula característica de l'acrosoma, és l'enzim que aquestes lectines reconeixen i el seu marcatge és baix quan els espermatozoides presenten l'òrganul intacte. En canvi, quan l'acrosoma ha tingut alguna alteració i, consegüentment, ha reaccionat, la intensitat d'aquest marcatge augmenta (Ozaki i col·l., 2002). L'especificitat de les lectines esmentades per l'acrosina (Tao i col·l., 1993) és variable i, d'acord amb els darrers estudis, el marcatge amb l'SBTI és el que presenta una resolució més elevada a l'hora de diferenciar

entre espermatozoides amb l'acrosoma intacte i espermatozoides amb l'acrosoma malmès o reaccionat (Tollner i col·l., 2000; Ozaki i col·l., 2002).

### *3.1.3. La beina mitocondrial*

Pel que fa a la beina mitocondrial, alguns estudis, duts a terme en un bon nombre d'espècies diferents, han utilitzat diversos fluorocroms. Així, en humà, Auger i col·laboradors (1993) i O'Connell i col·laboradors (2002) han utilitzat la rodamina 123, i Poot i col·laboradors (1996) el clorometil-X-rodamina. En porcí, s'ha utilitzat la rodamina (Fraser i col·l., 2001) i el iodur de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianina (Huo i col·l., 2002). Com que els fluorocroms que marquen la beina mitocondrial són catiònics i lipofílics, poden difondre passivament a través de la membrana plasmàtica i acumular-se a la matriu mitocondrial, que està carregada negativament. L'acumulació d'aquestes molècules de fluorocrom depèn del potencial de membrana del mitocondri (Gilmore i Wilson, 1999). Les darreres publicacions en aquest àmbit han demostrat que el MitoTracker<sup>®</sup>Green FM, de Molecular Probes (Eugene, Oregon, Estats Units), és el que ofereix un marcatge més òptim de la beina mitocondrial (Fazeli i col·l., 1997; Ozaki, 2002; Kavak i col·l., 2003). Aquest fluorocrom s'uneix específicament als lípids de membrana dels mitocondris funcionals però no als dels mitocondris alterats (Keij i col·l., 2000; Fraser i col·l., 2001). A més, presenta una especificitat més elevada que la rodamina 123 i la seva lectura, atesa la longitud d'ona a la qual emet després d'haver estat excitat, el converteix en un bon candidat per ser inclòs en els protocols de doble i triple marcatge (Sutovsky i col·l., 1999).

### *3.1.4. La viabilitat espermàtica en condicions estàndard*

En condicions normals, el semen ejaculat porcí conté entre un 65% i un 85% d'espermatozoides viables (Martín, 1982; Buxadé, 1984; Briz, 1994; Bonet i col·l., 1995; Briz i col·l., 1995; Pinart i col·l., 1999). Es parla de necrozoospermia quan el percentatge d'espermatozoides viables és inferior als valors llinars esmentats.



### 3.2. Motilitat espermàtica

Els espermatozoides madurs de mamífer tenen la capacitat de moure's mitjançant els impulsos que realitza la seva cua. La motilitat espermàtica és un dels paràmetres més analitzats i utilitzats en els centres de producció de dosis seminals per valorar la qualitat espermàtica d'una ejaculació (Flowers, 1997; Rigau i col·l., 2001; Sancho, 2002), encara que la correlació d'aquest paràmetre amb les taxes de fertilitat o de no-retorn a l'estre després de 60 dies és discutida (Berger i col·l., 1996; Pérez-Llano i col·l., 2001).

La valoració de la motilitat espermàtica es pot dur a terme tant de manera objectiva com subjectiva. En els treballs que constitueixen aquesta tesi doctoral, l'avaluació de la motilitat espermàtica s'ha dut a terme de manera objectiva, quantitativa i qualitativa, i s'han determinat els percentatges d'espermatozoides immòbils o estàtics i els d'espermatozoides mòbils, dins dels quals s'han distingit els que presentaven motilitat progressiva de la resta (WHO, 2000).

En els darrers anys s'ha estès l'ús de sistemes computeritzats per a l'anàlisi dels paràmetres clàssics de l'espermograma. Així, els sistemes CASA (*computer-assisted semen analysis*) ofereixen més precisió i més objectivitat que les anàlisis clàssiques convencionals, així com una reducció significativa del temps esmerçat a dur a terme aquesta anàlisi (WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002).

Tanmateix, i molt especialment per a l'anàlisi del semen porcí, cal tenir en compte que els espermatozoides d'aquesta espècie perden fàcilment la seva motilitat quan la temperatura disminueix o quan són sotmesos a manipulacions, com les centrifugacions a velocitats lleugerament baixes, per més petites que aquestes siguin. Encara que per resoldre aquest problema i induir la recuperació de la motilitat es pot incubar la mostra durant 15-20 min a 37°C (Briz, 1994) o estimular-la mitjançant l'addició de diferents compostos (com la cafeïna, Vázquez i col·l., 1985), la variabilitat inter- i, àdhuc, intragrups és molt elevada. En els darrers anys s'han dut a terme diferents estudis que analitzen l'estructura de les ejaculacions mitjançant l'anàlisi de les subpoblacions que els constitueixen. En aquests estudis, l'anàlisi de conglomerats de la motilitat espermàtica té un paper fonamental (Abaigar i col·l., 1999; Quintero-Moreno i col·l., 2004; Satake i col·l., 2006).

### 3.3. Morfologia espermàtica

L'avaluació de les característiques morfològiques i, especialment, de les anomalies dels espermatozoides representa una part molt important de l'anàlisi seminal. Per a la majoria d'investigadors, la morfologia espermàtica és un bon indicador de la fertilitat del mascle (Kruger i col·l., 1986, 1988; Jouannet i col·l., 1988; Oehninger i col·l., 1988, 1990; Boyle i col·l., 1992; Ombelet i col·l., 1995; Bonde i col·l., 1998; Martínez i col·l., 2000; Rigau i col·l., 2001; Alm i col·l., 2006).

Mitjançant l'examen microscòpic es poden determinar els percentatges d'espermatozoides madurs, d'espermatozoides immadurs i d'espermatozoides amb morfologia aberrant. Alguns autors han establert una freqüència llindar d'espermatozoides madurs del 75-80 % per a l'anàlisi de la morfologia espermàtica del semen fresc en condicions normals (Briz, 1994; Bonet i col·l., 1995, 2000; Pinart, 1998a; Pinart i col·l., 1998b; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002).

Quan el percentatge d'espermatozoides immadurs és elevat, a saber, igual o superior al 30 %, se suposa que hi ha alguna disfunció epididimària, generalment provocada per l'absència de la maduració dels espermatozoides al llarg del conducte epididimari, que és conseqüència, al seu torn, d'un trànsit excessivament ràpid dels espermatozoides pel conducte epididimari. De fet, aquesta disfunció és freqüent quan el ritme d'ejaculacions és massa elevat (Thibault i col·l., 1993; Pruneda i col·l., 2005).

D'altra banda, l'estudi de les formes aberrants que poden afectar el cap i/o la cua de l'espermatozoide té un interès especial. Segons quin sigui el seu origen, es distingeix entre les malformacions primàries, quan s'han produït al testicle durant l'espermatogènesi i l'espermioogènesi, i les malformacions secundàries, quan s'han produït a l'epidídim durant els processos de maduració (Bonet i col·l., 1995).

En funció de l'estructura afectada, es distingeix entre malformacions cefàliques i malformacions de la cua. Entre les malformacions cefàliques es distingeixen les de nombre (dos o tres caps), les de forma (caps triangulars, ovoïdals, piriformes...) i les de mida (macro- o microcefàlia). Entre les malformacions de la cua es distingeixen les de nombre (dues o tres cues), de longitud i de trajectòria (cua doblegada o enrotllada). Quan les formes aberrants superen el 50 %, es parla de teratozoospermia (OMS, 1999; WHO, 2000).

### **3.4. Aglutinació espermàtica**

S'entén per *aglutinació espermàtica* la presència de grups d'espermatozoides, habitualment units pels seus caps o les seves cues. En condicions normals, l'aglutinació espermàtica sol ser pràcticament inexistent i un augment considerable de la seva freqüència pot suggerir una causa immunològica de la infertilitat. Se sap que tant l'augment dels cations bivalents o trivalents al plasma seminal com la refrigeració excessivament llarga de les dosis seminals indueixen l'aglutinació (Sánchez, 1991; Yeste i col·l., 2007a).

# Capítol II

---

## Determinació dels paràmetres espermàtics

### **1 Anàlisi de la viabilitat espermàtica**

1.1 Anàlisi de la viabilitat espermàtica (SYBR-14/EthD-1)

1.2 Anàlisi de la viabilitat espermàtica i integritat de la beina mitocondrial i l'acrosoma (mètode del triple marcatge)

### **2 Anàlisi de la capacitació espermàtica**

### **3 Anàlisi de la motilitat i la concentració espermàtiques**

### **4 Anàlisi de la morfologia espermàtica**

### **5 Anàlisi de l'aglutinació espermàtica**

### **6 Anàlisi del percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat per contrast de fase**

### **7 Test de resistència osmòtica (ORT)**



---

# Determinació dels paràmetres espermàtics

---

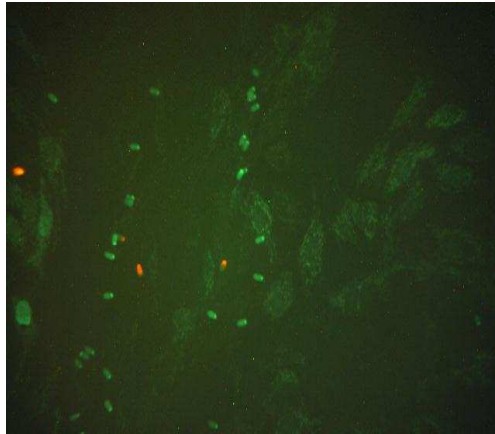
Els paràmetres espermàtics que s'han analitzat en els diferents estudis (capítol III i articles 4 i 6 del capítol IV) han estat: la viabilitat, valorada amb dos mètodes diferents, la capacitat, la motilitat, la concentració, la morfologia i l'aglutinació espermàtiques i la resistència osmòtica dels espermatozoides.

## 1. Anàlisi de la viabilitat espermàtica

### 1.1. Anàlisi de la viabilitat espermàtica (SYBR-14/EthD-1)

L'anàlisi de la viabilitat espermàtica en alguns experiments de cocultiu (capítol IV; articles 4 i 6) es va a dur a terme mitjançant el doble marcatge amb els fluorocroms SYBR-14 i homodímer d'etidi (EthD-1), ambdós adquirits a Molecular Probes (Molecular Probes<sup>®</sup> Inc., Eugene, Oregon, Estats Units). Com a pas previ al marcatge, es va preparar una solució de treball de SYBR-14 (concentració final: 100 nM) i EthD-1 (concentració final: 2 µM) en una relació 10:1.

En una alíquota que contenia 1 ml de mostra s'hi van afegir 11 µl de la solució de treball SYBR-14/EthD-1 i es va incubar durant 15 minuts a 37,5°C. Posteriorment, un gota de la mostra amb els espermatozoides marcats es va dipositar sobre un portaobjectes i es va cobrir amb un cobreobjectes, i es va observar utilitzant dos microscopis d'epifluorescència: Leica DMLR-XA (Leica, Wetzlar, Alemanya), a l'article IV, i Axio Imager.Z1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanya), a l'article VI, a 400 augments en ambdós casos i mitjançant dos filtres: un filtre I3 (longitud d'ona d'excitació: 450-490 nm; longitud d'ona d'emissió: 515 nm) i un filtre N2.1 (longitud d'ona d'excitació: 515-560 nm; longitud d'ona d'emissió: 590 nm). Es van dur a terme tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun. Cada espermatozoide es va classificar en viable (fluorescència verda) o no viable (fluorescència vermella) (figura II-1).



**Figura II-1.** Viabilitat espermàtica (SYBR-14/EthD-1) a 200 augments.

## **1.2. Anàlisi de la viabilitat espermàtica, de l'estat de l'acrosoma i de la beina mitocondrial (mètode del triple marcatge)**

En pràcticament totes les anàlisis de viabilitat espermàtica, llevat de l'anàlisi de la viabilitat en alguns experiments de cocultiu (vegeu els articles 4 i 6 del capítol IV), es va utilitzar el protocol de triple marcatge descrit per Bussalleu i col·laboradors (2005). Aquest mètode, que permet conèixer l'estat, íntegre o no, de tres compartiments —el nucli, l'acrosoma i la beina mitocondrial—, combina l'ús de quatre fluorocroms diferents: dos fluorocroms nuclears, la bisbenzimidida Hoescht 33258 DAPI (4'-6'-diamino-2-fenilindole) i el iodur de propidi (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint Louis, Missouri, Estats Units); una lectina (SBTI) conjugada a un fluorocrom (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) específica per a l'acrosoma i un fluorocrom específic per als mitocondris funcionals (MitoTracker<sup>®</sup>Green FM) (ambdós de Molecular Probes<sup>®</sup>).

El protocol que es va seguir va ser el descrit per Bussalleu i col·laboradors (2005)

### *a) Marcatge del nucli (Hoescht 33258 i IP)*

1. Afegiu 1  $\mu\text{l}$  de la solució de bisbenzimidida/Hoescht 33258 (5  $\mu\text{M}$ ) en un eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanya) de 2 ml que contingui 1 ml de mostra, i deixeu-ho incubar a 37°C durant 10 minuts. La concentració ha de ser d'uns  $25\text{-}75 \times 10^6$  espermatozoides· $\text{ml}^{-1}$ . Si la concentració de la mostra no s'ajusta a aquest rang un cop realitzades les dilucions pertinents, cal tornar a diluir.
2. Afegiu 10  $\mu\text{l}$  d'una solució de iodur de propidi (500  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) i incubeu-ho a 37°C durant 10 minuts.

3. Centrifugueu la mostra a  $400\times g$  durant 10 minuts i descarteu el sobrenedant.

*b) Marcatge de la beina mitocondrial i l'acrosoma (MitoTracker<sup>®</sup> Green FM i conjugat SBTI-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488)*

4. Resuspeneu el pèl·let restant amb una solució prèviament temperada a 37 C que contingui 1 ml d'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugat amb la SBTI (15  $\mu$ M) i 1 ml de Mitotracker<sup>®</sup> Green FM (100 nM).

5. Incubeu la solució preparada al pas anterior a 37 C durant 20 minuts.

6. Centrifugueu la mostra a  $400\times g$  durant 10 minuts i descarteu el sobrenedant.

7. Resuspeneu el pèl·let amb 1 ml de diluent BTS prèviament temperat a 37°C.

8. Guardeu-ho a 37°C fins al moment de l'observació.

9. Observeu-ho al microscopi òptic de fluorescència. Les mostres van ser observades amb un microscopi d'epifluorescència Leica DMR-XA (Leica, Wetzlar, Alemanya) amb un objectiu Leica 40x 1,32 HCX PL APO. Per fer l'observació es van utilitzar els tres filtres següents:

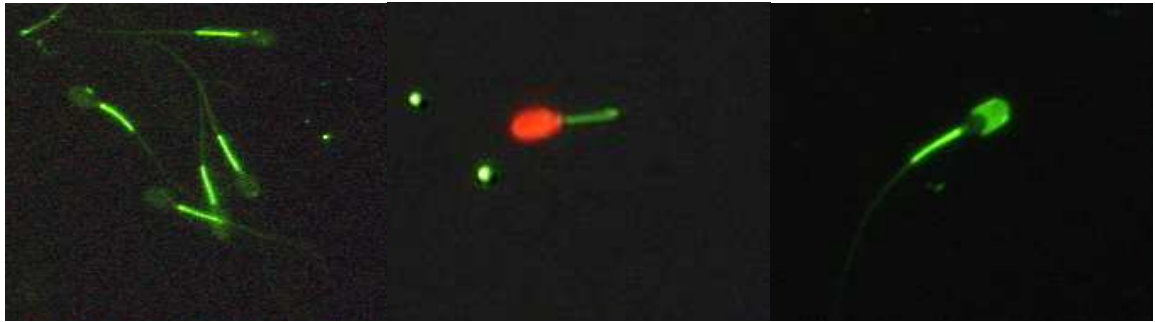
- **Filtre A (DAPI).** Permet l'observació dels espermatozoides viables (fluorescència blava), marcats amb bisbenzimidida (Hoescht 33258) (longitud d'ona d'excitació: 340-380 nm; longitud d'ona d'emissió: 425 nm) (figura II-2).



**Figura II-2.** Imatge del triple marcatge mitjançant el filtre A (DAPI) a 400 augments.

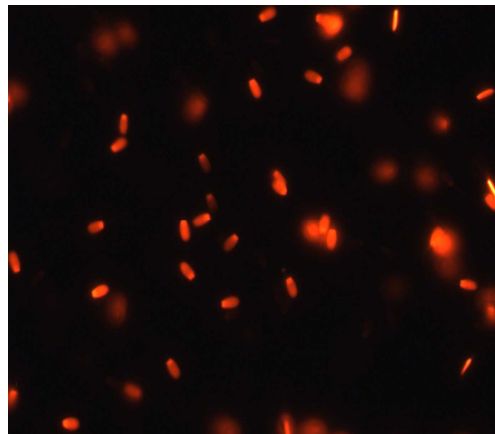
- **Filtre I3 (FITC).** Permet l'observació simultània de les mostres que presenten fluorescència verda, generada per la SBTI-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 i el MitoTracker<sup>®</sup> Green FM, així com una fluorescència dèbil emesa pel iodur de propidi i que correspon als espermatozoides no viables (longitud d'ona d'excitació: 450-490 nm; longitud d'ona d'emissió: 515 nm) (figura II-3).





**Figura II-3.** Imatges del triple marcatge obtingudes mitjançant el filtre I3 (FITC) a 400 augments.

- **Filtre N2.1 (rodamina).** Permet l'observació d'espermatozoides no viables (fluorescència vermella) marcats amb IP (longitud d'ona d'excitació: 515-560 nm; longitud d'ona d'emissió: 590 nm) (figura II-4).



**Figura II-4.** Imatge del triple marcatge obtinguda mitjançant el filtre N2.1 (rodamina) a 200 augments.

Després de l'observació, els espermatozoides es van classificar en vuit categories (taula II-1) d'acord amb la fluorescència emesa pels quatre fluorocroms. Tanmateix, en totes les anàlisis dutes a terme es va considerar com un espermatozoide totalment viable (VB) el que presentava intacte el nucli, la beina mitocondrial i l'acrosoma. En els casos en què un espermatozoide presentava almenys algun compartiment malmès, es va considerar no viable.

## 2. Anàlisi de la capacitat espermàtica

El doble marcatge amb clorotetraciclina (CTC) (Ward i Storey, 1984) i homodímer d'etidi (EthD-1; Molecular Probes<sup>®</sup>) va ser el mètode emprat per a l'anàlisi de la capacitat

espermàtica, d'acord amb el protocol descrit per Wang i col·laboradors (1995) i Mattioli i col·laboradors, i ajustat a l'espermatozoide de porcí per Fazeli i col·laboradors (1999) i Funahashi (2002). En primer lloc, es va preparar una solució de treball que contenia CTC (750 mM) (Sigma-Aldrich®), D, L-cisteïna (5 mM) (Sigma-Aldrich®) i també Tris-NaCl (20 mM). Aquesta solució, ajustada a pH 7,8, va ser filtrada emprant filtres (Millipore Corp., Espanya) que tenien un diàmetre de porus de 0,22 µm.

Fluorescència			Tipologia
Nucli	Beina mitocondrial	Acrosoma	
Blava	Verda	Verda	Espermatozoide viable amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes (VB).
	Verda	No marcat Glòbul verd escampat	Espermatozoide viable amb la beina mitocondrial intacta i l'acrosoma alterat.
	No marcat	Verda	Espermatozoide viable amb la beina mitocondrial alterada i l'acrosoma intacte.
Vermella	Verda	Verda	Espermatozoide no viable amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes.
	Verda	No marcat Glòbul verd escampat	Espermatozoide no viable amb la beina mitocondrial intacta i l'acrosoma alterat.
	No marcat	Verda	Espermatozoide no viable amb la beina mitocondrial alterada i l'acrosoma intacte.
	No marcat	No marcat Glòbul verd escampat	Espermatozoide no viable amb la beina mitocondrial i l'acrosoma alterats.

**Taula II-1.** Lectura del triple marcatge.

En un eppendorf que contenia 50 µl de semen s'hi van afegir 2 µl d'EthD-1 (Molecular Probes®) i la mostra es va incubar a 37°C durant 10 minuts. Posteriorment, s'hi van afegir 10 µl de la solució de treball CTC i, 2 minuts més tard, 10 µl de fixador (paraformaldehid al 2 % preparat amb PBS (*phosphate-buffered saline*)). Finalment, es van dipositar 5 µl de la mostra marcada en un portaobjectes i es va muntar amb medi de muntatge DABCO™ (que evita l'esmoreïment de la CTC) (Sigma-Aldrich®).

Els portaobjectes es van observar amb un microscopi d'epifluorescència (Leica DMLR-XA) amb font d'il·luminació a l'espectre blau-violeta (longitud d'ona d'excitació: 330-380 nm; longitud d'ona d'emissió: 420 nm) utilitzant un objectiu Leica A 40x 1,32 HCX PL APO i un filtre H3 (longitud d'ona d'excitació: 420-490 nm; longitud d'ona d'emissió: 515 nm). Per a cadascuna de les anàlisis es van recomptar 200 espermatozoides viables (EthD-1 negatius), diferenciant entre tres patrons de fluorescència possibles (Wang i col·l., 1995) (vegeu la taula II-2).

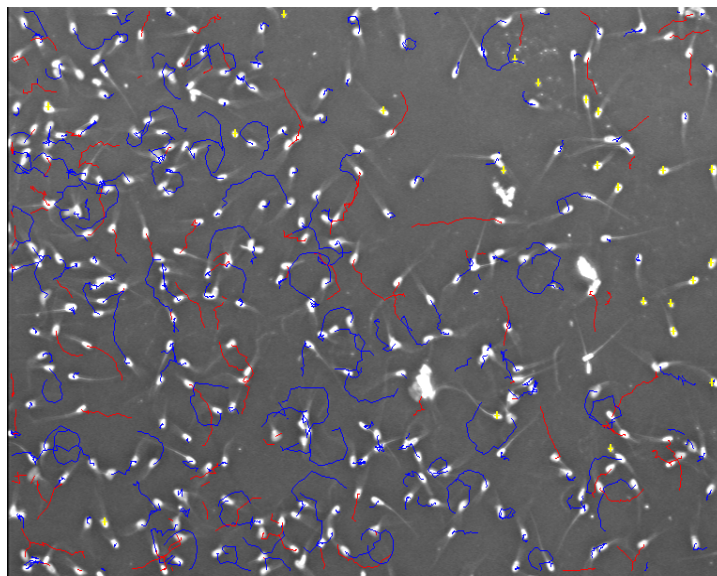
Abreviació	Estat	Descripció
NC/F	Espermatozoides no capacitats	S'observa fluorescència uniforme a tot el cap.
C/B	Espermatozoides capacitats	S'observa una banda no fluorescent a la regió postacrosòmica
AR	Espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat	No s'observa fluorescència al cap o bé s'observa una fina banda fluorescent al segment equatorial.

**Taula II-2.** Lectura de la capacitat espermatòica.

### 3. Anàlisi de la motilitat i la concentració espermàtiques

La motilitat i la concentració espermàtiques es van valorar mitjançant un sistema computeritzat o sistema CASA (*computer assisted sperm analyzer*), que consisteix en un microscopi òptic de contrast de fases (Olympus BX41) amb una platina calefactora incorporada (ajustada a 37°C), un *hardware* i un *software* (Sperm Class Analyzer Software, Microptic SL, Barcelona) compost per dos programes mòdul diferents (SCA<sup>®</sup> Production 2002 i SCA<sup>®</sup> Motility Module). Aquest sistema computeritzat permet una anàlisi més objectiva de la motilitat i la concentració espermàtiques.

Per dur a terme l'assaig, 15 µl de mostra, prèviament temperada, es van dipositar en una cambra de Makler (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) també temperada a 37°C. L'observació es va realitzar mitjançant un objectiu Olympus 10x 0,30 PLAN (contrast de fases negatives). Per a cadascuna de les mostres, es van recomptar uns 1.000 espermatozoides, capturant el nombre de camps necessaris per assolir aquest nombre (figura II-5).



**Figura II-5.** Imatge de la motilitat espermàtica obtinguda mitjançant el sistema SCA<sup>®</sup> 2002 a 100 augments.

A l'article 3 del capítol III (sobre la resistència dels espermatozoides als canvis osmòtics i la correlació d'aquest paràmetre amb la fertilitat), la motilitat es va valorar mitjançant el *software* SCA<sup>®</sup> Production 2002, que únicament proporcionava les freqüències d'espermatozoides amb motilitat total (MOT), amb motilitat progressiva (PMOT) i d'espermatozoides estàtics o immòbils (EST) (taula II-3).

<b>Tipus de moviment</b>	
Immòbils	Estàtics
Mòbils	No progressius
	Progressius (trajectòria lineal)

**Taula II-3.** Classificació de la motilitat espermàtica.

En canvi, en els articles 1, 2 i 4, llevat de l'estudi dels espermatozoides units a les OEC en cultiu (article 4), la motilitat espermàtica es va valorar mitjançant el *software* SCA<sup>®</sup> Motility Module. Aquest programa informàtic proporciona més informació sobre la motilitat i la velocitat espermàtiques que el mòdul de producció. Així, després d'observar la mostra tal com s'ha descrit prèviament, s'obtenen els percentatges d'espermatozoides MOT, PMOT i EST, però també els valors dels paràmetres cinètics de la taula II-4 (d'acord amb els llistats establerts a les taules II-5 i II-6) (Abaigar i col·l., 1999; Verstegen i col·l., 2002; Maes i col·l., 2003).

Abreviació	Paràmetre	Unitats	Descripció
VSL	Velocitat de progressió lineal ( <i>straight line velocity</i> )	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	És la velocitat mitjana en línia recta des de la primera fins a l'última posició detectada del cap.
VAP	Velocitat segons el trajecte mitjà ( <i>average path velocity</i> )	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	És la velocitat mitjana de desplaçament de l'espermatozoide seguint la mitjana del trajecte.
VCL	Velocitat curvilínia ( <i>curvilinear velocity</i> )	$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	És la velocitat mitjana de desplaçament de l'espermatozoide a través de la seva trajectòria real, tal com s'observa en dues dimensions al microscopi.
ALH	Amplitud del desplaçament lateral del cap ( <i>amplitude of lateral head displacement</i> )	$\mu\text{m}$	Representa l'amplitud de gir lateral del cap respecte de la peça intermèdia o mitoncondrial.
BCF	Freqüència de batec de la cua ( <i>beat cross frequency</i> )	Hz	
LIN	Percentatge de linealitat ( <i>percentage of linearity</i> )	%	VSL/VCL
STR	Percentatge de rectitud ( <i>percentage of straightness</i> )	%	VSL/VAP
WOB	Percentatge d'oscil·lació ( <i>motility parameter wobble</i> )	%	

**Taula II-4.** Paràmetres de la velocitat espermàtica.

Paràmetre	Mínim	Màxim
VSL	$1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$500 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
VAP	$1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$500 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
VCL	$1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$500 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
ALH	$0 \mu\text{m}$	$100 \mu\text{m}$
BCF	$0 \text{ Hz}$	$100 \text{ Hz}$
LIN	10%	98%
STR	10%	98%
WOB	10%	98%

**Taula II-5.** Restriccions dels paràmetres cinètics per a l'anàlisi de la motilitat espermàtica.

Mitjançant el mòdul de motilitat i sobre la base de la classificació feta per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (WHO, 2000), la població espermàtica total es pot subdividir en

quatre categories, d'acord amb el *low VAP cut-off* (LVV) i el *medium VAP cut-off* (MVV) (taula II-7).

Paràmetre	Valor llindar
Freqüència de camp	60 Hz
Camps adquirits	25
Contrast mínim	18 píxels
Mida mínima de la cèl·lula	10 $\mu\text{m}^2$
Intensitat mínima de consideració	0.5
Intensitat màxima de consideració	2.5
Mida mínima de consideració	0.65
Mida màxima de consideració	2.6
Elongació mínima	10
Elongació màxima	100
<i>Característiques dels espermatozoides amb motilitat progressiva</i>	
VAP <i>cut-off</i>	> 45 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
STR	> 45%
Mida de la cèl·lula	9 píxels
Intensitat	125
<i>Característiques dels espermatozoides amb motilitat lenta</i>	
VSL <i>cut-off</i>	10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
VAP <i>cut-off</i>	25 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$

**Taula II-6.** Llindars establerts al sistema CASA per a l'anàlisi de la motilitat espermàtica.

Subpoblació espermàtica	Relació de VAP
Espermatozoides amb velocitat ràpida	VAP > MVV
Espermatozoides amb velocitat mitjana	LVV < VAP < MVV
Espermatozoides amb velocitat baixa	VAP < LVV
Espermatozoides estàtics	Són les cèl·lules que no s'estan movent durant l'anàlisi

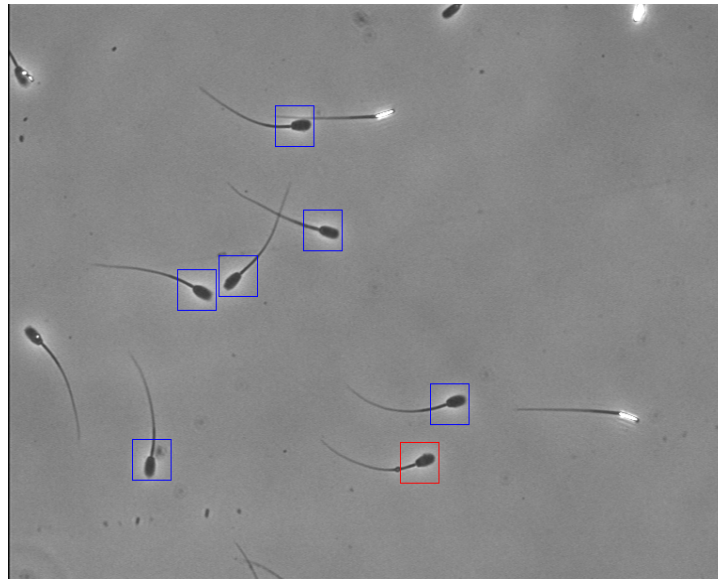
**Taula II-7.** Subpoblacions espermàtiques segons la VAP.

#### 4. Anàlisi de la morfologia espermàtica

La morfologia espermàtica es va analitzar mitjançant la deposició de 5  $\mu\text{l}$  de mostra seminal en un portaobjectes, posteriorment muntat amb un cobreobjectes. Abans de dur a terme

l'anàlisi de la morfologia, les mostres es van incubar durant 30 minuts a 25°C i 100 % d'humitat, per immobilitzar els espermatozoides.

Es va utilitzar el sistema CASA, equipat amb el microscopi Olympus BX41, emprant en aquest cas únicament el mòdul de producció (SCA<sup>®</sup> Production 2002; Microptic, SL, Barcelona). Les mostres es van observar amb un objectiu Olympus 20x 0,40 PLAN, de contrast de fases positives (figura II-6).



**Figura II-6.** Imatge de la morfologia espermàtica obtinguda amb el sistema SCA<sup>®</sup> producció 2002 a 200 augments.

La morfologia espermàtica es va avaluar subjectivament fent tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun i diferenciant entre espermatozoides madurs (MR), espermatozoides immadurs o espermatozoides amb morfologia aberrant (taula II-8) (Bonet, 1990; Bonet i Briz, 1991; Briz, 1994; Bonet i col·l., 1995, 2000; Pinart, 1997; Pinart i col·l., 1998; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002; Verstegen et al., 2002).

## 5. Anàlisi de l'aglutinació espermàtica

Per a l'aglutinació espermàtica es van dipositar 5 µl de mostra i un cobreobjectes sobre un portaobjectes i es va incubar durant 30 minuts a 25°C i humitat relativa del 100 % per immobilitzar els espermatozoides.

Per a cadascuna de les anàlisis, es van fer tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun i es van distingir els espermatozoides aglutinats (és a dir, aquells units a d'altres espermatozoides pel cap o la cua) i els no aglutinats (cèl·lules lliures) (Harayama i col·l., 1994; Harayama i col·l., 2003) (vegeu la taula II-8). Les observacions es van realitzar amb un microscopi òptic de contrast de fases (Olympus BX41) amb l'objectiu Olympus 20x 0,40 PLAN (de contrast de fases positives).

<b>Espermatozoide</b>	<b>Classificació</b>
Madur	Normal
Espermatozoides immadurs	Espermatozoides amb gota proximal
	Espermatozoides amb gota medial
Aberracions morfològiques del cap	Forma/mida cap
	Cap isolat
Aberracions morfològiques de la cua	Cua doblegada per la peça de connexió
	Cua doblegada per la peça intermèdia
	Cua doblegada per l'anell de Jensen
	Cua enrotllada
Altres anomalies	Altres tipus d'aberracions

**Taula II-8.** Classificació de la morfologia espermàtica.

## **6. Anàlisi del percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma intacte per contrast de fase**

El percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma intacte (article III) es va determinar subjectivament mitjançant un microscopi òptic de contrast de fases (Olympus BX41) amb l'objectiu Olympus 40x 0,65 PLAN (fases positives). Es van dipositar 5 µl de mostra en un portaobjectes i es va incubar durant 30 minuts a 25°C i humitat relativa del 100 % per immobilitzar els espermatozoides.

En cada cas es van fer dos recomptes de 100 espermatozoides cadascun. Els espermatozoides es van classificar en dues categories segons que presentessin l'acrosoma intacte o el tinguessin reaccionat.



## 7. Anàlisi de la resistència osmòtica (ORT)

La resistència osmòtica dels espermatozoides es va assajar mitjançant el test descrit per Schilling (1986) i modificat per Rodríguez-Gil i Rigau (1995). Per dur a terme l'anàlisi, es van dipositar 100 µl de mostra en dos tubs d'Eppendorf. Posteriorment, s'hi van afegir 900 µl d'una solució hipotònica de citrat de sodi a l'1 % (w/v) ajustada a pH 7,4 (pressió osmòtica:  $102 \pm 5$  mOsm·kg<sup>-1</sup>) a un dels tubs i, a l'altre, s'hi van afegir 900 µl d'una solució isotònica de citrat de sodi al 3,2 % (w/v) ajustada al mateix pH que l'anterior (pressió osmòtica:  $305 \pm 7$  mOsm·kg<sup>-1</sup>). Ambdós després van ser incubats a 37°C durant una hora.

Les mostres aleshores es van tenyir mitjançant el mètode de l'eosina-nigrosina (Rodríguez-Gil i Rigau, 1994; Rodríguez-Gil i col·l., 2006) i es van fer tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun, tenint en compte la viabilitat i el percentatge d'acrosomes alterats (AR). El percentatge de resistència osmòtica es va calcular aplicant la fórmula descrita per Sánchez (1991).

$$ORT = 100 - \frac{AR_{isotònic} + AR_{hipotònic}}{2}$$

# Capítol III

---

## Comportament dels espermatozoides de porcí a 15-17°C

### **1. Introducció**

1.1. Els diluents de refrigeració i la inseminació artificial

1.2. Millora de les dosis seminals

1.3. Conceptes sobre l'osmolaritat

### **2. Objectius**

### **3. Discussió general**

### **4. Conclusions**



# Capítol III. Comportament dels espermatozoides de porcí a 15-17°C

---

## 1. Introducció

### 1.1. Diluents i inseminació artificial

1.1.1. Conceptes generals

1.1.2. Funcions i composició del diluent

1.1.3. Tipus de diluents: refrigeració i congelació

1.1.4. La inseminació artificial

### 1.2. Millora de les dosis seminals

1.2.1. Conceptes generals

1.2.2. La prostaglandina  $F_{2\alpha}$

1.2.3. L'àcid hialurònic

1.2.4. La cafeïna

### 1.3. Conceptes sobre l'osmolaritat

1.3.1. Osmosi, pressió osmòtica i membranes biològiques

1.3.2. Osmolalitat i molalitat

1.3.3. Solucions isotòniques, hipotòniques i hipertòniques

1.3.4. La resistència osmòtica dels espermatozoides

1.3.5. L'efecte de l'estrès osmòtic en els espermatozoides



---

# 1. Introducció

---

## 1.1. Diluents i inseminació artificial

### 1.1.1. Conceptes generals dels diluents

El diluent es defineix com la solució aquosa que permet augmentar el volum de l'ejaculació fins a assolir la necessària per distribuir les dosis seminals, preservar les característiques funcionals dels espermatozoides i mantenir un nivell de fertilitat adequat.

Els espermatozoides es troben al plasma seminal, que subministra els nutrients necessaris per mantenir l'elevada activitat metabòlica adequada per transportar els espermatozoides a través del tracte genital femení. Des dels primers estudis sobre la conservació del semen porcí se sap que, en l'ejaculació, aquesta activitat metabòlica només pot mantenir-se durant un període de temps molt limitat. Per conservar els espermatozoides durant períodes prolongats és necessari que es redueixi l'activitat metabòlica dels espermatozoides, mitjançant la dilució en un medi adequat i la reducció de la temperatura de conservació.

Les característiques fisicoquímiques de l'espermatozoide porcí fan que aquest sigui molt sensible al xoc per fred (Pursel i col·l., 1973), la qual cosa provoca una alteració de la viabilitat espermàtica. Més concretament, la composició lipídica de les seves membranes sembla la responsable d'aquest fenomen. Així, quan es redueix la temperatura, els moviments laterals dels fosfolípids que constitueixen la membrana es redueixen i es produeixen separacions de fases lipídiques, situació associada a alteracions irreversibles de les proteïnes de les membranes. Tot això fa que s'alteri la funcionalitat de la membrana espermàtica i la viabilitat cel·lular queda compromesa (White, 1993). Aquesta susceptibilitat al xoc per fred implica que les mostres seminals s'hagin de conservar a 15-20°C, atès que una reducció en la temperatura d'emmagatzemament limita la viabilitat de les mostres seminals (Paulenz i col·l., 2000, 2002; Kommisrud i col·l., 2002).

La conservació a aquestes temperatures lleugerament reduïdes limita la capacitat d'emmagatzemament de les mostres, d'una banda, perquè no es pot reduir el metabolisme cel·lular i, de l'altra, perquè no es poden controlar les condicions microbiològiques amb la mateixa efectivitat que les temperatures inferiors (5°C).

D'altra banda, l'efecte de la dilució comporta que determinats compostos presents en el plasma seminal estiguin en concentracions molt baixes en el semen diluït i alterin la viabilitat espermàtica, com passa per exemple amb la reducció de la concentració de l'ió potassi (K<sup>+</sup>) (Harrison i col·l., 1978) o de les proteïnes plasmàtiques. Aquestes pèrdues necessàriament s'han de compensar amb una formulació adequada del diluent. Amb aquest objectiu, s'afegeix, per exemple, albúmina sèrica bovina (BSA), perquè s'ha demostrat que l'addició d'aquesta substància estimula la motilitat (Waberski i col·l., 1989) i millora les taxes de fertilitat del semen preservat (Waberski i col·l., 1994).

### **1.1.2. Funcions i composició del diluent**

Per dur a terme la seva funció, el diluent ha d'aportar els nutrients necessaris per al manteniment metabòlic de l'espermatozoide (glucosa), la protecció respecte al xoc tèrmic per fred (BSA), el control del pH del medi (bicarbonat, Tris, HEPES) i de la pressió osmòtica (NaCl, KCl) i la inhibició del desenvolupament microbià (antibiòtics).

#### 1.1.2.1. Nutrients

L'espermatozoide té la capacitat de produir l'energia necessària per mantenir el seu metabolisme cel·lular i generar el moviment del flagel, principalment a través de les vies glucolítiques. Aquests processos es desenvolupen als mitocondris, localitzats a la peça intermèdia de l'espermatozoide. La font d'energia emprada amb més freqüència en la composició dels diluents és la glucosa, encara que se n'han utilitzat d'altres (com la galactosa, la ribosa o la trehalosa) sense que els resultats hagin superat la glucosa (Gadea, 2003).

#### 1.1.2.2. Regulació del pH

El pH del semen immediatament després de l'ejaculació es troba al voltant de  $7,4 \pm 0,2$ , de manera similar a d'altres fluids orgànics, i quan es redueix aquest pH es redueix, al mateix

temps, el metabolisme energètic de l'espermatozoide i la seva motilitat. El metabolisme glucolític que du a terme l'espermatozoide (en el qual la glucosa és el glúcid) fa que el pH intracel·lular disminueixi i el metabolisme cel·lular quedi reduït. L'àcid làctic és el principal metabòlit d'aquest procés i la seva anàlisi bioquímica ha estat utilitzada com a índex de la qualitat seminal (Rigau i col·l., 1996).

L'addició d'agents amortidors ajuden, per tant, a controlar el pH del medi. Entre els tampons més simples es troben el bicarbonat i el citrat de sodi. Ambdós presenten una capacitat amortidora limitada, mentre que altres sistemes més complexos (com el Tes, l'Hepes, el Mops o el Tris) poden regular el pH en un rang més ampli i alguns no són dependents de la temperatura (Mops i Hepes).

El pH dels diluents comercials de refrigeració oscil·la, habitualment, entre 6,8 i 7,2, però cal tenir en compte que el pH d'aquests medis no s'estabilitza fins que han transcorregut uns 90 minuts de l'inici de la dilució amb aigua i que els diferents diluents presenten un patró diferent de canvi del seu pH al llarg del temps (Newth i Levis, 1999). Amb tot, s'han de prendre les mesures oportunes durant la preparació dels diluents abans de fer-los servir, per evitar així problemes en el procés de conservació.

### 1.1.2.3. Pressió osmòtica

La pressió osmòtica és un factor que varia entre els diferents tipus de diluents comercials de refrigeració, de manera que aquesta es troba dins del rang que l'espermatozoide porcí és capaç de tolerar (és a dir, entre 240 i 380 mOsm·kg<sup>-1</sup>). Diversos estudis han avaluat la tolerància dels espermatozoides a diverses pressions osmòtiques, i s'ha arribat a la conclusió que ni la motilitat ni la viabilitat espermàtiques no queden afectades per la pressió osmòtica en rangs compresos entre 250 i 390 mOsm·kg<sup>-1</sup> (Fraser i col·l., 2001). En canvi, quan l'osmolalitat es redueix per sota de 200 mOsm·kg<sup>-1</sup> es detecta una reducció significativa de la motilitat espermàtica (Gilmore i col·l., 1996; Fraser i col·l., 2001).

En qualsevol cas, els diluents isotònics (300 mOsm·kg<sup>-1</sup>) o lleugerament hipertònics són els que millors resultats han donat en la comercialització de dosis seminals refrigerades i destinades a inseminació artificial. Per regular la pressió osmòtica s'utilitzen principalment sals haloïdals com el clorur de sodi (NaCl) i el clorur de potassi (KCl).



#### 1.1.2.4. Antibiótics

Els antibiòtics s'afegeixen per controlar el creixement microbià en el diluent, perquè tant els components que el constitueixen (com la glucosa) com la temperatura a la qual es conserven les dosis seminals (15°C) permeten el creixement de la majoria de bacteris gramnegatius, com *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* i *Pseudomonas sp.*

Aquesta contaminació bacteriana produeix, principalment, una sèrie d'alteracions, entre les quals es troben una disminució de la motilitat, un augment de les aglutinacions espermàtiques i del percentatge d'acrosomes alterats i una reducció del pH fins a nivells àcids (entre 5,7 i 6,4) (Althouse i col·l., 2000). Tot plegat comporta una reducció del temps de conservació de les dosis seminals refrigerades.

#### **1.1.3. Tipus de diluents: refrigeració i congelació**

Pel que fa als tipus de diluent, cal diferenciar els que s'utilitzen per a semen refrigerat i els que s'utilitzen per a semen congelat.

Els diluents per a semen refrigerat es classifiquen en dos grans grups: els que tenen com a objectiu la conservació a curt termini (*short-term storage*: d'un a tres dies) i els que tenen com a objectiu la conservació a llarg termini (*long-term storage*: més de quatre dies). Els primers s'utilitzen principalment en estructures de distribució de les dosis seminals a curta distància (pròpies dels sistemes europeus, on la producció de dosis seminals en la mateixa granja és freqüent), mentre que els de llarg termini són propis d'estructures com les dels Estats Units o Noruega, on la distància entre el lloc d'obtenció de la dosi seminal i el lloc d'inseminació és molt gran.

Malauradament, no es coneix la composició quantitativa d'ambdós tipus de diluents, atès que aquesta està protegida per raons comercials, encara que sí que es coneixen alguns dels seus components bàsics, com ara els monosacàrids (la glucosa i la fructosa), les sals inorgàniques (com el clorur de sodi), les sals orgàniques (com el citrat de sodi), els agents quelants (com l'EDTA), les proteïnes (com l'albumina sèrica bovina) i els antibiòtics (com la kanamicina).

Respecte als diluents de congelació, aquests es basen en la utilització de rovell d'ou i de glicerol com a agents crioprotectors, en una elevada concentració de glúcids, en la presència de sistemes amortidors o tampons (com el Tris) i en l'addició d'un agent detergent (Royere i

col·l., 1996; Gadea, 2003). D'acord amb la formulació d'aquests diluents, el mètode bàsic de congelació del semen es desenvolupa en dues etapes: una de prèvia de refredament i una de posterior de congelació pròpiament dita (Eriksson i Rodríguez-Martínez, 2000).

#### **1.1.4. La inseminació artificial**

La primera inseminació artificial (IA) en porcí la va dur a terme Ivanow a la Rússia dels primers anys del segle passat (Ivanow, 1907 i 1922). Posteriorment, el seu ús es va estendre durant la dècada dels anys trenta a les granges estatals russes (Rodin i Lipatov, 1935; Milovanow, 1938) i, uns anys més tard, va arribar a altres països, com els Estats Units (Mckenzie, 1931) o el Japó (Ito, 1948). Aquesta tècnica va ser introduïda al sector porcí del Regne Unit gràcies als treballs desenvolupats per Polge (1956), perquè l'aplicació d'aquesta tècnica tenia l'avantatge que aprofitava el potencial genètic dels millors mascles reproductors porcíns en un gran nombre de truges reproductores, cosa que facilitava la millora genètica.

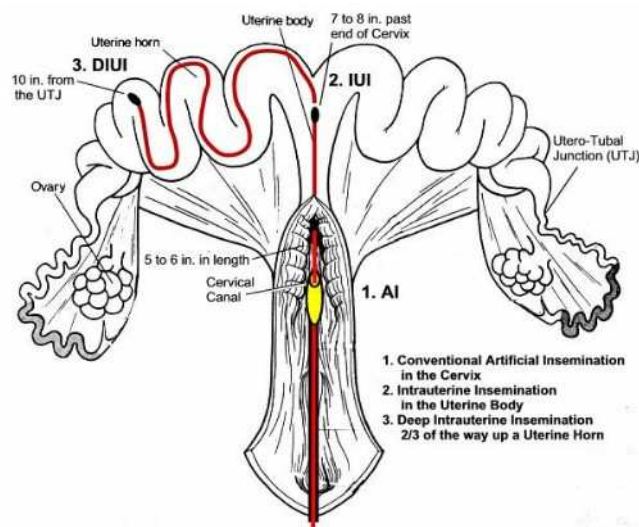
Però no va ser fins a principis dels anys vuitanta que la inseminació artificial es va generalitzar en l'àmbit comercial (Crabo, 1990; Johnson i col·l. 2000), quan es van estandarditzar els protocols d'inseminació. Òbviament, en aquesta evolució de pràcticament un segle s'han desenvolupat sistemes de recollida i preparació de dosis i s'han millorat també tots els protocols d'inseminació en condicions comercials.

Actualment, la inseminació artificial porcina amb semen fresc i refrigerat és una tècnica reproductiva d'àmplia aplicació al primer món, encara que el grau d'utilització en els diferents països és molt variable. Als països europeus en general l'aplicació de la inseminació artificial és molt elevada: assoleix percentatges superiors al 80 % en alguns països (Espanya, França, Alemanya, Holanda, Noruega, Finlàndia...), mentre que, al contrari, als Estats Units la freqüència d'ús de la inseminació artificial és encara reduït (de prop del 50 %), per bé que en els darrers anys s'hagi produït un increment molt destacable. Segons les últimes estimacions, al món es duen a terme uns 19 milions d'inseminacions, la pràctica totalitat de les quals (99 %) es realitza amb semen refrigerat a 15-20°C (Johnson i col·l., 2000). D'aquestes inseminacions, més del 85 % es duen a terme el mateix dia de recollida o l'endemà. Entre els factors que han afavorit el desenvolupament d'aquesta tècnica es troben els avantatges en la disseminació potencial del millor fenotip del mascle reproductor porcí i el fet que els resultats

obtinguts amb aquesta tècnica igualen o fins i tot milloren els obtinguts en sistemes amb munta natural.

El semen congelat, en canvi, es troba lluny d'ocupar un lloc destacat en el desenvolupament d'aquesta biotecnologia, atès que s'obtenen baixos nivells de fertilitat quan s'utilitza semen descongelat, respecte a quan s'utilitza semen refrigerat.

Una de les línies de recerca més aplicades i que més interès té per al sector productiu és l'optimització de les ejaculacions a partir de modificacions de la inseminació artificial convencional, que permeten reduir el volum i la concentració de les dosis seminals. Així, amb l'ús de catèters adequats, s'assagen la IA tradicional o cervical, la postcervical, la intrauterina i la intrauterina profunda (o cornual) (Ekwall i col·l., 1996) (figura III-1).



**Figura III-1.** Diagrama del tracte genital femení de la truja, en el qual es mostren tres tipus diferents d'inseminació artificial segons el lloc en el qual es disposen els espermatozoides (Belstra, 2002).

Entre aquestes variants de la tècnica convencional, la inseminació intrauterina profunda disposa els espermatozoides molt a prop de la regió uterotubàrica, la qual cosa representa un avantatge per al mètode, ja que amb el mètode convencional els espermatozoides que es troben a l'interior de l'úter han d'arribar a aquesta regió, de manera que se'n perd un nombre considerable. Amb el mètode de la inseminació artificial intrauterina profunda, en canvi, la població que pot colonitzar l'oviducte és considerablement superior a la que hi hauria en el cas que es practiqués el mètode convencional, de manera que el nombre d'espermatozoides que tindran les condicions per fecundar l'òocit serà molt més elevat i s'incrementaran de manera considerable les possibilitats d'èxit. Ultra millorar substancialment els resultats

obtinguts amb el mètode convencional, la inseminació intrauterina profunda permet reduir significativament la concentració i el volum de les dosis seminals utilitzades.

## 1.2. La millora de les dosis seminals

### 1.2.1. Conceptes generals

Actualment, la majoria de les inseminacions en la indústria porcina es duen a terme utilitzant dosis seminals refrigerades. Encara que diferents estudis (Colenbrander i col·l., 2003; Christensen i col·l., 2004) han demostrat que les característiques de l'ejaculació expliquen un percentatge de variació de la fertilitat (mesurada com a quocient del nombre de parts respecte del nombre de cobertes) inferior al 10 %, la utilització de dosis seminals d'elevada qualitat s'ha establert com a condició *sine qua non* (Correa i col·l., 1997; Vyt i col·l., 2004; Gillan i col·l., 2006). Per aquest motiu un dels àmbits que té un interès especial és l'estudi de la millora de dosis seminals i de la qualitat espermàtica de les ejaculacions de mascles que tenen una baixa qualitat seminal. L'addició de diferents substàncies al semen diluït i l'administració de fàrmacs per augmentar el transport espermàtic han demostrat efectivitat pel que fa a l'augment de l'eficàcia reproductiva (Traas i Kustritz, 2004). La millora dels diluents de refrigeració i de congelació-descongelació, mitjançant l'addició de diferents compostos, s'ha dut a terme tant en humà com en altres espècies d'animals domèstics (Barkay i col·l., 1984; Fattouh i col·l., 1991; López i col·l., 2000; Yeste i col·l., 2007a; Yeste i col·l., 2007b).

D'altra banda, hi ha un conjunt de tècniques que permeten la millora de la qualitat seminal, assajada en la majoria dels casos mitjançant la viabilitat, la motilitat i la morfologia espermàtiques. Dins d'aquests mètodes, utilitzats en alguns casos com a protocols de rentatge previs a la manipulació experimental de les dosis seminals (Petrunkina i col·l., 2003), es distingeixen:

- La **centrifugació amb gradients** continus o discontinus **de densitat**. Aquest gradient es pot formar a partir de diferents compostos. Els més comuns són el Percoll, el Ficoll o la BSA (Graham i Graham, 1990; Petrunkina i col·l., 2003).
- La **migració dels espermatozoides**, que permet la separació dels espermatozoides segons la seva motilitat. En aquest tipus de mètode, molt emprat en humans, es distingeixen bàsicament el *swim-up*, el *swim-down* i les seves variants (Georgiou i col·l., 1998)

- La **permeació per gel de les dosis seminals** a través de columnes que contenen matrius de naturalesa i càrrega elèctrica diversa (Sephadex, boletes i llana de vidre, Leucosorb) (Centola i col·l., 1998; Adiga i Kumar, 2001; Bussalleu i col·l., 2007) permet la retenció a la reïna dels espermatozoides no viables i amb morfologies aberrants.
- **L'addició de substàncies diferents a les dosis seminals diluïdes** i l'administració d'un bon nombre d'agents farmacològics, per incrementar la velocitat del transport espermàtic (Traas i Kustritz, 2004). La millora dels diluents de refrigeració i criopreservació mitjançant l'addició de substàncies diferents, com la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  o l'àcid hialurònic s'ha dut a terme tant en humà com en altres espècies d'animals domèstics (Barkay et al., 1984; Fattouh et al., 1991; Ponce et al., 1999; López et al., 2000; Yeste et al., 2007a; Yeste et al., 2007b).

### 1.2.2. La prostaglandina $F_{2\alpha}$

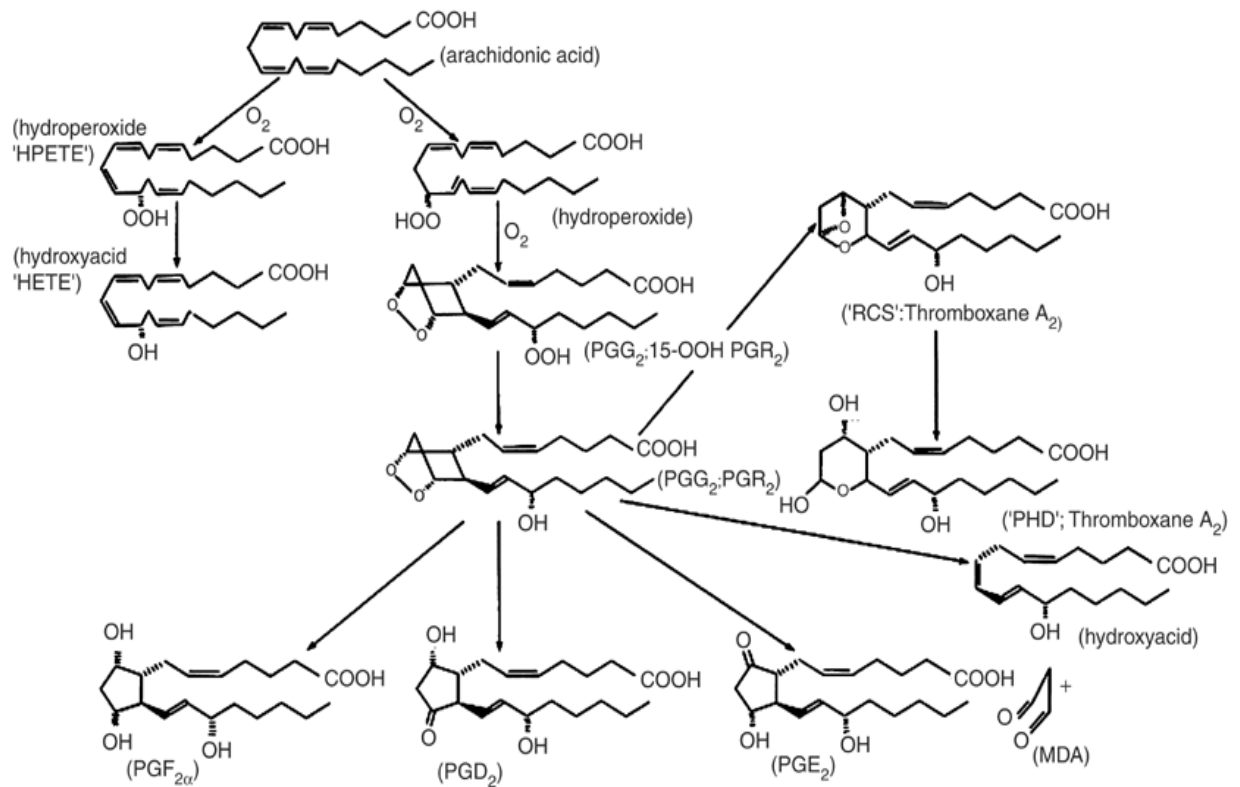
Les prostaglandines (PGs) són àcids grassos de 20 carbonis (icosanoides) i tenen un anell de ciclopentà en el seva estructura química. Es troben àmpliament distribuïts en els teixits dels vertebrats i tenen un paper important en un ampli ventall de processos fisiològics (Kingsley i col·l., 2005).

Les prostaglandines són produïdes a partir de la bisdioxigenació de l'àcid araquidònic (20:4), reacció en la qual s'obté com a producte l'hidroperoxi-endoperòxid ( $PGG_2$ ). Posteriorment, l'hidroperoxi-endoperòxid és reduït i s'obté l'hidroxil-endoperòxid ( $PGH_2$ ). Aquestes reaccions estan catalitzades per ciclooxigenases (figura III-2). L'hidroxil-endoperòxid és transformat després per diferents enzims a d'altres PG o al tromboxan  $A_2$  (Kingsley i col·l., 2005).

Les ciclooxigenases, que transformen l'àcid araquidònic a PG, es troben presents tant a l'esperma epididimària com a l'ejaculada dels mamífers. Estudis immunocitoquímics han permès la localització d'aquests enzims a la regió apical del cap, a la regió postacrosòmica i a la peça intermèdia de la cua (Shalev i col·l., 1994).

Les prostaglandines, que es troben presents al plasma seminal (Templeton i col·l., 1978) i al moc cervical (Charbonnel i col·l., 1982), poden ser sintetitzades per l'espermatozoide, tal com Roy i Ratnam (1992) han observat en humà. El paper que les PG i altres metabòlits

derivats de l'àcid araquidònic fan en els processos reproductius, bàsicament els relacionats amb la reacció acrosòmica i la fecundació, és prou important perquè hagi estat àmpliament investigat (Joyce i col·l., 1987).

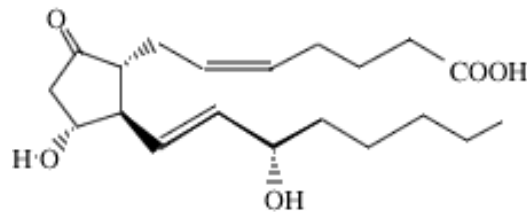


**Figura III-2.** Síntesi de les prostaglandines a partir de l'àcid araquidònic (Flower, 2006).

D'una banda, s'han dut a terme estudis sobre l'efecte de les prostaglandines PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> sobre la funció espermàtica (Aitken i Kelly, 1985; Gottlieb i col·l., 1988). Així, Aitken i Kelly (1985) van demostrar que en humà l'addició d'algunes PG incrementava significativament la motilitat espermàtica i la capacitat fecundant. Aquests autors van descobrir, a més, que les prostaglandines podrien modificar la competència funcional de l'espermatozoide. Per la seva banda, Shimizu i col·laboradors (1998) van estudiar els mecanismes que expliquen la presència de prostaglandines al plasma seminal i van concloure que les PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> promouen l'influx de calci a l'espermatozoide humà.

L'administració oral de la PGE<sub>2</sub> té un efecte contràctil sobre el conducte deferent i modifica l'activitat de les ciclooxygenases (Gottlieb i col·l., 1988a). Herrero i col·laboradors (1997) han observat que la PGE<sub>1</sub> és un agent capacitant per als espermatozoides de ratolí *in vitro* i que, en presència del ionòfor de calci, indueix la reacció acrosòmica.

D'altra banda, l'hormona prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ha estat utilitzada en porcí per a operacions de sincronització, per induir el part i per incrementar la libido dels mascles reproductors porcíns. De fet, es creu que l'addició de prostaglandina a les dosis seminals destinades a IA pot incrementar el rendiment reproductiu (Kos i Bilkei, 2004).



**Figura III-3.** Estructura química de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$ .

El trànsit dels espermatozoides a través del tracte genital femení és una combinació de transport actiu i passiu i és mitjançat per les contraccions de l'úter. Les prostaglandines poden incrementar aquest transport induint les contraccions. A més, la  $PGF_{2\alpha}$ , així com altres components del plasma seminal, contribueixen a la coordinació de l'ovulació en resposta a l'aparellament (Claus, 1990). Els efectes de diferents tipus i concentracions de prostaglandines (19-OH-PGE, 19-OH-PGF,  $PGE_1$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{1\alpha}$  and  $PGF_{2\alpha}$ ) en la funció espermàtica han estat àmpliament estudiats (Bendvold i col·l., 1984). Així, mentre que l'addició de  $PGF_{1\alpha}$  redueix la motilitat espermàtica, la 19-OH-PGE estimula positivament tant la capacitat que té l'espermatozoide de penetrar l'òocit com la seva motilitat i la 19-OH-PGF disminueix la concentració d'ATP cel·lular. En canvi, les altres prostaglandines assajades ( $PGE_1$ ,  $PGE_2$ , i  $PGF_{2\alpha}$ ) no tenen cap efecte sobre la funció espermàtica (Gottlieb i col·l., 1988b).

S'ha demostrat que l'administració de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  millora les taxes de fertilitat (Gustaffson i col·l., 1975; Gamcik, 1980). De fet, la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  és un agent contràctil de la musculatura llisa que exerceix un efecte uterotònic a través d'un receptor específic per a la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  receptor (FP) (Friel i col·l., 2005). Els efectes de l'oxitocina estan parcialment mitjançats per la  $PGF_{2\alpha}$ , atès que aquesta augmenta l'expressió del receptor específic per a l'oxitocina (Mirando i col·l., 1995). En els darrers anys, Friel i col·laboradors (2005) han identificat l'expressió del receptor específic per a la  $PGF_{2\alpha}$  al miometri d'humà, d'ovella i de rata. També s'ha observat que, quan es bloqueja (mitjançant *knock out*) aquest gen, es produeixen problemes en el part (Sugimoto i col·l., 1997). La  $PGF_{2\alpha}$  s'uneix al seu

receptor per activar una via de transducció del senyal que mobilitza el  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular (Olson i col·l., 2003).

D'altra banda, Cheng i col·laboradors (2001) van afegir  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a dosis seminals refrigerades de porcí 72 hores abans que es duqués a terme la IA i no van observar la inactivació d'aquesta hormona. Un altre estudi (Madej i col·l., 2005) va mostrar el paper de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en la seqüència d'esdeveniments que tenen lloc en l'ovari. Es van observar canvis significatius en la concentració plasmàtica de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  entre 15 i 21 minuts després d'iniciar l'estimulació, per assolir un pic després de 30 minuts.

Estienne i Harper (2004) van estudiar les conseqüències que l'administració immediatament anterior a l'extracció de semen, per via sanguínia, de diferents tractaments amb  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (10 mg) tenia sobre la qualitat espermàtica i sobre la libido dels mascles reproductors. Aquest estudi, que va durar 16 setmanes, no va mostrar efectes a llarg termini de l'administració de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ni pel que fa a la qualitat espermàtica ni pel que fa a la libido. Nogensmenys, Hashizume i Niwa (1984) havien demostrat que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  podia millorar la concentració espermàtica. Tanmateix, aquests autors van utilitzar condicions de tractament diferents de les assajades per Estienne i Harper.

En bovins, el tractament amb  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no va millorar el rendiment reproductiu de les vaques múltiples sense detecció de l'estre, sinó d'un cos luti aparent (Rhodes i col·l., 2001). Finalment, altres estudis han demostrat que la progesterona i el fluid fol·licular produeixen increments immediats en la concentració de calci a l'espermatozoide humà i que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pot estimular la reacció acrosòmica (Margalioth i col·l., 1988; Thomas i Meizel, 1988; Osman i col·l., 1989; Blackmore i col·l., 1990; Baldi i col·l., 1991).

### 1.2.3. L'àcid hialurònic

L'àcid hialurònic o hialuronat forma part dels glicosaminoglicans, una família de biomolècules de naturalesa glucídica. Els glicosaminoglicans són un grup d'heteropolisacàrids lineals i sense ramificar, l'estructura dels quals repeteix seqüències d'un disacàrid característic. Les unitats de disacàrid estan formades per un aminosucre i un àcid urònic (Lindahl i Hook, 1978; Jackson i col·l., 1991) (figura III-4).

L'àcid hialurònic és una molècula d'elevada i variable massa molecular (d'entre 1 i 10 milions de Da) i forma part del grup de GAG no sulfatats (Crater i col·l., 1995). La fórmula



molecular de l'àcid hialurònic consisteix en repeticions d'un disacàrid format per l'àcid D-glucurònic (GlcUA) i l'N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) units alternativament per enllaços glucosídics beta 1-3 ( $\beta$ , 1 $\rightarrow$ 3) i beta 1-4 ( $\beta$ , 1 $\rightarrow$ 4) (Fuchs i col·l., 2005).

En els teixits dels mamífers, hi ha quatre tipus principals de glicosaminoglicans: el coindritinsulfat, el dermatansulfat, l'heparin/heparan-sulfat i l'àcid hialurònic (Fernández-Botran i col., 2004). A diferència d'altres GAG, l'àcid hialurònic no es troba, generalment, covalentment unit amb proteïnes formant proteoglicans ni està sulfatat (Knepper i col·l., 2003; Suh i col·l., 2005).

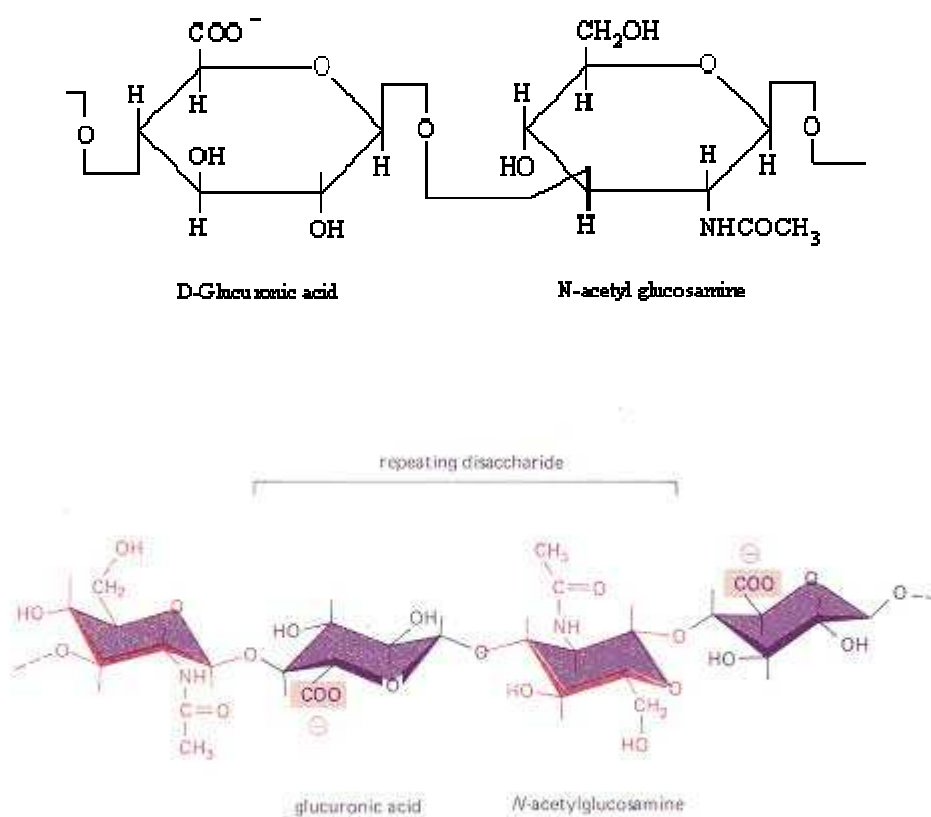
L'àcid hialurònic és sintetitzat a la membrana plasmàtica dels fibroblasts i d'altres cèl·lules per l'addició de sucres a l'extrem del polímer. Malgrat que l'àcid hialurònic és un component de la matriu extracel·lular del teixit connectiu, la seva taxa de renovació, o *turnover*, és elevada, amb un temps de vida mitjana ( $T_{1/2}$ ) de 12 a 48 hores. A més, aquest glicosaminoglicà està implicat en un gran nombre de funcions fisiològiques, com l'homeòstasi de les proteïnes plasmàtiques, la mitosi, el desenvolupament o la diferenciació cel·lulars (Lauren i Fraser, 1992). S'ha descrit també un receptor específic per a l'àcid hialurònic (CD 44) que està relacionat amb la migració cel·lular. D'altra banda, l'àcid hialurònic està implicat en el desenvolupament, la diferenciació i la migració cel·lulars (Lauren i Fraser, 1992).

Pel que fa a la seva funció en els teixits dels mamífers, l'àcid hialurònic és produït per les vellositats del cori, pel pulmó del fetus i, durant el part, pels fibroblasts que constitueixen el teixit connectiu del cèrvix uterí. Al líquid amniòtic s'hi troba també una concentració important d'àcid hialurònic (O'Kobayashi i col·l., 1999). De manera natural, es troba a més a l'humor vitri de l'ull, al fluid sinovial de les articulacions o al teixit subcutani, i actua com a agent cementant (O'Regan i col·l., 1994).

La propietat fisicoquímica més important de l'àcid hialurònic és la seva capacitat d'unir a les molècules, la qual cosa dona estructura als teixits i lubrica les articulacions. L'àcid hialurònic és també un glicosaminoglicà amb propietats antiinflamatòries i antiedematoses. En l'osteoartritis, s'han observat canvis en la concentració d'aquest glicosaminoglicà del cartílag, la qual cosa en provoca la degradació.

Pel que fa a la reproducció, s'ha observat que l'àcid hialurònic du a terme algunes funcions en mamífers. Així, s'ha publicat que, després de la seva addició al semen fresc, l'àcid hialurònic és capaç d'augmentar la motilitat de l'espermatozoide madur de mamífer

(Huszar i col·l., 1990; Sbracia i col·l., 1997; Peña i col·l., 2004). També s'ha publicat que en concentracions elevades l'àcid hialurònic indueix la reacció acrosòmica en humà (Slotte, 1993; Sabeur i col·l., 1998), mico (VandeVoort i col·l., 1997), hámster (Stanley i col·l., 1986) i porcí (Peña i col·l., 2004). Suzuki i col·laboradors (2000) van observar que l'addició d'àcid hialurònic durant la fecundació *in vitro* disminuïa la polispermia. Alguns autors han suggerit, a més, que aquest biopolímer podria tenir algun paper en la capacitació dels espermatozoides i podria estar relacionat amb el seu alliberament des del reservori seminal (Liberda i col·l., 2006).



**Figura III-4.** Fórmula química de la unitat de disacàrid repetida a l'àcid hialurònic.

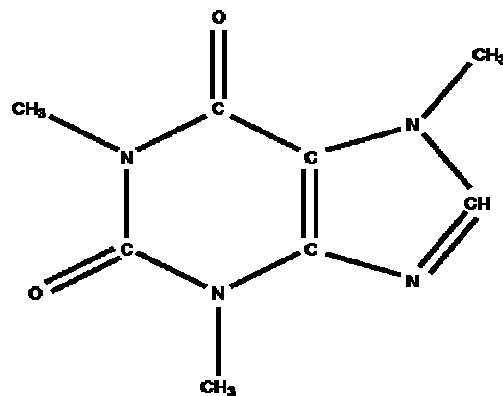
#### 1.2.4. La cafeïna

La cafeïna és un inhibidor competitiu de l'AMPC-fosfodiesterasa, la qual cosa incrementa els nivells intracel·lulars de l'adenilciclasa - adenosina monofosfat cíclica (cAMP) (Nassar i col·l., 1999) i, per tant, estimula la motilitat i la capacitació espermàtiques, tal com s'ha

observat en humà (Rees i col·l., 1990), porcí (Funahashi i Nagai, 2001) i boví (Coscioni i col·l., 2001). Així doncs, la cafeïna ha estat utilitzada amb freqüència com a agent inductor de la capacitació espermàtica en diferents sistemes d'IVF (Nagai i col·l., 1988; Mattioli i col·l., 1989; Funahashi i Day, 1993; Funahashi i Nagai, 2001). També ha estat utilitzada en la inseminació artificial porcina perquè facilita la penetració del moc cervical (Aitken i col·l., 1983).

La cafeïna té la capacitat d'inhibir les fosfodiesterases intracel·lulars i s'ha observat que la seva activitat impedeix la reabsorció de la norepinefrina (Combettes i col·l., 1994).

Pel que fa a la seva estructura química, la cafeïna és una metilxantina (1, 3, 7-trimetilxantina) formada per un anàleg de la purina (figura III-5). La cafeïna és un antagonista competitiu de l'adenosina, de manera que s'uneix als receptors que les neurones presenten per a aquesta molècula sense activar-los i actua, així, com a estimulants del sistema nerviós central.



**Figura III-5.** Fórmula química de la cafeïna.

D'altra banda, els efectes de la cafeïna sobre la morfologia espermàtica han demostrat ser contradictoris. Així, mentre que Harrison i col·laboradors (1980) van demostrar que la cafeïna podia generar alteracions ultraestructurals a l'espermatozoide humà, Barkay i els seus col·legues (1984) no van observar cap efecte nociu d'aquesta substància sobre la cèl·lula espermàtica de la mateixa espècie.

### 1.3. Conceptes sobre la osmolalitat

#### 1.3.1. Osmosi, pressió osmòtica i membranes biològiques

El fenomen de l'osmosi s'observa quan una solució està separada del seu solvent per una membrana semipermeable. L'osmosi és la difusió d'un solvent a través d'aquesta membrana des de la part de menor fins a la de major concentració. S'entén per *pressió osmòtica* aquella que s'ha d'aplicar sobre la solució de major concentració per impedir el pas del solvent (osmosi) a través de la membrana.

Les membranes biològiques ofereixen permeabilitats diferents respecte als diversos soluts, i es diu que són semipermeables perquè permeten el pas d'algunes molècules del solvent o petites molècules, però impedeixen el pas lliure de les molècules dissoltes.

L'osmol (Osm) és una unitat biològica que s'utilitza per a les solucions que tenen activitat osmòtica. Atès que l'osmol és una unitat massa gran per als fenòmens biològics, se sol utilitzar la subunitat mil·liosmol (mOsm), que és més representativa.

#### 1.3.2. Osmolalitat i molaritat

Per calcular l'osmolalitat d'una solució és necessari saber si el solut en qüestió s'ionitza o no. La ionització augmenta el nombre de partícules en solució. Així, quan es dissolen 180 mg de glucosa en un litre s'obté una molaritat d'1 mmol de glucosa i, com que aquesta no s'ionitza, també hi haurà 1 mOsm de glucosa; però quan es dissolen 58,5 mg de clorur de sodi en un litre, tal que s'ionitza donant dos ions ( $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ ), la molaritat continua sent d'1 mmol però l'osmolalitat és de 2 mOsm.

Tipus de solut	Exemple	Dissolució	Relació Osm-M
No s'ionitza	Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{s}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{aq})$	Osmolaritat = M
S'ionitza	Clorur de sodi ( $\text{NaCl}$ )	$\text{NaCl}(\text{s}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Na}^+(\text{aq}) + \text{Cl}^-(\text{aq})$	Osmolaritat = 2M

**Taula III-1.** Osmolalitat i molaritat.

La pressió osmòtica depèn del nombre partícules, però no de la càrrega ni tampoc de la seva massa. Així, una molècula gran, com per exemple una proteïna com l'hemoglobina, de massa molecular elevada i moltes càrregues, exerceix la mateixa pressió que un ió, com el catió sodi ( $\text{Na}^+$ ) i l'anió clorur ( $\text{Cl}^-$ ).

### 1.3.3. Solucions isotòniques, hipotòniques i hipertòniques

La majoria dels líquids corporals tenen una pressió osmòtica que concorda amb la d'una solució de clorur de sodi al 0,9 % i es diu que la solució és isotònica amb els líquids fisiològics. De fet, una solució és isotònica respecte a una cèl·lula viva quan no es produeix cap alteració en el balanç d'aigua a l'interior de la cèl·lula ni es produeix cap canvi quan la cèl·lula entra en contacte amb la solució.

Al laboratori, parlar de solucions isotòniques és referir-se a solucions que tenen la mateixa pressió osmòtica del plasma sanguini, que és aproximadament de 300 mOsm·kg<sup>-1</sup>. Aquest és també el cas de molts dels diluents comercials de refrigeració emprats en el camp de la reproducció porcina, com el BTS utilitzat en aquest estudi.

Les solucions fisiològiques d'osmolalitat inferior a 300 mOsm·kg<sup>-1</sup> s'anomenen *hipotòniques*, mentre que, quan la seva osmolalitat és superior a aquest valor llindar, s'anomenen *hipertòniques*.

### 1.3.4. La resistència osmòtica dels espermatozoides

L'estabilitat de la membrana plasmàtica dels espermatozoides d'humà es pot avaluar mitjançant el test HOST (*hypotonic swelling test*), que mesura la resistència d'aquesta membrana respecte a medis hipotònics (HOST) (Jeyendran i col·l., 1984 i 1992). Aquest test consisteix a incubar durant 30 minuts a 37°C, 0,1 ml de mostra seminal amb 1 ml d'una solució alíquota de fructosa i citrat de sodi ajustada a 150 mOsm·kg<sup>-1</sup> (solució hipotònica). L'estat intacte o la plasmòlisi dels acrosomes s'observa al microscopi òptic de contrast de fases.

Posteriorment, Chan i col·laboradors (1991) van descriure un mètode que combinava el test HOS amb una tinció supravital (el test VHOS). Així, mentre que el test HOS proporciona informació sobre l'estabilitat (integritat funcional) de la membrana de la cua de l'espermatozoide, el test VHOS és més específic per a l'estabilitat de les membranes del cap de l'espermatozoide. Encara que aquesta tècnica permet conèixer l'estat de les membranes de l'espermatozoide, el seu ús pel que fa a la pràctica clínica rutinària en humans és limitat. A més, els estudis sobre la relació d'aquest tipus de tests amb la fertilitat donen resultats discutibles (Keel, 1990; Weiske i Maleika, 1990; Van den Saffele i col·l., 1992; Takahashi i col·l., 1990, 1994).

La determinació de la resistència osmòtica de les membranes acrosòmiques de l'espermatozoide és, tanmateix, una prova important en el contrastat del semen porcí, especialment als centres de producció de dosis seminals. Actualment, el test de resistència osmòtica (ORT), similar al test HOS, descrit per Schilling i col·l. (1986), s'utilitza com a predictor de la fertilitat i de la prolificitat potencial d'una ejaculació (Sánchez, 1991). El mètode d'aquesta prova consisteix a afegir a una mostra de semen prèviament al·liquotada dues solucions de citrat de sodi ajustades a diferents pressions osmòtiques, una d'isotònica ( $300 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i una d'hipotònica ( $115 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), durant dues hores. La determinació de la resistència osmòtica de les membranes acrosòmiques dels espermatozoides en mostres de semen porcí permet un control quantitatiu de la qualitat espermàtica. Els valors estàndard, en condicions normals, de l'índex ORT en l'ejaculació porcina oscil·len entre 55 i 67 (segons quin sigui el temps d'incubació de la mostra en el medi hipotònic). Els índexs del test ORT inferiors a 50 es consideren indicadors de semen de mala qualitat (Schilling i Vengust, 1986).

Com passava amb el test HOS, també s'han dut a terme estudis que pretenien modificar el test ORT per millorar-lo. Així, els treballs de Pérez-Llano i col·laboradors (1998, 2003) perseguen reduir el període d'incubació, utilitzant un medi hipotònic ( $75 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i un d'isotònic ( $300 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), formats ambdós a partir de l'addició de fructosa i de citrat de sodi. Així, van dissenyar una variant del test que van denominar sORT (Nascimento i col·l., 2000).

Pel que fa a la utilitat d'aquests tests i a la seva relació amb els índexs de fertilitat i prolificitat, cal esmentar que en l'anàlisi del semen porcí prèvia a la penetració d'oòcits, en experiments de fecundació *in vitro*, s'hi inclouen els tests HOS i ORT, així com l'anàlisi de la concentració espermàtica, del percentatge d'espermatozoides mòbils i de morfoanomalies i de l'estat de l'acrosoma (Gadea i Matás, 2000; Gadea, 2005).

### **1.3.5. L'efecte de l'estrès osmòtic als espermatozoides**

En general, el xoc osmòtic afecta la difusió dels fosfolípids de la membrana dels espermatozoides (Christova i col·l., 2002) i l'augment de la pressió osmòtica redueix la motilitat espermàtica i malmet l'acrosoma (Curry i Watson, 1994; Liu i Foote, 1998; Rossato i col·l., 2002, i Chantler i Abraham-Peskir, 2004).

El mètode més simple d'augmentar la pressió osmòtica del medi és la variació de la concentració iònica. Tanmateix, l'addició d'aquests ions requereix un coneixement previ de quins són els efectes que aquests produeixen. Així, els cations bivalents i trivalents indueixen l'aglutinació espermàtica. El catió  $\text{Ca}^{2+}$  indueix la capacitació espermàtica (Tulsiani i col·l., 2007) i la reacció acrosòmica i l'anió  $\text{Cl}^-$  activa els canals de calci. El  $\text{Na}^+$  i el  $\text{Cl}^-$  tenen un paper molt important pel que fa a la regulació de la pressió osmòtica del fluid epididimari durant el procés de maduració dels espermatozoides (Rossato i col·l., 1996), per la qual cosa es va assajar el clorur de sodi, juntament amb la glucosa.

En treballs previs duts a terme amb espermatozoides humans de pacients normozoospermics s'han observat canvis de volum de les vesícules de la membrana plasmàtica, a la regió de la peça intermèdia o mitocondrial (Chantler i Abraham-Peskir, 2004) després d'addicionar rafinosa al medi, en un rang d'osmolalitats entre 276 i 450  $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Aquests canvis provocats per l'estrès osmòtic i els danys generats per aquest han permès concloure que la presència de la vesícula de la peça intermèdia, en condicions no estressants, té un paper clau en la funció de l'espermatozoide.

# **Capítol III. Comportament dels espermatozoides de porcí a 15-17°C**

---

## **2. Objectius**





---

## 2. Objectius

---

L'objectiu principal d'aquest capítol és contribuir a la preservació de l'esperma de porcí a 15-17°C (primer i segon articles) i al desenvolupament d'altres paràmetres espermàtics que permetin predir la capacitat fecundant d'una ejaculació (tercer article).

Actualment, la utilització de la inseminació artificial ha substituït la munta natural en porcí i un nombre considerable d'esforços han estat dirigits a l'augment de l'eficàcia reproductiva mitjançant la millora de les tècniques d'inseminació artificial, dels diluents d'esperma i de la qualitat de les dosis seminals. Atès que l'hormona PGF<sub>2α</sub> pot augmentar l'eficàcia reproductiva quan s'afegeix a les dosis seminals diluïdes (Cheng i col·l., 2001; Kos i Bilkei, 2004), el **primer objectiu** d'aquest capítol és demostrar que l'addició d'aquesta hormona sola o en combinació amb àcid hialurònic o cafeïna no malmena la qualitat espermàtica quan el semen és preservat a 15°C durant un període de deu dies.

També, i amb la intenció d'augmentar la qualitat espermàtica de les dosis seminals, el **segon objectiu** d'aquest capítol ha estat determinar els efectes de l'addició de l'àcid hialurònic sobre els paràmetres espermàtics en un període curt (tres dies) de preservació a 15°C, fent un èmfasi especial en la capacitat espermàtica. Malgrat que els efectes de l'àcid hialurònic siguin contradictoris quan es comparen els processos d'incubació i de refrigeració (Rodríguez-Martínez i col·l., 2001; Peña i col·l., 2004), aquest compost sembla retardar la capacitat espermàtica en el darrer cas. Com que és ben conegut que la cafeïna estimula la motilitat dels espermatozoides i n'indueix la capacitat, aquesta metilxantina ha estat utilitzada com a control positiu, a fi de determinar els efectes de l'àcid hialurònic sobre aquests paràmetres funcionals.

Finalment, els últims tres objectius d'aquest capítol estan relacionats amb l'estudi del tercer article. Així, el **tercer objectiu** ha estat avaluar la resposta dels espermatozoides de porcí a l'estrès osmòtic (en un rang ampli d'osmolalitats, de 100 a 4.000 mOsm·kg<sup>-1</sup>) pel que fa a la qualitat espermàtica. El **quart objectiu** ha estat determinar la relació entre els

paràmetres convencionals de l'espermograma i els resultats de proves de fertilitat i prolificitat *in vivo* (assajades com a taxes de no-retorn a l'estre després de 60 dies de les primeres inseminacions i de la mida de la camada, respectivament).

Com que un dels objectius de la recerca en reproducció porcina és establir algun mètode per predir la capacitat fecundant d'una ejaculació (Rodríguez-Martínez i col·l., 2003) i, sovint, els paràmetres convencionals de l'espermograma no són prou acurats per predir aquesta capacitat, el **cinquè objectiu** d'aquest capítol ha estat estudiar la tolerància dels espermatozoides davant un ventall ampli de canvis en l'osmolalitat del medi com a nou paràmetre funcional i predictor de la fertilitat. La tolerància respecte d'aquests canvis osmòtics pel que fa a la viabilitat i a la morfologia espermàtiques i al percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat ha estat utilitzada en models de regressió múltiple, en els quals la taxa de no-retorn a l'estre després de 60 dies de les primeres inseminacions i la mida de la camada han estat les variables dependents.

# **Capítol III. Comportament dels espermatozoides de porcí a 15-17°C**

---

## **3. Discussió general**



---

### 3. Discussió general

---

En la indústria porcina, l'ús de la inseminació artificial amb semen fresc i refrigerat ha esdevingut una pràctica rutinària, de manera que ha substituït la munta natural als països desenvolupats (Johnson i col·l., 2000). Amb la finalitat d'augmentar el rendiment reproductiu, s'han dut a terme estudis l'objectiu dels quals ha estat millorar les tècniques (Ekwall i col·l., 1996) d'inseminació artificial, com també la qualitat espermàtica de les dosis seminals (Correa i col·l., 1997; Vyt i col·l., 2004). Respecte a aquesta darrera qüestió, s'han dut a terme diferents treballs per millorar la preservació del semen de porc, per bé que la qualitat espermàtica només expliqui un percentatge molt baix (menys del 10 %) de la variància a les proves de fertilitat (Vyt i col·l., 2004; Gillan i col·l., 2006). En aquest sentit, Christensen i col·laboradors (2004) han demostrat que la variació de la mida de la ventrada és deguda, bàsicament, a aspectes relacionats amb la femella i amb la variació residual, de manera que el paper de l'ejaculació en el resultat de les proves de fertilitat és força limitat.

Atès que la variació de la fertilitat és només en part deguda a la qualitat espermàtica, tal com demostren treballs com l'anterior, en el qual es relativitza el paper de l'ejaculació, és molt difícil estudiar de quina manera es poden millorar els mètodes de valoració de la qualitat espermàtica. Tanmateix, és ben cert que els centres de producció de dosis seminals només comercialitzen aquelles ejaculacions que presenten una qualitat espermàtica elevada. Per això, s'han desenvolupat diferents mètodes (com la centrifugació amb gradients de densitat, el *swim up* o la cromatografia de permeació per gel de dosis seminals) (Georgiou i col·l., 1998; Adiga i Kumar, 2001; Bussalleu i col·l., 2007) amb l'objectiu d'assolir la millora de la qualitat espermàtica d'aquestes dosis.

Una altra estratègia per augmentar el rendiment reproductiu consisteix en l'addició de diferents substàncies al semen refrigerat o congelat amb l'objectiu de millorar-ne la conservació. En funció de la substància que s'afegeixi, els efectes que aquesta produeixi sobre la qualitat espermàtica (és a dir, la viabilitat, la capacitació o la motilitat espermàtiques) seran

diferents, tal com s'ha observat en humana i en altres espècies d'animals domèstics (Dougherty i col·l., 1976; Barkay i col·l., 1984; Fattouh i col·l., 1991; López i col·l., 2000).

La qualitat espermàtica es pot determinar mitjançant la valoració de paràmetres cel·lulars o bioquímics (Briz, 1994; Knobil i Neil, 1994; Sancho, 2002). Al capítol tercer i a l'article 4 del capítol quart, la qualitat espermàtica ha estat valorada mitjançant l'avaluació dels paràmetres cel·lulars. Així, la viabilitat espermàtica s'ha determinat mitjançant un triple marcatge amb fluorocroms (Bussalleu i col·l., 2005), i la motilitat i la morfologia espermàtiques, mitjançant un sistema computeritzat i objectiu d'anàlisi de la qualitat espermàtica, que ha estat prèviament validat en diferents espècies de mamífers (humana, caní i porcí) (Maes i col·l., 2003).

En aquest capítol s'han dut a terme dos estudis (articles 1 i 2) per millorar la tècnica de conservació del semen porcí, mitjançant l'addició de dues substàncies de naturalesa química diferent: la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  i l'àcid hialurònic, en períodes de refrigeració llarg i curt, respectivament. En ambdós casos s'han assajat també els efectes de l'addició de la cafeïna. Així, al primer article, s'han determinat els efectes de l'addició de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  a les dosis seminals diluïdes amb un diluent BTS modificat i refrigerades a 15°C durant un període de 10 dies. És ben conegut que l'addició de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  a les dosis seminals augmenta el rendiment reproductiu (Gustaffson i col·l., 1975; Gamcik i col·l., 1980) perquè augmenta les contraccions a l'úter i, per tant, intervé en el transport dels espermatozoides. Amb aquest coneixement previ, el principal objectiu del primer article va ser determinar si l'addició d'aquesta hormona malmena d'alguna manera la qualitat espermàtica quan les dosis seminals són conservades a 15°C durant un període de 10 dies.

L'estudi d'aquest primer article no és, certament, el primer que ha assajat els efectes que l'addició de diferents concentracions de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  produeix sobre els paràmetres espermàtics, tal com prèviament han publicat Maes i col·laboradors (2003). Tanmateix, la contribució original d'aquest estudi és que les concentracions esmentades han estat assajades en un rang força més ampli i que s'ha ampliat el temps de conservació i de l'anàlisi de les mostres (d'un a deu dies). Una de les altres aportacions originals d'aquest treball és que la qualitat espermàtica no només s'ha valorat mitjançant la motilitat espermàtica, tal com van fer Maes i col·laboradors (2003), sinó que també s'han determinat la viabilitat espermàtica i la integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma, la morfologia i l'aglutinació espermàtiques i la resistència osmòtica dels espermatozoides.

Respecte als resultats més importants de l'estudi del primer article, s'observa que les concentracions de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  iguals o superiors a 12,5 mg/100 ml són citotòxiques. Així, la viabilitat espermàtica es redueix de manera significativa, els percentatges d'espermatozoides mòbils, així com altres paràmetres cinètics, disminueixen (com la velocitat en línia recta, la velocitat curvilínia i la velocitat mitjana de la trajectòria) i la resistència osmòtica també minva quan s'afegeixen concentracions elevades de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . A més, la preservació de les dosis seminals diluïdes amb BTS durant més de sis dies es demostra perjudicial per a l'emmagatzematge de l'esperma, atès que el BTS és un diluent de refrigeració de curta durada. Un aspecte important que cal destacar és que aquesta reducció significativa de la viabilitat després de sis dies de preservació de les dosis que s'observa en alguns tractaments no es produeix quan s'han afegit, a temps zero, 5 mg/100 ml de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ni tampoc en els tractaments que contenen, a més d'aquesta hormona, àcid hialurònic i cafeïna (per a més informació, vegeu l'apartat sobre material i mètodes de la versió anglesa d'aquest capítol). Aquest resultat és sorprenent perquè no s'esperava, atès que la hipòtesi amb la qual es va dissenyar l'estudi suposava que aquesta hormona no produiria cap efecte sobre els paràmetres espermàtics.

D'altra banda, les dades procedents de les anàlisis dels diferents paràmetres espermàtics estan correlacionades i, com ja s'ha esmentat, s'observen increments significatius respecte al control negatiu i el tractament amb 5 mg/100 ml de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  després de sis i deu dies de refrigeració. Així doncs, de tots els tractaments assajats n'hi ha un, el de 5 mg/100 ml de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , que podria millorar el diluent de refrigeració BTS. Tanmateix, aquest és un diluent de curta durada, de manera que se suggereix la necessitat d'assajar els efectes d'aquest tractament en diluents de llarga durada com a possible perspectiva de futur (Dubé i col·l., 2004; Haugan i col·l., 2007).

A més, l'addició de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , d'àcid hialurònic i de cafeïna no altera la morfologia espermàtica perquè no s'observa ni una disminució del percentatge d'espermatozoides madurs ni un increment del percentatge d'espermatozoides aberrants (que inclou malformacions del cap i/o de la cua) en cap dels dos estudis (articles 1 i 2).

En general, i deixant de banda les concentracions de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  iguals o superiors a 12,5 mg/100 ml, les reduccions que s'observen en la viabilitat, la motilitat i la morfologia espermàtiques, com també les que s'observen per la resistència osmòtica a l'article 1, són degudes al temps de conservació, i no pas als tractaments assajats, tal com s'observa després



de deu dies de refrigeració de les dosis a 15°C. D'altra banda, i malgrat que l'ús de diluents de llarga durada es justifica, sovint, com una manera d'evitar la contaminació per patògens de les dosis seminals quan aquestes es volen conservar per un període de temps superior als tres dies, no s'ha observat contaminació bacteriana d'aquestes dosis durant tot el temps d'experimentació. Aquest resultat està d'acord amb un estudi previ sobre diluents comercials de curta (BTS) i llarga durada (Mulberry III, Androhep™ i Acromax™) dut a terme per Vyt i col·laboradors (2004). Precisament, una de les conseqüències de conservar els espermatozoides en un diluent de curta durada com el BTS per un període de temps massa prolongat és, com s'ha observat en l'estudi del primer article, un augment del percentatge d'aglutinació espermàtica després de sis dies de preservació, d'acord amb els resultats que va obtenir Sánchez (1991).

En definitiva, es conclou que l'addició de prostaglandina F<sub>2α</sub> (amb o sense combinació amb baixes concentracions de cafeïna o àcid hialurònic) a les dosis seminals es pot dur a terme amb l'objectiu de millorar el transport dels espermatozoides a través de l'úter (Gil i col·l., 1998; Kos i Bilkei, 2004; Friel i col·l., 2005) i, per tant, d'incrementar el rendiment reproductiu, sense malmenar la qualitat espermàtica si les concentracions de prostaglandina F<sub>2α</sub> són inferiors a 10 mg/100 ml. Així doncs, aquesta substància es pot afegir als diluents de curta durada, com el BTS, i probablement als diluents de llarga durada, per millorar els resultats de la inseminació artificial.

Els efectes de l'addició d'àcid hialurònic i de cafeïna sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals refrigerades a 15°C i diluïdes amb BTS també s'han analitzat en un període curt (tres dies) d'emmagatzematge, fent un èmfasi especial en la capacitat espermàtica (mitjançant el marcatge amb clortetraciclina, CTC). Malgrat que s'hagi demostrat que l'addició d'àcid hialurònic augmenta la velocitat espermàtica del semen fresc (Huszar i col·l., 1990) i congelat/descongelat en humà (Sbracia i col·l., 1997) i en porcí (Peña i col·l., 2004) i que s'hagi publicat que aquesta substància indueix la reacció acrosòmica dels espermatozoides d'humà (Slotte i col·l., 1993; Sabeur i col·l., 1998), micos (VandeVoort i col·l., 1997), hámsters (Stanley i col·l., 1986) i porcs (Peña i col·l., 2004), no és gaire clar quin és el paper que té en la capacitat espermàtica. Així, a la revisió de la bibliografia es troben alguns estudis que demostren que l'àcid hialurònic té un efecte inductor de la capacitat espermàtica *in vitro* (Suzuki i col·l., 2002), mentre que en d'altres s'ha observat un efecte

retardador d'aquesta substància (Rodríguez-Martínez i col·l., 2001). Com que els efectes de la cafeïna com a inhibidor de la cAMP-fosfodiesterasa, i, per tant, inductor de la capacitat espermàtica, són ben coneguts (Rees i col·l., 1990; Funahashi i Nagai, 2001), sobretot respecte als que produeix l'àcid hialurònic, s'ha emprat aquesta metilxantina com a control positiu del segon article.

A partir dels resultats obtinguts, s'ha observat que la cafeïna, tal com s'esperava, augmenta els percentatges d'espermatozoides capacitats i d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat tant immediatament després d'afegir la cafeïna com durant el període d'emmagatzemament a 15°C. Per contra, l'àcid hialurònic no té cap efecte sobre la capacitat espermàtica després de l'inici del tractament. Tanmateix, l'anàlisi dels paràmetres espermàtics després de tres dies d'emmagatzemament de les dosis seminals a 15°C ha demostrat que l'addició de dues de les concentracions d'àcid hialurònic assajades (50 i 100 µg·ml<sup>-1</sup>) retarda la capacitat dels espermatozoides, perquè els percentatges d'espermatozoides capacitats són significativament inferiors als obtinguts al control negatiu. Aquest resultat, que suggereix una interacció entre els tractaments i el temps de refrigeració, es troba en desacord amb un estudi publicat per Bergvist i col·laboradors (2006) en el qual es demostra que, després d'incubar els espermatozoides amb àcid hialurònic, augmenta el percentatge de cèl·lules espermàtiques capacitades. Tanmateix, les espècies animals emprades i les condicions experimentals d'aquest estudi i les del segon article són diferents, atès que al primer s'incuba a temperatura fisiològica i al segon s'emmagatzema l'esperma a 15°C.

El fet que la cafeïna s'hagi utilitzat com a control positiu i que els seus efectes sobre la capacitat espermàtica s'hagin comparat amb els que produeix l'àcid hialurònic, ha permès establir de manera més clara quin és el paper que té aquest àcid en un procés tan important com és la capacitat espermàtica quan les mostres estan refrigerades. L'àcid hialurònic sembla que fa un paper oposat al de la cafeïna quan els espermatozoides són conservats a 15°C. Així, mentre que la cafeïna indueix la capacitat espermàtica, l'àcid hialurònic la retarda després de tres dies d'emmagatzemament. D'altra banda, i d'acord amb un estudi anterior dut a terme en humà (Sabeur i col·l., 1998), l'addició d'àcid hialurònic sense progesterona o sense fraccions solubilitzades de la zona pel·lúcida al medi en el qual es troben els espermatozoides no indueix la reacció acrosòmica. Com en aquest darrer cas, en l'estudi de l'article 2 no s'ha observat tampoc cap efecte inductor de la reacció acrosòmica per part de l'àcid hialurònic, a diferència del que s'ha determinat per a la cafeïna.

Els efectes contradictoris que l'àcid hialurònic té sobre la capacitació espermàtica i la reacció acrosòmica i que s'han esmentat prèviament s'han observat també, en part, a l'article segon, després de comparar les diferents concentracions d'aquesta molècula. Així, quan la concentració d'àcid hialurònic és de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , els percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat augmenten respecte al control negatiu. Aquesta observació, en desacord amb el que han demostrat Sabeur i els seus col·laboradors (1998), confirma els resultats del treball de Slotte i col·laboradors (1993), que han publicat que la incubació dels espermatozoides amb medi de cultiu suplementat amb àcid hialurònic indueix la reacció acrosòmica dels espermatozoides en humà. També en desacord amb els nostres resultats, tant pel que fa als percentatges d'espermatozoides capacitats com als d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat, Suzuki i col·laboradors (2002) han observat que elevades concentracions d'àcid hialurònic ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en medi de cocultiu indueixen la capacitació espermàtica, però no la reacció acrosòmica dels espermatozoides després d'incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ . El fet que els resultats de l'article segon siguin diferents dels publicats per Suzuki i els seus col·legues s'explica, una altra vegada, per les diferències en el disseny experimental d'ambdós estudis, tant pel que fa les concentracions d'àcid hialurònic assajades, dels medis emprats i de les condicions d'incubació utilitzades.

Els efectes de la cafeïna com a inductor de la capacitació i com a estimulant de la motilitat espermàtica, com a conseqüències de les seves propietats químiques, són àmpliament coneguts. Així, Ain i col·laboradors (1999) han observat que la cafeïna mobilitza calci a nivell intracel·lular i incrementa els nivells d'AMP cíclic. Tanmateix, també hi ha d'altres estudis, com el dut a terme per Funahashi i Nagai (2001), que indiquen que en el semen descongelat dels mascles reproductors porcins la inducció de la capacitació espermàtica no està directament relacionada amb la reacció acrosòmica, sinó que és conseqüència dels "processos que s'assemblen a la capacitació" (Watson, 1995) i que s'esdevenen durant els protocols de congelació/descongelació.

Després d'haver fet una revisió bibliogràfica sobre les efectes de l'àcid hialurònic sobre els paràmetres funcionals dels espermatozoides tant en refrigeració com després d'una incubació, s'observa que l'estudi de l'article segon és el primer en el qual s'analitzen els efectes d'aquest glicosaminoglicà sobre la capacitació espermàtica durant els processos de refrigeració a  $15^{\circ}\text{C}$ . Així, atès que alguns estudis suggereixen que l'àcid hialurònic és un agent capacitant després d'incubar els espermatozoides *in vitro* (Suzuki i col·l., 2002), però en

canvi d'altres han indicat que podria tenir un efecte retardador *in vivo* (Rodríguez-Martínez i col·l., 2002), el nostre estudi aporta una nova dada en aquest sentit, que confirma els resultats observats *in vivo*, i és que l'àcid hialurònic retarda la capacitat espermàtica després de tres dies de conservació de les dosis seminals a 15°C.

Pel que fa a la viabilitat espermàtica, s'observa que aquesta va disminuint progressivament durant el període de refrigeració, encara que les diferències estadísticament significatives no apareixen fins al tercer dia. Tal com s'ha discutit pel que fa als resultats del primer article, aquesta reducció de la qualitat espermàtica és deguda a la característiques del diluent de refrigeració emprat (BTS), que és de curta durada (Dubé i col·l., 2004). Quant als efectes de l'àcid hialurònic i de la cafeïna sobre la viabilitat espermàtica, s'ha determinat que concentracions elevades d'ambdues substàncies (és a dir, els tractaments d'àcid hialurònic 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  i de cafeïna 8 mM ) provoquen una disminució del percentatge d'espermatozoides viables amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes, de manera similar al que s'observa quan s'afegeixen concentracions elevades de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (primer article). En l'anàlisi acurada de les categories resultants de l'anàlisi de la viabilitat espermàtica mitjançant el mètode del triple marcatge amb fluorocroms, s'observa que, de fet, les concentracions elevades de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , àcid hialurònic i cafeïna malmenen amb més intensitat la integritat de l'acrosoma que la de la beina mitocondrial. L'acrosoma és un orgànul que deriva de l'aparell de Golgi i que desencadena la reacció acrosòmica després que els espermatozoides s'uneixin a la zona pel·lúcida de l'oòcit (Silva i Gadella, 2006). Tanmateix, les reaccions acrosòmiques prematures (també anomenades *reaccions acrosòmiques falses* o *degeneratives*) poden esdevenir-se en condicions adverses o d'estrès per a l'espermatozoide, i llavors aquest perd la seva capacitat fecundant (Cross i Meizel, 1989). En general, s'observa que les concentracions elevades de les tres substàncies malmenen la qualitat espermàtica perquè redueixen la viabilitat i la integritat de l'acrosoma, la motilitat i la resistència osmòtica dels espermatozoides. Així doncs, es conclou que les concentracions més elevades de les tres substàncies assajades en ambdós estudis no són aptes per a la millora dels paràmetres funcionals dels espermatozoides pel que fa a la preservació de les dosis seminals refrigerades ni durant períodes curts ni durant períodes llargs.

Respecte a la motilitat espermàtica, mentre que els tractaments que només contenen prostaglandina  $F_{2\alpha}$  no afecten aquest paràmetre funcional (per a més informació, consulteu el primer article d'aquest capítol), s'ha observat que un tractament binari que combina aquesta

hormona amb l'àcid hialurònic (1,25 mg  $\text{PGF}_{2\alpha}$ /100 ml + àcid hialurònic 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) augmenta significativament el percentatge d'espermatozoides amb motilitat progressiva. El fet que l'àcid hialurònic augmenti la motilitat progressiva dels espermatozoides està d'acord amb l'estudi de Peña i col·laboradors (2004), que han utilitzat aquest glicosaminoglicà com a estimulador de la motilitat espermàtica del semen descongelat de porcí, però en desacord amb els efectes que la mateixa substància té a concentracions més baixes (com les assajades al segon article), quan no afecta no aquest paràmetre. L'efecte de la concentració sembla, doncs, que té un paper clau en aquest sentit, per bé que concentracions elevades d'àcid hialurònic també s'han demostrat inductores de la capacitat espermàtica i de la reacció acrosòmica.

Els resultats de l'anàlisi de la cafeïna sobre la motilitat espermàtica assajats al segon article han estat els que s'esperaven. Així, l'addició de cafeïna, en un rang de concentracions d'entre 0,25 i 2 mM a les dosis seminals refrigerades, augmenta la motilitat dels espermatozoides tant immediatament després de l'inici del tractament com 24 hores més tard, tal com han determinat també Funahashi i Nagai (2001). En un rang de concentracions d'entre 0,5 i 2 mM, la cafeïna produeix un augment significatiu de les velocitats rectilínia i mitjana de la trajectòria i de l'amplada de desplaçament lateral del cap després d'un dia de conservació, i redueix també de manera estadísticament significativa la velocitat curvilínia immediatament després de la seva addició. D'altra banda, aquestes mateixes concentracions de cafeïna fan que els percentatges de linealitat i rectitud augmentin durant tot el període de refrigeració.

La cinètica i la capacitat espermàtica estan relacionades, tal com García-Herreros i col·laboradors han descrit (2006) en el que no és sinó el primer article que investiga la cinètica espermàtica en condicions capacitants i no capacitants (vegeu també el capítol quart i l'article IV). En concordança amb aquest darrer estudi, s'ha observat que hi ha una correlació positiva entre els percentatges d'espermatozoides capacitats i el percentatge de linealitat i rectitud en l'anàlisi dels paràmetres descriptors de la motilitat en els tractaments que contenen cafeïna. La cafeïna també fa que augmenti l'amplada del desplaçament lateral del cap, però no provoca que el percentatge de linealitat disminueixi, tal com altres autors han determinat en altres espècies de mamífers (Cancel i col·l., 2000; Kinakuwa i col·l., 2003). Els augments de la motilitat espermàtica i dels percentatges de linealitat, així com els dels espermatozoides capacitats que s'observen en els tractaments amb cafeïna, són similars als que Holt i Harrison (2002) han publicat després d'estimular els espermatozoides de porcí amb bicarbonat. La relació entre la capacitat espermàtica i els descriptors de la cinètica espermàtica també s'ha

observat en els resultats obtinguts dels tractaments amb àcid hialurònic, de manera que, després de l'addició de diferents concentracions d'aquesta substància, no s'han observat canvis ni en els percentatges d'espermatozoides capacitats ni en els percentatges de linealitat i rectitud.

El treball del segon article és el primer que ha estudiat els efectes de l'àcid hialurònic sobre la capacitació, la viabilitat, la motilitat i la morfologia espermàtiques, així com la resistència osmòtica dels espermatozoides després de conservar les dosis seminals per un període de tres dies a 15°C, emprant la cafeïna com a control positiu. El fet que els resultats obtinguts en aquest article difereixin dels observats per altres autors tant en porcí com en altres espècies d'animals domèstics (Ponce i col·l., 1999) es pot justificar a partir de les diferències entre dissenys experimentals (els medis utilitzats i les condicions d'incubació i preservació).

En definitiva, l'article segon permet concloure que dues concentracions d'àcid hialurònic (50 i 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) retarden la capacitació espermàtica en comparació amb la dosi seminal sense suplementar, després de tres dies de refrigeració, sense malmenar la resta de paràmetres espermàtics funcionals. Per això, l'àcid hialurònic a aquestes concentracions es pot afegir a les dosis seminals refrigerades i diluïdes amb BTS, amb l'objectiu de millorar-ne la preservació i, fins i tot, amb l'objectiu de millorar els resultats obtinguts en protocols de fecundació *in vitro*, atès que Suzuki i col·laboradors (2000) han demostrat que la presència d'àcid hialurònic afavoreix la penetració monoespermàtica. Considerant que l'efecte retardador de la capacitació que té l'àcid hialurònic només s'observa després de tres dies de refrigeració, que és el màxim recomanat per conservar el semen amb BTS, se suggereix que es podrien dur a terme nous experiments utilitzant diluents de llarga durada i assajant noves condicions de temperatura i de temps de conservació.

Un altre aspecte molt important de la biologia reproductiva, a més de l'estudi i millora de la qualitat espermàtica de les dosis seminals, és la predicció de la capacitat fecundant d'una ejaculació concreta, especialment per a la indústria porcina (Rodríguez-Martínez, 2003). Per aquesta raó, s'han dut a terme un gran nombre d'estudis amb l'objectiu de conèixer quina és la relació entre les característiques d'una ejaculació i les dades de fertilitat i prolificitat *in vivo*.

En porcí, com en altres espècies d'animals domèstics com el cavall (Colenbrander i col·l., 2003), la certesa quan es prediu la capacitat fecundant d'una ejaculació mitjançant la seva qualitat espermàtica és encara baixa. Tanmateix, i seguint amb el porcí, un bon nombre de treballs han continuat aprofundint, malgrat tot, en l'estudi dels mètodes de valoració de la qualitat espermàtica (Juonala i col·l., 1999; Christensen i col·l., 2004; Bussalleu i col·l., 2005; Sutkeviciene i col·l., 2005; Turba i col·l., 2007), fent un èmfasi especial en les dificultats a l'hora d'identificar aquells mascles que presentaven una fertilitat potencial més elevada (Gadea, 2005). A més, Quintero-Moreno i col·laboradors (2004) han demostrat que l'anàlisi multivariant és necessària per dur a terme una valoració de la qualitat espermàtica, atès que la fecundació és un procés molt complex.

De manera convencional, els centres de producció de dosis seminals valoren la qualitat espermàtica mitjançant la determinació dels paràmetres clàssics de l'espermograma, és a dir, la viabilitat, la concentració, la motilitat i la morfologia espermàtiques, i del percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat, com a pas previ a la comercialització d'una ejaculació qualsevol. Tanmateix, aquests paràmetres convencionals de l'espermograma no són sovint prou acurats per a la detecció de les ejaculacions amb baixa capacitat fecundant (Ruiz-Sánchez i col·l., 2006; Turba i col·l., 2007). Per aquest motiu s'han desenvolupat altres mètodes per millorar la determinació de les característiques dels espermatozoides. Aquests mètodes es basen en la funció espermàtica (com ara l'avaluació de la capacitat espermàtica, els tests de penetració homòloga i heteròloga dels oòcits o la resposta dels espermatozoides respecte als canvis d'osmolalitat del medi) (Gadea, 2005; Collins, 2007) i en la determinació de les concentracions d'alguns marcadors al plasma seminal (com per exemple les proteïnes d'unió a l'heparina, la clusterina o les espècies reactives de l'oxigen) (Braundmeier i Miller, 2001).

D'entre tots aquests mètodes, l'avaluació de la resistència dels espermatozoides respecte als canvis de l'osmolalitat del medi que els envolta s'ha establert com a paràmetre avaluador de la funcionalitat espermàtica mitjançant l'ús de diferents mètodes, algunes vegades documentant la seva relació amb les proves de fertilitat i prolificitat *in vivo* i d'altres generant controvèrsia sobre la seva utilitat (Jeyendran i col·l., 1984). El test d'inflament hipotònic (HOS) i el test de resistència osmòtica (ORT) són dos exemples de mètodes que assagen la resistència dels espermatozoides respecte a variacions de l'osmolalitat del medi. Així, el test HOS, desenvolupat en primer terme en humans als anys vuitanta per l'equip de Jeyendran i

col·laboradors (1984) i més tard aplicat en altres animals domèstics (caní, porcí o boví), estudia l'activitat bioquímica de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide i es basa en el transport de l'aigua a través del plasmalemma de la cua de l'espermatozoide. D'altra banda, s'han dut a terme diverses modificacions d'ambdós tests. Així, per exemple, Pérez-Llano i col·laboradors en porcs (2003) i Rota i els seus col·legues en toros (2001) han sotmès els espermatozoides a solucions de molt baixa tonicitat, 75 i 100 mOsm·kg<sup>-1</sup>, respectivament, i Chan i col·laboradors (1993) han descrit un mètode que combina el test HOS amb una tinció supravital que ha permès la creació d'una variant del test (el test vHOS) i alhora una major robustesa en l'anàlisi de la funció espermàtica. D'altra banda, Nascimento i col·laboradors (2001) han descrit una variant del test ORT (*short* ORT) que consisteix, bàsicament, en una reducció del període d'incubació. Per acabar, Lechniak i col·laboradors (2002) han combinat l'ús del test HOS per assajar la funció de la membrana espermàtica després de la capacitació per comprendre millor aquest procés fisiològic.

A més dels tests HOS i ORT i de les seves modificacions, hi ha d'altres d'estudis que també han emprat la tolerància osmòtica com a mètode per predir la fertilitat potencial en diverses espècies. Així, per exemple, Petrunkina i els seus col·legues (2001b) han documentat en braus la relació entre el volum de la cèl·lula espermàtica (mesurat electrònicament) en resposta a les reduccions de l'osmolalitat del medi (hipotonicitat) i les dades de fertilitat *in vivo* (obtingudes a partir d'assaig en vaques de les taxes de no-retorn a l'estre després de 56 dies de les primeres inseminacions).

Com a conseqüència de la seva relació amb la funcionalitat espermàtica, l'avaluació de la tolerància dels espermatozoides als canvis de l'osmolalitat del medi és sovint assajada conjuntament amb la viabilitat, la concentració, la motilitat i la morfologia espermàtiques en els protocols de fecundació *in vitro* (Gadea i Matás, 2001) i en els de criopreservació espermàtica (Mazur, 1984; Curry i Watson, 1994). Precisament, i relacionat amb aquesta darrera qüestió, els canvis de tonicitat com a conseqüència dels protocols de criopreservació provoquen que la cèl·lula espermàtica s'encongeixi com a resultat de l'efluència d'aigua intracel·lular. Posteriorment, i a mesura que l'agent crioprotector i l'aigua entren, els espermatozoides s'inflen i recuperen el volum que tenen en condicions normals (Gao i col·l., 1997; Curry i col·l., 2000). En definitiva, els protocols de congelació/descongelació produeixen estrès osmòtic, la qual cosa pot malmenar la funció de l'espermatozoide i en pot comprometre la viabilitat (Pukazhenti i col·l., 2000).



Per preparar les solucions hipertòniques emprades als assajos de resistència osmòtica es poden utilitzar diferents medis i molècules, tenint en compte que l'addició de determinats ions i molècules requereix un coneixement previ sobre els efectes que produeix l'addició d'aquestes substàncies. Com que el fet d'utilitzar una substància o una altra per modificar l'osmolalitat del medi pot desencadenar un efecte o un altre, a l'estudi del tercer article s'han assajat tres soluts diferents, dos de naturalesa iònica (el clorur de sodi i el citrat de sodi) i un altre de naturalesa química no iònica (la glucosa). D'altra banda, s'han preparat dos tipus de tractament (en funció de l'osmolalitat), hipotònic (100, 150 i 200 mOsm·kg<sup>-1</sup>) i hipertònic (500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000 i 4.000 mOsm·kg<sup>-1</sup>), i dues modalitats diferents de tractament segons que els espermatozoides retornin o no al medi isotònic després d'haver entrat en contacte amb el medi anisotònic (tractaments amb retorn i amb no-retorn al medi isotònic, respectivament) (Caiza de la Cueva i col·l., 1997a; 1997b). Aquesta varietat de tractaments, quaranta-vuit en total, pretén comprendre millor el comportament de l'espermatozoide de porcí davant els canvis d'osmolalitat del medi.

Atenent el que s'ha esmentat fins ara, en l'estudi del tercer article es van formular prèviament les tres hipòtesis següents:

- 1) La variació de l'osmolalitat del medi malmena la qualitat espermàtica.
- 2) Els danys sobre la qualitat espermàtica poden ser produïts no només pels canvis d'osmolalitat, sinó també per la composició del medi (és per això que s'han utilitzat tres soluts diferents per preparar les solucions hipertòniques, tal com s'ha esmentat).
- 3) Hi pot haver una relació entre els resultats de les proves de fertilitat *in vivo* i la resistència osmòtica dels espermatozoides d'una ejaculació.

Per contrastar aquestes hipòtesis, s'han valorat la viabilitat espermàtica i la integritat de la beina mitocondrial i l'acrosoma, la motilitat i la morfologia espermàtica tant al control negatiu com als diferents tractaments (la qual cosa permet calcular el paràmetre de resistència osmòtica) i s'han correlacionat els resultats obtinguts d'aquestes analítiques amb les taxes de no-retorn a l'estre després de 60 dies de les primeres inseminacions. Per determinar acuradament fins a quin punt el paràmetre funcional de resistència osmòtica dels espermatozoides (mesurat com a quocient dels percentatges de cadascun dels paràmetres convencionals de l'espermograma a les diferents osmolalitats, de 100 a 200 mOsm·kg<sup>-1</sup> als tractaments hipotònics, i igual a superior a 500 mOsm·kg<sup>-1</sup> als tractaments hipertònics,

respecte dels valors dels mateixos paràmetres en condicions d'isotonicitat (KHR, 291 mOsm·kg<sup>-1</sup>) pot predir la capacitat fecundant d'una ejaculació, aquestes dades de fertilitat *in vivo* obtingudes en els centres d'inseminació artificial variaven entre el 81,8 % i el 87,9 %.

Respecte dels resultats, la primera qüestió que cal abordar és la dels efectes de l'estrès osmòtic sobre els paràmetres espermàtics. Així, s'ha observat que els canvis d'osmolalitat inferiors a 200 mOsm·kg<sup>-1</sup> i superiors a 500 mOsm·kg<sup>-1</sup> afecten negativament la viabilitat espermàtica i la integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma, en concordança amb el que Caiza de la Cueva i col·laboradors (1997a) han determinat en cavalls. Malgrat que els tractaments anisotònics malmenen la viabilitat espermàtica, els efectes produïts per les modalitats amb retorn al medi isotònic són més greus que els produïts per les modalitats sense retorn. D'altra banda, els soluts emprats produeixen efectes diferents sobre la viabilitat espermàtica. Així, els tractaments amb la glucosa malmenen més aquest paràmetre espermàtic que els que contenen clorur o citrat de sodi.

Una qüestió important que mereix ser discutida a part és com l'estrès osmòtic malmena l'acrosoma. Aquest efecte s'ha observat tant a partir del triple marcatge amb fluorocroms com mitjançant la valoració del percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat duta a terme per contrast de fase. En ambdós casos s'ha determinat, d'acord amb dos treballs previs (Guthrie i col·l., 2002; Walters i col·l., 2005), que l'acrosoma queda molt malmenat pels canvis d'osmolalitat. De fet, la resistència de l'acrosoma de l'espermatozoide de porcí respecte als canvis d'osmolalitat del medi és, en termes comparatius, inferior a la d'altres espècies de mamífers, com els braus o els bocs (Petrunkina i col·l., 2001a). Aquest fet s'explica en gran part per la composició de la membrana externa de l'acrosoma, que conté un percentatge elevat de fosfolípids insaturats, un baix nombre de molècules de colesterol i pocs canals de sodi activats pels canvis de l'osmolalitat del medi (Gilmore i col·l., 1998).

D'altra banda, en humana, s'han observat canvis en el volum de les vesícules que es troben en la membrana de la beina mitocondrial com a resposta de l'adaptabilitat de l'espermatozoide als canvis d'osmolalitat (Abraham-Peskir i col·l., 2002; Chantler i col·l., 2004). A més, en ratolins s'ha demostrat que, quan l'osmolalitat del medi és de 389 mOsm·kg<sup>-1</sup>, la difusió dels lípids de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide també queda afectada (Christova i col·l., 2002, 2004).

La motilitat espermàtica és el paràmetre que queda més afectat pels canvis d'osmolalitat, d'acord amb resultats d'estudis previs duts a terme tant en porcí com en altres espècies (Caiza

de la Cueva i col·l., 1997b; Pukazhenthí i col·l., 2000; Fraser i col·l., 2001) i s'expliquen com a conseqüència dels danys produïts a la membrana plasmàtica deguts a les condicions anisotòniques (Christova i col·l., 2002), que redueixen ràpidament els nivells intracel·lulars de trifosfat d'adenosina (ATP) (Kordan i col·l., 1997; 1998). Per tant, i atès que els nivells d'ATP tenen un paper significatiu en el manteniment de la motilitat espermàtica (Yavetz i col·l., 1992; Fraser i col·l., 2001), els espermatozoides esdevenen immòbils com a conseqüència dels perjudicis causats sobre el plasmalemma. En la comparació entre tractaments, la reducció de la motilitat és, de nou, més gran en els tractaments amb glucosa que en els tractaments que contenen clorur i citrat de sodi.

Un resultat esperat era l'obtingut de l'anàlisi de la morfologia espermàtica. Així, s'ha observat un augment dels percentatges d'espermatozoides amb les cues doblegades i enrotllades en les condicions d'osmolalitat més extremes (menys de  $200 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$  i més de  $1500 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), en concordança amb el que altres treballs previs han determinat després de l'anàlisi d'aquest mateix paràmetre (Zou i Yang, 2000; Chantler i Abraham-Peskir, 2004).

Es pot concloure, en definitiva, i d'acord amb el que han indicat altres autors, que els canvis en la pressió osmòtica redueixen la viabilitat i la motilitat espermàtiques i afecten la integritat de l'acrosoma i la morfologia dels espermatozoides (Curry i Watson, 1994; Liu i Foote, 1998; Rota i col·l., 2000; Chantler i col·l., 2004).

Altres treballs previs han documentat que els espermatozoides són sensibles als canvis d'osmolalitat del medi que els envolta, de manera que es produeixen canvis en el contingut osmòtic i en el volum de les cèl·lules, alhora que la capacitat d'adaptació de la cèl·lula espermàtica a aquests canvis fa que aquesta es comporti com un autèntic osmòmetre biològic (Petrunkina i col·l., 2000). D'altra banda, la resistència dels espermatozoides respecte als xocs osmòtics s'ha assajat en porcí i en d'altres animals domèstics (Fraser i col·l., 2001). En aquests estudis s'ha determinat que l'osmolalitat òptima per mantenir la qualitat espermàtica és de  $300 \pm 50 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ , que correspon a les condicions d'isotonicitat. Així, quan el medi és isotònic, la viabilitat, la motilitat i la morfologia espermàtiques es preserven millor que quan el medi és anisotònic. Tal com s'ha esmentat al tercer article, la reducció més elevada de la qualitat espermàtica s'observa quan les osmolalitats són més extremes (és a dir,  $100 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$  als tractaments hipotònics, i entre  $3.000$  i  $4.000 \text{ mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$  als tractaments hipertònics), tal com prèviament s'ha publicat en porcí (Zeng i col·l., 2001), en humana (Rota i col·l., 2000) i en altres espècies d'animals, com ara gats (Pukazhenthí i col·l., 2000), cavalls

(Pommer i col·l., 2002), braus (Guthrie i col·l., 2002), xais (Curry i Watson, 1994), ratolins (Willoughby i col·l., 1996) o gossos (Rigau i col·l., 2001; 2002).

Els efectes de l'osmolalitat s'avaluen mitjançant medis anisotònics que es preparen prèviament emprant aigua destil·lada o altres soluts, com el clorur de sodi, la glucosa, el citrat de sodi, la fructosa, el glicerol o l'etilenglicol (Gilmore i col·l., 1996; Caiza de la Cueva i col·l., 1997b; Gilmore i col·l., 1998; Fraser i col·l., 2001; Rigau i col·l., 2001; Agca i col·l., 2002; Guthrie i col·l., 2002; Koshimoto i Mazur, 2002). Malgrat que les reduccions més grans de la viabilitat i la motilitat espermàtiques s'observin als medis hipertònics preparats amb glucosa (tant pel que fa a la modalitat de no-retorn com a la de retorn) en comparació amb els tractaments que contenen clorur o citrat de sodi, en aquest darrer cas ambdós tractaments també afecten la qualitat espermàtica. D'aquesta observació es conclou que els efectes dels canvis d'osmolalitat del medi sobre els paràmetres espermàtics no són deguts només a la pressió osmòtica, sinó també a la concentració iònica i al tipus de substància afegida. Respecte a les diferències entre ambdues modalitats de tractament, s'ha determinat que en porc el retorn dels espermatozoides al medi isotònic malmena més les cèl·lules que si els espermatozoides resten al medi anisotònic, en concordança amb un estudi previ també dut a terme en porcí (Caiza de la Cueva, 1997b).

A l'estudi de l'article tercer no només s'han estudiat els efectes de l'estrès osmòtic sobre la qualitat espermàtica, sinó que també —i aquest és el principal objectiu amb el qual s'han dut a terme els experiments— s'han correlacionat alguns dels paràmetres convencionals de l'espermograma (és a dir, la viabilitat, la motilitat i la morfologia espermàtiques), així com la resistència osmòtica, amb el rendiment reproductiu, a fi de conèixer fins a quin punt les característiques d'una ejaculació poden predir la seva capacitat fecundant. Així, i pel que fa als paràmetres convencionals de l'espermograma, s'ha determinat que hi ha correlació entre la viabilitat i la morfologia espermàtica i la fertilitat *in vivo* (assajada mitjançant les taxes de no-retorn a l'estre després de 60 dies després de la primera inseminació). En canvi, la correlació entre la motilitat espermàtica i aquestes taxes de no-retorn a l'estre (NRR<sub>60d</sub>) no és estadísticament significativa. Així, i malgrat que la motilitat espermàtica sigui un paràmetre convencional del paràmetre que es valori rutinàriament als centres de producció de dosis seminals, els resultats d'aquest estudi confirmen que aquesta no és bona predictora de la fertilitat potencial d'una ejaculació, tal com han documentat treballs previs (Berger i col·l.,

1996; Pérez-Llano i col·l., 2001). D'altra banda, i com s'esperava, la morfologia espermàtica es troba significativament correlacionada amb les  $NRR_{60d}$ , en concordança amb l'estudi d'Alm i col·laboradors (2006). De fet, altres treballs han demostrat que la viabilitat i la morfologia espermàtiques són característiques de l'ejaculació que es troben més ben correlacionades que la motilitat espermàtica amb el rendiment reproductiu (no només assajat com a resultat de les  $NRR_{60d}$ ) i la prolificitat (Christensen i col·l., 2005).

Com s'ha esmentat anteriorment, la resistència dels espermatozoides a l'estrès hipotònic se sol valorar mitjançant els tests d'inflament hipoosmòtic (HOS) i de resistència osmòtica (ORT) i se sol emprar com a paràmetre funcional (Pérez-Llano i col·l., 2003). Al tercer article s'han formulat diferents equacions de regressió múltiple utilitzant la tolerància de la viabilitat i la morfologia espermàtiques i de la integritat de l'acrosoma com a variables independents i la  $NRR_{60d}$  com a variable dependent. En aquest sentit, s'observa que els coeficients de determinació ( $R^2$ ) són superiors en els tres tractaments següents: hipotònic sense retorn a 150  $mOsm \cdot kg^{-1}$ , hipotònic amb retorn a 200  $mOsm \cdot kg^{-1}$  i hipertònic sense retorn i citrat de sodi a 500  $mOsm \cdot kg^{-1}$ .

Respecte a la inclusió dels paràmetres de tolerància osmòtica com a variables independents al model de regressió, la significació de la resistència de la motilitat espermàtica no és mai suficient perquè aquesta variable sigui introduïda al model. La resistència de la morfologia espermàtica, en canvi, s'inclou en alguns casos i, finalment, la resistència dels acrosomes i de la viabilitat espermàtica s'inclou sempre. A partir d'aquests resultats, es pot concloure que sotmetre els espermatozoides a aquests tres tractaments i aplicar després els models matemàtics formulats es pot emprar com a mètode de predicció de la fertilitat d'una ejaculació. Així, la sensibilitat dels espermatozoides als canvis osmòtics esdevé un criteri addicional a l'hora de seleccionar o descartar quines ejaculacions poden ser comercialitzades i quines no, en funció de les seves característiques i de la seva capacitat fecundant potencial, atès que no només els caràcters fenotípics dels mascles reproductors porcins han de ser considerats en els centres de producció de dosis seminals i en els de selecció i multiplicació, sinó també la seva capacitat de transmetre'ls a la descendència (Thibault i col·l., 1993).

Una de les aplicacions de l'assaig de la tolerància osmòtica dels espermatozoides són les tècniques de criopreservació. Actualment, la criopreservació dels espermatozoides de porcí ha esdevingut un camp important dins de la biologia de la reproducció (Gilmore i col·l., 1996), per bé que la tècnica de congelació pel que fa als espermatozoides d'aquesta espècie és

particularment complicada, com a conseqüència de la composició i les propietats de la seva membrana plasmàtica, que conté un nombre elevat de fosfolípids insaturats, un relació baixa colesterol/proteïnes i presenta moviments del tipus flip-flop. A més, els espermatozoides estan sotmesos a condicions d'osmolalitat molt elevades durant els protocols de congelació/descongelació. Per aquest motiu, l'assaig d'aquesta resistència podria permetre conèixer quines són les ejaculacions que presenten una tolerància superior en termes d'estrès osmòtic i, per tant, quines són més aptes per ser criopreservades.

Finalment, una altra aplicació d'aquests estudis de resistència osmòtica és l'estudi de les subpoblacions d'una ejaculació. Així, i atès que Pérez-Llano i col·laboradors (2001, 2003) han demostrat que la membrana plasmàtica dels espermatozoides que reaccionen positivament al test de sHOS és més resistent als canvis de l'entorn que la dels que hi reaccionen negativament, especialment després d'emmagatzemar els espermatozoides durant set dies a 15°C, i que la determinació d'aquesta resistència permet la definició de diferents subpoblacions dins l'estructura de l'ejaculació, se suggereix que els tres tractaments descrits a l'article 3 (hipotònic sense retorn a 150 mOsm·kg<sup>-1</sup>, hipotònic amb retorn a 200 mOsm·kg<sup>-1</sup> i hipertònic sense retorn amb citrat de sodi i a 500 mOsm·kg<sup>-1</sup>) es podrien assajar tenint en compte aquesta qüestió.

En definitiva, es pot concloure que els espermatozoides de porcí són molt sensibles als canvis d'osmolalitat del medi que els envolta, perquè tant els tractaments hipotònics com els hipertònics en malmenen la viabilitat, motilitat i morfologia. Tanmateix, cal destacar que els medis que contenen soluts no iònics (com la glucosa) produeixen més danys que els que contenen soluts iònics (com el clorur o el citrat de sodi), i els que comporten un retorn a les condicions d'isotonicitat malmenen més la qualitat espermàtica que els que romanen en condicions anisotòniques. A més, s'observa que la viabilitat i la morfologia espermàtiques, així com el percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat, estan significativament correlacionats amb les taxes de no-retorn a l'estre després de 60 dies de les primeres inseminacions, i que l'assaig de la resistència d'aquests tres paràmetres als canvis d'osmolalitat i la seva introducció a models de regressió múltiple es pot afegir a la valoració dels paràmetres convencionals de l'espermograma, a fi de millorar la predicció de la capacitat fecundant d'una ejaculació.



## **Capítol III. Comportament dels espermatozoides de porcí a 15-17°C**

---

### **4. Conclusions**





---

## 4. Conclusions

---

1. La funció espermàtica es pot mantenir en refrigeració fins a tres dies en un diluent de curta durada (com el BTS).
2. L'addició de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  en un rang de concentracions de 2,5 a 10 mg/100 ml no malmena la qualitat espermàtica. Per això aquesta hormona a aquestes concentracions pot ser afegida a les dosis seminals per millorar el rendiment reproductiu induint contraccions a l'úter, sense produir efectes deleteris sobre els espermatozoides.
3. L'addició de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  a una concentració de 5 mg/100 ml sembla millorar la preservació de la viabilitat i la motilitat espermàtica després de sis dies d'emmagatzemament de les dosis a 15°C, en comparació amb el diluent sense aquesta hormona.
4. Atès que el BTS és un diluent de curta durada, l'addició de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  a 2,5, 5 i 10 mg/100 ml s'hauria de dur a terme també en diluents de llarga durada per conèixer amb més exactitud els efectes d'aquesta hormona sobre la funció espermàtica.
5. L'àcid hialurònic en un rang de concentracions d'entre 50 i 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  retarda la capacitat espermàtica després de tres dies de preservació a 15°C amb un diluent BTS modificat, sense malmenar la viabilitat ni afectar la motilitat espermàtiques.
6. L'àcid hialurònic a aquestes concentracions es pot afegir al BTS sense un cost excessiu, per millorar la preservació de l'esperma durant un període curt de temps.
7. Els efectes contradictoris de l'àcid hialurònic sobre la funció espermàtica després d'incubació i cocultiu i després de refrigeració s'haurien d'aclarir en estudis posteriors.
8. Els espermatozoides de porcí són sensibles als canvis d'osmolalitat del seu entorn (des de 100 fins a 4000  $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

9. Els tractaments hipotònics i hipertònics amb glucosa malmenen més la qualitat espermàtica que els tractaments amb clorur i citrat de sodi.
10. Els tractaments amb retorn a les condicions isotòniques malmenen més la qualitat espermàtica que els tractaments sense retorn a aquestes condicions.
11. La viabilitat i la morfologia espermàtiques i el percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat, a diferència de la motilitat espermàtica, són paràmetres de l'espermograma que estan correlacionats amb les dades de fertilitat i de prolificitat, assajades com a taxes de no-retorn a l'estre dins dels 60 dies posteriors a les primeres inseminacions ( $NRR_{60d}$ ) i de mida de la camada (LS).
12. La tolerància dels espermatozoides als canvis osmòtics del seu entorn, determinada com a resistència de la viabilitat i la morfologia espermàtiques i del percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat, es pot introduir dins de models de regressió lineal i es pot valorar juntament amb els paràmetres convencionals de l'espermograma, a fi de predir millor la capacitat fecundant d'una ejaculació.

# Capítol IV

---

## Espermatozoides i cèl·lules epitelials de l'oviducte en cocultiu

### **1. Introducció: l'oviducte**

- 1.1. Introducció
- 1.2. Anatomia de l'oviducte
- 1.3. Funcions de l'oviducte
- 1.4. El fluid oviductal
- 1.5. La musculatura de l'oviducte i dels lligaments relacionats
- 1.6. Cultiu de cèl·lules oviductals
- 1.7. Cocultiu de cèl·lules oviductals i espermatozoides
- 1.8. Incubació dels espermatozoides amb OEC-CM i fraccions APM

### **2. Objectius**

### **3. Discussió general**

### **4. Conclusions**



# **Capítol IV. Espermatozoides i cèl·lules epitelials de l'oviducte en cocultiu**

---

## **1. Introducció: l'oviducte**



---

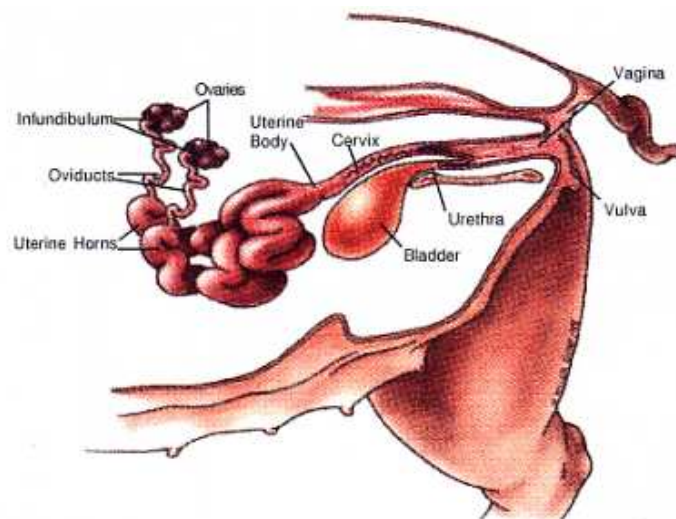
# 1. Introducció: l'oviducte

---

## 1.1. Introducció

La relació anatòmica de l'oviducte i de l'ovari és molt elevada. En els mamífers domèstics, l'ovari es troba en una bossa ovàrica oberta, a diferència del que succeeix en d'altres espècies, com la rata o el ratolí, en les quals es troba en un sac tancat. En els animals domèstics aquesta bossa consisteix en un plec peritoneal del mesosalpinx molt prim, unit a una nansa que es troba suspesa a la porció superior de l'oviducte (Hafez, 1996).

En porcí, la bossa ovàrica està ben desenvolupada i, tot i que resta oberta, comprèn la major part de l'ovari.



**Figura IV-1.** El tracte genital femení de la truja ([www.ansc.purdue.edu/swine/porkpage/repro/sow2.htm](http://www.ansc.purdue.edu/swine/porkpage/repro/sow2.htm)).

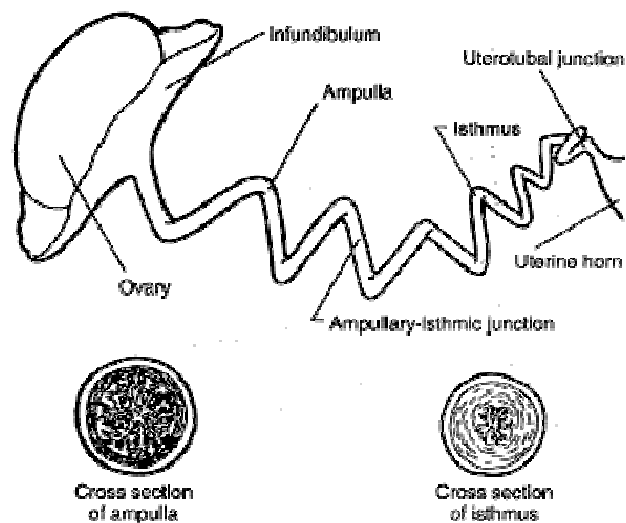


## 1.2. Anatomia de l'oviducte

Els oviductes es troben suspesos al mesosalpinx, un plegament del peritoneu derivat de la capa lateral del lligament ample. La longitud de l'oviducte i el seu grau d'enrotllament són dues característiques que varien entre els mamífers domèstics. En les truges, per exemple, la longitud varia entre 15 i 30 cm, mentre que en les ovelles és d'entre 15 i 19 cm i en les vaques se situa a l'entorn dels 25 cm.

L'oviducte es pot dividir en quatre segments funcionals (figura IV-2): les fimbries; l'infundíbul, que és una obertura abdominal en forma d'embut que es troba pròxima a l'ovari; l'ampul·la, dilatada i més distal; i l'istmus, que és la secció més proximal i estreta de l'oviducte, i que connecta amb l'úter.

La mida de l'infundíbul varia segons l'espècie i l'edat de l'animal. L'obertura de l'infundíbul descansa al centre de les fimbries que es troben lliures excepte en el pol superior de l'ovari. Així, hi ha una proximitat estreta de les fimbries i la superfície ovàrica.



**Figura IV-2.** Anatomia de l'oviducte (I) – Parts de l'oviducte ((<http://nongae.gsnu.ac.kr>)).

L'ampul·la, que ocupa la meitat de la longitud de l'oviducte, es fusiona amb l'istmus. Es desconeix el significat anatòmic i fisiològic d'aquesta unió entre l'istmus i l'ampul·la. L'istmus connecta directament amb l'úter i forma la unió uterotubàrica que, a les truges, està envoltada per plegaments d'una mucosa digitiforme.

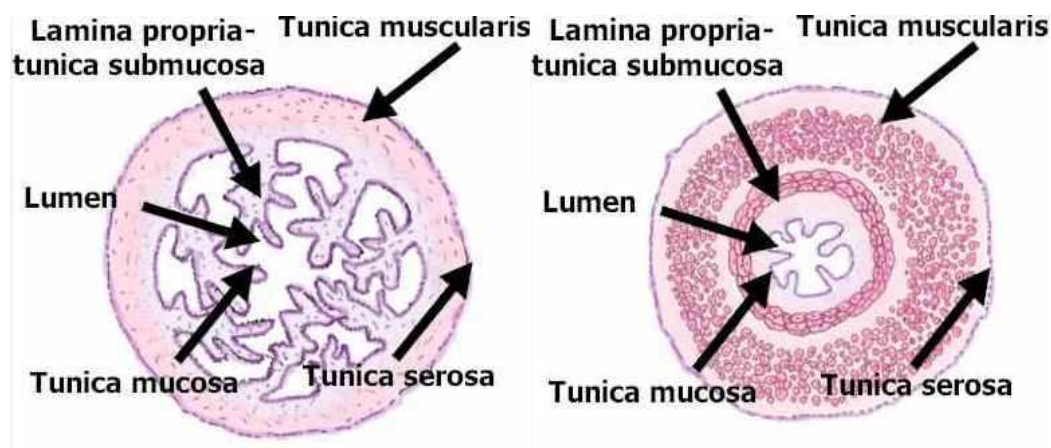
També hi ha músculs que s'estenen des d'aquestes capes fins a l'interior del teixit connectiu del pleg mucos, la qual cosa permet la contracció coordinada de tota la paret. El gruix de la musculatura augmenta des de l'extrem ovàric de l'oviducte fins a l'extrem uterí.

### 1.2.1. Mucosa de l'oviducte

La mucosa de l'oviducte està constituïda per plegaments primaris, secundaris i terciaris. La mucosa de l'ampul·la es disposa en plegaments elevats i ramificats l'altura dels quals disminueix fins a l'istmus. La configuració complexa d'aquests plegaments mucosos a l'ampul·la emplena en gran part la llum del conducte (figura IV-3).

La mucosa consisteix en una monocapa de cèl·lules epitelials cilíndriques i la mucosa contigua o submucosa està formada per fibres de musculatura llisa i teixit connectiu i està molt vascularitzada.

L'epiteli conté cèl·lules ciliades i cèl·lules secretores



**Figura IV-3.** Anatomia de l'oviducte – Infundibulum i ampulla (esquerra) i istmus (dreta).

(<http://instruction.cvhs.okstate.edu/Histology/fr/hifrp12.htm>).

#### 1.2.1.1. Cèl·lules ciliades

A la mucosa de l'oviducte aquestes cèl·lules tenen cilis primis i mòbils (cinocilis) que s'estenen cap a la llum del conducte. La freqüència de batec d'aquests cilis depèn de la concentració d'hormones ovàriques i la seva activitat és màxima en el moment de l'ovulació, quan el moviment dels cilis de la regió fimbriada de l'oviducte està molt sincronitzat i dirigit cap a l'obertura de l'infundíbul. Segons sembla l'acció de batec ciliar permet que l'òvul es

desprengui de la superfície dels fol·licles i avanci cap a l'infundíbul. Les variacions de la relació entre el percentatge de cèl·lules ciliades i el de cèl·lules secretores a través de l'oviducte és de gran importància. Així, mentre les cèl·lules ciliades són més abundants a les fimbries i a l'infundíbul, que és on l'òvul és captat, les cèl·lules secretores són més nombroses a les regions de l'oviducte en les quals els fluids luminals actuen com a medi de suport per la interacció entre l'òvul i l'espermatozoide.

Els cilis bateguen cap a l'úter. La seva activitat, acoblada a les contraccions de l'oviducte, és fonamental perquè es produeixi la fecundació i perquè la implantació de l'òocit fecundat no es produeixi a l'oviducte. D'altra banda, els oviductes depenen en algunes espècies d'animals domèstics, encara que no en el porcí, del cicle estral, de tal manera que durant l'anestru s'atrofien i perden els cilis, durant el proestre i l'estre s'hipertrofien i recuperen els cilis i, finalment, es tornen a atrofiar i a perdre els cilis durant la gestació (Hafez, 1996).

#### 1.2.1.2. Cèl·lules secretores

Les cèl·lules secretores de l'oviducte són no ciliades i, de manera característica, contenen grànuls secretors, la mida i el nombre dels quals depèn de l'espècie així com també de les fases del cicle estral.

La superfície apical de les cèl·lules secretores està coberta per un gran nombre de microvellositats. Els grànuls secretors acumulats a les cèl·lules epitelials durant la fase fol·licular del cicle s'alliberen a la llum del conducte després de l'ovulació, de tal manera que es redueix l'altura de l'epiteli.

#### *1.2.2. Vascularització*

La vascularització de l'oviducte prové de les artèries uterina i ovàrica. L'augment del nombre de vasos sanguinis, regulat en gran part pels estrògens produïts a l'ovari, es relaciona amb una intensificació del funcionament secretor de l'oviducte.

#### *1.2.3. Innervació*

Com succeeix a d'altres segments de l'aparell reproductor femení, l'oviducte està innervat parcialment per neurones adrenèrgiques "curtes" que, des d'un punt de vista

fisiofarmacològic, difereixen de les adrenèrgiques “llargues”, més corrents. A més de rebre nervis de ganglis prevertebrals i paravertebrals (neurons adrenèrgiques llargues), l'oviducte rep part de les formacions dels ganglis de la zona uterovaginal (neurons adrenèrgiques curtes).

El grau d'innervació varia a través de les capes musculars i de les regions de l'oviducte. La innervació adrenèrgica és particularment abundant a la musculatura circular de l'istmus i a la unió entre l'istmus i l'ampul·la, a on les terminacions adrenèrgiques estan en contacte amb la musculatura llisa. La densa innervació adrenèrgica permet a l'istmus actuar com a esfínter fisiològic, la qual cosa té la seva importància en la regulació del transport de l'òvul.

### **1.3. Funcions de l'oviducte**

L'oviducte té la funció singular de transportar els òvuls i els espermatozoides en sentits oposats de manera gairebé simultània i la seva estructura està ben adaptada a les seves múltiples funcions. La banda de fimbries duu els òvuls alliberats des de la superfície ovàrica fins a l'infundíbul. Després els òvuls són transportats a través dels plegaments de la mucosa a l'ampul·la, lloc en el qual s'esdevé la fecundació i l'escissió dels òvuls fecundats. Els embrions romanen a l'oviducte aproximadament durant tres dies abans de ser transportats cap a l'úter. El mesosalpinx i la musculatura de l'oviducte coordinen estrògens i progestàgens. La unió uterotubàrica controla part del transport d'espermatozoides des de l'úter cap als oviductes.

L'oviducte proporciona un medi òptim per a la unió dels gàmetes i pel desenvolupament inicial de l'embrió. Aquest ambient és tant nutritiu com protector pels espermatozoides, l'òocit i l'embrió. D'altra banda, s'ha observat que els espermatozoides i els embrions tenen antígens rars que poden ser reconeguts i atacats pel sistema immunològic humoral de la mare (Oliphant i col·l., 1984a; 1984b).

### **1.4. El fluid oviductal**

El fluid de l'oviducte genera l'ambient adequat perquè es duguin a terme la fecundació i l'escissió dels òvuls fecundats; la seva acumulació està regulada per les hormones ovàriques. Mitjançant l'ús de tècniques diferents de canulació per a la obtenció contínua de fluid, s'ha

demonstrat que el volum del líquid secretat per l'oviducte varia durant el cicle estral. Aquest volum és baix durant la fase luteal, augmenta a l'inici de l'estre, assoleix un nivell màxim un dia més tard, i després decreix fins als valors característics de la cossos atrèsics.

El sentit del flux de l'oviducte es dirigeix cap a l'ovari, atès que l'istmus bloqueja totalment o parcial el flux dels líquids cap a l'úter.

Diferents factors fisiològics poden intervenir en la creació de corrents i contracorrents:

- a. en humans, canvis quantitativs i qualitativs de les secrecions de l'oviducte durant el cicle menstrual i com a resposta als anticonceptius,
- b. variació de la mida i de la forma dels batec dels cinocilis en compartiments de l'oviducte,
- c. canvi constant del diàmetre de la llum de l'oviducte en diferents segments com a resultat de la contracció muscular i reorientació dels plegaments de la mucosa.

El moviment de les secrecions de l'oviducte contribueix al transport de l'òvul cap a l'úter. El fluid oviductal té diverses funcions com nodrir l'òocit que acaba de ser ovulat, permetre la capacitat espermatòica, servir de medi perquè es produeixi la fecundació i perquè l'embrió es desenvolupi abans de la implantació. Aquest fluid està constituït per sèrum i productes de secreció procedents dels grànuls de les cèl·lules secretores de l'epiteli oviductal (Oliphant i col·l., 1984a) i l'activitat secretora de l'oviducte està regulada per les hormones esteroidees. Al fluid oviductal hi ha algunes proteïnes que no es troben al sèrum, la qual cosa indica que les cèl·lules de l'oviducte duen a terme activitats secretores específiques.

Finalment, cal esmentar que el fluid oviductal té un efecte directe en la hiperactivació dels espermatozoides, fenomen que en porcí i a diferència d'altres espècies es produeix de manera molt ràpida (Yanagamachi i col·l., 1994), i que és molt important per la interacció entre l'òvul i l'espermatozoide.

### **1.5. La musculatura de l'oviducte i dels lligaments relacionats**

Les contraccions dels oviductes faciliten que el contingut de les secrecions s'homogeneïtzi, faciliten la fecundació i regulen, en part, el transport de l'òocit. A diferència del peristaltisme intestinal, el peristaltisme de l'oviducte tendeix a demorar lleugerament l'avenç de l'òvul enlloc de contribuir a que aquest es produeixi.

### 1.5.1. *Patró de contraccions de l'oviducte*

La musculatura de l'oviducte experimenta diversos tipus de contraccions complexes: contraccions de tipus peristàltiques localitzades que s'originen en segments aïllats o nanses i que recorren només una distància curta, contraccions dels segments, i moviments lumbricoïdals de la totalitat de l'oviducte. Les contraccions en sentit abovàric són més comunes que les adovàriques i, en general, l'ampul·la és menys activa que l'istmus.

Atès que les fibres musculars longitudinals (que escurcen) i les fibres musculars circulars (que produeixen constricció anular) són activades constantment, el patró de contraccions de l'oviducte és complex. Altres factors que contribueixen a la complexitat del patró de contraccions oviductal són les activitats contràctils del mesosalpinx, del miometri i dels lligaments de sosteniment, així com també el moviment ciliar.

El patró i l'amplitud de la contracció varien a través dels diferents segments de l'oviducte. A l'istmus, les contraccions peristàltiques i antiperistàltiques són segmentàries i contínues. A l'ampul·la, ones peristàltiques intenses avancen de manera segmentària cap a la porció mitjana de l'òrgan. Els patrons variables de contracció poden associar-se amb els canvis cíclics en el contingut de glicogen de la musculatura de l'oviducte que és més abundant a la musculatura circular interna que a la musculatura longitudinal externa.

### 1.5.2. *Prostaglandines i contractibilitat de l'oviducte*

Les prostaglandines  $E_1$  i  $E_2$  duen a terme un efecte característic a la musculatura longitudinal de l'oviducte: contrauen la part proximal i relaxen la resta de l'òrgan. En canvi, la prostaglandina  $E_3$  el relaxa completament. D'altra banda, les prostaglandines  $F_1$  i  $F_{2\alpha}$  actuen com a estimulants, la variant 2 amb més intensitat que la variant 1, sense que es produeixi cap canvi aparent en la sensibilitat o l'acció durant el cicle menstrual. La prostaglandina  $F_{2\alpha}$  té un efecte relaxant a tot l'òrgan.

### 1.5.3. *Lligament uteroovàric*

El lligament uteroovàric conté cèl·lules de la musculatura llisa disposades principalment en feixos longitudinals que segueixen dins del miometri i fins a l'estroma ovàric. La musculatura llisa dels mesoovarís i dels diversos lligaments dels mesenteris units als ovaris i a les fimbries

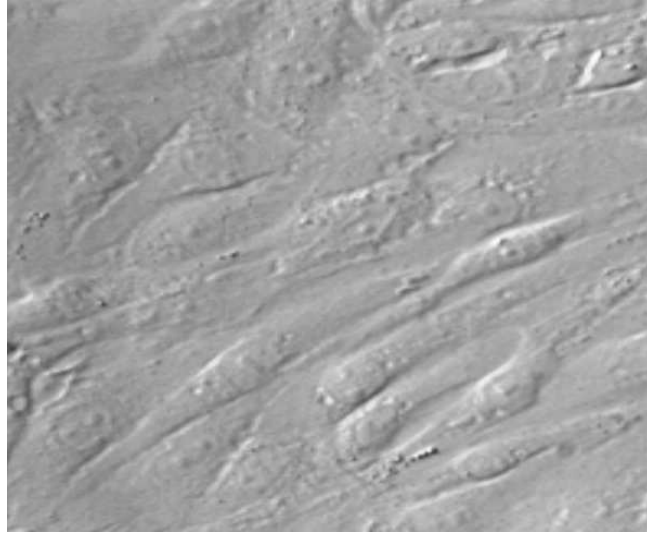
es contrau de manera intermitent. Aquestes contraccions musculars rítmiques asseguren que les fimbries romanguin en una posició constant respecte la superfície dels ovaris. (Hafez, 1996)

## 1.6. Cultiu de cèl·lules oviductals

L'oviducte té un paper molt important en la reproducció dels mamífers perquè ofereix un microambient adequat pel transport dels gàmetes i perquè és el lloc on es produeix la fecundació i les primeres etapes del desenvolupament embrionari (Romar i col·l., 2001; Hunter, 2005). En porcí, la interacció entre els espermatozoides i les cèl·lules epitelials de l'oviducte constitueix la fase final del procés de maduració del gàmet masculí, atès que li dona la capacitat de penetrar l'oòcit (Hunter, 1984).

L'epiteli de l'oviducte dels mamífers està constituït per cèl·lules secretors i cèl·lules ciliades. Les cèl·lules secretores tenen una elevada activitat i produeixen i secreten a la llum de l'oviducte un gran nombre de proteïnes, entre les quals cal destacar la glicoproteïna secretora oviductal (*oviductal secretory glycoprotein*, OSP) que està conservada en moltes espècies (Bui i col·l., 2000; Killian, 2004). Les proteïnes secretades intervenen en el desenvolupament embrionari i s'ha observat que *in vitro* mantenen la funcionalitat de l'espermatozoide (Abe, 1996). L'activitat i les funcions de l'oviducte depenen de la seva activitat secretora, de la regulació de la musculatura llisa i de les cèl·lules ciliades. Diferents estudis han demostrat que les hormones produïdes a l'ovari: l'òxid nítric, les citoquines i els factors endotelials de creixement relaxen i contrauen la musculatura llisa d'aquest òrgan i modulen l'activitat de les cèl·lules ciliades del seu epiteli (Pérez-Martínez i col·l., 2006). En alguns mamífers, encara que no en porcí, s'han dut a terme estudis de cocultiu de cèl·lules de l'epiteli oviductal i d'espermatozoide que han suggerit diferències regionals de l'activitat secretora (Petrunkina i col·l., 2001c)

El cultiu primari de cèl·lules oviductals ha estat objecte d'estudi (Figura IV-4), especialment el seu cocultiu amb oòcits en protocols d'IVF. Kano i col·laboradors (1994) van demostrar que el seu ús en cultiu permetia la reducció de la polispermia i Chian i col·laboradors (1995) van observar el paper que un factor secretat per aquestes cèl·lules tenia en la capacitat espermatocítica.



**Figura IV-4.** Cultiu *in vitro* de cèl·lules epitelials de l'oviducte (100x augments).

### 1.7. Cocultiu de cèl·lules oviductals i espermatozoides

Diferents estudis duts a terme en vaques (Eyestone i col·l., 1989; 1991; Xu i col·l., 1992) i en ovelles (Gandolfi et al., 1987) han permès observar que el cocultiu amb cèl·lules oviductals així com el medi condicionat que aquestes produeixen en cultiu (OEC-CM) promou el desenvolupament embrionari *in vitro*. En porcí, les cèl·lules oviductals en cultiu produeixen i secreten un conjunt de productes que ofereixen les condicions adequades per reduir la polispèrmia i per augmentar les taxes de fecundació en els protocols d'IVF (White i col·l., 1989; Nagai i Moor, 1990; Kano i col·l., 1994; Vatzias i Hagen, 1999). Encara que s'hagi especulat sobre la possibilitat, plausible, que l'activitat de l'oviducte estigui sotmesa a variacions del cicle ovàric, Eyestone i col·laboradors (1991) no van observar diferències quan van comparar l'efecte del cultiu de cèl·lules procedents de diferents estadis d'aquest cicle en desenvolupament d'embrions en boví. D'altra banda, Fazeli i col·laboradors (1999) tampoc van observar variacions pel que fa a la capacitat espermàtica després de cocultivar *in vitro* les cèl·lules epitelials de l'oviducte i els espermatozoides de porcí.

L'oviducte de la truja es pot dividir en dues grans regions: l'istmus i l'ampul·la. Tanmateix, aquest òrgan pot ser dividit en quatre parts: la regió intramural, l'istmus, l'ampul·la (on es produeix la fecundació) i l'infundíbul. En porcí, i en altres espècies de mamífers, un petit segment de l'istmus forma el reservori seminal durant el període estral (Suárez i col·l., 1991). En el moment de l'ovulació, només uns quants espermatozoides són



alliberats del reservori (Töpfer-Petersen i col·l., 2002). Hunter (1990) va demostrar que la polispermia augmentava quan un nombre excessiu d'espermatozoides eren alliberats del reservori seminal, de tal manera que aquest duria a terme dues funcions molt importants: assegurar que hi ha espermatozoides disponibles a l'oviducte al moment de l'ovulació i prevenir la polispermia

Pel que fa al cocultiu de cèl·lules oviductals i espermatozoides s'han dut a terme diferents estudis en humà (Bongso i col·l., 1993; Kervancioglu i col·l., 1994;; Morales i col·l., 1996; Ellington i col·l., 1998; Yao i col·l., 1999) i en altres espècies de mamífers: ovella (Gutiérrez i col, 1993), conill (Smith i Nothnick, 1997), cangur (Sidhu i col·l., 1998), gos (Ellington i col·l., 1995; Kawakami i col·l., 2001), rata (Cortés i col·l., 2004), vaca (Lefebvre i Suárez, 1996) i cavall (Ellington i col·l., 1993, Thomas i col·l., 1994; 1995).

En humà, diversos estudis (Kervancioglu i col·l., 1994; Yeung i col·l., 1994; Morales et al. (1996) han demostrat que el cultiu de cèl·lules oviductals té un efecte positiu sobre els espermatozoides perquè n'augmenten la viabilitat i la motilitat, modifiquen la freqüència de batec de la cua i estableixen l'acrosoma.



**Figura IV-5.** Cocultiu homòleg porcí de cèl·lules epitelials de l'oviducte i espermatozoides (200x augments).

### **1.8. Incubació dels espermatozoides amb OEC-CM i fraccions APM**

Zhu i col·laboradors (2001) han demostrat que el medi condicionat per les cèl·lules oviductals (OEC-CM) pot prolongar viabilitat dels espermatozoides humans criopreservats. D'acord amb

els estudis de Quintero i col·laboradors (2005) duts a terme en humà, el fluid oviductal podria tenir un paper estabilitzador de l'acrosoma, impeding la reacció acrosòmica, la qual cosa és molt important en absència del gàmeta femení.

En conills, Smith i Nothnick (1997) han demostrat que la viabilitat espermàtica pot ésser prolongada quan els espermatozoides són incubats amb les fraccions apicals de la membrana plasmàtica (APM) de les cèl·lules oviductals (OEC), com a conseqüència del contacte directe entre els gàmets masculins i les OEC. Aquest efecte és específic del teixit i està correlacionat amb l'estadi reproductiu.

En vaques, s'ha observat que el fluid oviductal regula la funció espermàtica per facilitar la fecundació, capacitant l'espermatozoide i induint-ne la seva hiperactivació (Parrish i col·l., 1989; McNutt i Killian, 1991; McNutt i col·l., 1994; Abe i col·l., 1995). D'altra banda, el medi condicionat per les cèl·lules oviductals en cultiu (OEC-CM) prolonga tant la viabilitat com la motilitat espermàtiques (Ijaz i col·l., 1994; Abe i col·l., 1995) i el tractament amb 17- $\beta$ -estradiol augmenta la capacitat que té l'OEC-CM de prolongar la motilitat dels espermatozoides (King i col·l., 1994). S'han dut a terme, a més, experiments de cocultiu heteròleg d'espermatozoides humans i cèl·lules de l'epiteli oviductal boví i s'ha observat que aquestes cèl·lules actuen estabilitzant la cromatina dels espermatozoides, tant en semen fresc com criopreservat (Ellington i col·l., 1998).

Encara que el medi condicionat obtingut del cultiu *in vitro* de cèl·lules oviductals i el fluid oviductal obtingut mitjançant un catèter contenen secrecions oviductals, la seva composició no és idèntica. En efecte, el fluid oviductal conté algunes molècules que no són presents en el medi condicionat produït per les cèl·lules cultivades. Tanmateix, tan el fluid oviductal com el cultiu *in vitro* de cèl·lules oviductals i el medi que aquestes produeixen han estat utilitzats per estudiar l'oviducte, la composició del seu fluid i l'efecte de les seves secrecions en la funcionalitat dels gàmets i en el desenvolupament embrionari (Oliveira i col·l., 1999; Killian, 2004). D'acord amb Suárez i col·laboradors (1991), la motilitat espermàtica en porcí es manté en cocultiu tant amb cèl·lules procedents de l'istmus com de l'ampul·la. Aquests autors també varen demostrar que la interacció espermatozoide-cèl·lula oviductal, que forma el reservori seminal a nivell de l'istmus, no està restringit ni al període estral ni a la regió ístmica. Petrunkina i col·laboradors (2001c) tampoc varen trobar diferències significatives en la interacció espermatozoide-cèl·lula oviductal en les comparacions entre istmus i ampul·la, entre les fases fol·licular i luteal ni entre les femelles. En concordança amb els resultats

obtinguts en aquest darrer estudi, Fazeli i col·laboradors (2003) no varen observar diferències significatives ni entre les regions de l'oviducte ni entre les fases del cicle ovàric quan van analitzar els efectes de l'APM sobre els espermatozoides de porcí. De manera oposada, en dos estudis en gossos (Kawakami i col·l., 2000; 2001) es va observar que els percentatges d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat i els d'espermatozoides hiperactivats eren significativament superiors després del cocultiu amb cèl·lules procedents d'oviducte que es trobaven a l'estadi fol·licular que després del cocultiu amb cèl·lules procedents de la fase luteal del cicle. Aquesta diferència fou atribuïda als glicosaminoglicans i/o a les glicoproteïnes secretades per les OEC en estadi fol·licular.

Diferents estudis han mostrat que el fluid oviductal conté proteïnes que s'uneixen a receptors de membrana de l'espermatozoide i que tenen un efecte beneficiós per la funció espermàtica en humà (Wagh i Lippes, 1989; Lippes i Wagh, 1989), en toro (King i Killian, 1994; Abe i col·l., 1995; Lapointe i Sirard, 1996) i en cavall (Ellington i col·l., 1993).

En un altre ordre, s'han dut a terme estudis sobre la influència dels estrògens en els patrons proteics de les cèl·lules epitelials de l'oviducte en cultiu (Xia i col·l., 1996) i s'ha demostrat que la motilitat oviductal està regulada pels nivells plasmàtics d'estrògens i progesterona (Spilman i col·l., 1978; Mwanza i col·l., 2000).

Amb tots aquests antecedents, es va plantejar l'estudi dels efectes del cocultiu de cèl·lules de l'epiteli oviductal sobre la viabilitat, la motilitat i la capacitat espermàtiques, així com també l'estat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma, tenint en compte que la funció espermàtica està influïda no només pel contacte directe dels espermatozoides amb aquestes cèl·lules sinó també per les proteïnes que aquestes secreten (article 4). Amb aquest objectiu es varen plantejar dos experiments. En el primer, els espermatozoides procedents de dosis seminals refrigerades i destinades a IA foren rentats amb gradient de Percoll (35-70%) i posteriorment cocultivats amb cèl·lules de l'epiteli oviductal o amb cèl·lules procedents d'una línia cel·lular de ronyó (LLC-PK1), que van servir de control positiu. Els paràmetres espermàtics esmentats foren analitzats tant pels espermatozoides que no estaven units a les cèl·lules cultivades i que estaven, per tant, en suspensió, com pels que es trobaven units a aquestes cèl·lules. En el segon experiment, els espermatozoides van ser incubats amb el medi condicionat per les cèl·lules oviductals i per les cèl·lules de la línia de ronyó obtingut prèviament, per observar si aquest tenia algun efecte sobre els espermatozoides. En el present

estudi, es va utilitzar el sistema de cocultiu perquè ofereix un model més fidedigne que les incubacions amb fraccions d'APM (Smith i Nothnick, 1997).



# **Capítol IV. Espermatozoides i cèl·lules epitelials de l'oviducte en cocultiu**

---

## **2. Objectius**



---

## 2. Objectius

---

Si l'objecte d'estudi del capítol anterior és bàsicament l'espermatozoide de porcí i la seva conservació, aquest capítol estudia alguns aspectes de la reproducció porcina al tracte genital femení, bàsicament referits al cocultiu *in vitro* de cèl·lules epitelials de l'oviducte i espermatozoides.

Els dos primers objectius són la base del quart article, el tercer i quart objectius són el fonament del cinquè i els dos darrers objectius són la base del sisè article.

L'oviducte juga un paper clau en la reproducció dels mamífers, atès que és la regió del tracte genital femení en la qual es produeix la fecundació. Aquest òrgan ofereix l'ambient adequat pel transport dels gàmetes, la fecundació de l'òocit i el desenvolupament embrionari primerenc (Romar i col·l., 2001; Hunter, 1984; 2002; 2005). Per aquest motiu, el **primer objectiu** d'aquest capítol és estudiar els efectes del cocultiu homòleg amb cèl·lules oviductals durant un període de 24 hores sobre alguns paràmetres funcionals dels espermatozoides, fent especial èmfasi en la viabilitat i la capacitat espermàtiques. Per dur a terme aquest primer objectiu, s'han analitzat de manera separada les poblacions espermàtiques unides a les cèl·lules epitelials de les poblacions que no ho estan, i s'ha utilitzat una línia cel·lular d'epiteli de ronyó de porc (LLC-PK1) com a control positiu.

D'altra banda, estudis previs (Bureau i col·l., 2000) han demostrat els beneficis que la incubació amb el medi condicionat per les cèl·lules oviductals té sobre la fecundació *in vitro*. A més, les cèl·lules oviductals presenten activitat secretora tan *in vivo* com *in vitro* (Lippes i Wagh; Quintero i col·l., 2005). Per això, el **segon objectiu** és determinar els efectes de la incubació dels espermatozoides amb el medi condicionat per les cèl·lules oviductals i LLC-PK1 sobre els diferents paràmetres funcionals, també durant un període de 24 hores.

Estudis previs han demostrat que no hi ha diferències entre els estadis ovàrics de les cèl·lules oviductals cultivades en la seva capacitat de modular la funcionalitat espermàtica. El **tercer objectiu** ha estat, així, el d'analitzar els nivells d'expressió gènica de quatre gens



rellevants, la clusterina, la *heat shock protein 90 kDa alpha A1 (HSP90AA1)*, la *heat shock cognate protein related 70 kDa (HSPA8)*, i la *glucose regulated protein 78 kDa (HSPA5)*, identificats en un extracte soluble procedent de les fraccions apicals de la membrana de les cèl·lules oviductals (sAPM) (Sostaric i col·l., 2006; Elliot i col·l., comunicació personal).

La funció espermàtica està modulada tant pel contacte directe amb les cèl·lules oviductals com per les proteïnes que aquestes secreten al lumen de l'oviducte, tal i com d'altres estudis han determinat (McCauley i col·l., 2003; Zhang i col·l., 2006). Tanmateix, són pocs els treballs que han documentat l'efecte que la presència dels espermatozoides té sobre la funció de les cèl·lules oviductals (Fazeli i col·l., 2004; Georgiou i col·l., 2005; 2007; Kodithuwakku i col·l., 2007). Per aquesta raó, el **quart objectiu** és estudiar les variacions en l'expressió dels quatre gens esmentats després del cocultiu *in vitro* durant un període de 24 hores.

La interferència d'RNA és una tècnica molt útil per estudiar la funció gènica. El **cinquè objectiu** d'aquest capítol és optimitzar aquest mètode en el cultiu primari de cèl·lules oviductals mitjançant transfecció i electroporació *in vitro* i utilitzant diferents molècules curtes d'RNA d'interferència (siRNA).

Finalment, s'ha observat que el gen *HSP90AA1* està sobreexpressat per les cèl·lules oviductals, després que aquestes siguin cocultivades *in vitro* amb espermatozoides. A més, la proteïna HSP90AA1 ha estat identificada en els extractes de la membrana plasmàtica apical, que tenen la propietat de perllongar la viabilitat espermàtica (Fazeli et al., 2003). Per això, el **sisè objectiu** és determinar els efectes que té el silenciament del gen *HSP90AA1* a les cèl·lules oviductals sobre la viabilitat espermàtica.

# **Capítol IV. Espermatozoides i cèl·lules epiteliais de l'oviducte**

---

## **3. Discussió general**



---

### 3. Discussió general

---

El capítol anterior estava bàsicament centrat en la millora de les dosis seminals refrigerades, i de les característiques de les ejaculacions i la seva capacitat fecundant. Tanmateix, un bon nombre dels treballs dedicats a la reproducció porcina i a la d'altres espècies d'animals domèstics comprèn com a objectiu formal del seu estudi el tracte genital femení; en aquest sentit, són particularment nombrosos els estudis sobre la fisiologia de l'oviducte (per revisió, vegeu Hunter, 2005) i la de l'úter (Tabizadeh i Broome, 1999) i sobre les tècniques de fecundació *in vitro* (Romar i col·l., 2001). Concretament, l'oviducte o trompa de Fal·lopi té un paper molt important en els esdeveniments que condueixen a la fecundació de l'òocit per part de l'espermatozoide, perquè proporciona el microambient adequat pel transport dels gàmetes cap a l'ampul·la (que és la regió de l'oviducte en la qual es produeix la fusió dels gàmetes), i pel desenvolupament embrionari primerenc (Romar i col·l., 2001; Hunter, 2005). De fet, a la majoria de les espècies de mamífers, inclosa la porcina, el contacte entre els espermatozoides i les cèl·lules epitelials de l'oviducte representa una de les fases finals de la maduració de la cèl·lula espermàtica, la qual li dona la capacitat de penetrar l'òocit (Hunter, 1984). Així, és ben conegut que la fisiologia reproductiva inclou la coordinació acurada d'un gran nombre de processos, inclosa la interacció entre els gàmetes masculins i les cèl·lules epitelials de la trompa de Fal·lopi al tracte genital femení (Hunter i Rodríguez-Martínez, 2004).

Atesa la importància del que s'ha exposat, aquest capítol està bàsicament dirigit al coneixement de l'oviducte porcí i de la relació entre les cèl·lules epitelials que el constitueixen i els espermatozoides, determinada tant des d'un punt de vista cel·lular com molecular.

L'oviducte dels mamífers està format per cèl·lules secretores i ciliades (Hafez, 1996). A més, els espermatozoides s'uneixen a les cèl·lules epitelials de l'oviducte (Petrunkina i col·l., 2001c), i en porcí i en altres espècies d'animals domèstics formen durant el període estral un segment curt a nivell de l'istmus que s'anomena reservori seminal (Suárez i col·l., 1991;

Töpfer-Petersen i col·l., 2002). Com a conseqüència de la rellevància de les cèl·lules epitelials de l'oviducte en la reproducció dels mamífers, la recerca en aquest àmbit inclou estudis duts a terme en cultiu primari per conèixer l'estructura i l'ultraestructura d'aquestes cèl·lules (Eslaminejad i col·l., 2007), l'establiment de sistemes de fecundació *in vitro*, la determinació dels paràmetres espermàtics després de cocultiu homòleg i heteròleg i l'assaig dels efectes de les proteïnes i del medi condicionat per aquestes cèl·lules epitelials oviductals sobre la funcionalitat espermàtica.

Pel que fa als protocols de fecundació *in vitro*, s'han publicat varis treballs en humà (Vlad i col·l., 1996; Saridogan i col·l., 1997; Tse i col·l., 2007) i en altres espècies de mamífers, com en cavalls (Thomas i col·l., 1995a), conills (Dickens i col·l., 1996), cabres (Rodríguez-Dorta i col·l., 2007), vaques (Walter i Miller, 1996; Xia i col·l., 1996; Cox i Leese, 1997; Reischl i col·l., 1999; Rottmayer i col·l., 2006), porcs (Romar i col·l., 2001), micos (Rajagopal i col·l., 2006), ratolins (Lee i Yeung, 2006; Tan i col·l., 2007) o gossos (Vannucchi i col·l., 2006).

Respecte al cocultiu d'espermatozoides i de cèl·lules epitelials de l'oviducte, s'han dut a terme un bon nombre d'experiments a les espècies humana (Bongso i col·l., 1993; Kervancioglu i col·l., 1994; Morales i col·l., 1996; Ellington i col·l., 1998; Yao i col·l., 1999), i porcina (Suárez i col·l., 1991; Fazeli i col·l., 1999; Petrunkina i col·l., 2001c; Yeste i col·l., 2007c), així com també en cangurs (Sidhu i col·l., 1998), ovelles (Gutiérrez i col·l., 1993), gossos (Ellington i col·l., 1995; Kawakami i col·l., 2001), rates (Cortés i col·l., 2004), vaques (Lefebvre i Suárez, 1996; Gualtieri i Talevi, 2000; 2003) o cavalls (Ellington i col·l., 1993, Thomas i col·l., 1994; Thomas i col·l., 1995b). En bona part d'aquests estudis, s'ha demostrat que les cèl·lules epitelials influeixen de manera específica els espermatozoides, atès que en prolonguen la seva viabilitat, n'estabilitzen l'acrosoma i n'indueixen la capacitació (Kervancioglu i col·l., 1994; Yeung i col·l., 1994; Morales i col·l., 1996; Ellington i col·l., 1998; Fazeli i col·l., 1999). Més endavant, es reprendran tots i cadascuns d'aquests aspectes en la discussió del que s'ha observat per l'espècie porcina al quart article.

Finalment, els últims antecedents que resten per comentar són els que estudien l'efecte de les proteïnes del fluid oviductal i del medi condicionat produït per les cèl·lules oviductals en cultiu sobre la funcionalitat espermàtica. És ben conegut que un dels aspectes de la fisiologia de l'oviducte és la secreció de glicoproteïnes que s'acumulen al cauda de l'istmus, que és la regió en la qual es forma el reservori seminal preovulatori. Les funcions d'aquests secrecions són: impedir l'entrada dels fluids de l'úter i de l'ampul·la al reservori seminal i eliminar les

secrecions residuals del mascle que resten a la superfície dels espermatozoides (Hunter, 2002). S'ha observat, a més, que aquestes proteïnes oviductals influeixen d'alguna manera les cèl·lules espermàtiques (Wagh i Lippes, 1989; Abe i col·l., 1995; Lapointe i Sirard, 1996; Zhu i col·l., 2001; Quintero i col·l., 2005).

Un cop esbossats els trets més importants i l'estat actual de l'estudi de l'oviducte tant en porcí com en altres espècies, és moment d'exposar les raons que han conduït a dur a terme el quart article. En primer lloc, i reprenent l'inici de la discussió, cal esmentar que un nombre considerable d'estudis previs han demostrat que les cèl·lules epitelials de l'oviducte afecten la viabilitat, la capacitació i la motilitat espermàtiques a les espècies humana (Ellington i col·l., 1998; Yao i col·l., 1999), porcina (Fazeli i col·l., 1999), equina (Thomas i col·l., 1995b; Dobrinski i col·l., 1999), canina (Kawakami i col·l., 2001), bovina (Kodithuwakku i col·l., 2007) i en algunes espècies de rosegadors (Cortés i col·l., 2004). Amb aquests antecedents, l'objectiu del quart article ha estat determinar els efectes del cocultiu homòleg de cèl·lules oviductals i espermatozoides, i la co-incubació d'aquests amb el medi condicionat per les cèl·lules oviductals en cultiu, sobre la viabilitat, la capacitació i la motilitat espermàtiques i sobre la integritat de l'acrosoma i de la beina mitocondrial a l'espècie porcina. Aquest disseny experimental s'ha dut a terme durant un període de 24 hores, emprant una línia cel·lular d'epiteli de ronyó porcí (LLC-PK1) com a control positiu i separant en el cas dels experiments de cocultiu les poblacions d'espermatozoides unides a les cèl·lules epitelials d'aquelles que romanien lliurement al medi.

Un cop dut a terme el treball de laboratori, s'ha observat que el cocultiu *in vitro* dels espermatozoides amb les cèl·lules epitelials del oviducte i la incubació amb el medi condicionat per aquestes mateixes cèl·lules (OEC-CM), manté la viabilitat espermàtica, indueix la capacitació i en modifica alguns paràmetres de la seva cinètica. Cadascun d'aquests aspectes serà discutit a continuació, primer per separat i després conjuntament.

El cocultiu i la incubació amb el medi condicionat procedent de les cèl·lules epitelials no reproductives de ronyó (LLC-PK1, control positiu) també perllonga la viabilitat espermàtica si es compara amb el medi sense cèl·lules (control negatiu), encara que no en el mateix grau que les cèl·lules epitelials de l'oviducte. Tanmateix, el fet que les cèl·lules de l'epiteli no reproductiu mantinguin d'alguna manera la viabilitat espermàtica està d'acord amb el que han observat Kervancioglu i col·laboradors (1994) després de cocultivar els espermatozoides amb cèl·lules oviductals i amb cèl·lules Vero (que pertanyen a una línia cel·lular no reproductiva

de ronyó de mico), però també amb el treball d'Akhondi i els seus col·legues (1997) que han demostrat que el cocultiu d'espermatozoides amb cèl·lules epitelials epididimàries augmenta la viabilitat espermàtica en humà, de tal manera que l'epiteli del tracte genital és el que millor manté la funcionalitat espermàtica.

De fet, la viabilitat valorada amb el marcatge amb SYBR-14 i homodímer d'etidi (EthD-1) és més elevada a la població espermàtica unida a les cèl·lules oviductals i a les cèl·lules LLC-PK1 que a la població que resta lliure al medi de cocultiu. Després de 24 hores de cocultiu, la viabilitat es manté sense canvis significatius respecte l'inici de l'experiment a la població d'espermatozoides units a les cèl·lules oviductals però no a la d'aquells que es troben units a les cèl·lules LLC-PK1, en concordança amb el fet, prèviament exposat, que les cèl·lules de naturalesa reproductiva, com són les cèl·lules oviductals, s'uneixen específicament als espermatozoides i en perllonguen la seva viabilitat.

Els estudis dedicats al contacte entre els espermatozoides i les cèl·lules epitelials de l'oviducte ens permetre comprendre quin és el paper que juguen aquestes cèl·lules sobre els gàmetes masculins. En aquest sentit és molt important la formació del reservori seminal preovulatori a nivell de l'istmus, constituït a partir del contacte entre les cèl·lules somàtiques femenines i les cèl·lules germinals masculines. Gràcies a aquest reservori, els espermatozoides poden ser emmagatzemats de tal manera que es mantingui la seva funcionalitat, mitjançant un perllongament de la viabilitat i una reducció de la motilitat espermàtiques (Töpfer-Petersen i col·l., 2002). A l'istmus el reservori seminal es forma com a conseqüència de la interacció glucídico-proteica, entre oligosacàrids que contenen residus de manosa i que són exposats per les cèl·lules oviductals i les espermadhesines que són produïdes per les vesícules seminals i s'associen amb la superfície de l'espermatozoide en el moment de l'ejaculació (Töpfer-Petersen i col·l., 2002). Relacionat amb aquest darrer aspecte, cal destacar que l'espermadhesina AQN1 és una de les proteïnes d'unió a glúcids més importants a l'espècie porcina i juga un paper clau en la unió a les cèl·lules epitelials de l'oviducte i, per tant, en la formació del reservori seminal, com abans s'ha comentat (Ekhalsi-Hundrieser i col·l., 2005). Així doncs, si *in vivo* l'istmus emmagatzema els espermatozoides en condicions molt específiques, suprimint-ne la capacitació prematura fins que s'esdevé l'ovulació en un procés molt coordinat (Töpfer-Petersen i col·l., 2002), *in vitro* aquest efecte també s'observa.

A banda del contacte directe entre les cèl·lules oviductals i les cèl·lules espermàtiques, estudis previs duts a terme en conills (Smith i Nothnick, 1997) i en porcs (Fazeli i col·l., 2003) han demostrat que la unió dels espermatozoides amb algunes proteïnes procedents de les fraccions apicals de les membranes plasmàtiques de les cèl·lules oviductals (APM) també manté la viabilitat espermàtica. En porcí, sembla que són les proteïnes perifèriques més que no pas les integrals de membrana les qui duen a terme aquest perllongament (Fazeli i col·l., 2003).

A les poblacions espermàtiques que no es troben unides ni a les cèl·lules oviductals ni a les cèl·lules LLC-PK1 dels experiments de cocultiu i en els experiments d'incubació amb el medi condicionat de les cèl·lules cultivades, s'ha emprat un mètode de triple marcatge amb fluorocroms que permet conèixer, entre d'altres, l'estat funcional de l'acrosoma. A partir dels resultats obtinguts, s'observa que el percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma intacte és superior als cocultius i a les incubacions amb el medi condicionat de les cèl·lules oviductals que en els cocultius i a les incubacions amb el medi condicionat de les cèl·lules LLC-PK1 i superior als resultats del control negatiu. Aquest resultat confirma que les cèl·lules oviductals estableixen les membranes de l'acrosoma de l'espermatozoide de porcí, mitjançant la preservació de la seva integritat i redueixen el percentatge de reaccions acrosòmiques falses o degeneratives, de manera similar al que s'observa en humà (Yao i col·l., 1999). També relacionat amb la integritat de l'acrosoma i amb el paper que aquesta juga en el moment clau de la fecundació, s'ha observat que els espermatozoides d'humà i boví que presenten l'acrosoma intacte són més capaços d'unir-se a la zona pel·lúcida que els que presenten l'acrosoma alterat (Nishikimi i col·l., 1997; Liu i col·l., 2006).

El manteniment i la prolongació de la viabilitat espermàtica és una característica comuna dels sistemes homòlegs i heteròlegs de cocultiu, tal i com s'ha observat en humà (Kervancioglu i col·l., 1994; Yeung i col·l., 1994; Akhondi i col·l., 1997; Yao i col·l., 1999), porcí (Fazeli i col·l., 1997; 1999), boví (Ellington i col·l., 1991; Pollard i col·l., 1991), oví (Gutiérrez i col·l., 1993) i equí (Ellington i col·l., 1991; Thomas i col·l., 1994). A l'article quart, la viabilitat espermàtica es manté tant a les poblacions espermàtiques que estan unides a les cèl·lules epitelials de l'oviducte com en aquelles que no ho estan, per bé que s'observa que els percentatges d'espermatozoides viables són superiors a les primeres que a les segones. Així, i després de 24 hores de cocultiu, la viabilitat de la població unida a les cèl·lules oviductals es veu reduïda només en 10% respecte l'inici de l'experiment, mentre que la



viabilitat de la població espermàtica que no està unida a aquestes cèl·lules disminueix en un 50%. D'altra banda, atès que la viabilitat espermàtica és superior a la població unida a les cèl·lules oviductals respecte de la que està unida a les cèl·lules LLC-PK1 i superior a la població que no està unida a les cèl·lules oviductals respecte de la que no està unida a les cèl·lules LLC-PK1 en els experiments de cocultiu, es conclou que tant les secrecions procedents de les cèl·lules oviductals en cultiu com el contacte directe entre els espermatozoides i aquestes cèl·lules afecta la funcionalitat espermàtica.

D'acord amb aquest darrer punt, la viabilitat espermàtica es manté de manera significativament més important en les incubacions amb el medi condicionat procedent de les cèl·lules oviductals en cultiu que en el medi produït per les cèl·lules LLC-PK1 i, alhora, en el medi condicionat per aquestes darreres respecte del control negatiu. Malgrat que aquesta observació es produeixi només després d'una hora de l'inici de l'experiment però no més tard, aquests resultats concorden, en part, amb d'altres estudis duts a terme en humà i boví i en els que s'ha observat que la incubació amb el medi condicionat per les cèl·lules oviductals manté la viabilitat espermàtica (Ijaz i col·l., 1994; King i col·l., 1994; Abe i col·l., 1995; Zhu i col·l., 2001).

Quan s'analitzen conjuntament les dades de viabilitat en ambdues poblacions espermàtiques als experiments de cocultiu i en els experiments amb medi condicionat, s'observa que el medi condicionat afecta en menor mesura a la viabilitat i a la motilitat espermàtiques (aquesta darrera es discutirà a continuació) que la combinació entre les secrecions i el contacte directe cèl·lula oviductal-espermatozoide del cocultiu. Aquest resultat està d'acord amb d'altres estudis previs que han analitzat l'efecte de l'activitat secretora de les cèl·lules oviductals (Yeung i col·l., 1994; Abe i col·l., 1995; Yao i col·l., 1999) i del contacte directe entre aquestes i els espermatozoides (Dobrinski i col·l., 1997; Smith i Nothnick, 1997; Töpfer-Petersen i col·l., 2002; Petrunkina i col·l., 2004) sobre la funcionalitat espermàtica.

El cocultiu amb cèl·lules oviductals també té un paper incrementador sobre alguns paràmetres de la cinètica espermàtica, com ara la velocitat lineal, la curvilínia, la velocitat mitjana de la trajectòria i el percentatge de linearitat, i manté, a més, els percentatges d'espermatozoides amb motilitat progressiva a la població no unida a les cèl·lules oviductals. Aquest efecte potenciador de la motilitat espermàtica s'observa fins a una hora i mitja després d'haver començat l'experiment i es fa sobretot evident quan es compara amb les mateixes

dades de motilitat espermàtica procedents del cocultiu amb cèl·lules LLC-PK1 i del control negatiu. D'acord amb aquestes observacions, Bongso i col·laboradors (1993) han demostrat que el cocultiu d'espermatozoides amb línies cel·lulars de l'epiteli ampul·lar augmenta significativament la seva velocitat curvilínia així com també l'amplitud mitjana del desplaçament lateral del cap. Pel que fa a la motilitat progressiva, les dades obtingudes al quart article són coherents amb les observades en humà (Yao i col·l., 1999) o en ovelles (Gutiérrez i col·l., 1993). En aquest darrer estudi s'ha documentat que el percentatge d'espermatozoides amb motilitat progressiva és més gran després de cocultius homòlegs o heteròlegs amb cèl·lules oviductals que després de cocultius amb cèl·lules no reproductives (com la línia cel·lular IBRS-2) i que després d'incubar les cèl·lules espermàtiques amb un medi sense cèl·lules epitelials.

Pel que fa a la comparació del efectes dels medis condicionats per ambdós tipus cel·lulars (OEC i LLC-PK1) sobre la motilitat espermàtica, cal indicar que en la incubació amb el medi produït per les cèl·lules oviductals el percentatge d'espermatozoides amb motilitat progressiva és relativament, encara que no significativament, superior al dels controls positiu i negatiu. Malgrat tot, i atès que no hi ha un efecte clar del medi condicionat per les cèl·lules oviductals respecte del medi condicionat per les cèl·lules LLC-PK1, aquestes observacions estan només parcialment d'acord amb altres experiments similars duts a terme en humà i en d'altres espècies d'animals domèstics, en els quals s'ha demostrat que el medi condicionat per les cèl·lules oviductals perllonga la motilitat espermàtica (Ijaz i col·l., 1994; King i col·l., 1994; Abe i col·l., 1995; Zhu i col·l., 2001).

Un altre procés fisiològic clau que involucra les cèl·lules de l'epiteli oviductal a nivell de l'istmus i que afecta als espermatozoides és la capacitació espermàtica. Aquest procés es caracteritza per un influx de cations de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i per la fosforilació de tirosines d'algunes proteïnes de la superfície de l'espermatozoide (Töpfer-Petersen i col·l., 2002). Així doncs, durant el procés de capacitació espermàtica i a la població espermàtica no unida a les cèl·lules epitelials es produeix un increment del nombre de proteïnes fosforilades de la membrana plasmàtica, en primer terme a nivell de la cua de l'espermatozoide, i posteriorment a nivell del cap de la cèl·lula espermàtica (Petrunkina i col·l., 2004). De manera oposada, quan s'uneixen a les cèl·lules epitelials de l'oviducte, l'absorció de calci per part dels espermatozoides es veu

reduïda i els residus de tirosina de les proteïnes a nivell de la cua i del cap no es fosforilen (Töpfer-Petersen i col·l., 2002).

Al quart article, s'ha observat una reducció dels percentatges dels espermatozoides no capacitats i un augment dels espermatozoides capacitats a la població espermàtica no unida a les cèl·lules oviductals, trenta minuts després d'iniciar-se els experiments de cocultiu. En canvi, aquesta inducció de la capacitació espermàtica no s'observa ni a la població no unida a les cèl·lules no reproductives LLC-PK1 ni al medi sense cèl·lules (control negatiu) després del mateix temps d'incubació. Aquests resultats són similars als que prèviament han observat Kervancioglu i els seus col·legues (1994) en humà i Fazeli i col·laboradors (1999) en porcí, en el sentit que és el cocultiu amb cèl·lules oviductals, i no pas el cocultiu amb d'altres tipus cel·lulars, el qui indueix de manera específica la capacitació espermàtica. Aquesta observació sembla lògica si es té en compte que la capacitació espermàtica és un procés fisiològic que *in vivo* té lloc a l'istmus de la trompa de Fal·lopi (Petrunkina i col·l., 2004).

A més, aquest resultat sembla estar d'acord amb d'altres estudis duts a terme en gossos (Petrunkina i col·l., 2004) en els quals s'observa un augment de la fosforilació de tirosines de les proteïnes del cap de l'espermatozoide en les poblacions no unides a les cèl·lules oviductals, però no en les poblacions unides a aquestes cèl·lules. Aquest estudi de Petrunkina i col·laboradors (2004) és de particular interès perquè demostra que la taxa de proteïnes amb els residus de tirosina fosforilats a nivell de la cua de l'espermatozoide és més gran en les poblacions unides a fragments d'oviducte que en les que romanen lliures en suspensió o que els espermatozoides incubats en un medi sense fragments d'oviducte. Aquest fet es relaciona amb la preferència que tenen els espermatozoides que presenten les proteïnes del cap no fosforilades d'unir-se a les cèl·lules oviductals, en detriment dels qui presenten residus de tirosina fosforilats a nivell d'aquestes proteïnes. De fet, la unió dels espermatozoides a les cèl·lules oviductals forma el reservori seminal perquè retarda la capacitació impeding la fosforilació d'aquests residus de tirosina. D'altra banda, com que aquesta preferència d'unió a les cèl·lules oviductals que presenten els espermatozoides que no tenen les proteïnes del cap fosforilades s'ha observat tant en cocultiu homòleg com heteròleg (Petrunkina i col·l., 2004), no sembla que aquest fenomen depengui de les espècies animals en qüestió.

A la població espermàtica unida a les cèl·lules oviductals, el percentatge d'espermatozoides no capacitats també augmenta durant el període d'incubació, encara que en grau menor al que succeeix a la població no unida a aquestes cèl·lules. Això podria estar

relacionat amb el suggeriment que d'altres autors han fet en porcí i que suposa que els espermatozoides no capacitats s'uneixen preferentment a les cèl·lules oviductals i, posteriorment, capaciten ràpidament (Fazeli i col·l., 1999). En d'altres espècies, en canvi, s'ha observat que la unió dels espermatozoides amb les cèl·lules oviductals també és selectiva (Petrunkina i col·l., 2001c) però retarda la capacitació (Petrunkina i col·l., 2003) i que l'alliberament dels espermatozoides del reservori seminal és dependent de la capacitació i de l'hiperactivació (Yanagimachi i col·l., 2004); un fenomen, aquest darrer, que té menys rellevància en porcí a diferència del que s'esdevé en d'altres espècies com, per exemple, els ratolins.

Encara que els espermatozoides units a les cèl·lules oviductals restin menys capacitats que aquells que romanen lliures al medi de cocultiu durant el període d'incubació, fenomen que en principi s'explica en principi perquè la població espermàtica unida a les cèl·lules oviductals hauria de permanèixer no capacitada, l'augment del percentatge d'espermatozoides capacitats en aquesta població revela que tant el mecanisme d'unió entre els gàmetes masculins i les cèl·lules de l'epiteli oviductal com la capacitació espermàtica són processos complexos. En concordança amb aquest fenomen, la capacitació espermàtica no es veu induïda en aquells espermatozoides que s'uneixen a les cèl·lules no reproductives LLC-PK1, tal i com s'ha discutit al quart article. De fet, en el present capítol es proposa, tal i com han fet prèviament altres autors (Fazeli i col·l., 1999), que la majoria d'espermatozoides que s'uneixen a les cèl·lules oviductals no es troben capacitats sinó que la capacitació es produeix precisament durant aquesta unió. Així, els espermatozoides capacitats no s'uneixen a les cèl·lules oviductals perquè altrament el seu transport a través de l'oviducte i en direcció a l'òdit restaria impedit. Tanmateix, i malgrat els indicis raonables que condueixen a aquesta hipòtesi, els resultats actuals encara no són prou esclaridors en aquest punt.

Els efectes del medi condicionat per les cèl·lules en cultiu sobre la capacitació espermàtica també són dependents del tipus cel·lular emprat, atès que el percentatge d'espermatozoides capacitats és més gran després de la incubació amb el medi condicionat per les cèl·lules oviductals que després de les incubacions amb el medi produït per les cèl·lules LLC-PK1 o amb el medi no condicionat. Aquesta observació, més destacable a la població no unida a les cèl·lules epitelials dels experiments de cocultiu que en aquest cas, es produeix després d'una hora de l'inici de la co-incubació. D'acord amb aquests resultats, semblaria que els components del medi condicionat per les cèl·lules oviductals són diferents dels produïts

per les cèl·lules LLC-PK1 i dels que es troben al medi no condicionat, i al mateix temps també són diferents dels que es troben al medi dels experiments de cocultiu. Aquesta dada corrobora, en part, l'estudi d'Abe i col·laboradors (1995) que ha demostrat que la incubació dels espermatozoides amb medi condicionat per cèl·lules oviductals provoca efectes diferents de la incubació amb medi no condicionat per les mateixes cèl·lules.

La capacitació, la hiperactivació i alguns descriptors de la cinètica espermàtica són processos relacionats segons García-Herreros i col·laboradors (2000). A l'estudi del quart article, les incubacions amb el medi condicionat per les cèl·lules oviductals augmenten simultàniament els percentatges d'espermatozoides capacitats, la velocitat curvilínia i el percentatge de linearitat després d'una hora i mitja d'incubació, malgrat que en tots els casos aquest increment no sigui tant important com el que s'observa a la població no unida a les cèl·lules oviductals de l'experiment de cocultiu. Aquestes dades, que es reprendran més endavant en aquesta discussió, corroboren la hipòtesi que les secrecions produïdes i alliberades per les cèl·lules oviductals tenen algun paper en la funció espermàtica, encara que en menor grau que en el cocultiu. Endemés, aquests resultats estan d'acord amb el treball que Yeung i col·laboradors (1994) han dut a terme en humà, en el qual s'ha documentat que tant el cocultiu com la incubació amb el medi condicionat de les cèl·lules oviductals manté la hiperactivació dels espermatozoides.

Concretament, com que en ambdós sistemes (és a dir, tant a les suspensions espermàtiques no unides a les cèl·lules oviductals en cocultiu com en la co-incubació amb el medi condicionat per aquestes cèl·lules), els percentatges d'espermatozoides no capacitats disminueixen i els d'espermatozoides capacitats augmenten durant el període d'incubació, sembla que l'activitat secretora específica de les cèl·lules oviductals influeix en la capacitació espermàtica. Aquest fet sembla estar relacionat amb el fet que en porcí (Rodríguez-Martínez i col·l., 2001; Tienthai i col·l., 2004) i en boví (Parrish i col·l., 1989; McNutt i Killian, 1991; McNutt i col·l., 1994; Abe i col·l., 1995), el fluid oviductal també juga un paper clau en la capacitació dels espermatozoides. De fet, i a partir dels resultats obtinguts al quart article, és molt probable que les secrecions produïdes per les cèl·lules oviductals estiguin involucrades en la capacitació, per bé que l'efecte sigui molt més evident en el cas de la població espermàtica no unida a les cèl·lules oviductals en els experiments de cocultiu que en les incubacions amb el medi no condicionat. Concretament, i pel que fa a l'activitat secretora de

les cèl·lules oviductals, cal recordar que l'epiteli de l'oviducte de mamífer està constituït tant per cèl·lules secretores com per cèl·lules ciliades (vegeu també la Introducció del present capítol). Aquestes cèl·lules secretores produeixen i alliberen al lumen de l'oviducte un gran nombre de macromolècules, com la glicoproteïna secretada per l'oviducte (OSP) que es troba conservada en un bon nombre d'espècies de mamífers (Buhi i col·l., 2000; Killian, 2004). Aquestes proteïnes secretades duen a terme funcions de suport en el desenvolupament embrionari i de manteniment de la funcionalitat espermàtica (Abe, 1996; Pérez-Martínez i col·l., 2006). A més, i com ja s'ha assenyalat anteriorment, aquest fluid intraluminal està involucrat en la capacitat espermàtica en porcí, tal i com s'ha observat en estudis previs (Rodríguez-Martínez i col·l., 2001; Tienthai i col·l., 2004).

La capacitat espermàtica es un conjunt d'esdeveniments molt ben coordinat que té lloc al tracte genital femení i la seva terminació per aquelles cèl·lules espermàtiques implicades amb la fecundació està sincronitzada amb l'ovulació (Hunter i Rodríguez-Martínez, 2004). A més, la capacitat espermàtica és un procés periovulatori molt ben controlat i integrat *in vivo*, de manera que el seu estudi *in vitro* és una tasca força complicada. Durant el període preovulatori i de formació del reservori seminal, es produeix la supressió de la finalització de la capacitat espermàtica com a estratègia d'emmagatzemament dels espermatozoides. A més, la capacitat es veu afectada per mecanismes de control de l'ovari de tipus local i sistèmic, els quals actuen per coordinar la fase final de la maduració espermàtica i l'encontre de l'espermatozoide i l'oòcit (Hunter i Rodríguez-Martínez, 2004). Segons sembla, la capacitat i la reacció acrosòmica d'un espermatozoide que penetra l'oòcit es veuen concloses gràcies al fluid oviductal a nivell de la unió entre l'istmus i l'ampul·la (Hunter, 2002).

El marcatge amb l'antibiòtic clortetraciclina, que s'utilitza per valorar la capacitat espermàtica, permet conèixer també l'estat de l'acrosoma (Wang i col·l., 1995). A la població d'espermatozoides unida a les cèl·lules epitelials oviductals i cèl·lules LLC-PK1 no s'observen canvis en els percentatges d'espermatozoides que presenten l'acrosoma reaccionat, a diferència del que s'observa a les poblacions no unides a les cèl·lules epitelials. Aquest resultat és coherent amb el fet, demostrat en boví, que només els espermatozoides que presenten l'acrosoma intacte s'uneixen a les cèl·lules epitelials de l'oviducte i que un cop els espermatozoides s'han unit a aquestes cèl·lules els seus acrosomes romanen intactes. Així, la unió dels espermatozoides amb les cèl·lules oviductals apareix de nou, encara que aquest cop

en termes d'integritat acrosòmica, com un procés essencial per a preservar la capacitat fecundant de l'espermatozoide durant l'interval entre l'inici de l'estre i l'ovulació (Gualtieri i Talevi, 2000).

El paper dels inductors de la capacitació espermàtica ha estat també estudiat en experiments previs, alguns casos amb resultats contradictoris. Així, per exemple, l'àcid hialurònic, com s'ha discutit al capítol anterior, té un efecte retardador de la capacitació *in vivo* (Rodríguez-Martínez i col·l., 2001) i quan els espermatozoides són preservats durant tres dies a 15°C (Yeste i col·l., 2007b), però també té un efecte inductor després d'incubar els espermatozoides en condicions *in vitro* (Bergqvist i col·l., 2006). En aquesta controvèrsia, s'ha observat que l'heparina i el dermatan sulfat, ambdós glicosaminoglicans com l'àcid hialurònic i ambdós considerats com a inductors de la capacitació, augmenten el nombre d'espermatozoides viables i capacitats després de ser addicionats a l'esperma congelat de brau (Bergqvist i col·l., 2007). Altres estudis han suggerit que l'àcid hialurònic té algun paper en aquest procés perquè actua com a inhibidor potent de la interacció entre els espermatozoides i les cèl·lules oviductals i indueix la capacitació *in vitro* sense desencadenar l'exocitosi de l'acrosoma (Tienthai i col·l., 2000). En aquest sentit, un estudi força recent de Liberda i col·laboradors (2006) ha demostrat que el fluid oviductal inhibeix les proteïnes d'unió a l'oviducte que es troben al plasma seminal. Així, el fluid oviductal contindria glicoproteïnes i glicosaminoglicans que podrien induir l'alliberament dels espermatozoides del reservori seminal o bé podrien impedir la unió dels espermatozoides a les cèl·lules epitelials de l'oviducte. En canvi, el plasma seminal actua com a factor decapacitant per bé que l'àcid hialurònic i el medi condicionat indueixin la capacitació dels espermatozoides de porcí *in vitro* (Suzuki i col·l., 2002).

Tal i com s'ha discutit prèviament, la capacitació i la hiperactivació dels espermatozoides s'han demostrat associades amb els paràmetres cinètics de velocitat curvilínia i de percentatge de linearitat (Cancel i col·l., 2000), de tal manera que s'ha determinat una correlació positiva entre el percentatge d'espermatozoides capacitats i els percentatges de linearitat i rectitud (García-Herreros i col·l., 2005). Encara en relació amb la motilitat espermàtica, un altre estudi dut a terme en porcí (Satake i col·l., 2006) ha demostrat que les proteïnes procedents dels extractes apicals de la membrana plasmàtica de l'oviducte (APM) actuen sobre les subpoblacions espermàtiques que es mou de manera ràpida i lineal i en suprimeix la seva

velocitat. Al quart article, el percentatge de linearitat i el d'espermatozoides capacitats ha estat major al cocultiu amb cèl·lules oviductals que al cocultiu amb cèl·lules LLC-PK1 i al medi sense cèl·lules, de tal manera que aquest resultat sembla concordar amb el fet que en porcí les proteïnes procedents de l'APM duen a terme una resposta dosi-dependent sobre la linearitat

Els espermatozoides no capacitats s'uneixen preferentment a les cèl·lules oviductals o a les cèl·lules LLC-PK1 en detriment dels capacitats, com ja s'ha assenyalat en aquesta mateixa discussió. Al mateix temps la unió entre els espermatozoides i les cèl·lules oviductals és un aspecte bàsic de la formació del reservori seminal i dels esdeveniments previs i necessaris perquè la fecundació es dugui a terme. En aquest sentit, la integritat de la membrana plasmàtica és una característica dels espermatozoides que s'uneixen a les cèl·lules oviductals i que penetren l'òocit. Tal i com s'ha publicat en un estudi previ dut a terme amb esperma congelat/descongelat de boví (Khalil i col·l., 2006), la capacitat d'unió de l'espermatozoide a les cèl·lules oviductals depèn de la integritat de la seva membrana, de manera que aquells espermatozoides que presenten l'habilitat de modificar el seu volum respecte de les reduccions de la osmolaritat del medi perquè la seva membrana plasmàtica és íntegra i funcional, presenten una major capacitat d'unió a les cèl·lules oviductals i una capacitat fecundant més elevada. Així, i seguint els resultats d'aquest treball citat, els braus subfèrtils que presenten ejaculacions amb un nombre elevat d'espermatozoides amb la membrana plasmàtica malmesa presenten índexs d'unió a les cèl·lules epitelials més baixos i deficiències en l'adaptabilitat del seu volum després que es produeixin xocs hipotònics. També relacionat amb la fertilitat i la integritat de la membrana plasmàtica, Pérez-Llano i col·laboradors (2001) han demostrat que la resistència osmòtica dels espermatozoides, que està correlacionada amb la fertilitat *in vivo*, depèn de la integritat de la membrana plasmàtica dels espermatozoides.

Quan s'analitzen conjuntament la viabilitat, la motilitat i la capacitat espermàtiques, es conclou que el cocultiu amb cèl·lules epitelials de l'oviducte manté la viabilitat espermàtica, afecta les paràmetres cinètics i indueix la capacitació. Aquests resultats concorden amb els d'estudis previs duts a terme en humà (Kervancioglu i col·l., 1994; Yeung i col·l., 1994; Morales i col·l., 1996; Yao i col·l., 1999), porcí (Fazeli i col·l., 1999; Yeste i col·l., 2007c), caní (Petrunkina i col·l., 2003), boví (Ellington i col·l., 1991; Pollard i col·l., 1991; Gualtieri i Talevi, 2000), oví (Gutiérrez i col·l., 1993) i equí (Ellington i col·l., 1991; Thomas i col·l.,



1993; Thomas i col·l., 1995b), en els qual s'ha observat que les cèl·lules oviductals perllonguen la viabilitat dels espermatozoides, n'augmenten o en conserven la motilitat, n'estabilitzen l'acrosoma, en modifiquen la freqüència de batec de la cua i n'indueixen la capacitat i la seva posterior hiperactivació. Els efectes beneficiosos que tenen les cèl·lules oviductals sobre els espermatozoides també s'han observat en sistemes heteròlegs de cocultiu entre espermatozoides humans i cèl·lules oviductals bovines (Ellington i col·l., 1998). En aquest cas, s'ha observat que aquestes cèl·lules somàtiques estabilitzen l'estructura de la cromatina nuclear de l'espermatozoide, tant en semen fresc com criopreservat.

En l'anàlisi separada dels efectes de les cèl·lules oviductals sobre les poblacions espermàtiques unides a aquestes cèl·lules de les que no ho estan als experiments de cocultiu després de 24 hores de l'inici de l'experiment, i comparant amb el que s'observa als 5 minuts, el percentatge d'espermatozoides no viables i estàtics es veu significativament incrementat a la població no unida a les cèl·lules oviductals, mentre que els espermatozoides units a les cèl·lules oviductals romanen viables i mòbils. Així, i com ja s'ha esmentat, després de 24 hores la viabilitat dels espermatozoides units a les cèl·lules oviductals es veu només reduïda en un 10%, mentre que la viabilitat dels espermatozoides no units ni a aquestes cèl·lules ni a les cèl·lules LLC-PK1 es redueix del 80% al 30%. Com que s'observen diferències entre el control negatiu i les cèl·lules oviductals a la població d'espermatozoides lliures i entre les poblacions unides a les cèl·lules oviductals i les unides a les cèl·lules LLC-PK1, es pot concloure que tant les secrecions de les cèl·lules oviductals com el contacte directe entre cèl·lules somàtiques i germinals masculines afecta la funcionalitat espermàtica. De fet, els estudis que prèviament han demostrat la influència d'ambdós fenòmens són bastant nombrosos (Yeung i col·l., 1994; Abe i col·l., 1995; Dobrinski i col·l., 1997; Smith i Nothnick, 1997; Yao i col·l., 1999). A més, determinades proteïnes de l'epiteli oviductal regulen la funció espermàtica en braus (Boquest i col·l., 1998) i la preservació de la funcionalitat espermàtica al tracte genital femení sembla estar relacionada, almenys parcialment, amb la presència de catalasa al fluid oviductal.

En la comparació dels paràmetres espermàtics entre la població no unida a les cèl·lules epitelials dels experiments de cocultiu i els espermatozoides incubats amb el medi condicionat per les cèl·lules cultivades *in vitro*, s'observa que el cocultiu té la capacitat de mantenir la motilitat espermàtica en major grau que la incubació amb medi condicionat, entre d'altres raons perquè el medi condicionat no és idèntic al medi de cocultiu. Aquests resultats

concorden amb els de Gutiérrez i col·laboradors (1993) en ovelles i de Kervancioglu i col·legues (1994) en humà, en ambdós casos s'ha demostrat que el medi condicionat no té el mateix efecte que el cocultiu, per bé que siguin millors les incubacions amb aquest medi (Abe i col·l., 1995) que les incubacions amb medi sense condicionar. Encara que a la literatura s'hi trobin un bon nombre d'estudis que demostrin que el medi condicionat per les cèl·lules oviductals perllonga la viabilitat i manté la motilitat espermàtiques (Ijaz i col·l., 1994; King i col·l., 1994; Abe i col·l., 1995; Zhu i col·l., 2001), a l'article quart d'aquest capítol (Yeste i col·l., 2008) només s'ha observat una tendència lleugera pel que fa a aquest efecte, sense que s'hagin observat diferències estadísticament significatives. En boví, les proteïnes del fluid oviductal regulen la funcionalitat espermàtica per tal de facilitar la fecundació de l'òocit (Parrish i col·l., 1989; McNutt i Killian, 1991; McNutt i col·l., 1994). Tanmateix, els resultats de l'estudi de l'article quart suggereixen que el model per estudiar l'efecte de les secrecions de les cèl·lules oviductals sobre els espermatozoides requereix una millora com ara la utilització fluid oviductal canulat, atès que aquest conté molècules que no són presents al medi condicionat *in vitro* (Oliveira i col·l., 1999; Killian, 2004).

De l'estudi dels efectes del cocultiu amb cèl·lules oviductals i del medi condicionat produït per aquestes sobre els espermatozoides es pot concloure, en fi, que ambdós afecten la funció espermàtica en porcí, encara que l'efecte del cocultiu és molt més important que el de la incubació amb medi condicionat. Una qüestió important a tenir en compte en possibles estudis futurs és el mètode de valoració de la capacitat espermàtica. Així, malgrat que en el disseny experimental del quart article aquesta s'hagi assajat mitjançant el marcatge amb clortetraciclina, altres treballs, com per exemple el de Bergqvist i col·laboradors (2007) ha determinat aquest paràmetre mitjançant el marcatge merocianina-540, que sembla un mètode força més sensible i acurat.

L'activitat secretora de les cèl·lules oviductals tant *in vivo* com *in vitro* ha estat abastament discutida en els paràgrafs d'aquesta discussió. Breument, el fluid oviductal conté *in vivo* proteïnes secretades per les cèl·lules oviductals que tenen un efecte beneficiós per l'espermatozoide humà (Lippes i Wagh, 1989) com, per exemple, impedir que es desencadeni la reacció acrosòmica en absència de l'òocit (Quintero i col·l., 2005). D'altra banda, recentment s'ha estudiat l'efecte de dues proteïnes integrals de la membrana plasmàtica de les cèl·lules oviductals — la *heat shock protein 60 kDa* (60 kDa) i la *glucose regulated protein 78*

*kDa* (HSPA5) — sobre la funcionalitat de l'espermatozoide d'humà (Lachance i col·l., 2007). Així doncs, el coneixement actual en aquest àmbit ha demostrat que les cèl·lules oviductals actuen sobre els paràmetres espermàtics cel·lulars (per a més informació vegeu el quart article) mitjançant el contacte directe (Fazeli i col·l., 1999; Sostaric i col·l., 2006; Lachance i col·l., 2007) i la secreció de determinats productes (McCauley i col·l., 2003; Quintero i col·l., 2005; Kumaresan i col·l., 2006; Zhang i col·l., 2006).

Tanmateix, no hi ha massa treballs que dirigeixin els seus esforços a comprendre quin és l'efecte que té presència d'espermatozoides sobre l'expressió gènica de les cèl·lules oviductals (Fazeli i col·l., 2004; Georgiou i col·l., 2005; 2007; Kodithuwakku i col·l., 2007). En porcí s'ha observat que els extractes aïllats de les membranes plasmàtiques apicals (APM) perllonga la viabilitat (Fazeli i col·l., 2003). En relació amb aquesta troballa, s'han identificat recentment algunes proteïnes de l'extracte soluble d'aquestes fraccions (sAPM) que apareix en una banda de 70 kDa de massa molecular i s'uneix als espermatozoides (Sostaric i col·l., 2006; Elliot i col·l., comunicació personal). Tenint en compte aquests antecedents, l'estudi del cinquè article té dos objectius:

- 1) Determinar com varia l'expressió dels gens d'algunes de les proteïnes identificades a la sAPM durant les fases fol·licular i luteal de les cèl·lules cultivades i,
- 2) Assajar com els espermatozoides prèviament rentats amb gradient de Percoll modifiquen, en cocultiu *in vitro* i durant un període de 24 hores, l'expressió d'aquests gens.

Els gens que s'han estudiat són quatre: la clusterina (*CLU*), la *heat shock cognate protein related 70 kDa* (*HSPA8*), la *heat shock protein 90 kDa alpha A1* (*HSP90AA1*) i la *glucose regulated protein 78 kDa* (*HSPA5*) (per a més informació, vegeu la versió anglesa de la Introducció d'aquest capítol) i la seva expressió s'ha determinat mitjançant la tècnica de la transcripció inversa prèvia a la reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR), emprant el gen de la  $\beta$ -actina (*ACTB*) com a estàndard intern. D'altra banda, i com succeïa al quart article, s'ha utilitzat la línia cel·lular no reproductiva LLC-PK1 com a control negatiu i les incubacions s'han dut a terme en el medi de cocultiu (TALP).

La clusterina és un glicoproteïna multifuncional que constitueix els complexos d'adhesió cel·lulars i està implicada en les interaccions cèl·lula-cèl·lula i entre les cèl·lules i la matriu extracel·lular (Valdés-González i col·l., 2005; Wang i col·l., 2007). Encara que la seva funció en termes reproductius sigui encara poc coneguda, aquesta proteïna ha estat localitzada a la

superfície dels espermatozoides d'humà (Atlas-White i col·l., 2000) i al tracte genital masculí d'humà i brau (Plotton i col·l., 2006; Moura i col·l., 2007).

La HSP90AA1, la HSPA8 i la HSPA5 són components induïbles i constitutius de la superfamília de proteïnes de xoc tèrmic. El paper que juguen aquestes proteïnes en la fisiologia reproductiva està relacionada amb la seva interacció amb els receptors d'esteroides que inclouen, a banda del domini d'unió a lligand, setis d'unió a proteïnes de xoc tèrmic i seqüències de localització nuclear. També pel que fa al paper de les proteïnes d'estrès tèrmic i la seva funció reproductiva s'han observat canvis en els nivells d'aquestes proteïnes durant els cicles menstrual (Wu i col·l., 1996) i endometrial (Komatsu i col·l., 1997; Tabibzadeh i Broome, 1999).

D'altra banda, la HSP90AA1 sembla estar implicada en la motilitat (Huang i col·l., 1999) i la capacitat espermatògica (Ecroyd i col·l., 2003; Hou i col·l., 2007). La HSPA8 és la forma constitutiva de la *heat shock protein 70 kDa* (HSPA1A), una proteïna que és sobreproduïda en resposta a la presència d'espermatozoides (Georgiou i col·l., 2005). Finalment, la HSPA5 és una proteïna present a l'oviducte i a l'úter i s'uneix als espermatozoides d'humà i boví. A més, aquesta proteïna ha estat identificada com a una de les sis proteïnes més importants que constitueixen les fraccions apicals de la membrana plasmàtica (APM) de les cèl·lules oviductals de boví (Boilard i col·l., 2004).

Gràcies als resultats obtinguts al cinquè article, es conclou que no hi ha diferències significatives en la expressió d'aquests quatre gens entre les cèl·lules oviductals en cultiu dels estadis fol·licular i luteal. Aquest resultat és coherent amb el que altres treballs previs han documentat pel que fa a d'altres aspectes d'aquestes cèl·lules en cultiu *in vitro* i en els que no s'han observat diferències entre ambdós estadis. Així, per exemple, l'estadi de l'ovari o la regió de l'oviducte de la qual s'han obtingut les cèl·lules oviductals cultivades, no afecta la funció espermatògica de manera diferencial (Suárez i col·l., 1991; Fazeli i col·l., 1999; Petrunkina i col·l., 2001c). Malgrat tot, altres treballs *in vivo* centrats en l'estudi de l'endometri d'humà han constatat variacions en els patrons d'expressió gènica depenent del cicle menstrual en algunes proteïnes de xoc tèrmic com la HSPB1, la HSPD1 i la HSPA8. De fet, l'endometri en humans pateix un conjunt de canvis com a conseqüència dels cicles proliferatius i secretors característics i en resposta a les hormones esteroïdees. És dins del marc d'aquest conjunt de canvis fisiològics que s'observen variacions en l'expressió d'aquestes tres proteïnes, unes variacions que són especialment subtils després de l'ovulació

(Tabibzadeh i Broome, 1999). Shah i col·laboradors (1998) han demostrat també en humà que es produeixen disminucions dels nivells de HSP90AA1 en els teixits decidual i de la placenta durant el curs normal de la gestació.

D'altra banda, i malgrat no s'hagin observat diferències en l'expressió de clusterina entre ambdós estadis, Forni i col·laboradors (2003) han demostrat que l'expressió d'aquesta proteïna augmenta en els cossos lútics quan la luteòlisi és induïda.

En definitiva, i a partir de les dades obtingudes als experiments de cultiu, sembla que els perfils d'expressió d'aquests quatre gens no varien quan es comparen ambdós estadis ovàrics. Tanmateix, i atès que s'observen canvis en l'expressió d'aquests gens en d'altres òrgans *in vivo*, no és del tot evident si l'absència de diferències entre els estadis fol·licular i luteal es deu a la naturalesa de l'oviducte respecte l'endometri, o si la manca de diferències és una conseqüència dels processos de desdiferenciació cel·lular que es produeixen durant el cultiu primari d'algunes cèl·lules epitelials, tal i com s'esdevé, per exemple, durant el cultiu *in vitro* de cèl·lules epididimàries de porcí (Bassols i col·l., 2004; 2007). Així, se suggereix que és necessari dur a terme experiments addicionals per tal de comprendre amb més exactitud quins canvis es produeixen en la expressió gènica durant el cicle ovàric.

Quan es comparen els nivells d'expressió d'aquests quatre gens entre les cèl·lules oviductals i les cèl·lules LLC-PK1, la *HSP90AA1* i la *HSPA5* estan més expressades en els cultius de cèl·lules LLC-PK1 que en els cultius de cèl·lules oviductals. Com que ambdues formen part del grup de proteïnes de xoc tèrmic induïbles, a diferència de la clusterina i de la *HSPA8*, aquest fet i la diferència entre el cultiu primari i la línia cel·lular podria explicar aquestes diferències entre ambdós tipus de cultius. Nogensmenys, i com en el cas anterior, s'hauria de desenvolupar un nou estudi emprant cultiu primari de cèl·lules no reproductives per explicar millor aquesta darrera qüestió.

La presència d'espermatozoides en cocultiu *in vitro* produeix la sobreexpressió del gens que codifiquen per proteïnes de xoc tèrmic (*HSP90AA1*, *HSPA8* i *HSPA5*) tant en cèl·lules oviductals com LLC-PK1. Per contra, l'expressió de la clusterina no es veu afectada per la presència dels gàmetes masculins. Com ja s'ha esmentat en aquesta discussió, el paper de la clusterina respecte de la fisiologia reproductiva no és tant clar com el de les proteïnes d'estrès tèrmic, que interaccionen amb els receptors d'esteroides. De fet, la sobreexpressió d'aquests gens és significativament superior en els cultius de cèl·lules oviductals que en els de cèl·lules

LLC-PK1, i als gens induïbles que als constitutius, en concordança amb d'altres estudis (Tabibdzadeh i Broome, 1999; Georgiou i col·l., 2005) que suggereixen que aquestes proteïnes d'estrès tèrmic juguen algun paper en el tracte genital femení.

S'ha publicat que la *HSP90AA1* és una proteïna involucrada en la capacitat espermàtica (Ecroyd i col·l., 2003; Hou i col·l., 2007), un procés que com s'ha discutit s'esdevé a l'oviducte. En porcí, de manera similar al que passa en d'altres espècies de mamífers, els espermatozoides no capacitats s'uneixen de manera preferent a les cèl·lules oviductals i a les cèl·lules LLC-PK1 i posteriorment i en el primer cas capaciten ràpidament (vegeu el quart article i l'inici d'aquesta discussió). Atès que la capacitat espermàtica no es veu induïda en aquells espermatozoides que s'uneixen a les cèl·lules LLC-PK1 i que la sobreexpressió del gen de la *HSP90AA1* com a conseqüència de la presència de les cèl·lules espermàtiques s'observa abans a les cèl·lules oviductals que a les cèl·lules LLC-PK1, es conclou que ambdós fenòmens podrien estar relacionats.

El gen que codifica per una altra proteïna induïble d'estrès tèrmic, la *HSPA5*, també es veu sobreexpressat a les cèl·lules oviductals tres hores després que aquestes siguin cocultivades amb els espermatozoides, de manera similar al que s'observa pel gen de la *HSP90AA1*. Aquesta *HSPA5* és un xaperona molecular (Little i col·l., 1994) que és induïda en condicions d'estrès i juga un paper protector. Al cinquè article s'ha demostrat que l'expressió del gen que codifica per aquesta proteïna es veu induït específicament per les cèl·lules oviductals, tal i com s'observa després de comparar amb el cocultiu amb cèl·lules LLC-PK1. Aquest resultat suggereix una funció específica d'aquesta proteïna en els esdeveniments reproductius i concorda amb el fet que la *HSPA5* ha estat identificada com una de les sis proteïnes més importants en els extractes de la membrana plasmàtica apical de les cèl·lules oviductals en bovins (Boilard i col·l., 2004). A més, aquesta proteïna està implicada en la espermatogènesi en ratolí (Huo i col·l., 2004) i en l'inici de la sensitització uterina en rates (Simmons i Kennedy, 2000).

L'altra proteïna de xoc tèrmic al cinquè article és la *HSPA8* que també ha estat identificada en una fracció soluble de l'APM de les cèl·lules oviductals (Elliot i col·l., comunicació personal) i és la forma constitutiva de la *HSPA1A*. A diferència del que s'observa per la *HSP90AA1* i la *HSPA5*, la sobreexpressió del *HSPA8* deguda a la presència dels espermatozoides no és tant important com el dels gens que codifiquen per les proteïnes induïbles d'estrès tèrmic, per bé que la seva expressió es vegi augmentada després de sis

hores cocultiu. Malauradament, no hi ha estudis que estudiïn aquesta proteïna a l'oviducte, de manera que només es disposa dels resultats que s'han documentat per la seva forma induïble (HSPA1A). En aquest sentit, s'ha determinat que els espermatozoides indueixen l'expressió del gen HSPA1A tant en cèl·lules d'una línia de cèrvix uterí en humà com en cultiu primari de cèl·lules de l'endocèrvix de dones sexualment actives (Jeremias i col·l., 1997). També s'ha observat que les proteïnes de la família de la HSPA1A són produïdes en resposta a la presència d'espermatozoides (Georgiou i col·l., 2005). Tanmateix, en d'altres treballs en els que s'han estudiat les proteïnes HSPA8 i HSPA1A a l'endometri d'humà, s'ha observat que els patrons d'expressió d'ambdues proteïnes són diferents. Així, mentre que els nivells d'HSPA8 varien, de tal manera que augmenten durant les fases proliferativa tardana i secretora primerenca i disminueixen a les fases secretores medial i tardana i a la fase menstrual, els nivells de l'HSPA1A es mantenen constants durant tot aquest cicle (Tabibdzadeh i Broome, 1999). Els resultats que s'han obtingut al cinquè article, com els treballs previs, indiquen que la HSPA8 és una proteïna implicada en els processos reproductius per bé que el seu comportament sigui diferent del de les proteïnes induïbles de xoc tèrmic estudiades (HSP90AA1 i HSPA5).

Previ a l'estudi del cinquè article, s'han dut a terme d'altres aproximacions amb l'objectiu d'estudiar l'expressió gènica de les cèl·lules oviductals en resposta als espermatozoides. Després de la inseminació en ratolins, Fazeli i col·laboradors (2004) han demostrat que els espermatozoides desencadenen una via de transducció de la senyal que modula l'expressió gènica de les cèl·lules oviductals quan els gàmetes masculins arriben a l'oviducte. En porcí, Georgiou i col·laboradors (2005; 2007) han demostrat que els gàmetes masculins i femenins (és a dir, els espermatozoides i els oòcits) modifiquen l'expressió d'algunes proteïnes oviductals després de ser incubats amb fragments de l'oviducte. Recentment, un estudi similar al del cinquè article, que s'ha dut a terme en boví, ha demostrat que els espermatozoides mòbils augmenten l'expressió de prostaglandines per part de les cèl·lules epitelials de l'oviducte (Kodithuwakku i col·l., 2007).

Com s'ha indicat prèviament, en conills (Smith i Nothnick, 1997), en porcí (Fazeli i col·l., 2003) i en vaques (Boilard i col·l., 2004), la incubació dels espermatozoides amb les fraccions apicals de la membrana plasmàtica (APM) de l'oviducte en manté la seva viabilitat. En porcí, aquests extractes han estat parcialment caracteritzats (Sostaric i col·l., 2006; Elliot i col·l.,

comunicació personal) de manera que els esforços es dirigeixen ara cap a la identificació de la proteïna o proteïnes que modulen la funció espermàtica. De fet, si s'aprofundeix en el coneixement d'aquesta o aquestes proteïnes es podran dissenyar nous diluents de llarga durada amb el consegüent benefici per les pràctiques de conservació espermàtiques i les indústries agroalimentàries. Els resultats del cinquè article suggereixen que les proteïnes HSP90AA1, HSPA8 i/o HSPA5 podrien ser alguns dels components de l'APM implicats en aquesta modulació de la funció espermàtica de la qual es parlava (Fazeli i col·l., 2003; Boilard i col·l., 2004). Tanmateix, i atès que al cinquè article s'ha utilitzat bàsicament la transcripció inversa i la PCR convencional, es recomana el disseny i consecució de nous treballs emprant la PCR a temps real, així com tècniques d'immunocitoquímica, proteòmica i silenciament gènic.

Seguint aquest suggeriment, i a partir dels resultats exposats fins ara, s'ha dut a terme l'estudi del sisè article, bàsicament focalitzat en la determinació dels efectes de la HSP90AA1 sobre la viabilitat espermàtica després de cocultiu *in vitro* amb cèl·lules oviductals i espermatozoides. Per tal d'assolir aquest objectiu, s'ha utilitzat la interferència de l'RNA (RNAi) que és una estratègia de silenciament gènic per tal d'inhibir l'expressió de l'HSP90AA1. Posteriorment, la optimització i l'efectivitat d'aquest silenciament s'han valorat mitjançant transcripció inversa i PCR convencional i immunocitoquímica anti-HSP90AA1. Un cop optimitzat el silenciament d'aquest gen s'ha valorat la viabilitat espermàtica després d'un cocultiu amb cèl·lules oviductals que tenien el gen de la HSP90AA1 silenciada. En aquest experiment s'han utilitzat, a més, dos controls: el primer consisteix amb cèl·lules oviductals a les quals no se'ls ha practicat transferència de l'siRNA (control negatiu) i el segon consisteix amb cèl·lules oviductals a les quals se'ls ha transferit un siRNA que no silencia cap gen (control positiu). Com al cinquè article, el gen de la  $\beta$ -actina s'ha utilitzat com a estàndard intern.

La interferència de l'RNA és una estratègia per reduir l'expressió gènica (*knockdown*) que actua a nivell post-transcripcional i que s'indueix a partir de la introducció de cadenes dobles i curtes d'RNA (siRNA). Aquesta tècnica d'interferència és una estratègia molt útil en línies cel·lulars i cultiu primari de cèl·lules de mamífer a l'hora d'identificar la funció que té un gen determinat (Liu i col·l., 2004; Paroo i Corey, 2004). Actualment, la interferència de l'RNA induïda per siRNA és juntament amb l'mRNA antisentit la tècnica més emprada dins



del conjunt de tècniques anti-mRNA (Kurreck, 2003; Yu, 2007). Tanmateix, durant els últims anys l'ús de la interferència de l'RNA ha anat substituint progressivament la utilització de l'mRNA antisentit (Elbashir i col·l., 2001; Ovcharenko i col·l., 2005), atès que la primera presenta molts més avantatges que la segona (Hogrefe, 1999; Lee i col., 2002; Achenbach i col·l., 2003; Hough i col·l., 2003).

Un inconvenient de les tècniques d'interferència d'RNA, com succeeix també amb la resta de tècniques anti-mRNA, és la transferència de l'àcid nucleic a la cèl·lula, perquè sovint aquest procés compromet la viabilitat cel·lular i, a vegades, aquesta transferència és difícil d'aconseguir en cultiu primari (Ovrachenko i col·l., 2005). Per transferir aquests siRNA es poden utilitzar diferents mètodes com, per exemple, la transfecció, la transducció o l'electroporació *in vitro*. D'entre tots aquests, la transfecció és el mètode més utilitzat en línies cel·lulars immortalitzades per bé que en cultiu primari sigui sovint poc efectiva (Rebersek i col·l., 2007). Al sisè article, s'han dut a terme un conjunt d'intents per transferir els siRNA mitjançant el mètode de la transfecció química. Tanmateix, i atès que la transfecció no ha estat prou efectiva, s'ha utilitzat l'electroporació *in vitro* per tal de silenciar el gens *ACTB* i *HSP90AA1*, malgrat que aquesta tècnica estigui associada a una elevada citotoxicitat, especialment pel que fa a la introducció de plasmidis amb un elevat nombre de parells de bases (Sato, 2005).

Al sisè article, els nivells de viabilitat cel·lular observats han estat superiors després d'aplicar la transfecció que després d'aplicar l'electroporació, per bé que mitjançant la primera no s'han arribat a reduir els nivells d'expressió dels gens *ACTB* i *HSP90AA1*. Així, després d'optimitzar la transferència d'siRNA mitjançant l'electroporació *in vitro*, les cèl·lules oviductals electroporades s'han cocultivat amb espermatozoides, la viabilitat dels quals ha estat valorada després de 24 i 48 hores. Els resultats obtinguts confirmen que el cocultiu amb cèl·lules oviductals perllonga la viabilitat espermàtica (tal i com s'observa al quart article), car la viabilitat dels espermatozoides és superior després del cocultiu amb les cèl·lules oviductals no electroporades (que presenten una confluència molt més elevada) que després del cocultiu amb les electroporades, tant quan s'utilitzen siRNAs específics pel gen *HSP90AA1* que quan s'utilitzen siRNAs que no silencien cap gen. Això fa pensar que la viabilitat espermàtica més baixa observada en el cocultiu amb cèl·lules electroporades es deu als efectes del mètode d'electroporació i no pas al silenciament.

A partir dels resultats de l'anàlisi de la viabilitat espermàtica es conclou que la HSP90AA1 no està implicada en el manteniment de la viabilitat espermàtica, perquè les dades d'aquest paràmetre són similars quan s'utilitzen siRNAs específics pel gen *HSP90AA1* i siRNAs inespecífics. S'ha publicat que les cèl·lules oviductals afecten de manera diferencial la viabilitat espermàtica segons si els espermatozoides s'uneixen o no a les cèl·lules epitelials (vegeu el quart article; Yeste i col·l., 2008). Tanmateix, tampoc s'han observat diferències en l'anàlisi de la viabilitat espermàtica de les dues poblacions com a conseqüència del silenciament del gen *HSP90AA1*, de manera que aquests resultats confirmen el paper de les cèl·lules oviductals en el manteniment de la viabilitat espermàtica però descarten la HSP90AA1 com a proteïna oviductal involucrada en aquest manteniment.

Atès que al cinquè article s'ha observat que els espermatozoides indueixen l'expressió del gen *HSP90AA1* a les cèl·lules oviductals després de tres hores de cocultiu, aquesta proteïna podria tenir algun altre paper sobre la funcionalitat espermàtica diferent del manteniment de la viabilitat. Així i atès que la HSP90AA1 sembla estar involucrada en la capacitat espermàtica (Ecroyd i col·l., 2003; Hou i col·l., 2007), es podria utilitzar la interferència de l'RNA per esclarir aquesta funció, puix que no hi ha fonament per la presència d'inductors de la capacitat espermàtica en els diluents de curta i llarga durada.

D'altra banda, els gens *HSPA8* i *HSPA5* també són sobreexpressats per les cèl·lules oviductals després de cocultiu *in vitro* amb espermatozoïes. Així, la interferència de l'RNA també podria permetre conèixer en major grau quin és el paper d'aquests dos gens sobre la funcionalitat espermàtica.

Finalment, l'ús de la RNAi planteja el problema de la citotoxicitat a les cèl·lules transfectades. En aquest sentit, no és del tot evident si les cèl·lules epitelials no viables com a conseqüència de l'aplicació de l'electroporació poden influir d'alguna manera sobre els resultats finals, de manera que la utilització d'altres tècniques de transferència de l'RNA és un dels aspectes a tenir en compte en futurs estudis.



# **Capítol IV. Espermatozoides i cèl·lules epitelials de l'oviducte**

---

## **4. Conclusions**



---

## 4. Conclusions

---

1. El cocultiu homòleg de cèl·lules epitelials de l'oviducte i d'espermatozoides prolonga la viabilitat espermàtica i estabilitza les membranes acrosòmiques dels espermatozoides de porcí.
2. El perllongament de la viabilitat és significativament superior a les poblacions espermàtiques unides a les cèl·lules oviductals respecte als espermatozoides que romanen lliures al medi de cocultiu. Aquest resultat està d'acord amb la formació i el paper del reservori seminal.
3. El cocultiu *in vitro* amb cèl·lules de l'oviducte manté els paràmetres de motilitat espermàtica a la població no unida a les cèl·lules epitelials de manera significativament superior al cocultiu amb cèl·lules LLC-PK1.
4. Les cèl·lules epitelials no reproductives (LLC-PK1) mantenen la viabilitat i la motilitat espermàtiques en major mesura que el medi sense cèl·lules, per bé que en inferior grau que les cèl·lules oviductals.
5. Els espermatozoides no capacitats s'uneixen de manera preferent a les cèl·lules oviductals i a les cèl·lules LLC-PK1, mentre que els espermatozoides capacitats romanen lliures al medi sense unir-se a aquestes cèl·lules.
6. El percentatge d'espermatozoides capacitats és superior en les poblacions unides i no unides a les cèl·lules oviductals que a les poblacions respectives de les cèl·lules LLC-PK1. Aquest fet suggereix que les cèl·lules oviductals indueixen específicament la capacitat espermàtica.
7. L'evolució dels percentatges d'espermatozoides capacitats i no capacitats a la població espermàtica unida a les cèl·lules oviductals es troba en concordança amb el suggeriment que les cèl·lules espermàtiques no capacitades en porcí s'uneixen a les cèl·lules oviductals, i després capaciten ràpidament.

8. La incubació dels espermatozoides amb el medi condicionat per les cèl·lules oviductals afecta la funció espermàtica, per bé que el cocultiu amb aquestes cèl·lules influencii en major grau la viabilitat, la capacitació i la motilitat espermàtiques.
9. No s'observen canvis en l'expressió dels gens que codifiquen per la clusterina, la HSP90AA1, la HSPA8 i la HSPA5 quan es comparen el cultius de cèl·lules en els estadis fol·licular i luteal del cicle ovàric.
10. La presència d'espermatozoides no altera l'expressió del gen de la clusterina ni a les cèl·lules oviductals ni a les cèl·lules LLC-PK1, però provoca la sobreexpressió dels gens *HSP90AA1*, *HSPA8* i *HSPA5*, que a pertanyen a la família de les proteïnes d'estrès tèrmic.
11. Els espermatozoides també indueixen l'expressió dels gens *HSP90AA1*, *HSPA8* i *HSPA5* a les cèl·lules no reproductives LLC-PK1, però amb posterioritat al que s'observa a les cèl·lules oviductals. Aquest resultat suggereix un efecte específic dels espermatozoides sobre l'expressió d'aquests gens a les cèl·lules oviductals.
12. La citotoxicitat observada quan s'utilitza la electroporació *in vitro* és superior que quan s'utilitza el mètode de transfecció convencional (*plated transfection*).
13. Atès que utilitzant la transfecció química no s'observa el silenciament dels gens *ACTB* i *HSP90AA1* a les cèl·lules transfectades, l'electroporació *in vitro* esdevé una alternativa per a l'ús de la interferència de l'RNA en el cultiu primari de cèl·lules oviductals.
14. No s'observen canvis en la viabilitat espermàtica després de cocultivar els espermatozoides amb cèl·lules que tenen el gen *HSP90AA1* silenciats. Aquest resultat implica que aquesta proteïna no està implicada en el perllongament de la supervivència espermàtica.
15. Atès que la HSP90AA1 és una proteïna involucrada en la capacitació espermàtica, els experiments posteriors podrien estudiar quins són els efectes que produeix el silenciament d'aquest gen a les cèl·lules oviductals sobre aquest paràmetre funcional espermàtic.
16. Se suggereixen nous experiments utilitzant la interferència de l'RNA per tal d'elucidar el paper que la HSPA8 i HSPA5, entre d'altres, juguen sobre la funcionalitat espermàtica, així com també nous estudis emprant altres mètodes de transferència dels siRNA diferents de la transfecció i de l'electroporació *in vitro*.

# **Conclusions generals**

---





---

## Conclusions generals

---

1. L'addició de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  en un rang de concentracions de 2,5 a 10 mg/100 ml no malmena la qualitat espermàtica. Per això aquesta hormona a aquestes concentracions pot ser afegida a les dosis seminals per millorar el rendiment reproductiu induint contraccions a l'úter, sense produir efectes deleteris sobre els espermatozoides, i millorar les tècniques d'inseminació artificial.
2. L'addició d'àcid hyaluronic en un rang de concentracions de 50-100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  retarda la capacitat espermàtica després de tres dies de conservació a 15°C amb el diluent BTS, sense malmenar ni la viabilitat ni la espermàtiques.
3. La tolerància dels espermatozoides als canvis osmòtics del seu entorn, determinada com a resistència de la viabilitat i la morfologia espermàtiques i del percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma reaccionat, es pot introduir dins de models de regressió lineal i es pot valorar juntament amb els paràmetres convencionals de l'espermograma, a fi de predir millor la capacitat fecundant d'una ejaculació.
4. El perllongament de la viabilitat és significativament superior a les poblacions espermàtiques unides a les cèl·lules oviductals respecte als espermatozoides que romanen lliures al medi de cocultiu. Aquest resultat concorda amb la formació i el paper del reservori seminal.
5. El percentatge d'espermatozoides capacitats és superior en les poblacions unides i no unides a les cèl·lules oviductals que a les poblacions respectives de les cèl·lules LLC-PK1. Aquest fet suggereix que les cèl·lules oviductals indueixen específicament la capacitat espermàtica.
6. La incubació dels espermatozoides amb el medi condicionat per les cèl·lules oviductals afecta la funció espermàtica, per bé que el cocultiu amb aquestes cèl·lules influencï en major grau la viabilitat, la capacitat i la motilitat espermàtiques.

7. No s'observen canvis en l'expressió dels gens que codifiquen per la clusterina, la *HSP90AA1*, la *HSPA8* i la *HSPA5* quan es comparen el cultius de cèl·lules en els estadis fol·licular i luteal del cicle ovàric.
8. La presència d'espermatozoides no altera l'expressió del gen de la clusterina ni a les cèl·lules oviductals ni a les cèl·lules LLC-PK1, però provoca la sobreexpressió dels gens *HSP90AA1*, *HSPA8* i *HSPA5*, que a pertanyen a la família de les proteïnes d'estrès tèrmic.
9. No s'observen canvis en la viabilitat espermàtica després de cocultivar els espermatozoides amb cèl·lules que tenen el gen *HSP90AA1* silenciats. Aquest resultat implica que aquesta proteïna no està implicada en el perllongament de la supervivència espermàtica. Tanmateix, els experiments posteriors emprant tècniques d'RNA d'interferència podrien estudiar quins són els efectes que produeix el silenciament d'aquest gen sobre d'altres paràmetres funcionals dels espermatozoides.

# **Bibliography**

---



---

## Bibliography

---

Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A., and del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of Reproduction*, 60: 32-41.

Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T., and Hoshi, H. (1995). Secretory products of bovine epithelial cells support the viability and motility of bovine spermatozoa in culture in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 272: 54-61.

Abe, H. (1996). The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histology and Histopathology*, 11: 743-768.

Abraham-Peskir, J., Chantler, E., Uggerhøf, E., and Fedder, J. (2002). Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. *Human Reproduction*, 17: 375-382.

Achenbach, T., Brunner, B., and Heermeier, K. (2003). Oligonucleotide-Based Knockdown Technologies: Antisense versus RNA Interference. *ChemBioChem: a European journal of Chemical Biology*, 4: 928-935.

Adah, S.A., Bayly, S.F., Cramer, H., Silverman, R.H., and Torrence, P.F. (2001). Chemistry and biochemistry of 2', 5'-oligoadenylate-based antisense strategy. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 1189-1212.

Agca, Y., Gilmore, J., Byers, M., Woods, E.J., Liu, J., and Critser, J.K. (2002). Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. (2002). *Biology of Reproduction*, 67: 1493-1501.

Aigner, J. (2006). Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) In Vivo. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006: 71659.

- Ain, R., Uma Devi, K., Shivaji, S., and Seshagiri, P.B. (1999). Pentoxifylline-stimulated capacitation and acrosome reaction in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signalling molecules. *Molecular Human Reproduction*, 5: 618-626.
- Aitken, R.J., Best, F., Richardson, D.W., Schats, R., and Simm, G. (1983). Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 67: 19-27.
- Aitken, R.J., and Kelly, R.W. (1985). Analysis of the direct effects of prostaglandins on sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility*, 73: 139-146.
- Aitkin, R.J., Clarkson, J.S., Hargreave, T.B., Irvine, D.S., and Wu, F.C. (1989). Analysis of the relationship between defective sperm function in the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *Journal of Andrology*, 10: 214-220.
- Akhondi, M.A., Chapple, C., and Moore, H.D.M. (1997). Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures. *Human Reproduction*, 12: 514-522.
- Alm, K., Peltoniemi, O.A.T., Koskinen, E., and Andersson, M. (2006). Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 210-213.
- Al-Madhoun, S., Chen, Y.X., Haidari, L., Rayner, K., Gerthoffer, W., McBride, H., and O'Brien, E.R. (2007). The interaction and cellular localization of HSP27 and ERbeta are modulated by 17beta-estradiol and HSP27 phosphorylation. *Molecular Cell Endocrinology*, 270: 33-42.
- Althouse, G.C., Wilson, M.E., Kuster, C., and Parsley, M. (1998). Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*, 50: 535-543.
- Althouse, G.C., Kuster, C.E., Clark, S.G., and Weisiger, R.M. (2000). Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, 53: 1167-1176.
- Anderson, L.L. (1993). Pigs. In: Hafez, E.S.E., ed. *Reproduction in Farm Animals*. Sixth edition. Lea & Febiger. Philadelphia, USA. pp. 343-360.

- Andrade-Rocha, F.T. (1999). Seminal fructose levels in male infertility: relationship with sperm characteristics. *International Urology and Nephrology*, 31: 107-111.
- Andolz, P., and Bielsa, M.A. (1995). *Semen Humano*. Garsi. Madrid, Spain.
- Arrigo, A.P., and Welch, W.J. (1987). Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 15359-15369.
- Arrigo, A.P. (2005). Chaperons moléculaires et repliement des protéines: l'exemple de certaines protéines de choc thermique. *Médecine Sciences (Paris)* 21: 619-625.
- Arrigo, A.P., Simon, S., Gibert, B., Kretz-Remy, C., Nivon, M., Czekalla, A., Guillet, D., Moulin, M., Díaz-Latoud, C., and Vicart, P. (2007). Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Letters*, 581: 3665-3674.
- Arts, E.G., Kuiken, J., and Jager, S. (1994). A new method to detect acrosome-reacted spermatozoa using biotinylated soybean trypsin inhibitor. *Fertility and Sterility*, 62: 1044-1055.
- Atlas-White, M., Murphy, B.F., and Baker, H.W. (2000). Localisation of clusterin in normal human sperm by immunogold electron microscopy. *Pathology*, 32: 258-261.
- Auger, J., Leonce, S., Jouannet, P., and Ronot, X. (1993). Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41: 1247-1251.
- Azuma, K., Horie, K., Inoue, S., Ouchi, Y., and Sakai, R. (2004). Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane. *FEBS Letters*, 577: 339-344.
- Bagchi, M.K., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1991). Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins Hsp90, Hsp56 and Hsp70. *Molecular and Cellular Biology*, 11: 4998-5004.
- Bains, R., Miles, D.M., Carson, R.J., and Adeghe, J. (2001). Hyaluronic acid increases motility/intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in human sperm in vitro. *Archives of Andrology*, 47: 119-125.
- Baker, B.F., Condon, T.P., Koller, E., McKay, R.A., Siwkowski, A.M., Vickers, T.A., and Monia, B.P. (2001). Discovery and analysis of antisense oligonucleotide activity in cell culture. *Methods*, 23: 191-198.



- Baldi, E, Casano, R, and Constanza, F. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 12: 323-330.
- Ball, B.A., and Vo, A. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, 22, 1061-1069.
- Bantounas, I., Phylactou, L.A., and Uney, J.B. (2004). RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33: 545-557.
- Bardwell, J.C.A., and Craig, E.A. (1987). Eucaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 848-852.
- Barkay, J., Bartoov, B., Ben-Ezra Sm Langsam, J., Feldman, E., Gordon, S., and Zuckerman, H. (1984). The influence of in vitro caffeine treatment on human sperm morphology and fertilizing capacity. *Fertility and Sterility*, 41: 913-918.
- Barlow, P., Delvigne, A., and van Dromme, J. (1991). Predictive value of classical and automated sperm analysis for in vitro fertilization. *Human Reproduction*, 6: 119- 124.
- Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2002). Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 14943-14945.
- Bassols, J., Kádár, E., Briz, M.D., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M., and Bonet, S. (2004). In vitro culture of epithelial cells from the caput, corpus, and cauda epididymis of *Sus domesticus*. *Theriogenology*, 62: 929-42.
- Bassols, J., Bonet, S., Belghazi, M., Dacheux, F., and Dacheux, J.L. (2007). Proteomic study of the establishment of boar epididymal cell cultures. *Theriogenology*, 68: 76-86.
- Beck, L.R., and Boots, L.R. The comparative anatomy, histology and morphology of the mammalian oviduct. In: Johnson, A.D., Foley, C.W, eds. *The oviduct and its functions*. Academic Press. New York, USA. pp. 1-51.

- Bedford, J.M., and Hoskins, D.D. (1990). The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In: *Marshall's Physiology of Reproduction*. Lamming, G.E., ed. Churchill Livingstone, London, UK, Vol. 2, pp: 379-568.
- Belstra, B.A. (2002). Review: Intrauterine (transcervical) and fixed-times artificial insemination in swine. *Annual Swine Report*, 25: 2.
- Bendvold, E., Svanborg, K., Eneroth, P., Gottlieb, C., and Bygdeman, M. (1984). The natural variations in prostaglandin concentration in human seminal fluid and its relation to sperm quality. *Fertility and Sterility*, 41: 743-747.
- Bennett, C.F. (1998). Antisense oligonucleotides: is the glass half full or half empty? *Biochemical Pharmacology*, 55: 9-19
- Bennett, C.F., and Cowser, L.M. (1999). Application of antisense oligonucleotides for gene functionalization and target validation. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 1: 359-371.
- Berger, T., Anderson, D.L., and Penedo, M.C.T. (1996). Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Animal Reproduction Science*, 44: 231-239.
- Bergqvist, A.S., Yokoo, M., Bage, R., Sato, E., and Rodríguez-Martínez, H. (2005). Detection of the hyaluronan receptor CD44 in the bovine oviductal epithelium. *Journal of Reproduction and Development*, 51: 445-453.
- Bergqvist, A.S., Ballester, J., Johannisson, A., Hernandez, M., Lundeheim, N., and Rodríguez-Martínez, H. (2006). In vitro capacitation of bull spermatozoa by oviductal fluid and its components. *Zygote*, 14: 259-273.
- Bergqvist, A.S., Ballester, J., Johannisson, A., Lundeheim, N., and Rodríguez-Martínez, H. (2007). Heparin and dermatan sulphate induced capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa measured by merocyanine-540. *Zygote*, 15: 225-232.
- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, R.L., and Bernards, R. (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, 428: 431-437.

- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363-366.
- Bhat, S.P., Horwitz, J., Srinivasan, A., and Ding, L. (1991). Alpha-B crystallin exists as an independent protein in the heart and in the lens. *European Journal of Biochemistry*, 202: 775-781.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Müller, U., and Filipowicz, W. (2001). Specific interference with gene expression by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 14428-14433.
- Blackmore, P.F., Beebe, S.J., and Danforth, D.R. (1990). Progesterone and 17-hydroxyprogesterone: novel stimulators of calcium influx in human sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 1376-1380.
- Bohen, S.P., and Yamamoto, K.R. (1993). Isolation of HSP90AA1 mutants by screening for decreased steroid receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 11424-11428.
- Boden, D., Pusch, O., Silbermann, R., Lee, F., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2004). Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Research*, 32: 1154-1158.
- Bohen, S.P., and Yamamoto, K.R. (1993). Isolation of HSP90AA1 mutants by screening for decreased steroid receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 11424-11428.
- Boilard, M., Reyes-Moreno, C., Lachance, C., Massicotte, L., Bailey, J.L., Sirard, M.A., Baniahmad A, and Ming-Jer T. (1993). Mechanisms of transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Journal of Cell Biochemistry*, 51: 151-156.
- Bonadonna, T. (1989). *Reproducción Animal e Inseminación Artificial*. Tomo II. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Bonde, J.P., Ernst, E., Jensen, T.K., Hjollund, N.H., Kolstad, H., Henriksen, T.B., Scheike, T., Giwercman, A., Olsen, J., and Skakkebaek, N.E. (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *The Lancet*, 352: 1172-1177.

- Bonet S. (1990). Immature and aberrant spermatozoa in ejaculate of *Sus domesticus*. *Animal Reproduction Science*, 22: 67-80.
- Bonet, S., and Briz, M. (1991). New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Theriogenology*, 4: 725-730.
- Bonet, S., Briz, M., Pinart, E., Camps, R., Fradera, A., and Casadevall, M. (1995). Light microscopy characterization of sperm morphology. *Microscopy and Analysis*, 9: 29-31.
- Bonet, S., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., and Badia, E. (2000). *Morfologia espermàtica en Porcí*. Institut d'Estudis Catalans. Barcelona, Spain.
- Bongso, A., Ho, J., Fong, C.Y., Ng, S.C., and Ratnam, S. (1993). Human sperm function after coculture with human fallopian tubal epithelial cell monolayers: in vitro model for studying cell interactions in early human conception. *Archives of Andrology*, 31: 183-190.
- Borawski, J., Lindeman, A., Buxton, F., Labow, M., and Gaither, L.A. (2007). Optimization Procedure for Small Interfering RNA Transfection in a 384-Well Format. *Journal of BioMolecular Screening*, 12: 546-559.
- Boyle, C.A., Khoury, M.J., Katz, D.F., Annest, J.L., Kresnow, M.J., DeStefano, F., and Schrader, S.M. (1992). The relation of computer-based measures of sperm morphology and motility to male infertility. *Epidemiology*, 3: 239-246.
- Braasch, D.A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M.A., and Corey, D.R. (2003). RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry*, 42: 7967-7975.
- Braundmeier, A.G. and Miller, J. (2001). The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *Journal of Dairy Science*, 84: 1915-1925.
- Bresnick, E.H., Dalman, F.C., Sánchez, E.R., and Pratt, W.B. (1989). Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 4992-4997.
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L., and Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genetics*, 34: 263-264.
- Brown, P.O., and Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics*, 21: 33-37.

- Brown, M.A., Zhu, L., Schmidt, C., and Tucker, P.W. (2007). HSP90AA1 - from signal transduction to cell transformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363: 241-246.
- Briz, M.D. (1994). Anàlisi microscòpica de l'esperma ejaculada i de la maduració epididimària dels espermatozoides de *Sus domesticus*. *Doctoral Thesis*. University of Girona, Spain.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002a). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296: 550-553.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002b). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, 2: 243-247.
- Buhr, M.M., Canvin, A.T., and Bailey, J.L. (1989). Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Research*, 23: 441-449.
- Bureau, M., Bailey, J.L., and Sirard, M.A. (2000). Influence of oviductal cells and conditioned medium on porcine gametes. *Zygote*, 8: 139-144.
- Burel, C., Mezger, V., Pinto, M., Rallu, M., Trigon, S., and Morerange, M. (1992). Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*, 48: 629-634.
- Burg, M.B., Ferraris, J.D., and Dmitrieva, N.I. (2007). Cellular response to hyperosmotic stress. *Physiological Reviews*, 87: 1441-1474.
- Bussalleu, E., Pinart, E., Yeste, M., Briz, M.D., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Bassols, J., Pruneda, A., Casas, I., and Bonet, S. (2005). Development for a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa. *Microscopy, Research and Technique*, 68: 227-283.
- 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., Rodríguez-Gil, J.E., and Bonet, S. (2007). Effects of Filtration of Semen Doses from Subfertile Boars through Neuter Sephadex Columns. *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 48-52.
- Buxadé, C. (1984). *Ganado Porcino. Sistemas de explotación and técnicas de producción*. Mundi-Prensa. Madrid, Spain.

- Cai, K., Yang, J., Guan, M., Ji, W., Li, Y., and Rens, W. (2005). Single UV excitation of Hoechst 33342 and propidium iodide for viability assessment of rhesus monkey spermatozoa using flow cytometry. *Archives of Andrology*, 51: 371-383.
- Caiza de la Cueva, F.I., Pujol, M.R., Rigau, T., Bonet, S., Miró, J., Briz, M., and Rodríguez-Gil, J.E. (1997a). Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology*, 48: 947-968.
- Caiza de la Cueva, F.I., Rigau, T., Pujol, R., Piedrafita, J., and Rodríguez-Gil, J.E. (1997b). Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 48: 301-315.
- Calderwood, S.K., Mambula, S.S., and Gray, P.J. Jr. (2007). Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113: 28-39.
- Campbell, T.N., and Choy, F.Y. (2005). RNA interference: past, present and future. *Current Issues in Molecular Biology*, 7: 1-6.
- Cancel, A.M., Lobdell, D., Mendola, P., and Perreault, S.D. (2000). Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Human Reproduction*, 15: 1322-1328.
- Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz, M., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., and Roca, J. (2004). Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *Journal of Andrology*, 25: 389-396.
- Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.E., Feramisco, J.R., and Welch, W.J. (1985). The common 90-kd protein component of non-transformed 98S9 steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO Journal*, 4: 3131-3135.
- Catelli, M.G., Devin-Leclerc, J., Bouhouche, I., and Cadepond, F. (1999). Interaction fonctionnelle de l'HSP90AA1 avec les récepteurs des stéroïdes. *Journal de la Société de Biologie*, 193: 361-367.
- Cedenho, A.P., Lima, S.B., Cenedeze, M.A., Spaine, D.M., Ortiz, V., and Oehninger, S. (2006). Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Human Reproduction*, 21: 1791-1794.

- Chan, S.Y., Pearlstone, A., Uhler, M., Tucker, M., Greenspon, R., Leung, A., and Wang, C. (1993). Human spermatozoal tail hypo-osmotic swelling test, motility characteristics in hypotonic saline, and survival of spermatozoa after cryopreservation. *Human Reproduction*, 8: 717-721.
- Chantler, E., and Abraham-Peskir, J.V. (2004). Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia*, 36: 87-93.
- Charbonnel, B., Kremer, M., Gerozissis, K., and Dray, F. (1982). Human cervical mucus contains large amounts of prostaglandins. *Fertility and Sterility*, 38: 109-111.
- Cheng, H., Althouse, G.C., and Hsu, W.H. (2001). Prostaglandin F<sub>2α</sub> added to extended boar semen at processing elicits in vitro myometrial contractility after 72 hours of storage. *Theriogenology*, 55: 1901-1906.
- Chiu, Y.L., and Rana, T.M. (2002). RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Molecular Cell*, 10: 549-561
- Christensen, P., Knudsen, D.B., Wachmann, H., and Madsen, M.T. (2004). Quality control in boar semen production and correlation to field fertility. *Theriogenology*, 62: 1218-1228.
- Christensen, P., Boelling, D., Pedersen, K.M., Korsgaard, I.R., and Jensen, J. (2005). Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and non-return rate of dairy bulls. *Journal of Andrology*, 26: 98-106.
- Christova, Y., James, P.S., Cooper, T.G., and Jones, R. (2002). Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure and knockout of the c-ros gene. *Journal of Andrology*, 23: 384-392.
- Christova, Y., James, P.S., Mackie, A., Cooper, T.G., and Jones, R. (2004). Molecular diffusion in sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Molecular Cellular and Endocrinology*, 216: 41-46.
- Ciocca, D.R., Österreich, S., Chamness, G.C., McGuire, M.L., Fuqua, S.A.W. (1993). Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27); a Review. *Journal of the National Cancer Institute*, 85: 1558-1570.

- Claus, R. (1990) Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 40: 117-131.
- Colenbrander, B., Feitsma, H., and Grooten, H.J. (1993). Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and Fertility*, 48: 207-215.
- Colenbrander, B., Gadella, B.M., and Stout, T.A.E. (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 38: 305-311.
- Collins, E.D., Flowers, W.L., Shanks, R.D., and Miller, D.J. (2007). Porcine sperm zona ability as an indicator of fertility. *Animal Reproduction Science*, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.01.012.
- Combettes, L., Berthon, B., and Claret, M. (1994). Caffeine inhibits cytosolic calcium oscillations induced by noradrenaline and vasopressin in rat hepatocytes. *Biochemical Journal*, 301: 737-744.
- Cooper, T.G. (1999). Epididymis. In: Knobil, E., and Neill, J.D., eds. *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press Inc. San Diego, USA. Volume. 2, pp: 1-17.
- Córdova-Izquierdo, A., Muñoz-Mendoza, R., Córdova-Jiménez, S., Córdova-Jiménez, A., and Pérez-Gutiérrez, J.F. (2004). Características del semen de verraco y su evaluación práctica. *Porcinocultura*, 2004: Junio.
- Corey, D.R. (2007). RNA learns from antisense. *Nature Chemical Biology*, 3: 8-11.
- Correa, J.R., Pace, M.M., and Zavos, P.M. (1997). Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, 48: 721-731.
- Correa-Pérez, J.R., Fernández-Pelegrina, R., Zarmakoupis-Zavos, P.N., and Zavos, P.M. (2003). The effect of colloid osmotic pressure in human spermatozoa exposed to hypoosmotic conditions. *Andrologia*, 35: 117-120.
- Cortés, P.P., Orihuela, P.A., Zúñiga, L.M., Velásquez, L.A., and Croxatto, H.B. (2004). Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface. *Biology of Reproduction*, 71: 1262-1269.



- Coscioni, A.C., Reichenbach, H.D., Schwartz, J., LaFalci, V.S.N., Rodrigues, J.L., and Brandelli, A. (2001). Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. *Animal Reproduction Science*, 61: 59-67.
- Cox, C.I., and Lesse, H.J. (1997). Retention of functional characteristics by bovine oviduct and uterine epithelia in vitro. *Animal Reproduction Science*, 46: 169-178.
- Crabo, B.G. (1990). Preservation of boar semen: a worldwide perspective. *Reproduction in Domestic Animals*, 1: 3-9.
- Craig, E.A., Weissman, J.S., and Horwich, A.L. (1994). Heat shock proteins and molecular chaperones, mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell*, 78: 365-372.
- Crater, D.L., Dougherty, B.A., and van de Rijn I. (1995). Molecular characterization of hasC from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose pyrophosphorylase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 28676-28680.
- Crooke, S.T. (2000) Evaluating the mechanism of action of antiproliferative antisense drugs. *Antisense Nucleic Acid Drug Development*, 10: 123-126
- Cross, N.L., and Meizel, S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction*, 41: 635-641.
- Cross, B.E., O'Dea, H.M., and MacPhee, D.J. (2007). Expression of small heat shock-related protein 20 (HSP20) in rat myometrium is markedly decreased during late pregnancy and labour. *Reproduction*, 133: 807-817.
- Cummins, J.M., Pember, S.M., Jequier, A.M., Yovich, J.L., and Hartmann, P.E. (1991). A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge (ARIC): Relationship to fertility and other semen parameters. *Journal of Andrology*, 12: 98-103.
- Cupps, P.T. (1991). *Reproduction in domestic animals*. Fourth edition. Academic Press Inc. New York, USA.
- Curry, M.R., and Watson, P.F. (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation on thawing injury. *Cryobiology*, 31: 39-46.

- Curry, M.R., Kleinhans, F.W., and Watson, P.F. (2000). Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology*, 41:167-173.
- Czar, M.J., Lyons, R.H., Welsh, M.J., Renoir, J.M., and Pratt, W.B. (1995). Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Molecular Endocrinology*, 9: 1549-1560.
- Dalman, F.C., Sturzenbecker, L.J., Levin, A.A., Lucas, D.A., Perdew, G.H., Petkovitch, M., Chambon, P., Grippo, J.F., and Pratt, W.B. (1991). Retinoic acid receptor belongs to a subclass of nuclear receptors that do not form “docking” complexes with HSP90AA1. *Biochemistry*, 30: 5605-5608.
- Daugaar, M., Rohde, M., and Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, 581: 3702-3710.
- De Leeuw, F.E., Chen, H.C., Colenbrander, B., and Verkleij, A.J. (1990). Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27: 171-183.
- Den Daas, J.H.G., De Jong, G., Lansbergen, L.M.T.E., and van Wagendonk-De Leew, A.M. (1998). The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *Journal of Dairy Science*, 81: 1714-1723.
- Devroe, E., and Silver, P.A. (2002). Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnology*, 2: 15.
- Dickens, C.J., Cox, C.I., and Leese, H.J. (1996). Intracellular calcium in cultured rabbit oviduct epithelial cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 8: 243-247.
- Dobrinski, I., Hughes, H.P., and Barth, A.D. (1994). Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101: 531-538.
- Dobrisnki, I., Suárez, S.S., and Ball, B.A. (1996). Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biology of Reproduction*, 54: 783-788.

- Dobrinski, I., Smith T.T., Suarez, S.S., and Ball, B.A. (1997). Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 56: 861-869.
- Dobrinski, I., Jacob, J.R., Tennant, B.C., and Ball, B.A. (1999). Generation of an equine oviductal epithelial cell line for the study of sperm-oviduct interactions. *Theriogenology*, 52: 875-885.
- Doench, J.G., Petersen, C.P., and Sharp, P.A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes and Development*, 17: 438-442.
- Donze, O., and Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 30: e46.
- Dott, H.M., and Foster, G.C. (1972). A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential life dead stain. *Journal of Reproduction and Fertility*, 29: 443.
- Dougherty, K.A., Cockett, A.T., and Urry, R.L. (1976). Caffeine, theophylline, and human sperm motility. *Fertility and Sterility*, 27: 541-548.
- Dougherty, J.J., Puri, R.K., and Toft, D.O. (1984). Polypeptide components of two 8 S forms of chicken oviduct progesterone receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 8004-8009.
- Du, J., Tao, J., Kleinhans, F.W., Peter, A.T., and Critser, J.K. (1994). Determination of boar spermatozoa water volume and osmotic response. *Theriogenology*, 42:1183-1191.
- Dubé, C., Beaulieu, M., Reyes-Moreno, C., Guillemette, C., and Bailey, J.L. (2004). Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology*, 62: 874-886.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 457-467.
- Ecroyd, H., Jones, R.C., and Aitken, R.J. (2003). Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 69: 1801-1807.
- Ekhalsi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoleva, M., Petrunkina, A., and Töpfer-Petersen, E. (2005). Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biology of Reproduction*, 73: 536-545.

- Elbashir, S.M., Harboth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411: 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 15: 188-200.
- Elbashir, S.M. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO Journal*, 20: 6877-6888.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26: 199-213.
- Ellis, R.J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 328: 378-379.
- Ellington, J.E., Padilla, A.W., Vredenburgh, W.L., Dougherty, E.P., and Foote, R.H. (1991). Behavior of bull spermatozoa in bovine uterine tube epithelial cell co-culture - an in vitro model for studying the cell interactions of reproduction. *Theriogenology*, 35: 977-989.
- Ellington, J.E., Ball, B.A., and Yang, X. (1993a). Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after co-culture with oviductal epithelial cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98: 203-208.
- Ellington, J.E., Ignatz, G.G., Ball, B.A., Meyers-Wallen, V.N., and Currie, W.B. (1993b). De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 48: 851-856.
- Ellington, J.E., Meyers-Wallen, V.N., and Ball, B.A. (1995). Establishment of a coculture system for canine sperm and uterine tube epithelial cells. *Veterinary Record*, 136: 542-543.
- Ellington, J.E., Evenson, D.P., Fleming, J.E., Brisbois, R.S., Hiss, G.A., Broder, S.J., and Wright, R.W. Jr. (1998). Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertility and Sterility*, 69: 643-649.
- Elzanaty, S., Ritchthoff, J., Malm, J., and Giwercman, A. (2002). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Human Reproduction*, 17: 2904-2911.
- Eriksson, B.M., and Rodríguez-Martínez, H. (2000). Deep-freezing of boar semen in plastic film "cochettes". *Journal of Veterinary Medicine*, 47: 89-97.

- Eriksson, B.M., and Rodríguez-Martínez, H. (2000). Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxistraws. *Animal Reproduction Science*, 63: 364-368.
- Eslaminejad, M.B., Valojerdi, M.R., Ashtiani, S.K., and Eftekhari-Yazdi, P. (2007). Light and electron microscopic study of epithelial cells from the human oviduct and uterus subcultured on extracellular matrix gel. *Journal of Reproductive Medicine*, 52: 503-512.
- Estienne, M.J., and Harper, A.F. (2004). Semen characteristics and libido in boars treated repeatedly with prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Journal of Animal Science*, 82: 1494-1498.
- Estienne, M.J., Harper, A.F., and Day, J.L. (2007). Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18 degrees C. *Reproductive Biology*, 7: 221-231.
- Fattouh el, S.M., and Adbou, M.S. (1991). Effect of caffeine on the post-thaw motility of buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 36: 149-154.
- Fazeli, A., Hage, W.J., Cheng, F.P., Voorhout, W.F., Marks, A., Bevers, M.M., and Colenbrander, B. (1997). Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biology of Reproduction*, 56: 430-438.
- Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F., and Holt, W.V. (1999). Sperm-Oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biology of Reproduction*, 60: 879-886.
- Fazeli, A., Elliot, R.M., Duncan, A.E., Moore, A., Watson, P.F., and Holt, W.V. (2003). In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal plasma membrane preparations. *Reproduction*, 125: 509-517.
- Fazeli, A., Affara, N.A., Hubank, M., and Holt, W.V. (2004). Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. *Biology of Reproduction*, 71: 60-65.
- Fernández-Botrán, R., Romanovskis, P., Sun, X., and Spatola, A.F. (2004). Linear basic peptides for targeting interferon- $\gamma$ -glycosaminoglycan interactions: synthesis and inhibitory properties. *Journal of Peptide Research*, 63: 56-62.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- Fisher, T.L., Terhorst, T., Cao, X., and Wagner, R.W. (1993). Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 21: 3857-3865.
- Fléchon, J.E., and Hunter, R.H. (1981). Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study. *Tissue and Cell*, 13: 127-139.
- Flower, R.J. (2006) Prostaglandins, bioassay and inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 147: 182-192.
- Flowers, W.L. (1997). Management of boar for efficient semen production. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 52: 67-78.
- Foote, R.H. (1978). Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *Journal of Animal Science Supplement*, 47: 1-11.
- Foote, R.H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science, Biography and History Series*: 1-10.
- Forni, M., Zannoni, A., Tamanini, C., and Bacci, M.L. (2003). Opposite regulation of clusterin and LH receptor in the swine corpus luteum during luteolysis. *Reproduction, Nutrition and Development*, 43: 517-525.
- Fournier-Delpech, S., and Thibault, C. (1993). Acquisition of sperm fertility. In: Thibault, C., Levasseur, M.C, and Hunter, R.H.F. eds. *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. Paris, France. pp. 369-386.
- Fraser, G.L., Holmgren, J., Clarke, P.B., and Wahlestedt, C. (2000). Antisense inhibition of delta-opioid receptor gene function *in vivo* by peptide nucleic acids. *Molecular Pharmacology*, 57: 725-731.
- Fraser, L., Gorszyczaruk, K., and Strzeżek, J. (2001). Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reproduction in Domestic Animals*, 36: 325-329.

- Friel, A.M., O'Reilly, M.W., Sexton, D.J., and Morrison, J.J. (2005). Specific PGF<sub>2α</sub> receptor (FP) antagonism and human uterine contractility in vitro. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2005, 112: 1034-1042.
- Fu, D., Uauy, C., Blechl, A., and Dubcovsky, J. (2007). RNA interference for wheat functional gene analysis. *Transgenic Research*, 16: 689-701.
- Fuchs, S., Erbe, T., Fischer, H.L., and Tibesku, C.O. (2005). Intraarticular hyaluronic acid versus glucocorticoid injections for nonradicular pain in the lumbar spine. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 16: 1493-1498.
- Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R.A., Yoshida, N., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2003). Phospholipase Cdelta4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *Journal of Cell Biology*, 161: 79-88.
- Funahashi, H., and Day, B.N. (1993). Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99: 97-103.
- Funahashi, H., and Nagai, T., (2001). Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Molecular Reproduction and Development*, 58: 424-431.
- Gadea, J., and Matás, C. (2000). Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology*, 54: 1343-1357.
- Gadea, J. (2001). La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro. *Investigaciones agrarias y producción y sanidad animales*, 16.
- Gadea, J. (2003). Semen extenders used in the artificial insemination of swine. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1: 17-27.
- Gadea, J. (2005). Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 63: 431-444.
- Gamcik, P., Mesaros, P., and Scvarc, F. (1980). Influence of prostaglandins on fertility of sheep with the use of deep-frozen sperm. *Proceedings of the 9th International Conference on Animal Reproduction and Artificial Insemination held in Madrid, Spain*, 3: 149.

- Gandolfi, F., and Moor, R.M. (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81: 23-28.
- Gandolfi, F. (1995). Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. *Microscopy, Research and Technique*, 32: 1-12.
- Gao, D.Y., Mazur, P., Kleinans, F.W., Watson, P.F., Noiles, E.E., and Critser, J.K. (1992). Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology*, 29: 657-667.
- Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinans, F.W., Mazur, P., and Critser, J.K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, 49: 112-123.
- Gao, D.Y., Mazur, P., and Critser, J.K. (1997). Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Narrow, A.H., and Critser, J.K., eds. *Reproductive Tissue Banking*. Academic Press Inc. San Diego, USA. pp. 263-328.
- García-Artiga, C., Fontanillos, J.C., Pérez, J., García-Cuenca, I., Martín, S., and Pérez-García, T. (1994). Técnicas de tinción espermática. *Tratado de Ganado Porcino*, 21: 11-18.
- García-Herreros, M., Aparicio, I.M., Núñez, I., García-Marín, L.J., Gil, M.C., Peña Vega, F.J. (2005). Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology*, 63: 795-805.
- Garner, D.L., and Hafez, E.S.E. (1989). Espermatozoides y plasma seminal. In: Hafez, E.S.E., ed. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Fifth edition. McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México. pp.: 205-226.
- Garner, D.L., and Hafez, E.S.E. (1996). Espermatozoides y plasma seminal. In: Hafez, E.S.E., ed. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Sixth edition. McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México. pp.: 158-179.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., Yue, S.T., Roth, B.L., and Haugland, R.P. (1994). Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of Andrology*, 15: 620-629.



- Garner, D.L., and Johnson, L.A. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53: 276-284.
- Geary, R.S., Yu, R.Z., and Levin, A.A. (2001a). Pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2: 562-573.
- Geary, R.S., Watanabe, T.A., Truong, L., Freier, S., Lesnik, E.A., Sioufi, N.B., Sasmor, H., Manoharan, M., and Levin, A.A. (2001b). Pharmacokinetic properties of 20-O-(2-methoxyethyl)-modified antisense oligonucleotides analogs in rats. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, 296: 890-897.
- Georgiou, I., Syrrou, M., Stefanidis, K., Konstantelli, M., and Lolis, D. (1998). Effect of Percoll gradient and swim-up preparation on the chromomycin A3 staining of normal and abnormal semen samples. *Andrologia*, 30: 101-104.
- Georgiou, A.S., Sostaric, E., Wong, C.H., Snijders, A.P., Wright, P.C., Moore, H.D., and Fazeli, A. (2005). Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4: 1785-1796.
- Georgiou, A.S., Snijders, A.P., Sostaric, E., Aflatoonian, R., Vázquez, J.L., Vázquez, J.M., Roca, J., Martínez, E.A., Wright, P.C., and Fazeli, A. (2007). Modulation of the oviductal environment by gametes. *Journal of Proteome Research*, 6: 4656-4666.
- Gewirtz, A.M. (2007). On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *Journal of Clinical Investigations*, 117: 3612-3614.
- Gil, J., Chico, J., Gil, O., and López, A. (1998). Increasing swine prolificacy by adding Dinolytic to semen doses. Abstract. *Proceeding of 15<sup>th</sup> IPVS Congress held in Birmingham, UK*, 216.
- Giles, R.V., Ruddell, C.J., Spiller, D.G., Green, J.A., and Tidd, D.M. (1995). Single base discrimination for ribonuclease H-dependent antisense effects within intact human leukaemia cells. *Nucleic Acids Research*, 23: 954-961.
- Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W.M., and Evans, G. (2006). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*, doi:10.1016/j.anireprosci.2006.12.010.

- Gilmore, J.A., Du, J., Tao, J., Peter, A.T., and Critser, J.K. (1996). Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107: 87-95.
- Gilmore, J.A., Liu, J., Peter, A.T., and Critser, J.K. (1998). Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 58: 28-36.
- Gilmore, K., and Wilson, M. (1999). The use of chloromethyl-X-rosamine (Mitotracker red) to measure loss of mitochondrial membrane potential in apoptotic cells is incompatible with cell fixation. *Cytometry*, 36: 355-358
- Glander, H.J. (1987). Spermiologic aspects of in vitro fertilization. *Zentralblatt für Gynäkologie*, 109: 745-754.
- Golden, T.A., Schauer, S.E., Lang, J.D., Pien, S., Mushegian, A.R., Grossniklaus, U., Meinke, D.W., and Ray, A. (2002). Short Integuments1/suspensor1/carpel Factory, a Dicer homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130: 808-822.
- Goldstein, L. (1958). Localization of nucleus-specific protein as shown HSP90AA1 and the nuclear transport of PR by transplantation experiments in *Amoeba proteus*. *Experimental Cell Research*, 15: 635-637.
- Gonzales, G.F., and Villena, A. (1997). Influence of low corrected seminal fructose levels on sperm chromatin stability in semen from men attending an infertility service. *Fertility and Sterility*, 67: 763-8.
- González-Urdiales, R., Tejerina, F., Domínguez, J.C., Alegre, B., Ferreras, A., Peláez, J., Bernal, S., and Cárdenas, S. (2006). Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. In: Bonet, S., Martínez, E.A., Rodríguez-Gil, J.E., and Barrera, X., eds. *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*. Universitat de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. Girona, Spain.
- Goodpasture, J.C., Polakoski, K.L., and Zaneveld, L.J.D. (1980). Acrosin, Proacrosin, and Acrosin Inhibitor of Human Spermatozoa: Extraction, Quantitation, and Stability. *Journal of Andrology*, 1: 16-27.

- Gottlieb, C., Bremme, K., Svanborg, K., Eneroth, P., and Bygdeman, M. (1988a). The effects of oral administration of prostaglandin E2 on the human ejaculate. *Fertility and Sterility*, 50: 789-794.
- Gottlieb, C., Svanborg, K., Eneroth, P., and Bygdeman, M. (1988b). Effects of prostaglandins on human sperm function and seminal adenosine triphosphate content. *Fertility and Sterility*, 49: 322-327.
- Grad, I., and Picard, D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275: 2-12.
- Graham, E.F., Rajamannan, A.H.J., Schmehl, M.K.L., Maki-Laurila, M., and Bower, R.E. (1971). Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *Artificial Insemination Digest*, 19: 16-18.
- Gravance, C.G., Garner, D.L., Miller, M.G., and Berger, T. (2000). Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reproductive Toxicology*, 15: 5-10.
- Griekspoor, A., Zwart, A., Neefjed, J., Neefjes, J., and Michalides, R. (2007). Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nuclear Receptor Signaling*, 5: e003.
- Grimm, D., and Kay, M.A. (2007). Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *Journal of Clinical Investigations*, 117: 3633-3641.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106: 23-34.
- Gualtieri, R., and Talevi, R. (2000). In vitro-cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release. *Biology of Reproduction*, 62: 1754-1762.
- Gualtieri, R., and Talevi, R. (2003). Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction*, 125: 251-258

- Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Perrot-Applanat, M., and Milgrom, E. (1991). Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO Journal*, 10: 3851-3859.
- Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., and Milgrom, E. (1994). Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 7179-7183.
- Guo, S., and Kempthues, K. J. (1995). Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81: 611-620.
- Gustaffson, B., Edqvist, S., Einarsson, S., and Linge, F. (1975). Fertility of deep frozen ram semen supplemented with PGF<sub>2α</sub>. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 16: 468-470.
- Guthrie, H.D., Liu, J., and Critser, J.K. (2002). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67: 1811-1816.
- Gutiérrez, A., Garde, J., García-Artiga, C., and Vázquez, I. (1993). Ram spermatozoa cocultured with epithelial cell monolayers: an in vitro model for the study of capacitation and the acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development*, 36: 338-345.
- Guzhova, I., and Margulis, B. (2006). Hsp70 chaperone as a survival factor in cell pathology. *International Reviews of Cytology*, 254: 101-149.
- Hafez, E.S.E. (1996). *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*. Sixth edition. McGraw Hill Interamericana. México D.F., México.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A., and Rodríguez-Martínez, H. (2006). Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology*, 65: 1122-1136.
- Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science*, 286: 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404: 293-296.

- Han, J.H., Choi, C.S., Kim, M.Y., and Chun, Y.J. (2007). Differential gene expression by styrene in rat reproductive tissue. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 70: 1259-1263.
- Hancock, J.L., and Howell, G.J.L. (1959). The collection of boar semen. *Veterinary Record*, 71: 664-665.
- Hang, H., and Fox, M.H. (1994). Low pH suppresses synthesis of heat-shock proteins and thermotolerance. *Journal of Radiation Research*, 140: 24-30.
- Harayama, H., Miyano, T., Miyake, M., Kusunoki, H., and Kato, S. (1994). Identification of anti-agglutinin for spermatozoa in epididymal boar plasma. *Molecular Reproduction and Development*, 37: 436-445.
- Harayama, H., Okada, K., and Miyake, M. (2003). Involvement of cytoplasmic free calcium in boar sperm: head-to-head agglutination induced by a cell-permeable cyclic adenosine monophosphate analog. *Journal of Andrology*, 24: 91-99.
- Harrison, R.F., Sheppard, B.L., and Kaliszer, M. (1980). Observations on motility, ultrastructure and elemental composition of human spermatozoa incubated with caffeine. *Andrologia*, 12: 34-42.
- Hashizume, T., and Niwa, T. (1984). Effect of administration of prostaglandin F<sub>2α</sub> on the properties of sperm rich fraction of boar semen. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 30: 182-185.
- Haugan, T., Gaustad, A.H., Reksen, O., Gröhn, Y.T., and Hofmo, P.O. (2007). Fertility results of artificial inseminations performed with liquid boar semen stored in X-Cell™ vs. BTS extender. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 94-99.
- Havarinen, M., Passinen, S., Syvälä, H., Pasanen, S., Manninen, T., Tuohimaa, P., and Ylikomi, T. (2001). Heat shock protein 90 and the nuclear transport of progesterone receptor. *Cell Stress and Chaperones*, 6: 256-262.
- Hendrick, J.P., and Hartl, F.U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry* 1993, 62: 349-384.

- Henry, S.P., Monteith, D., Bennett, F., and Levin, A.A. (1997). Toxicological and pharmacokinetic properties of chemically modified antisense oligonucleotide inhibitors of PKC-alpha and C-raf kinase. *Anti-Cancer Drug Design*, 12: 409-420.
- Herrero, M.B., Viggiano, J.M., Boquet, M., and Gimeno, M.A. (1997). Prostaglandin modulation of mouse and human sperm capacitation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 57: 279-284.
- Hingst, O., Blottner, S., and Franz, C. (1995). Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia*, 27: 275-279.
- Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Nakai, A., Iwamatsu, A., Yamada, K.M., and Nagata, K. (1991). HSP47: a tissue specific, transformation-sensitive, collagen binding heat shock protein of chicken embryo fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 11: 4036-4044.
- Hogrefe, R.I. (1999). An antisense oligonucleotide primer. *Antisense Nucleic Acid Drug Development*, 9: 351-357.
- Holley, S.J., and Yamamoto, K.R. (1995). A role for HSP90AA1 in retinoid receptor signal transduction. *Molecular Biology of the Cell*, 6: 1833-1842.
- Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D.M., Red, H.C.B., and Curnock, R.M. (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology*, 18: 312-323.
- Holt, W.V., and Harrison, R.A.P. (2002). Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway between cell and between ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *Journal of Andrology*, 23: 557-565.
- Honda, A., Siruntawineti, J., and Baba, T. (2002). Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Human Reproduction Update*, 8: 405-412.
- Honeyman, M.S., Pirog, R.S., Huber, G.H., Lammers, P.J., and Hermann, J.R. (2006). The United States pork niche market phenomenon. *Journal of Animal Science*, 84: 2269-2275.
- Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 10449-10453.

- Hoshi, K., Katayose, H., Yanagida, K., Kimura, Y., and Sato, A. (1996). The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertility and Sterility*, 66: 634-639.
- Hou, M.L., Huang, S.Y., Lai, Y.K., Lee, W.C. (2007). Geldanamycin augments nitric oxide production and promotes capacitation in boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.01.006.
- Hough, S.R., Wiederholt, K.A., Burrier, A.C., Woolf, T.M., and Taylor, M.F. (2003). Why RNAi makes sense. *Nature Biotechnology*, 21, 731-732.
- Howes, L., and Jones, R. (2002). Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *Journal of Reproduction and Immunology*, 53: 181-192
- Huang, S.Y., Kuo, Y.H., Lee, W.C., Tsou, H.L., Lee, Y.P., Chang, H.L., Wu, J.J., and Yang, P.C. (1999). Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 51: 1007-1016.
- Hughes, T.R., Marton, M.J., Jones, A.R., Roberts, C.J., Stoughton, R., Armour, C.D., Bennett, H.A., et al. (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*, 7: 109-126.
- Hughes, M.D., Hussain, M., Nawaz, Q., Sayyed, P., and Akhtar, S. (2001). The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. *Drug Discovery Today*, 6: 303-315.
- Hugues, P.E., and Varley, M.A. (1984). *Reproducción del cerdo*. Acribia. Zaragoza, Spain.
- Hunt, C., and Morimoto, R.I. (1985). Conserved features of eukaryotic Hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human Hsp70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 6455-6459.
- Hunter, R.H. (1984). Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, 72: 203-211.
- Hunter, R.H. (2002). Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs. *Reproduction in Domestic Animals*, 37: 186-190.

- Hunter, R.H., and Rodríguez-Martínez, H. (2004). Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Molecular Reproduction and Development*, 67: 243-250.
- Hunter, R.H. (2005). The fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reproduction, Nutrition and Development*, 45: 281-290.
- Huo, L.J., Ma, X.H., and Yang, Z.M. (2002). Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, 58: 1349-1360.
- Huo, R., Zhu, YF, Ma, X., Lin, M., Zhou, Z.M., and Sha, J.H. (2004). Differential expression of glucose-regulated protein 78 during spermatogenesis. *Cell and Tissue Research*, 316: 359-367.
- Huszar, G., Willetts, M., and Corrales, M., (1990). Hyaluronic acid (sperm select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertility and Sterility*, 54: 1127-1134.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293: 834-838.
- Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297: 2056-2060.
- Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). RNAi: Nature abhors a doublestrand. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12: 225-232.
- Ibrahim, N.M., Gilbert, G.R., Loseth, K.J., and Crabo, B.G. (2000). Correlation between clusterin.-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *Journal of Andrology*, 21: 887-894.
- Ijaz, A., Lambert, R., and Sirard, M.A. (1994). In vitro-cultured bovine granulosa and oviductal cells secrete sperm motility-maintaining factors(s). *Molecular Reproduction and Development*, 37: 54-60.
- Imamoto, N., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, M., Sakiyama, F., Okada, Y., Tsunasawa, S., and Yoneda, Y. (1992). Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein



inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *Journal of Cell Biology*, 119: 1047-1061.

Inano, K., Curtis, S.W., Korach, K.S., Omata, S., and Horigome, T. (1994). Heat shock protein 90 strongly stimulates the binding of purified estrogen receptor to its responsive element. *Journal of Biochemistry*, 116: 759-766.

Issaq, H.J. (2002). The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 587-592.

Ito, T., Niwa, T., and Kudo, A. (1948). Studies on artificial insemination in swine. *Zootechnic Experimental Station, Research Bulletin*, 55: 1-74.

Ivanow, E.I. (1907). De la fécondation artificielle chez les mammifères. *Archives de Sciences Biologiques*, 12: 377-511.

Ivanow, E.I. (1922). On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *Journal of Agricultural Science*, 12: 244-256.

Iversen, P.L. (2001). Phosphorodiamidate morpholino oligomers: favorable properties for sequence-specific gene inactivation. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 3: 235-238.

Jäättelä, M., and Wissing, D. (1992). Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Annals of Medicine*, 24: 249-258.

Jackson, R.L., Busch, S.J., and Cardin, A.D. (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Physiological Reviews*, 71: 481-539.

Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*, 21: 635-637.

Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 1517-1520.

Jakob, U., and Buchner, J. (1994). Assisting spontaneity: the role of HSP90AA1 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends in Biochemical Sciences*, 19: 205-211.

- Januskauskas, A., and Rodríguez-Martínez, H. (1995). Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 36: 571-574.
- Javid, B., MacAry, P.A., and Lehner, P.J. (2007). Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *Journal of Immunology*, 179: 2035-2040.
- Jeoung, D.I., Chen, S., Windsor, J., and Pollack, R.E. (1991). Human major HSP70 protein complements the localization and functional defects of cytoplasmic mutant SV40 T antigen in Swiss 3T3 mouse fibroblast cells. *Genes and Development*, 5: 2235-2244.
- Jeremias, J.C., David, S.S., Toth, M., and Witkin, S.S. (1997). Induction of messenger RNA for the 70 kDa heat shock protein in HeLa cells and the human endocervix following exposure to semen: implications for antisperm antibody production and susceptibility to sexually transmitted infections. *Human Reproduction*, 12: 1915-1919.
- Jeremias, J.C., Bongiovanni, A.M., and Witkin, S.S. (1999). Induction of heat shock protein expression in cervical epithelial cells by human semen. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 7: 17-22.
- Jeyendran, R.S., van der Ven, H.H., Pérez-Peláez, M., Crabo, B.G., and Zaneveld, L.J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219-228.
- Jez, J., Chen, J., Rastelli, G., Stroud, R., and Santi, D. (2003). Crystal Structure and Molecular Modeling of 17-DMAG in Complex with Human HSP90AA1. *Chemistry and Biology*, 10: 361-368.
- Jindal, S., Dudani, A.K., Singh, B., Harley, C.B., and Gupta, R.S. (1989). Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonins and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. *Molecular and Cellular Biology*, 9: 2279-2283.
- Johnson, L.A., and Howards, S.S. (1976). Hyperosmolarity in intratubular fluids from hamster testis and epididymis: a micropuncture study. *Science*, 195: 492-493.
- Johnson, L.A., Aalbert, J.G., Willems, C.M., Rademaker, J.H., and Rexroad, C.E. Jr. (1982). Use of boar spermatozoa for artificial insemination. III. Fecundity of boar spermatozoa stored

in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18°C. *Journal of Animal Science*, 54: 132-136.

Johnson, L.A., Aalbers, J.G., and Grooten, H.J.G. (1988). Artificial insemination of swine - fecundity of boar semen stored in Beltsville Ts (BTS), modified Modena (Mn) or Mr-a and inseminated on 1, 3 and 4 days after collection. *Zuchthygiene*, 23: 49-55.

Johnson, J.L., Beito, T.G., Krco, C.J., and Toft, D.O. (1994). Characterization of a novel 23-kilodalton protein of inactive progesterone receptor complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 56-1963.

Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., and Maxell, W.M.C. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 143 -172.

Jones, S.E., and Jomary, C. (2002). Clusterin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34: 427-431.

Jouannet, P., Ducot, B., Feneux, D., and Spira, A. (1988). Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples: I study of sperm characteristics. *International Journal of Andrology*, 11: 379-394.

Joyce, C.L., Nuzzo, N.A., Wilson, L. Jr., and Zanevel, L.J. (1987). Evidence for a role of cyclooxygenase (prostaglandin synthetase) and prostaglandins in the sperm acrosome reaction and fertilization. *Journal of Andrology*, 8: 74-82.

Juonala, T., Salonen, E., Nurttila, T., and Andersson, M. (1999). Three fluorescence methods for assessing boar semen viability. *Reproduction in Domestic Animals*, 34: 83-87.

Kakar, M., Kanwal, C., Davis, J.R., Li, H., and Lim, C.S. (2006). Geldanamycin, an inhibitor of HSP90AA1, blocks cytoplasmic retention of progesterone receptors and glucocorticoid receptors via their respective ligand binding domains. *AAPS Journal*, 8: 718-728.

Kamal, A., Boehm, M.F., and Burrows, F.J. (2004). Therapeutic and diagnostic implications of HSP90AA1 activation. *Trends in Molecular Medicine*, 10: 283-290.

Kavak, A., Johannisson, A., Lundeheim, N., Rodríguez-Martinez, H., Aidnik, M., and Einarsson, S. (2003). Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 76: 205-216.

- Kawakami, E., Kashiwagi, C., Hori, T., and Tsutsui, T. (2001). Effects of canine oviduct epithelial cells on movement and capacitation of homologous spermatozoa in vitro. *Animal Reproduction Science*, 68: 121-131.
- Keij, J.F., Bell-Prince, C., and Steinkamp, J.A. (2000). Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry*, 36: 203-210.
- Kervancioglu, M.E., Djahanbakhch, O., and Aitken, R.J. (1994). Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation. *Fertility and Sterility*, 61: 1100-1108.
- Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G., and Plasterk, R.H. (1999). Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNase D. *Cell*, 99: 133-141.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes and Development*, 15: 2654-2659.
- Khalil, A.A., Petrunina, A.M., Sahin, E., Waberski, D., and Töpfer-Petersen, E. (2006). Enhanced binding of sperm with superior volume regulation to oviductal epithelium. *Journal of Andrology*, 27: 754-765.
- Kim, P.S., and Arvan P. (1998). Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocrine Reviews*, 19: 173-202.
- Kim, D.H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E., and Rossi, J.J. (2004). Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nature Biotechnology*, 22: 321-325.
- Kinakuwa, M., Nagata, M., and Aoki, F. (2003). Changes in flagellar bending during the course of hyperactivation in hamster spermatozoa. *Reproduction*, 125: 43-51.
- King, G. (1993). *Reproduction in domesticated animals*. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands.

- King, R.S., Anderson, S.H., and Killian, G.J. (1994). Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilizing oocytes. *Journal of Andrology*, 15: 468-478.
- King, R.S., and Killian, G.J. (1994). Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biology of Reproduction*, 51: 34-42.
- Kingsley, P.J., Rouzer, C.A., Saleh, S., and Marnett, L.J. (2005). Simultaneous analysis of prostaglandin glyceryl esters and prostaglandins by electrospray tandem mass spectrometry. *Annals of Biochemistry*, 343: 203-211.
- Kirwood, R.N., and Thacker, P.A. (1991). The influence of adding estradiol to semen on reproductive performance of sows. *Canadian Journal of Animal Science*, 71: 589-591.
- Klemenz, R., Frohli, E., Steiger, R.H., Schafer, R., and Aoyama, A. (1991). Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 3652-3656.
- Klemenz, R., Andres, A.C., Frohli, E., Schafer, R., and Aoyama, A. (1993). Expression of the murine small heat shock proteins Hsp25 and alpha B crystallin in the absence of stress. *Journal of Cell Biology*, 120: 639-645.
- Knepper, M.A., Saidel, G.M., Hascall, V.C., and Dwyer, T. (2003). Concentration of solutes in the renal inner medulla: interstitial hyaluronan as mechano-osmotic transducer. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 284: 433-446.
- Knobil, E., and Neill, J.D. (1994). *The Physiology of Reproduction*. Second edition. Raven Press. New York, USA. pp 1063-1175, 1435-1487.
- Knoblauch, R., and Garabedian, M.J. (1999). Role for HSP90AA1-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 3748-3759.
- Kobayashi, H., Sun, G.W., Tanaka, Y., Kondo, T., and Terao, T. (1999). Serum hyaluronic acid levels during pregnancy and labor. *Obstetrics and Gynecology*, 93:480-484.
- Kodithuwakku, S.P., Miyamoto, A., and Wijayagunawardane, M.P. (2007). Spermatozoa stimulate prostaglandin synthesis and secretion in bovine oviductal epithelial cells. *Reproduction*, 133: 1087-1094.

- Kole, R., and Sazani, P. (2001). Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 3: 229-234.
- Komatsu, T., Konishi, I., Fukumoto, M., Nanbu, K., Koshiyama, M., Mandai, M., and Mori, T. (1997). Messenger ribonucleic acid expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in human endometrium and myometrium during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82: 1385-1389.
- Kommissrud, E, Paulenz, H., Sehested, E., and Grevle, I.S. (2002). Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43: 49-55.
- Kordan, W., and Strezežek, J. (1997). Regulation of biochemical mechanisms of mammalian sperm motility. *Advances in Cell Biology*, 24: 543-560.
- Kordan, W., Hoody, D., Eriksson, B., Fraser, L., Rodríguez-Martínez, H., and Strezežek, J. (1998). Sperm motility inhibiting factor (SMIF) - a plasmatic peptide with multifunctional biochemical effects on boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 33: 347-354.
- Kos, M., and Bilkei, G. (2004). Prostaglandin F2alpha supplemented semen improves reproductive performance in artificially inseminated sows. *Animal Reproduction Science*, 80: 113-120.
- Koshimoto, C., and Mazur, P. (2002). The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. *Cryobiology*, 45: 80-90.
- Koshiyama, M., Konishi, I., Nanbu, K., Mandai, M., Komatsu, T., Yamamoto, S., Mori, T., and Fujii, S. (1995). Immunohistochemical localization of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in the human endometrium, correlation with sex steroid receptors and Ki-67 antigen expression. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80:1106-1112.
- Kost, S.L., Smith, D.F., Sullivan, W.P., Welch, W.J., and Toft, D.O. (1989). Binding of heat shock proteins to the avian progesterone receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 9: 3829-3838.
- Kruger, T.F., Menkveld, R., Stander, F.S., Lombard, C.J., van der Merwe, J.P., van Zyl, J.A., and Smith, K. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 46: 1118-1123.

- Kumar, M., and Carmichael, G.G. (1998). Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1415-1434.
- Kumar, L.D., and Clarke, A.R. (2007). Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): from in vitro to in vivo applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 87-100.
- Kumaresan, A., Ansari, M.R., Garg, A., and Kataria, M. (2006). Effect of oviductal proteins on sperm functions and lipid peroxidation levels during cryopreservation in buffaloes. *Animal Reproduction Science*, 93: 246-257.
- Kurrek, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical. *European Journal of Biochemistry*, 270: 1628-1644.
- Kurreck, J. (2006). siRNA Efficiency: Structure or Sequence-That Is the Question. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006: 83757.
- Kvist, U., and Björndahl, L., eds. (2002). *Manual on basic semen analysis*. ESHRE monographs. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Lachance, C., Bailey, J.L., and Leclerc, P. (2007). Expression of Hsp60 and HSPA5 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Human Reproduction*, 22: 2606-2614.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294: 853-858.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860-921.
- Lapointe, S., and Sirard, M.A. (1996). Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 44: 234-240.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294: 858-862.
- Lauren, T.C., Fraser, J.R. (1992). Hyaluronan. *FASEB Journal*, 6: 2397-2404.

- Lay, M.F., Richardson, M.E., Boone, W.R., Bodine, A.B., and Thurston, R.J. (2001). Seminal plasma and IVF potential. Biochemical constituents of seminal plasma of males from in vitro fertilization couples. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18: 144-150.
- Lebedeva, I., Benimetskaya, L., Stein, C.A., and Vilenchik, M. (2000). Cellular delivery of antisense oligonucleotides. Review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50: 101-119.
- Lechniak, D., Kedzierski, A., and Stanislawski, D. (2002). The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 37: 379-380.
- Leclerc, P. (2004). Localization of the Chaperone Proteins GRP78 and HSP60 on the Luminal Surface of Bovine Oviduct Epithelial Cells and Their Association with Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71: 1879-1889.
- Lee, A.S. (1992). Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Current Opinion in Cell Biology*, 4: 267-273
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843-854.
- Lee, H.S., Aumais, J., and White, J.H. (1996). Hormone-dependent transactivation by estrogen receptor chimeras that do not interact with HSP90AA1: evidence for transcriptional repressors. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 25727-25730.
- Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotechnology*, 20: 500-505.
- Lee, K.F., and Yeung, W.S. (2006). Gamete/embryo - oviduct interactions: implications on in vitro culture. *Human Fertility (Cambridge)*, 9: 137-143.
- Lefebvre, R., and Suarez, S.S. (1996). Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biology of Reproduction*, 54: 575-582.
- Lehtonen, E., Virtanen, I., and Saxén, L. (1985). Reorganization of intermediate filament cytoskeleton in induced metanephric mesenchyme cells is independent of tubule morphogenesis. *Developmental Biology*, 108: 481-90.



- Lemansky, P., Brix, K., and Herzog, V. (1999). Subcellular distribution, secretion, and posttranslational modifications of clusterin in thyrocytes. *Experimental Cell Research*, 251: 147-155.
- Lewin, L.M., Golan, R., Freidlin, P., and Shochat, L. (1999). A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 124: 133-137.
- Lewis-Jones, D.I., Aird, I.A., Biljan, M.M., and Kingsland, C.R. (1996). Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Human Reproduction*, 11: 2465-2467.
- Li, C.X., Parker, A., Menocal, E., Xiang, S., Borodyansky, L., and Fruehauf, J.H. (2006). Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*, 5: 2103-2109.
- Li, W., and Cha, L. (2007). Predicting siRNA efficiency. *Cell and Molecular Life Sciences*, 64: 1785-1792.
- Liberda, J., Manaskova, P., Prelovska, L., Ticha, M., and Jonakova, V. (2006). Saccharide-mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *Journal of Reproductive Immunology*, 71: 112-125.
- Lin, S.L., Kim, H., and Ying, S.Y. (2007). Intron-mediated RNA interference and microRNA (miRNA). *Frontiers in Bioscience*, 13: 2216-2230.
- Lindahl, U., and Hook, M. (1978). Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annual Review of Biochemistry*, 47: 385-417.
- Lindblom, B., Hamberger, L., and Wiqvist, N. (1978). Differentiated contractile effects of prostaglandins E and F on the isolated circular and longitudinal smooth muscle of the human oviduct. *Fertility and Sterility*, 30: 553-559.
- Lindquist, S.C., and Craig E.A. (1988). The heat shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22: 631-636.
- Lippes, J., and Wagh, P.V. (1989). Human oviductal fluid (hOF) proteins. IV. Evidence for hOF proteins binding to human sperm. *Fertility and Sterility*, 51: 89-94.

- Little, E., Ramakrishnan, M., Roy, B., Gazit, G., and Lee, A.S. (1994). The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Critical Reviews Eukaryotic Gene Expression*, 4: 1-18.
- Liu, Z., and Foote, R.H. (1998). Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *Journal of Dairy Science*, 81: 1868-1873.
- Liu, J.H., Wu, S.C., Wei-Shone, C., Yen, C.C., Yang, M.H., Tsai, Y.C., and Chen, P.M. (2004). An intron promotes the anti-*bcr-abl* activities of a retrovirally expressed ribozyme in chronic myeloid leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318: 764-772.
- Liu, D.Y., Garrett, C., and Baker, H.W.G. (2006). Acrosome-reacted human sperm in insemination medium do not bind to the zona pellucida of human oocytes. *International Journal of Andrology*, 29: 475-481.
- López, F.J., and Alvarino, J.M. (2000). Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Animal Reproduction Science*, 58: 147-154.
- Love, C.C., Thompson, J.A., Brinsko, S.P., Rigby, S.L., Blanchard, T.L., Lowry, V.K., and Varner, D.D. (2003). Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, 60: 1127-1138.
- Ludwig, G., and Frick, J. (1990). *Spermatology: Atlas and Manual*. Springer-Verlag. New York, USA.
- Luo, B., Heard, A.D., and Lodish, H.F. (2004). Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA (SPEED). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 5494-5499.
- Ma, Y., and Hendershot, L. M. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. Review. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28: 51-65
- Macer, D.R., and Koch, G.L. (1988). Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 91: 61-70.

- Madej, A., Lang, A., Brandt, Y., Kindahl, H., Madsen, M.T., and Einarsson, S. (2005). Factors regulating ovarian function in pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 29: 347-361.
- Maes, D.G.D., Mateusen, T., Rijsselaere, T., De Vlieghe, S., van Soom, A., and de Kruif, A. (2003). Motility characteristics of boar spermatozoa after addition of prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Theriogenology*, 60: 1435-1443.
- Makler, A. (1980). The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertility and Sterility*, 33: 337-338.
- Manche, L., Green, S.R., Schmedt, C., and Mathews, M.B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Molecular and Cellular Biology*, 12: 5238-5248.
- Mao, C., Tai, W-C, Bai, Y., Poizat, C., and Lee, A.S. (2006). In vivo regulation of HSPA5/BiP transcription embryonic heart. Role of the endoplasmic reticulum stress response element. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 8877-8887.
- Margalioth, E.J., Bronson, R.A., and Cooper, G.W. (1988). Luteal phase sera and progesterone enhance sperm penetration in the hamster egg assay. *Fertility and Sterility*, 50: 117-122.
- Mariani, M.L., Souto, M., Fanelli, M.A., and Ciocca, D.R. (2000). Constitutive expression of heat shock proteins hsp25 and hsp70 in the rat oviduct during neonatal development, the oestrous cycle and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120: 217-223.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J. Steck, T.L., Postlethwait, P., and Nellen, W. (2002). RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Molecular Biology of the Cell*, 13: 445-453.
- Martín, S. (1982). *Reproducción e Inseminación Artificial porcina*. Aedos. Barcelona, Spain.
- Martín, S.E., and Caplen, N.J. (2007). Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 8: 81-108.
- Martínez, E.A., Vázquez, J.M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M.A., and Parrilla, I. (2002). Minimal sperm number for normal fertility after deep intrauterine insemination in nonsedated sows. *Reproduction*, 123:167:170.

- Martínez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110: 563-574.
- Marton, M.J., DeRisi, J.L., Bennett, H.A., Iyer, V.R., Meyer, M.R., Roberts, C.J., Stoughton, R., Burchard, J., Slade, D., Dai, H., Bassett, D.E. Jr., Hartwell, L.H., Brown, P.O., and Friend, S.H. (1998). Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nature Medicine*, 4: 1293-1301.
- Mattioli, M., Bacci, M.L., Galeati, G., and Seren, E. (1989). Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 31: 1201-1208.
- Mattioli, M., Barboni, B., Lucidi, P., and Seren, E. (1996). Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 45: 373-381.
- Maxell, W.M.C., and Johnson, L.A. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52: 1353-1362.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, 284: C125-C142.
- McCauley, T.C., Buhi, W.C., Wu, G.M., Mao, J., Caamaño, J.N., Didion, B.A., and Day, B.N. (2003). Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 69: 828-834.
- McKenzie, E.E. (1931). A method for collection boar semen. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 31: 244-246.
- McLaughlin, E.A., Ford, W.C.L., and Hull, M.G.R. (1992). Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95: 527-534.
- McManus, M.T., and Sharp, P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Reviews Genetics*, 3: 737-747.
- McNutt, T.L., and Killian, G.J. (1991). Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *Journal of Andrology*, 12: 244-252.
- McNutt, T.L., Olds-Clarke, P., Way, A.L., Suárez, S.S., and Killian, G.J. (1994). Effect of follicular or oviductal fluids on movement characteristics of bovine sperm during capacitation in vitro. *Journal of Andrology*, 15: 328-335.

- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., and Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO Journal*, 15: 1292-1300.
- Milovanov, V. K. (1938). *Isskusstvenoye Ossemenebie Selsko-Khoziasvennykh Jivotnykh*. (The Artificial Insemination of Farm Animals). Seljhozgiz. Moscow, Russia.
- Miller, V.M., Xia, H., Marrs, G.L., Gouvion, C.M., Lee, G., Davidson, B.L., and Paulson, H.L. (2003). Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 7195-7200.
- Miller, H., Poon, S., Hibbert, B., Rayner, K., Chen, Y.X., and O'Brien, E.R. (2005). Modulation of estrogen signaling by the novel interaction of heat shock protein 27, a biomarker for atherosclerosis, and estrogen receptor beta: mechanistic insight into the vascular effects of estrogens. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25: 10-14
- Minhas, B.S., and Ripps, B.A. (1996). Methods for enhancement of sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1: 65-71.
- Mirando, M.A., Prince, B.C., and Tysseling, K.A. (1995). Proposed role for oxytocin in regulation of endometrial prostaglandin F<sub>2α</sub> secretion during luteolysis in swine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 395: 421-433.
- Miska, E.A., and Ahringer, J. (2007). RNA interference has second helpings. *Nature Biotechnology*, 25: 302-303.
- Miyagishi, M., and Taira, K. (2002). U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 20: 497-500.
- Miyagishi, M., and Taira, K. (2003). Strategies for generation of an siRNA expression library directed against the human genome. *Oligonucleotides*, 13: 325-333.
- Miyagishi, M., Matsumoto, S., and Taira, K. (2004). Generation of an shRNAi expression library against the whole human transcripts. *Virus Research*, 102: 117-124.
- Montgomery, M.K. (2006). RNA interference: unraveling a mystery. *Nature: Structural and Molecular Biology*, 13: 1039-1041.

- Moore, H.D.M. (1990). The epididymis. In: *Scientific foundations of urology*. Chisholm, G.D., and Fair, W.D., eds. Heimann Medical. Oxford, UK. pp.: 399-410.
- Morales, P., Palma, V., Salgado, A.M., and Villalón, M. (1996). Sperm interaction with human oviductal cells in vitro. *Human Reproduction*, 11: 1504-1509.
- Morano, K.A., and Thiele, D.J. (1999). Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene Expression*, 7: 271-282.
- Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 10: 384-391.
- Moura, A.A., Chapman, D.A., Koc, H., and Killian, G.J. (2007). A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, 98: 169-188.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes and Development*, 16: 720-728.
- Munro, S., and Pelham, H.R.B. (1986). An hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kDa glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, 46: 291-300.
- Mwanza, A.M., Einarsson, S., Madej, A., Lundeheim, N., Rodríguez-Martínez, H., and Kindahl, H. (2002). Postovulatory effect of repeated administration of prostaglandin F<sub>2α</sub> on the endocrine status, ova transport, binding of accessory spermatozoa to the zona pellucida and embryo development of recently ovulated sows. *Theriogenology*, 58: 1111-1124.
- Nagai, T., Takenaka, A., Mori, T., and Hirayama, M. (1994). Effects of caffeine and casein phosphopeptides on fertilization in vitro of pig oocytes matures in culture. *Molecular Reproduction and Development*, 37: 452-456.
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E.K., and Gadella, B.M. (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction*, 68: 1828-1835.

- Nakamoto, H., and Víggh, L. (2007). The small heat shock proteins and their clients. *Cell and Molecular Life Sciences*, 64: 294-306.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2: 279-289
- Nascimento, J.F.K., Nascimento, E.F., and Melo, M.I.V. (2001) Modification of the short osmotic resistance test for evaluating the functional integrity of boar spermatozoa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53: 393-395.
- Nassar, A., Morshedi, M., Mahony, M., Srisombut, C., Lin, M.H., and Oehninger, S. (1999). Pentoxifylline stimulates various sperm motion parameters and cervical mucus penetrability in patients with asthenozoospermia. *Andrologia*, 31: 9-15.
- Neckers, L., and Ivy, S.P. (2003). Heat shock protein 90. *Current Opinion in Oncology*, 15: 419-424.
- Nesterova, M., and Cho-Chung, Y.S. (2004). Killing the messenger: antisense DNA and siRNA. *Current Drug Targets*, 5: 683-689.
- Newth, M.S., and Levis, D.G. (1999). Change in pH boar semen extenders. *1999 Nebraska Swine Report*, 3-6.
- Nicholson, R.H., and Nicholson, A.W. (2002). Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mammalian Genome*, 13: 67-73.
- Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 15: 1497-1500.
- Nip, M.M.C., Miller, D., Taylor, P.V., Gannon, M.J., and Hancock, K.W. (1994). Expression of heat shock protein 70 kDa in human endometrium of normal and infertile women. *Human Reproduction*, 9: 1253-1256.
- Nishikimi, A., Yamada, M., Minami, N., and Utsumi, K., (1997). Evaluation of acrosomal status of bovine spermatozoa using concanavalin a lectin. *Theriogenology*, 48: 1007-1016.

- Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107: 309-321.
- O'Connell, M., McClure, N., and Lewis, S.E. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17: 704-709.
- Odenhal, F., Barth, T., and Jost, K. (1990). The effect of Depotocin (carbetocin) added to insemination doses of boar semen on the conception rate of sows and their fertility. Abstract. *Pig News Info*, 11: 203.
- Oehninger, S., Acosta, A.A., Morshedi, M., Veeck, L., Swanson, R.J., Simmons, K., and Rosenwaks, Z. (1988). Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertility and Sterility*, 50: 283-287.
- Oehninger, S., Acosta, R., Morshedi, M., Philput, C., Swanson, R.J., and Acosta, A.A. (1990). Relationship between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. *Journal of Andrology*, 11: 446-452
- Oliphant, G., Cabot, C., Ross, P., and Marta, J. (1984). Control of the humoral immune system within the rabbit oviduct. *Biology of Reproduction*, 31: 205-212.
- Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology*, 216: 671-680.
- Olson, D.M., Zaragoza, D.B., Shalow, M.C., Cook, J.L., Mitchell, B.F., Grigsby, P., and Hirst, J. (2003). Myometrial activation and preterm labour: evidence supporting a role for the prostaglandin F receptor. A review. *Placenta*, 24: S47-S54.
- Ombelet, W., Menkveld, R., Kruger, T.F., and Steeno, O. (1995). Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Human Reproduction Update*, 1: 543-557.
- Omate, S.A., Estes, P.A., Welch, W.J., Nordeen, S.K., and Edwards, D.P. (1991). Evidence that heat shock protein-70 associated with progesterone receptors is not involved in receptor-DNA binding. *Molecular Endocrinology*, 5: 1993-2004.
- O'Neill, D.J., Beekman, S.P.A., Roche, J.F., Hanrahan, J.P., Diskin, M., and Boland, M.P. (1997). The effect of different freezing curves on the viability, mitochondrial activity and



- acrosome integrity of ram spermatozoa. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 36: 132.
- OMS. (1999). *Manual de laboratorio para el examen del semen humano*. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Orgebin-Crist, M.C. (1998). The epididymis across 24 centuries. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 53: 285-292.
- Orum, H., and Wengel, J. (2001). Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 3: 239-243.
- Osman, R.A., Andria, M.L., and Jones, A.D. (1989). Steroids induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160: 828-833.
- Ouhibi, N., Menezo, Y., Benet, G., and Nicollet, B. (1989). Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Human Reproduction*, 4: 229-235.
- Ouhibi, N., Benet, G., and Menezo, Y. (1991). Fetal bovine oviduct epithelial cell monolayers: method of culture and identification. *Journal of Tissue Culture Methods*, 13: 289-294.
- Ovcharenko, D., Jarvis, R., Hunicke-Smith, S., Kelnar, K., and Brown, D. (2005). High-throughput RNAi screening in vitro: From cell line to primary cells. *RNA*, 11: 985-993.
- Ozaki, T., Takahashi, K., Kanasaki, H., and Miyazaki, K. (2002). Evaluation of acrosome reaction and viability of human sperm with two fluorescent dyes. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 266: 114-117.
- Paddison, P.J., and Hannon, G.J. (2002). RNA interference: The new somatic cell genetics? *Cancer Cell*, 2: 17-23.
- Paroo, Z., and Corey, D.R. (2004). Challenges for RNAi in vivo. *Trends in Biotechnology*, 22: 390-394.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winter, M.A., and First, N.L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 38: 1171-1180.

- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Handrow, R.R., Sims, M.M., and First, N.L. (1989). Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biology of Reproduction*, 40: 131-140.
- Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I., and Engelke, D.R. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnology*, 20, 505-508.
- Paulenz, H., Kommisrud, E., and Hofmo, P.O. (2000). Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 35: 83-85.
- Pedersen, M.E., Øzdas, Ø.B., Farstad, W., Tverdal, A., and Olsaker, I. (2005). Effects of bovine oviduct epithelial cells, fetal calf serum and bovine serum albumin on gene expression in single bovine embryos produced in the synthetic oviduct fluid culture system. *Reproduction, Fertility and Development*, 17: 751-757.
- Peña, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M., and Rodríguez-Martínez, H., (2004). Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Theriogenology*, 61: 63-70.
- Peña, F.J., Saravia, F., Núñez-Martínez, I., Johannisson, A., Wallgren, M., and Rodríguez-Martínez, H. (2006). Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 93: 101-113.
- Pérez-Llano, B., Lorenzo, J.L., Yenes, P., Trejo, A., and García-Casado, P. (2001). A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 53: 387-398.
- Pérez-Llano, B., Yenes-García, P., and García-Casado, P. (2003). Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37°C. *Theriogenology*, 60: 1401-1407.
- Pérez-Martínez, S., Franchi, A.M., Viggiano, J.M., Herrero, M.B., and Gimeno, M. (1998). Effect of prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) on oviductal nitric oxide synthase (NOS) activity: possible role of endogenous NO on PGF<sub>2α</sub>-induced contractions in rat oviduct. *Prostaglandins and other Lipid Mediators*, 56: 155-166.
- Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., and Cebrián-Pérez, J.A. (2001). Sperm washing method alters the ability of seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *International Journal of Andrology*, 24: 352-359.

- Perreault, S.G., and Roger, B.J. (1992). Relationship between fertilizing ability and cAMP in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 13: 396-401.
- Perrot-Applanat, M., Lescop, P., and Milgrom, E. (1992). The cytoskeleton and the cellular traffic of the progesterone receptor. *Journal of Cell Biology*, 119: 337-348.
- Petrunkina, A.M., and Töpfer-Petersen, E. (2000). Heterogeneous osmotic behaviour in boar sperm populations and its relevance for detection of changes in plasma membrane. *Reproduction, Fertility and Development*, 12: 297-305.
- Petrunkina, A.M., Harrison, R.A., Hebel, M., Weitze, K.F., and Töpfer-Petersen, E. (2001a). Role of quinine-sensitive ion channels in volume regulation in boar and bull spermatozoa. *Reproduction*, 122: 327-336.
- Petrunkina, A.M., Petzoldt, R., Stahlberg, S., Pfeilsticker, J., Beyerbach, M., Bader, H. and Töpfer-Petersen, E. (2001b). Sperm-cell volumetric measurements as parameters in bull semen function evaluation: correlation with nonreturn rate. *Andrologia*, 33: 360-367.
- Petrunkina, A.M., Gehlhaar, R., Drommer, W., Waberski, D., and Töpfer-Petersen, E. (2001c). Selective sperm binding to porcine oviductal epithelium in vitro. *Reproduction*, 121: 889-896.
- Petrunkina, A.M., Friedrich, J., Drommer, W., Bicker, G., Waberski, D., Töpfer-Petersen, E. (2001d). Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction*, 122: 469-480.
- Petrunkina, A.M., Simon, K., Günzel-Apel, A.R., and Töpfer-Petersen, E. (2003). Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 38: 455-463.
- Petrunkina, A.M., Simon, K., Günzel-Apel, A.R., and Töpfer-Petersen, E. (2004). Kinetics of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific is the regulation by the oviduct? *Theriogenology*, 61: 1617-1634
- Pfeffer, U., Fecarotta, E., Arena, G., Forlani, A., and Vidali, G. (1996). Alternative splicing of the estrogen receptor primary transcript normally occurs in estrogen receptor positive tissues and cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 56: 99-105.

- Piasecka, M., and Kawiak, J. (2003). Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochemical and Cytobiology*, 41: 125-139.
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S., and Yamamoto, K.R. (1990). Reduced levels of HSP90AA1 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature*, 348: 166-168.
- Pinart, E., Camps, R., Briz, M., Bonet, S., and Egozcue, J. (1998a). Unilateral spontaneous abdominal cryptorchidism: structural and ultrastructural study of sperm morphology. *Animal Reproduction Science*, 49: 247-268.
- Pinart, E., Sancho, S., Briz, M., and Bonet, S. (1998b). Germ cells and meiosis in unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *Advances in Reproduction*, 2: 35-44.
- Pinart, E., Sancho, S., Briz, M., Bonet, S., and García-Gil, N. (1999). Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Animal Reproduction Science*, 55: 269-278.
- Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., Briz, M., Sancho, S., García-Gil, N., Bassols, J., Pruneda, A., Casas, I., and Bonet, S. (2006). Protocolo de triple marcaje con fluorocromos para el análisis funcional de los espermatozoides de porcino. In: Bonet, S., Martínez, E.A., Rodríguez-Gil, J.E., and Barrera, X., eds. “*Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*”. Universitat de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina.
- Plasterk, R.H.A. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, 296: 1263-1265.
- Plotton, I., Sánchez, P., Durand, P., and Lejeune, H. (2006). Decrease of both stem cell factor and clusterin mRNA levels in testicular biopsies of azoospermic patients with constitutive or idiopathic but not acquired spermatogenic failure. *Human Reproduction*, 21: 2340-2345.
- Polge, C. (1956). The development of artificial insemination service for pigs. *Animal Breeding Abstract*, 24: 209-217.
- Pollard, J.W., Plante, C., King, W.A., Hansen, P.J., Betteridge, K.J., and Suarez, S.S. (1991). Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by the binding of oviductal epithelial cells. *Biology of Reproduction*, 44: 102-107.

- Pommer, A.C., Rutllant, J., and Meyers, S.A. (2002). The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, 58:1373-1384.
- Ponce, A.A., Fiol de Cuneo, M., Ruiz, R.D., Vincenti, L.M., Santilla, M.E., Stutz, G., and Lacuara, J.L. (1999). Influence of pentoxifylline on sperm membrane functional integrity. *Archives of Andrology*, 43: 77-84.
- Pond, W., and Houpt, K. (1981). *Biología del Cerdo*. Acribia. Zaragoza, Spain.
- Poot, M., Zhang, Y.Z., Krämer, J.A., Wells, K.S., Jones, L.J., Hanzel, D.K., Lugade, A.G., Singer, V.L., and Haugland, R.P. (1996). Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44: 1363-1372.
- Powers, M.V., and Workman, P. (2006). Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocrinology-Related Cancer Supplement*, 1: 125-135.
- Pratt, W.B., and Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews*, 18: 306-360.
- Presley, A.D., Fuller, K.M., and Arriaga, E.A. (2003). MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 793: 141-150.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frenthewey, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2002a) Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO Journal*, 21: 5864-5874.
- Provost, P., Silverstein, R.A., Dishart, D., Walfridsson, J., Djupedal, I., Kniola, B., Wright, A., Samuelsson, B., Radmark, O., and Ekwall, K. (2002b). Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16648-16653.
- Pruneda, A., Pinart, E., Briz, M.D., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Kádár, E., Bassols, J., Bussalleu, E., Yeste, M., and 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.

- Pukazhenthil, B., Noiles, E., Pelican, K., Donoghue, A., Wildt, D., and Howard, J. (2000). Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology*, 40: 139-150.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A., and Schulman, L.L., (1973). Fertilizing capacity of boar semen stored at 15°C. *Journal of Animal Science*, 37: 532-535.
- Quax-Jeuken, Y., Quax, W., van Rens, G., Khan, P.M., and Bloemendal, H. (1985). Complete structure of the alpha B-crystallin gene, conservation of the exon-intron distribution in the two nonlinked alpha-crystallin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 5819-5823.
- Quintero, I., Ghersevich, S., Caille, A., Munuce, M.J., Daniele, S.M., and Morisoli, L. (2005). Effects of human oviductal in vitro secretion on spermatozoa and search of sperm-oviductal proteins interactions. *International Journal of Andrology*, 28: 137-143.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., and Rodríguez-Gil, J.E. (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*, 61: 673-690.
- Rajagopal, M., Tollner, T.L., Finkbeiner, W.E., Cherr, G.N., and Widdicombe, J.H. (2006). Differentiated structure and function of primary cultures of monkey oviductal epithelium. *In Vitro Cell and Developmental Biology - Animal*, 42: 248-254.
- Rajapandi, T., Greene, L.E., and Eisenberg, E. (2000). The molecular chaperones HSP90AA1 and HSPA8 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 22597-22604.
- Ranganathan, S., Ganguly, A.K., and Datta, K. (1994). Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Molecular Reproduction and Development*, 38: 69-76.
- Ranganathan, S., Bharadwaj, A., and Datta, K. (1995). Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylation of proteins including hyaluronan binding protein. *Cell and Molecular Biology Research*, 41: 467-476.
- Rasbech, N.O. (1984). The male and fertility and domestic animals. In: Court, M., ed. *The Male in farm animal reproduction*. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrech, The Netherlands. pp. 2-23.

- Ratajczak, T., Carrello, A., Mark, P.J., Warner, B.J., Simpson, R.J., Moritz, R.L., and House, A.K. (1993). The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBPS9). *Journal of Biological Chemistry*, 268: 13187-13192.
- Rebersek, M., Fauries, C., Kanduser, M., Corović, S., Teissié, J., Rols, M.P., and Miklavcic, D. (2007). Electroporator with automatic change of electric field direction improves gene electrotransfer in-vitro. *BioMedical Engineering OnLine*, 6: 25
- Rees, J.M., Ford, W.C., and Hull, M.G. (1990). Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90, 147-156.
- Reischl, J., Prella, K., Schöl, H., Neumüller, C., Einspanier, R., Sinowatz, F., and Wolf, E. (1999). Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells in vitro. *Cell and Tissue Research*, 296: 371-383.
- Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 378: 681-689.
- Renoir, J.M., Radanyi, C., Faber, L.E., and Baulieu, E.E. (1990). The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a HSP90AA1-bound 59-kilodalton protein. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 10740-10745.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology*, 22: 326-330.
- Rhodes, F.M., McDougall, S., and Verkerk, G.A. (2001). Reproductive performance of dairy cows not detected in oestrus but with a detectable corpus luteum, in response to treatment with progesterone, oestradiol, benzoate and prostaglandin F<sub>2α</sub>. *New Zealand Veterinary Journal*, 49: 13-17.
- Richardson, W.D., Mills, A.D., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., and Dingwall, C. (1988). Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores. *Cell*, 52: 655-664.

- Rief, S., Sinowatz, F., Stojkovic, M., Einspanier, R., Wolf, E., and Prella, K. (2002). Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*, 124: 543-556.
- Rigau, T., Piedrafita, J., Reverter, J., Canal, M., and Rodríguez-Gil, J.E. (1996). The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Animal Reproduction Science*, 43:161-172.
- Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T, Pena, A., and Rodríguez-Gil, J.E. (2001). Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56: 801-815.
- Rigau, T., Rivera, M., Palomo, M.J., Fernández-Novell, J.M., Mogas, T., Ballester, J., Peña, A., Otaegui, P.J., Guinovart, J.J., and Rodríguez-Gil, J.E. (2002). Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*, 123: 579-591.
- Robert, M., and Gagnon, C. (1996). Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biology of Reproduction*, 55: 813-821.
- Robert, M., and Gagnon, C. (1999). Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cell and Molecular Life Sciences*, 55: 944-960.
- Rodin, I.M., and Lipatov, V.I. (1935). Artificial insemination of pigs. *Problemy Zhivotnovodstva*, 9: 108; and *Animal Breeding Abstract*, 4: 205.
- Rodríguez-Dorta, N., Cognié, Y., González, F., Poulin, N., Guignot, F., Touzé, J.L., Baril, G., Cabrera, F., Álamo, D., Batista, M., Gracia, A., and Mermillod, P. (2007). Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*, 68: 908-913.
- Rodríguez-Gil, J.E., Montserrat, A., and Rigau, T. (1994) Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*, 42: 815-829.
- Rodríguez-Gil, J.E. and Rigau, T. (1995). Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar semen. *Animal Reproduction Science*, 39: 141-146.
- Rodríguez-Gil, J.E., Rigau, T., Miró, J., Mogas, T., Palomo, M.J., Rivera del Álamo, M., and Ramió, L. (2006). Pruebas de funcionalidad espermática. In: Bonet, S., Martínez, E.A.,



- Rodríguez-Gil, J.E., and Barrera, X., eds. “*Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*”. Universitat de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina.
- Rodríguez-Martínez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H., and Johannisson, A., (2001). Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reproduction Supplement*, 58: 129-145.
- Rodríguez-Martínez, H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals*, 38: 312-318.
- Romano, N., and Macino, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6: 3343-3353.
- Romar, R., Coy, P., Campos, I., Gadea, J., Matás, C., and Ruiz, S. (2001). Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine epithelial cells on in vitro fertilization. *Animal Reproduction Science*, 68: 85-98.
- Romar, R., Coy, P., Ruiz, S., Gadea, J., and Rath, D. (2003). Effects of oviductal and cumulus cells on vitro fertilization and embryo development of porcine oocytes fertilized with epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 59: 975-986.
- Rossato , M., Di Virgilio, F., and Foresta, C. (1996). Osmosensitive calcium influx in human sperm. *Molecular Human Reproduction*, 2:903-909.
- Rossato, M., Balercia, G., Lucarelli, G., Foresta, C., and Mantero, F. (2002). Role of seminal osmolarity in the regulation of human sperm motility. *International Journal of Andrology*, 25: 230-235.
- Rota, A., Penzo, N., Vincenti, L., and Mantovani, R. (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening. *Theriogenology*, 53: 1415-1420.
- Rothschild, M.P. (1990). The role of biology in future pig breeding programs. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production held in Edinburgh, UK*, 15: 415-424.
- Rottmayer, R., Ulbrich, S.E., Kölle, S., Preller, K., Neumueller, C., Sinowatz, F., Meyer, H.H., Wolf, E., and Hiendleder, S. (2006). A bovine oviduct epithelial cell suspension culture

system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*, 132: 637-648.

Rousseau, J.P., and Ménézo, Y. (1993). Role of the female genital tract in the transport and survival of gametes and the fertilized egg, In: Thibault, C., Levasseur, M.C, and Hunter, R.H.F., eds. *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. Paris, France. pp. 369-386.

Rowland, S.C., Jacobson, J.D., Patton, W.C., King, A., and Chan, P.J. (2003). Dual fluorescence analysis of DNA *apoptosis in sperm*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 188: 1156-1157.

Roy, A.C., and Ratnam, S.S. (1992). Biosynthesis of prostaglandins by human spermatozoa in vitro and their role in acrosome reaction and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 33: 303-306.

Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S., and Lansac, J. (1996). Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Human Reproduction Update*, 2: 553-559.

Ruiz-Sánchez, A.L., O'Donoghue, R., Novak, S., Dyck, M.K., Cosgrove, J.R., Dixon, W.T. and Foxcroft, G.R. (2006). The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology*, 66: 736-748.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview. New York, USA.

Sabeur, K., Cherr, G.N., Yudin, A.I., and Overstreet, J.W. (1998). Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote*, 6: 103-111.

Sánchez, R., 1991. Control de la calidad espermática. *Anaporc*, 104: 27-33.

Sancho, S. (2002). Efectes del fotoperíode sobre la qualitat espermàtica de mascles porcíns (*Sus domesticus*). *Doctoral Thesis*. University of Girona.

Sandy, P., Ventura, A., and Jacks, T. (2005). Mammalian RNAi: a practical guide. *Biotechniques*, 39: 215-224.

Sands, H., Gorey-Feret, L.J., Cocuzza, A.J., Hobbs, F.W., Chidester, D., and Trainor, G.L. (1994) Biodistribution and metabolism of internally <sup>3</sup>H-labeled oligonucleotides. I.

Comparison of a phosphodiester and a phosphorothioate. *Molecular Pharmacology*, 45: 932-943

Saravia, F., Núñez-Martínez, I., Morán, J.M., Soler, C., Muriel, A., and Rodríguez-Martínez, H., Peña, F.J. (2007). Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology*, 68: 196-203.

Saridogan, E., Djahanbakhch, O., Kervancioglu, M.E., Kahyaoglu, F., Shrimanker, K., and Grudzinskas, J.G. (1997). Placental protein 14 production by human Fallopian tube epithelial cells in vitro. *Human Reproduction*, 12: 1500-1507.

Satake, N., Elliot, R.M., Watson, P.F., and Holt, W.V. (2006). Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *Journal of Experimental Biology*, 209: 1560-1572.

Sato, M. (2005). Intraoviductal introduction of Plasmid DNA and subsequent Electroporation for efficient In Vivo Gene Transfer to Murine Oviductal Epithelium. *Molecular Reproduction and Development*, 71: 321-330

Sbracia, M., Grasso, J., Syame, N., Stronk, J., and Huszar, G. (1997). Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Human Reproduction*, 12: 1949-1954.

Scherr, M., and Eder, M. (2007). Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells. *Cell Cycle*, 6: 444-449.

Scherrer, L.C., Picard, D., Massa, E., Harmon, J.M., Simons, S.S. Jr., Yamamoto, K.R., and Pratt, W.B. (1993). Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry*, 32: 5381-5386.

Schilling, E., Vengust, M., Bast, G., and Tomac, M. (1986). The Osmotic Resistance test (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress held in Barcelona, Spain*, 77.

Schilling, E., and Vengust, M. (1986). Osmotic pressure of boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 21: 33-34.

- Schmidt, C.W. (2003). Therapeutic interference. *Modern Drug Discovery*, July: 37-42.
- Schramke, V., and Allshire, R. (2003) Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science*, 301: 1069-1074.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115: 199-208.
- Sen, G.L., and Blau, H.M. (2006). A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB Journal*, 20: 1293-1299.
- Setchell, B.P. (1991). Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P.T., ed. *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press Inc. San Diego, California. Chapter 6, pp. 221-249.
- Shaffer, J.E., and Almquist, J.O. (1948). Vital staining of bovine spermatozoa with an eosine-aniline blue staining mixture. *Journal of Dairy Science*, 31: 677.
- Shah, M., Stanek, J., and Handwerger, S. (1998). Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochemical Journal*, 30: 509-518.
- Shalev, Y., Shemesh, M., and Levinshal T. (1984). Localization of cyclooxygenase and production of prostaglandins in bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101: 405-413.
- Shaner, L., and Morano, K.A. (2007). All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. *Cell Stress and Chaperones*, 12: 1-8.
- Shapiro, H.M. (1998). *Practical Flow Cytometry*. Second edition. Alan R. Liss Inc. New York, USA. pp. 168-169.
- Sharp, P.A. (2001). RNA interference - 2001. *Genes Development*, 15: 485-490.
- Shemetov, A.A., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B. (2007). Structure, properties, and functions of the human small heat-shock protein HSP22 (HspB8, H11, E2IG1): A critical review. *Journal of Neuroscience Research*, [doi.wiley.com/10.1002/jnr.21441](https://doi.org/10.1002/jnr.21441).
- Sheskin, D.J. (2000). *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*. Second edition. Chapman & Hall/Crc. New York, USA.

- Shimizu, Y., Yorimitsu, A., Maruyama, Y., Kubota, T., Aso, T., and Bronson, R.A. (1998). Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 4: 555-561.
- Shirane, D., Sugao, K., Namiki, S., Tanabe, M., Iino, M., and Hirose, K. (2004). Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs. *Nature Genetics*, 36: 190-196.
- Shoji, M., Chuma, S., Yoshida, K., Morita, T., and Nakatsuji, N. (2005). RNA interference during spermatogenesis in mice. *Developmental Biology*, 282: 524-534.
- Sidhu, K.S., Mate, K.E., and Rodger, J.C. (1998). Sperm-oviduct epithelial cell monolayer co-culture: an in vitro model of sperm-female tract interactions in a marsupial, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 114: 55-61.
- Sierakowska, H., Gorman, L., Kang, S.H., and Kole, R. (2000). Antisense oligonucleotides and RNAs as modulators of pre-mRNA splicing. *Methods in Enzymology*, 313: 506-521.
- Sikka, S.C., and Hellstrom, W.J. (1991). The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. *Journal of Andrology*, 12: 165-170.
- Silva, P.F.N., and Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65: 958-978.
- Simmons, D.G., and Kennedy, T.G. (2000). Induction of glucose-regulated protein 78 in rat uterine glandular epithelium during uterine sensitization for the decidual cell reaction. *Biology of Reproduction*, 62: 1168-1176.
- Slotte, H., Akerlof, E., and Pousette, A. (1993). Separation of human spermatozoa with hyaluronic acid induces, and Percoll inhibits, the acrosome reaction. *International Journal of Andrology*, 16: 349-354.
- Smikle, C.B., and Turek, P.J. (1997). Hypo-osmotic swelling can accurately assess the viability of nonmotile sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 47: 200-203.
- Smith, D.F. (1993). Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Molecular Endocrinology*, 7: 1418-1429.
- Smith, D.F., and Toft, D.O. (1993). Steroid receptors and their associated proteins. *Molecular Endocrinology*, 7: 4-11.

- Smith, T.T., and Nothnick, W.B. (1997). Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability. *Biology of Reproduction*, 56: 83-89.
- Sohail, M., Doran, G., Riedemann, J., Macaulay, V., and Southern, E.M. (2003). A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucleic Acids Research*, 31: e38.
- Songsasen, N., Yu, I., Murton, S., Paccamonti, D.L., Eilts, B.E., Goodke, R.A., and Leibo, S.P. (2002). Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology*, 44: 79-90.
- Sostaric, E., Georgiou, A.S., Wong, C.H., Watson, P.F., Holt, W.V., and Fazeli, A. (2006). Global profiling of surface plasma membrane proteome of oviductal epithelial cells. *Journal of Proteome Research*, 5: 3029-3037.
- Sőti, C., Nagy, E., Giricz, Z., Vígh, L., Csermely, P., and Ferdinandy, P. (2005). Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, 146: 769-780.
- Stanley, M., and Turner, K.O. (1986). Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of previously capacitated hamster sperm. *Journal of Experimental Zoology*, 237: 137-139.
- Stein, C.A. (1995). Does antisense exist? *Nature Medicine*, 1: 1119-1121.
- Stein, C.A. (2001). The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed. *Journal of Clinical Investigations*, 108: 641-644.
- Steinert, P.M., and Roop, D.R. (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annual Review of Biochemistry*, 57: 593-625.
- Sten-Knudsen, O. (2002). *Biological Membranes: Theory of transport potentials and electric impulses*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Stewart, S.A., Dykxhoorn, D.M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E.Y., Sung An, D., Sabatini, D.M., Chen, I.S.Y., Hahn, W.C., Sharp, P.A., Weinberg, R.A., and Novina, C.D. (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, 9: 493-501.
- Stoffel, M.H., Busato, A., and Friess, A.E. (2002). Density and distribution of anionic sites on boar ejaculated and epididymal spermatozoa. *Histochemistry and Cell Biology*, 117:441-445.

- Størvold, G.L., Gjernes, E., Askautrud, H.A., Børresen-Dale, A.L., Perou, C.M., and Frengen, E. (2007). A retroviral vector for siRNA expression in mammalian cells. *Molecular Biotechnology*, 35: 275-282.
- Suárez, S., Redfern, K., Raynor, P., Martin, F., and Phillips, D.M. (1991). Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, 44: 998-1004.
- Subjeck, J.R., Shyy, T., Shen, I., and Johnson, R.J. (1983). Association of the mammalian 110,000-dalton heat shock protein and nucleoli. *Journal of Cell Biology*, 97: 1389-1395.
- Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Segi, E., Tsuboi, K., Aze, Y., Nishimura, T., Oida, H., Yoshida, N., Tanaka, T., Katsuyama, M., Hasumoto, K., Murata, T., Hirata, M., Ushikubi, F., Negishi, M., Ichikawa, A., and Narumiya, S. (1997). Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science*, 277: 681-683.
- Suh, K.Y., Yang, J.M., Khademhosseini, A., Berry, D., Tran, T.N., Park, H., and Langer, R. (2005). Characterization of chemisorbed hyaluronic acid directly immobilized on solid substrates. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B: Applied Biomaterials*, 72: 292-298.
- Sun, Y., and MacRae, T.H. (2005). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell and Molecular Life Sciences*, 62: 2460-2476.
- Sutovsky, P., Ramalho-Santos, J., Moreno, R.D., Oko, R., Hewitson, L., Schatten, G. (1999). On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe MitoTracker™ and high resolution differential interference contrast microscopy. *Human Reproduction*, 14: 2301-2312.
- Sutkeviciene, N., Andersson, M.A., Zilinskas, H., and Andersson, M. (2005). Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. *Theriogenology*, 63: 739-747.
- Suzuki, K., Eriksson, B., Shimizu, H., Nagai, T., and Rodríguez-Martínez, H. (2000). Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *International Journal of Andrology*, 23: 13-21.
- Suzuki, K., Asano, A., Eriksson, B., Niwa, K., Nagai, T., and Rodríguez-Martínez, H. (2002). Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma,

cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *International Journal of Andrology*, 25, 84-93.

Szurop, L., Nagy, A., and Jochle, W. (1985). Stimulation of libido in pubertal and mature boars with prostaglandin F<sub>2α</sub> analogs: clinical observation. *Zuchthygiene*, 20: 83-86.

Tabibzadeh, S., Kong, Q.F., Satyaswaroop, P.G., and Babaknia, A. (1996). Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Reproduction*, 11: 633-640.

Tabibzadeh, S., and Broome, J. (1999). Heat shock proteins in human endometrium. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 7: 5-9

Takahashi, K., Uchida, A., and Kitao, M. (1990). Hypoosmotic swelling test of sperm. *Archives of Andrology*, 25: 225-242.

Tan, X.W., Ma, S.F., Yu, J.N., Zhang, X., Lan, G.C., Liu, X.Y., Han, Z.B., and Tan, J.H. (2007). Effects of species and cellular activity of oviductal epithelial cells on their dialogue with co-cultured mouse embryos. *Cell and Tissue Research*, 327: 55-66.

Tao, J., Critser, E.S., and Critser, J.K. (1993). Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development*, 36: 183-194.

Tartagni, M., Schonauer, M.M., Cicinelli, E., Selman, H., Ziegler, D., Petruzzelli, F., and D'Addario, V. (2002). Usefulness of Hypo-Osmotic Swelling test in predicting pregnancy rate and outcome in couples undergoing intrauterine insemination. *Journal of Andrology*, 23: 498-502.

Tartagni, M., Cicinelli, E., Schonauer, M.M., Causio, F., Petruzzelli, F., and Loverro, L. (2004). Males with subnormal Hypo-Osmotic Swelling-Test scores have lower pregnancy rates than those with normal scores when ovulation induction and timed intercourse is used as a treatment for mild problems with sperm count, motility, or morphology. *Journal of Andrology*, 25: 781-783.

Templeton, A.A., Cooper, I., and Kelly, R.C. (1978). Prostaglandin concentration in the semen of fertile men. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52: 147-150.



- Tesarik, J., Thebault, A., and Testart, J. (1992). Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Human Reproduction*, 7: 1257-1263.
- Theng-Ong, S., Li, F., Du, J., Tan, Y.W., and Wang, S. (2005). Hybrid cytomegalovirus Enhancer-H1 promoter-based plasmid and baculovirus vectors mediate effective RNA interference. *Human Gene Therapy*, 16:1404-12
- Thibault, Ch., Levasseur, M.C., and Hunter, R.H.F., eds. (1993). *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. Paris.
- Thomas, P., and Meizel, S. (1988). An influx of extracellular calcium is required for initiation of human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Research*, 20: 397-411.
- Thomas, P.G., Ball, B.A., and Brinsko, S.P. (1994). Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explants. *Biology of Reproduction*, 51: 222-228.
- Thomas, P.G., Ignatz, G.G., Ball, B.A., Miller, P.G., Brinsko, S.P., and Currie, B. (1995a). Isolation, culture, and characterization of equine oviduct epithelial cells in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 41: 468-478.
- Thomas, P.G., Ignatz, G.G., Ball, B.A., Brinsko, S.P., and Curie, W.B. (1995b). Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells. *American Journal of Veterinary Research*, 56: 1657-1662.
- Thompson, J.D. (2002). Applications of antisense and siRNAs during preclinical drug development. *Drug Discovery Today*, 7: 912-917.
- Tienthai, P., Johannisson, A., and Rodríguez-Martínez, H. (2004). Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Animal Reproduction Science*, 80: 131-146.
- Tollner, T.L., Yudin, A.I., Cherr, G.N., and Overstreet, J.W. (2000). Soybean trypsin inhibitor as a probe for the acrosome reaction in motile cynomolgus macaque sperm. *Zygote*, 8:127-137.

- Töpfer-Petersen, E., Wagner, A., Friedrich, J., Petrunkina, A., Ekhlesi-Hundrieser, M., Waberski, D., and Drommer, W. (2002). Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *Journal of Experimental Zoology*, 292: 210-215.
- Torchia, J., Glass, C., and Rosenfeld, M.G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Current Opinion in Cell Biology*, 10: 373-383.
- Traas, A.M, and Kustritz, M.V.R. (2004). Effect of administering oxytocin or prostaglandin F<sub>2α</sub> on characteristics of the canine ejaculate. *Canadian Veterinary Journal*, 45: 999-1002.
- Tse, P.K., Lee, Y.L., Chow, W.N., Luk, J.M., Lee, K.F., and Yeung, W.S. (2007). Preimplantation embryos co-operates with oviductal cells to produce embryotrophic IC3B. *Endocrinology*, doi:10.1210/en.2007-1277
- Tulsiani, D.R., Zeng, H.T., and Abou-Haila, A. (2007). Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 63: 257-272.
- Tuohimaa, P, Pekki, A., Blauer, M., Joensuu, T., Vilja, P., and Ylikomi, T. (1993). Nuclear progesterone receptor is mainly heat shock protein 90-free in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 5848-5852.
- Turba, M.E., Fantinati, P., Bernardini, C., Gentilini, F., Bacci, M.L., and Forni, M. (2007). Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Animal Reproduction Science*, 99: 72-81.
- Tyagi, R.K., Amazit, L., Lescop, P., Milgrom, E., and Guiochon-Mantel, A. (1998). Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and ran guanosine triphosphate. *Molecular Endocrinology*, 12: 1684-1695.
- Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., and Saigo, K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 32: 936-948.
- Valdés-González, R., Silva-Torres, L., Ramírez-González, B., Ormsby, C.E., Terán-Ortiz, L., and Ayala-Sumuano, J.T. (2005). Method for evaluating quality of cultured neonatal pig Sertoli cells. *Xenotransplantation*, 12: 316-323.

- Van der Ven, H.H., Jeyendran, R.S., Al-Hasani, S., Pérez-Peláez, M., Diedrich, K., and Zaneveld, L.J. (1986). Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *Journal of Andrology*, 7: 190-196.
- VandeVoort, C.A., Cherr, G.N., and Overstreet, J.W. (1997). Hyaluronic acid enhances the zona pellucida-induced acrosome reaction of macaque sperm. *Journal of Andrology*, 18: 1-5.
- Van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M.T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F.C., Brummelkamp, T.R., Agami, R., and Clevers, H. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Reports*, 4: 609-615.
- Vannucchi, C.I., de Oliveira, C.M., Marques, M.G., Assumpção, M.E., and Visintin, J.A. (2006). In vitro canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone-supplemented media. *Theriogenology*, 66: 1677-1681.
- Van't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R., and Friend, S.H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415: 530-536.
- Vázquez, I., Martínez, F., Piedrabuena, E., and Díaz, C. (1985). Efecto de la cafeína en la contrastación del semen de verraco conservado a + 5°C. *Anaporc*, 36: 32-35.
- Vázquez-Ortíz, G., Piña-Sánchez, P., and Salcedo, M. (2006). Grandes alcances de los RNAs pequeños RNA de interferencia y microRNA. *Revista de Investigación Clínica*, 58: 335-349.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291: 1304-1351.
- Verdi, J.M., and Campagnoni, A.T. (1990). Translational regulation by steroids: identification of a steroid modulatory element in the 5'-untranslated region of the myelin basic protein messenger RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 20314-20320.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., and Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.
- Vincent, R., and Nadeau, D. (1984). Adjustment of the osmolality of Percoll for the isopycnic separation of cells and cell organelles. *Analytical Biochemistry*, 141: 322-328.

- Vlad, M., Walker, D., and Kennedy, R.C. (1996). Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Human Reproduction*, 11: 1678-1686.
- Voellmy, R., and Boellmann, F. (2007). Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Advances in Experimental Med. Biology*, 594: 89-99.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I., and Martienssen, R.A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 297: 1833-1837.
- Vyt, P., Maes, D., Dejonckheere, E., Castryck, F., and van Soom, A. (2004). Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 39: 8-12.
- Waberski, D., Weitze, K.F., Rath, D., and Sallmann, H.P. (1989). Effect of bovine serum albumin and zwitterionic buffers on stored liquid boar semen. *Zuchthygiene*, 24: 128-133.
- Waberski, D., Meding, S., and Dirksen, G. (1994). Fertility of long-term stored boar semen: Influence of extenders, storage time and plasma droplets in the semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 145-151.
- Wagh, P.V., and Lippes, J. (1989). Human oviductal fluid proteins. III. Identification and partial purification. *Fertility and Sterility*, 51: 81-88.
- Wagner, R.W. (1995). The state of the art in antisense research. *Nature Medicine*, 1: 1116-1118.
- Walter, I., and Miller, I. (1996). S-100 protein subunits in bovine oviduct epithelium: in situ distribution and changes during primary cell culture. *Histochemical Journal*, 28: 671-680.
- Walters, E.M., Men, H., Agca, Y., Mullen, S.F., Critser, E.S., and Critser, J. (2005). Osmotic tolerance of mouse spermatozoa from various genetic backgrounds: Acrosome integrity, membrane integrity, and maintenance of motility. *Cryobiology*, 50: 193-205.
- Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Fraser, L.R., and Niwa, K. (1995). Functional-analysis using chlortetracycline fluorescence and in-vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically-defined medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 104: 305-313.

- Wang, Z., Widgren, E.E., Richardson, R.T., and O'Rand, M.G. (2007). Characterization of an eppin protein complex from human semen and spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 77: 476-484.
- Ward, C.R., and Storey, B.T. (1984). Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Developmental Biology*, 104: 287-290.
- Waterhouse, K.E., Hofmo, P.O., Tverdal, A., and Miller, R.R. Jr. (2006). Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, 131: 887-894.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7: 871-891.
- Weigel, N.L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochemical Journal*, 319: 657-667.
- Weis, K. (1998). Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends in Biochemical Sciences*, 23: 185-189.
- White, R., Sjoberg, M., Kalkhoven, E., and Parker, M.G. (1997). Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *EMBO Journal*, 16: 1427-1435.
- WHO, World Health Organization. (2000). *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Fourth edition. Cambridge: Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Williams, A.C., and Ford, W.C.L. (2001). The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 22: 680-692.
- Willoughby, C.E., Mazur, P., Peter, A.T., and Critser, J.K. (1996). Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 55: 715-727.
- Woelders, H. (1990). Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Proceedings of the 2<sup>th</sup> International Conference on Boar Sperm Preservation held in Beltsville, Maryland, USA*, 145-164.

- Wu, W.X., Derks, J.B., Zhang, Q., and Nathanielsz, P.W. (1996). Changes in heat shock protein-90 and -70 messenger ribonucleic acid in uterine tissues of the ewe in relation to parturition and regulation by estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 137: 5685-5693.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature: Structural and Molecular Biology*, 3: 206.
- Xia, P., Han, V.K., Viuff, D., Armstrong, D.T., and Watson, A.J. (1996). Expression of insulin-like growth factors in two bovine oviductal cultures employed for embryo co-culture. *Journal of Endocrinology*, 149: 41-53.
- Xia, X.G., Zhou, H., Ding, H., Affar, E.B., Shi, Y., and Xu, Z. (2003). An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA. *Nucleic Acids Research*, 31: e100.
- Yamada, R., Sano, H., Hla, T., Hashiramoto, A., Kawahito, Y., Mukai, S., Kohno, M., Tsubouchi, Y., Inoue, M., Komatsu, A., Inoue, K., and Kondo, M. (2000). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 with antisense oligodeoxynucleotide restricts induction of rat adjuvant-induced arthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269: 415-421.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2: 371-372.
- Yang, J., and DeFranco, D.B. (1994). Differential roles of heat shock protein 70 in the in vitro nuclear import of glucocorticoid receptor and simian virus 40 large tumor antigen. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 5088-5098.
- Yao, Y.Q., Ho, P.C., and Yeung, W.S. (1999). Effects of human oviductal cell culture on various functional parameters of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 71: 232-239.
- Yao, Y., Ho, P., and Yeung, W.S. (2000). Human oviductal cells produce a factor(s) that maintains the motility of human spermatozoa in vitro. *Fertility and Sterility*, 73: 479-486.
- Yavetz, H., Harash, B., Paz, G., Yogev, L., Jaffa, A.J., Lessing, J.B., and Homonnai, Z.T. (1992). Cryptorchidism: incidence and sperm quality in infertile men. *Andrologia*, 24: 293-297.
- Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Casas, I., and Bonet, S. (2007a). Boar spermatozoa and prostaglandin F<sub>2α</sub>.

Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F<sub>2α</sub> to the short-term extender over cooling time. *Animal Reproduction Science*, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.08.008.

Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Casas, I., and Bonet, S. (2007b). Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15°C. *Animal Reproduction Science*, doi:10.1016/j.anireprosci.2007.11.003.

Yeste, M., Lloyd, R.E., Briz, M., Badia, E., Bonet, S., and Holt, W.V. (2007c). Boar sperm quality after co-culture with homologous oviductal epithelial cells. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Conference on Boar Sperm Preservation held in Toronto, Canada, 12-15 August, 2007*, P21.

Yeste, M., Lloyd, R.E., Briz, M., Badia, E., Bonet, S., and Holt, W.V. (2008). Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro. *Animal Reproduction Science*, doi:10.1016/j.anireprosci.2008.08.018.

Yeung, W.S., Ng, V.K., Lau, E.Y., and Ho, P.C. (1994). Human oviductal cells and their conditioned medium maintain the motility and hyperactivation of human spermatozoa in vitro. *Human Reproduction*, 9: 656-660.

Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO Journal*, 11: 3681-3694.

Ylikomi T, Wurtz JM, Syvala H, et al. 1998. Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 437-466.

Yovich, J.M., Edirisinghe, W.R., Cummins, J.M., and Yovich, J.L. (1988). Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 50: 179-181.

Yovich, J.M., Edirisinghe, W.R., Cummins, J.M., and Yovich, J.L. (1992). Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 53: 715-722.

Yovich, J.L. (1993). Pentoxifylline actions and applications in assisted reproduction. *Human Reproduction* 8, 1786-1791.

- Yu, A.M. (2007). Small interfering RNA in drug metabolism and transport. *Current Drug Metabolism*, 8: 700-708.
- Zamecnik, P.C., and Stephenson, M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75: 280-284.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101: 25-33.
- Zamore, P.D. (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, 296: 1265-1269.
- Zeng, W.X., Shimada, M., Isobe, N., and Terada, T. (2001). Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. *Theriogenology*, 56: 447-458.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E., and Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO Journal*, 21: 5875-5885.
- Zhang, M., Hong, H., Zhou, B., Jin, S., Wang, C., Fu, M., Wang, S., and Xia, G. (2006). The expression of atrial natriuretic peptide in the oviduct and its functions in pig spermatozoa. *Journal of Endocrinology*, 189: 493-507.
- Zhu, W.J., Zhong, Y., and Zhang, C.X. (2001). Effect of human oviductal epithelial cell cultural medium on cryopreserved human sperm survival. *Cell Biology International*, 25: 1025-1027.
- Zini, A., Finelli, A., Phang, D., and Jarvi, K. (2000). Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*, 56: 1081-1084.
- Zöpfigen, A., Priem, F., Sudhoff, F., Jung, K., Lenk, S., Loening, S.A., and Sinha, P. (2000). Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, alpha glucose, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Human Reproduction*, 15: 840-845.
- Zou, C.X., and Yang, Z.M. (2000). Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology*, 53: 1477-1488.





