



Universitat de Girona

**CULTIU DE LES CÈL·LULES EPIDIDIMÀRIES DE  
*Sus domesticus*: ANÀLISI ESTRUCTURAL,  
FUNCIONAL I PROTEÒMIC**

**Judit BASSOLS CASADEVALL**

**ISBN: 84-690-0240-6  
Dipòsit legal: GI-932-2006**



Universitat de Girona

# **CULTIU DE LES CÈL·LULES**

## **EPITELIALS EPIDIDIMÀRIES DE *Sus domesticus*:**

### **ANÀLISI ESTRUCTURAL, FUNCIONAL I PROTEÒMIC**

**Judit Bassols Casadevall**

**2006**





Universitat de Girona

# **CULTIU DE LES CÈL·LULES**

## **EPITELIALS EPIDIDIMÀRIES DE *Sus domesticus*:**

### **ANÀLISI ESTRUCTURAL, FUNCIONAL I PROTEÒMIC**

Memòria que presenta Judit Bassols Casadevall per optar al grau de Doctor per la Universitat de Girona.

Vist-i-plau dels directors,

Dr. Sergi Bonet Marull  
Catedràtic de Biologia Cel·lular  
de la Universitat de Girona

Dra. Elisabet Kádár García  
Doctora en Biologia per la  
Universitat de Barcelona

Girona, 2006.



A la memòria del meu pare,

Cerqueu-me en les ones del mar,  
en la força del vent,  
en la tempesta d'estiu,  
en la llavor que creix al camp,  
allí em trobareu.

A la meva família.

A en Xavi.



# AGRAÏMENTS

Per fi ha arribat el moment, escric les últimes línies i dono la tesi per acabada. Una tesi, que no és només la compilació de tècniques i resultats obtinguts al laboratori durant aquests darrers quatre anys, sinó que entre aquestes pàgines s'amaguen totes les experiències viscudes, a vegades bones i altres no tant, i que he anat superant gràcies a tots vosaltres, que d'una manera o altre heu estat al meu costat donant-me ajuda i suport per tirar endavant. I és per això que us vull donar a tots les gràcies.

En primer lloc al Dr. Sergi Bonet per permetre'm formar part d'aquest grup de recerca i introduir-me en el món de la docència i la investigació. Per donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi, i per la llibertat i la confiança dipositada en mi.

A totes les companyes (i company) del grup de Biologia de la Reproducció (Mailo, Beth, Silvia, Núria, Elena, Anna, Eva, Marc i Isabel) amb els quals he compartit molt més que despatx i laboratori, i m'han premiat amb la seva inestimable ajuda i amistat.

A l'Elisabeth Kádár que, malgrat la distància, ha continuat al meu costat fins al final, ajudant-me, corregint-me, donant-me consells, i sempre ha tingut paraules d'ànim en els moments difícils.

A tots els becaris de biologia que han coincidit amb mi durant aquest temps. Al grup Coffee Girls & Co (Anna, Lluís, Gis, Glòria, Sílvia, Goreti, Noemí, Xevi, Marga, Maria, Noe, Martí, Kp, Pep...) pels cafès, sopars, festes i les bones estones viscudes. A la gent d'EECC (Marc, Anna, Núria, Olaya, Àlex nen, Àlex nena, Marçal, Olga, Pere, Gerard, Jess, Montse...) per fer-me sentir tant bé entre ells, per les bromes a tota hora i el bon humor.

Je veux aussi remercier a toutes les personnes de l'équipe « Gamètes, Males et Fertilité » d'INRA (JL Dacheux, F Dacheux, JL Gatti, Sandrine, Clémence, Véronique, Guillaume, Heath...) pour l'hospitalité, l'aide au labo; et surtout merci beaucoup pour leur amitié.

No vull oblidar-me de la colla de Banyoles (Elena, Engràcia, Sandra, Esther, Maribel...) que sempre han estat, són i seran al meu costat oferint-me la seva amistat.



I finalment un agraïment molt especial a la meva família. Als meus pares (Jordi i Elena), que m'han animat en tot moment a continuar endavant i a lluitar per fer realitat els meus somnis. A les meves germanes & Co(Elena i Josep, Cris i tt) pels seus ànims i suport. I a en Xavi pel seu amor incondicional, la seva paciència i comprensió. Gràcies per ser sempre al meu costat, per escoltar-me, per entendre'm. Gràcies per eixugar-me les llàgrimes en els moments difícils i compartir les rialles i somriures en els moments bons. Gràcies per estimar-me. Gràcies per ser com sou.

A tots, **MOLTISSIMES GRÀCIES!**

# ÍNDEX

Abreviatures .....	1
Resum / Resumen/ Summary / Résumé .....	3
1. INTRODUCCIÓ .....	7
1.1. Epidídim .....	9
1.1.1. Epiteli epididimari .....	10
1.1.1.1. Cèl·lules principals .....	11
1.1.1.2. Cèl·lules basals .....	12
1.1.1.3. Cèl·lules apicals .....	12
1.1.1.4. Cèl·lules clares .....	12
1.1.1.5. Cèl·lules halo .....	13
1.1.2. Beina músculo-conjuntiva .....	13
1.1.3. Fluid epididimari .....	14
1.2. Funcions epididimàries .....	15
1.2.1. Secreció proteica a l'epidídim .....	15
1.2.1.1. Mètodes d'estudi .....	15
1.2.1.2. Vies de secreció .....	16
1.2.1.3. Proteïnes del fluid epididimari .....	17
1.2.1.4. Expressió gènica .....	19
1.2.2. Protecció dels espermatozoides .....	20
1.2.3. Transport dels espermatozoides .....	21
1.2.4. Maduració espermàtica .....	21
1.2.4.1. Remodelació de la membrana plasmàtica .....	22
1.2.4.2. Migració i alliberament de la gota citoplasmàtica .....	22
1.2.4.3. Adquisició i desenvolupament de la motilitat .....	23
1.2.5. Emmagatzematge dels espermatozoides .....	24
1.3. Regulació de les funcions epididimàries .....	25
1.3.1. Andrògens .....	25
1.3.1.1. Mecanismes d'acció dels andrògens en l'epidídim .....	26
1.3.1.2. Funcions androgen dependents de l'epidídim .....	27
1.3.2. Temperatura .....	28
1.4. Cultiu de les cèl·lules epididimàries .....	28

1.4.1. Mètodes de cultiu .....	28
1.4.2. Coincubació de cultius epididimaris amb espermatozoides .....	29
2. OBJECTIUS .....	33
3. MATERIAL I MÈTODES .....	37
3.1. Mètodes de cultiu .....	39
3.1.1. Obtenció i cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries .....	39
3.1.2. Medi de cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries (ECM) .....	40
3.1.3. Cultiu de les cèl·lules epitelials de ronyó (LLC-PK1) .....	40
3.1.4. Procés de tripsinització .....	41
3.1.5. Recompte del nombre de cèl·lules .....	41
3.2. Microscòpia electrònica .....	42
3.2.1. Microscòpia electrònica de les cèl·lules epididimàries en monocapa .....	42
3.2.2. Microscòpia electrònica dels fragments epididimaris .....	43
3.3. Immunofluorescència .....	43
3.3.1. Immunofluorescència indirecta de les cèl·lules en monocapa .....	44
3.3.2. Immunofluorescència indirecta de les cèl·lules en suspensió .....	44
3.4. Cocultiu amb espermatozoides .....	46
3.4.1. Recol·lecció i preparació dels espermatozoides per cocultiu .....	46
3.4.2. Anàlisi de les característiques dels espermatozoides .....	46
3.4.2.1. Concentració .....	46
3.4.2.2. Integritat de la membrana (tinció eosina-nigrosina) .....	46
3.4.2.3. Motilitat .....	47
3.4.2.4. Morfologia .....	47
3.5. Anàlisi de Proteïnes .....	47
3.5.1. Marcatge amb [ <sup>35</sup> S] metionina-cisteïna .....	47
3.5.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS .....	48
3.5.2.1. Electroforesi unidimensional .....	48
3.5.2.2. Electroforesi bidimensional .....	50
3.5.2.2.1. Isoelectroenfoc (1a dimensió) .....	50
3.5.2.2.2. Electroforesi (2a dimensió) .....	51
3.5.3. Tinció dels gels de poliacrilamida .....	52
3.5.4. Lectura de la radioactivitat .....	53

3.6. Anàlisi d'àcids nucleics .....	54
3.6.1. Extracció d'RNA total .....	54
3.6.2. Estimació de la concentració de RNA .....	55
3.6.3. Transcripció reversa (RT) .....	55
3.6.4. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR) .....	55
3.6.5. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa .....	57
4. RESULTATS .....	59
4.1. ARTICLE I: In vitro culture of epithelial cells from the caput, corpus, and cauda epididymis of <i>Sus domesticus</i> . <i>Theriogenology</i> . 2004 Sep 1; 62(5):929-42 .....	61
4.2. ARTICLE II: Effect of culture conditions on the obtention of boar epididymal epithelial cell monolayers. <i>Animal Reproduction Science</i> . 2005 (In press) .....	77
4.3. ARTICLE III: Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures. <i>Theriogenology</i> . 2005 Dec; 64(9):1995-2009 .....	91
4.4. ARTICLE IV: Secretory activity of epididymal tubules and cells in culture: a comparative study and proteomic approach. <i>Biology of Reproduction</i> . 2006 (Send) .....	109
5. DISCUSSIÓ GENERAL .....	127
6. CONCLUSIONS .....	141
7. BIBLIOGRAFIA .....	145



# ABREVIATURES

1D	Unidimensional	pb	Parells de bases
2D	Bidimensional	PBP	Proteïna d'unió a fosfolípids
ABP	Proteïna d'unió a andrògens	PBS	Solució tamponada de fosfat
ADN	Àcid desoxiribonucleic	PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
AG	Aparell de Golgi	pl	Punt isoelèctric
AR	Receptor d'andrògens	PM	Pes molecular
ARN	Àcid ribonucleic	PUFA	Àcids grassos poliinsaturats
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	REL	Reticle endoplasmàtic llis
BSA	Albúmina sèrica bovina	RER	Reticle endoplasmàtic rugós
cAMP	Adenosina monofosfat cíclica	ROS	Espècies d'oxigen reactives
cDNA	DNA complementari	RT	Transcripció reversa
DHT	Dihidrotestosterona	SDS	Dodecil sulfat sòdic
dNTPs	Mescla dels desoxiribonucleòtids dATP, dGTP, dCTP, dTTP	RES	Reticle endoplasmàtic escassament granulat
DTT	Ditiotreitòl	SOD	Superòxid dismutasa
ECM	Medi de cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries	TBE	Tampó tris-borat-EDTA
E-RABP	Proteïna d'unió a l'àcid retinoic	T	Testosterona
FCS	Sèrum fetal boví	Temed	N, N, N', N' - tetrametilendiamida
FITC	Fluoresceïn isotiocianat	Train A	RNAse A10
g	Força relativa de centrifugació	Tris	Hidroximetilaminometà
GPI	Glicosil fosfatidil inositol	UV	Radiació ultraviolada
GPX	Glutatió peroxidasa		
HE1	Proteïna d'unió a colesterol		
Hepes	Àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin- etasulfònic		
Hexo	Hexosaminidasa		
IEF	Isoelectroenfoc		
KDa	Kilodalton		
mRNA	RNA missatger		
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida		



# RESUM

En aquest treball s'han desenvolupat dos mètodes simples i ràpids pel cultiu de les cèl·lules epitelials de les tres regions de l'epidídim de *Sus domesticus*. Un es basa en el cultiu de fragments del túbul epididimari intactes durant 8 dies. L'altre mètode es basa en el cultiu de fragments del túbul epididimari digerits amb col·lagenasa que, després de 7 dies, donen lloc a la formació d'una monocapa de cèl·lules epitelials epididimàries que adquireixen el 90-100% de confluència després de 12-16 dies en cultiu. Aquestes cèl·lules es mantenen viables durant més de 60 dies en cultiu i no s'observa proliferació de cèl·lules no epitelials.

Per determinar el nivell de conservació de les característiques epididimàries en els cultius s'ha analitzat l'estructura cel·lular, l'activitat de síntesi i secreció proteica, i el manteniment i maduració dels espermatozoides en cocultiu.

Els resultats demostren, que els fragments epididimaris intactes mantenen l'estructura i el mateix patró específic de secreció que l'epiteli epididimari *in vivo* durant 2-4 dies en cultiu.

Els fragments epididimaris digerits amb col·lagenasa presenten unes característiques similars als fragments epididimaris intactes, però perden l'especificitat epididimària més ràpidament, degut a la disgregació de l'epiteli per la formació de la monocapa cel·lular. De totes maneres, durant els primers 4 dies de cultiu, els fragments del corpus epididimari digerits amb col·lagenasa promouen la migració de la gota citoplasmàtica en els espermatozoides immadurs després de 24 hores d'incubació. Això indica que durant aquest temps es mantenen les característiques fisiològiques del túbul epididimari.

Les cèl·lules epitelials del caput, corpus i cauda epididimari en monocapa perden l'estructura pròpia de l'epiteli epididimari *in vivo*, però mantenen moltes de les seves característiques morfològiques com són la presència d'estereocilis apicals, unions intercel·lulars i orgànuls citoplasmàtics relacionats amb les seves funcions absorbent i secretora. Aquestes monocapes de cèl·lules epitelials no expressen el fenotip epididimari complet, perquè secreten proteïnes inespecífiques que són comuns amb les línies cel·lulars epitelials. De totes maneres, les cèl·lules epitelials d'aquests cultius presenten mRNAs de diversos gens considerats com a marcadors epididimaris *in vivo*, i confirmen que es manté un cert nivell del seu estat de diferenciació. A més, aquests cultius creen un microambient beneficiós per a la supervivència dels espermatozoides immadurs procedents del caput proximal i el manteniment de la seva motilitat durant un període de 72 hores.



# RESUMEN

En este trabajo se han desarrollado dos métodos simples y rápidos para el cultivo de las células epiteliales de las tres regiones del epidídimo de *Sus domesticus*. Uno se basa en el cultivo de fragmentos del túbulo epididimario intactos durante 8 días. El otro método se basa en el cultivo de fragmentos del túbulo epididimario digeridos con colagenasa que, después de 7 días, dan lugar a la formación de una monocapa de células epiteliales epididimarias que adquieren el 90-100% de confluencia tras 12-16 días en cultivo. Estas células se mantienen viables durante más de 60 días en cultivo y no se observa proliferación de células no epiteliales.

Para determinar el nivel de conservación de las características epididimarias en los cultivos se ha analizado la estructura celular, la actividad de síntesis y secreción proteica, y el mantenimiento y maduración de los espermatozoides en cocultivo.

Los resultados demuestran que los fragmentos epididimarios intactos mantienen la estructura y el mismo patrón específico de secreción del epitelio epididimario *in vivo* durante 2-4 días en cultivo.

Los fragmentos epididimarios digeridos con colagenasa presentan unas características similares a los fragmentos epididimarios intactos, pero la disgregación del epitelio para la formación de la monocapa celular provoca una rápida pérdida de la especificidad epididimaria. Durante los primeros 4 días de cultivo, los fragmentos del corpus epididimario digeridos con colagenasa promueven la migración de la gota citoplasmática en los espermatozoides inmaduros después de 24 horas de incubación. Esto indica que durante este tiempo se mantienen las características fisiológicas del túbulo epididimario.

Las células epiteliales del caput, corpus y cauda epididimario en monocapa pierden la estructura propia del epitelio epididimario *in vivo*, pero mantienen muchas de sus características morfológicas como son la presencia de estereocilios apicales, uniones intercelulares y orgánulos citoplasmáticos relacionados con sus funciones absorbente y secretora. Estas monocapas de células epiteliales no expresan el fenotipo epididimario completo, porque secretan proteínas inespecíficas que son comunes con las líneas celulares epiteliales. Las células epiteliales de estos cultivos presentan mRNAs de distintos genes considerados como marcadores epididimarios *in vivo*, i confirman que se mantiene un cierto nivel de su estado de diferenciación. Además, estos cultivos crean un microambiente beneficioso para la supervivencia de los espermatozoides inmaduros procedentes del caput proximal y el mantenimiento de su motilidad durante un período de 72 horas.

# SUMMARY

In this work, we have developed two simple and quick methods for the culture of boar epididymal epithelial cells. The first one involves the culture of intact epididymal tubule fragments during 8 days. The second one involves the culture of epididymal tubule fragments digested with collagenase that, after 7 days in culture, allows the formation of an epididymal epithelial cell monolayer that reached 90-100% confluence after 12-16 days. These epididymal epithelial cells monolayers were maintained *in vitro* for more than 60 days and overgrowth of non-epithelial cells was not observed.

To estimate the level of preservation of epididymal characteristics in these cultures we have focused on cell morphology, protein secretion activity, and sperm preservation and maturation.

The results demonstrated that intact epididymal fragments maintained their structure and showed the same regional specific pattern of secretion as the *in vivo* epididymal epithelium during 2-4 days in culture.

Epididymal fragments digested with collagenase display similar characteristics to intact epididymal fragments despite of the lost of the epididymal specificity which occurred faster due to the disruption of the epithelium to form the cell monolayer. However, during the first 4 days of culture, corpus epididymal tubule fragments digested with collagenase promoted the migration of the cytoplasmic droplet along the tail of immature sperm from proximal caput after 24 hours of co-incubation, suggesting that epididymal fisiology was maintained.

Caput, corpus and cauda epithelial cells monolayers lost their three-dimensional cell geometry in culture, but retained some morphological features that characterize the epididymal epithelium in the intact organ such as apical stereocilia, cell-cell contact, and some organelles related to their absorptive and secretory functions. These epithelial cells monolayers did not express the complete epididymal phenotype, but secreted unspecific proteins which are common between epithelial cell lines. Epididymal epithelial cells still expressed several genes considered as epididymal markers *in vivo*, confirming that they maintained a certain level of their differentiation stage. Moreover, these epithelial cells monolayers create a suitable microenvironment for the survival of immature spermatozoa from the proximal caput and the maintenance of their motility over a 72 hour period.

# RÉSUMÉ

Dans cette étude, nous avons développé deux méthodes faciles et rapides de culture des cellules épithéliales des trois régions épididymaires de ver rat. La première concerne une culture de fragments de tubule épididymaire intacts pendant 8 jours. La deuxième concerne une culture de fragments de tubule épididymaire digérés par la collagénase. Après 7 jours, il se forme une monocouche de cellules épithéliales qui arrive à confluence au bout de 12 à 16 jours. Ces cellules sont maintenues *in vitro* pendant plus de 60 jours et on n'observe aucune croissance de cellules non épithéliales.

Pour estimer le niveau de conservation des caractéristiques épididymaires de ces cultures, nous avons étudié la morphologie cellulaire, les sécrétions protéiques, la conservation et la maturation des spermatozoïdes en co-culture.

Les résultats ont montré que les fragments épididymaires intacts conservent la structure cellulaire et le même mode de sécrétion spécifique que l'épithélium épididymaire *in vivo* et cela pendant 4 jours.

Les fragments épididymaires digérés par la collagénase ont montré des caractéristiques semblables, cependant la désagrégation de l'épithélium pour former la monocouche cellulaire entraîne une perte plus rapide de la spécificité épididymaire. Pendant les 4 premiers jours de culture, les fragments du corpus épididymaire digérés par la collagénase favorisent la migration de la gouttelette cytoplasmique au long de la queue des spermatozoïdes immatures du caput proximal après 24 heures en co-incubation.

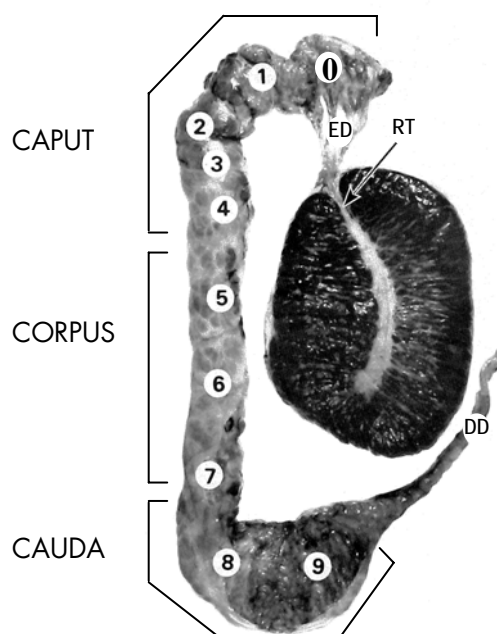
Les cellules du caput, du corpus et du cauda épididymaire de la monocouche ont perdu leurs caractéristiques structurales. Toutefois, elles ont conservé quelques traits structuraux et ultra-structuraux qui caractérisent l'épithélium de l'épididyme dans l'organe intact (microvillosités apicales, le contact intercellulaire, et quelques structures impliquées dans des fonctions d'absorption et de sécrétion). Ces monocouches cellulaires n'expriment pas le phénotype épididymaire complet mais elles sécrètent des protéines non spécifiques communes aux lignées cellulaires épithéliales. Néanmoins, ces cellules expriment encore plusieurs gènes considérés comme marqueurs épididymaires *in vivo*. Ces gènes maintiennent les cellules dans leur état de différenciation endogène. De plus, ces monocouches de cellules épithéliales épididymaires créent un microenvironnement convenable pour la survie des spermatozoïdes immatures et l'entretien de leur motilité sur une période de 72 heures.

# **1 INTRODUCCIÓ**



## 1.1.- EPIDÍDIM

L'epidídim és l'òrgan de l'aparell reproductor masculí que conté el conducte epididimari, un llarg conducte de recorregut tortuós i molt replegat sobre si mateix. A l'epidídim es distingeixen tres regions anatòmicament diferents: el caput o regió cefàlica, el corpus o regió corporal i el cauda o regió caudal (Reid i Cleland, 1957; Robaire i Hermo, 1988). La regió cefàlica té forma lleugerament aplanada, se situa al pol proximal del testicle i s'uneix a aquest mitjançant el conducte eferent; la regió corporal és la més estreta i allargada de les tres regions, se situa a un costat del testicle i uneix la regió cefàlica amb la regió caudal; i la regió caudal és molt prominent, se situa al pol distal del testicle i s'uneix al conducte deferent, que desemboca al conducte ejaculador. En algunes espècies s'ha descrit una quarta regió anomenada segment inicial i que se situa entre el conducte eferent i el caput. Aquestes regions anatòmiques poden dividir-se en subregions morfològica i funcionalment diferents. Així, en porc, Stoffel i Friess (1994) a partir de criteris morfològics distingeixen 6 regions diferents: caput proximal, caput distal, corpus proximal, corpus distal, cauda proximal i cauda distal; mentre que Syntin i col. (1999), basant-se en les diferències de la secreció proteica, distingeixen 9 regions fisiològicament diferents (Figura 1): les regions E0-E1 (caput proximal), les regions E2-E3 (caput medial), la regió E4 (caput distal), la regió E5 (corpus proximal), la regió E6 (corpus medial), la regió E7 (corpus distal), la regió E8 (cauda proximal) i la regió E9 (cauda distal).

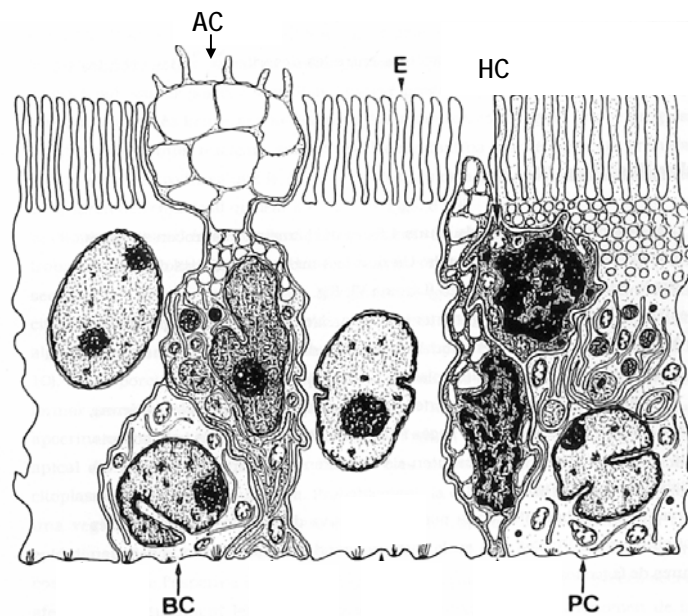


**Figura 1.-** Regions de l'epidídim de *Sus domesticus* segons Syntin i col. (1999). Caput proximal (E0-E1), caput medial (E2-E3), caput distal (E4), corpus proximal (E5), corpus medial (E6), corpus distal (E7), cauda proximal (E8) i cauda distal (E9). Conducte eferent (ED), conducte deferent (DD) i rete testis (RT).

El conducte epididimari està format per un epitelí cilíndric pseudoestratificat que conté varis tipus cel·lulars que limiten la llum del conducte, on hi ha els espermatozoides i el fluid epididimari. L'epitelí descansa sobre una membrana basal de naturalesa conjuntiva i està envoltat per una beina músculo-conjuntiva que conté fibres musculars llises i teixit conjuntiu lax entremig del qual hi ha vasos sanguinis, vasos limfàtics i nervis. Externament, l'epidídim està recobert per una càpsula fibrosa.

### 1.1.1.- Epitelí epididimari

Les característiques de l'epitelí epididimari són similars a les diverses espècies i totes elles presenten diferències en l'alçada de l'epitelí, en la longitud dels estereocilis i en el diàmetre del conducte, segons la zona epididimària. Concretament, a l'espècie porcina l'alçada de les cèl·lules epitelials disminueix del caput al cauda, des de 85 µm al caput proximal, 75 µm al caput distal, 60 µm al corpus distal, 35 µm al cauda distal (Stoffel i Friess, 1994). Igualment, la longitud dels estereocilis és superior al caput amb 13 µm, comparat amb els 7 µm del corpus i els 9 µm del cauda (Briz, 1994). El diàmetre del conducte epididimari és d'uns 300 µm al caput proximal, 350 µm al caput distal, 315 µm al corpus proximal, 500 µm al corpus distal, 700 µm al cauda proximal i 1 mm al cauda distal (Stoffel i Friess, 1994).



**Figura 2.-** Esquema de les cèl·lules presents a l'epitelí epididimari de *Sus domesticus* segons Briz (1994). (PC) cèl·lula principal, (BC) cèl·lula basal, (AC) cèl·lula apical, (HC) cèl·lula halo. Les cèl·lules principals es caracteritzen per tenir estereocilis apicals (E).

A l'epitelí epididimari dels mamífers s'han descrit 5 tipus cel·lulars (Figura 2): cèl·lules principals, cèl·lules basals, cèl·lules apicals, cèl·lules clares i cèl·lules halo. Aquestes cèl·lules estan estretament unides entre elles i amb la matriu extracel·lular mitjançant complexos d'unió, que

mantenen la polaritat cel·lular (Cereijido i col., 1998; Yap i col., 1998) i permet diferenciar, en les cèl·lules, una porció apical i una porció basal. La porció apical comunica directament amb el lumen i està involucrada en l'absorció i secreció de proteïnes específiques i altres molècules relacionades directament amb la maduració espermàtica. Basalment, les cèl·lules s'adhereixen a la làmina basal i estan en contacte amb la circulació sanguínia. Els complexos d'unió mantenen les cèl·lules epitelials unides i alhora restringeixen el pas lliure de grans molècules i petits compostos lipídics de la sang al lumen. Això forma una barrera anomenada barrera hemato-epididimària que, entre altres funcions, permet el desenvolupament d'un microambient epididimari específic diferent de la sang. Aquestes unions són molt importants per a la funcionalitat i fisiologia de l'epiteli epididimari.

### 1.1.1.1. Cèl·lules principals

Les cèl·lules principals són les més abundants, constitueixen aproximadament el 65-80% del total de la població cel·lular de l'epidídim. Són cèl·lules columnars, d'alçada superior a les altres cèl·lules de l'epiteli i es caracteritzen per presentar estereocilis a la membrana apical, entre els quals es formen nombroses invaginacions tubulars. El citoplasma presenta un reticle endoplasmàtic rugós (RER) ben desenvolupat situat basalment, un aparell de Golgi (AG) supranuclear gran i nombroses vesícules i vacuoles apicals. També s'hi observen abundants grànuls de secreció, vesícules de pinocitosis, endosomes, cossos multivesiculats, lisosomes, mitocondries i cisternes de reticle endoplasmàtic llis (REL) (Briz, 1994; Stoffel i Friess, 1994). En aquestes cèl·lules es distingeixen dos tipus de RER, un que es troba en el citoplasma basal i està format per cisternes allargades disposades paral·leles unes a altres, i un altre format per cisternes dilatades i de forma irregular que presenten pocs ribosomes i es troben a la regió supranuclear i apical de la cèl·lula. El primer és el RER que es troba en totes les cèl·lules, mentre que aquest últim s'anomena RE escassament granulat (RES) i és present a les cèl·lules principals del caput epididimari de porcí (Dacheux i Dacheux, 1987; Stoffel i Friess, 1994). El RES s'ha observat també, al segment inicial de l'epidídim de rata i s'ha postulat que les proteïnes que sintetitza poden ser secretades directament fora la cèl·lula (Hoffer i col., 1973; Flickinger, 1985).

Les cèl·lules principals són presents en tot el conducte però la seva estructura varia segons la regió de l'epidídim (Robaire i Hermo, 1988). Aquestes diferències es manifesten bàsicament en l'aparença i organització dels orgànuls secretors (RER, AG i grànuls secretors) i els orgànuls endocítics (vesícules apicals, endosomes, cossos multivesiculars i lisosomes).

Mitjançant la utilització de mètodes immunocitoquímics, western blott i proteòmica s'ha demostrat que les cèl·lules principals sintetitzen un gran nombre de proteïnes, que són secretades al lumen epididimari o retingudes a l'interior de les pròpies cèl·lules (Flickinger, 1981; Holland i Orgebin-Crist, 1988; Hermo i col., 1994; Syntin i col., 1996). També se les ha relacionat amb processos



d'absorció de ions, aigua i soluts orgànics del fluid luminal i amb el transport d'osmolits de baix pes molecular (Robaire i Hermo, 1988).

#### **1.1.1.2. Cèl·lules basals**

Les cèl·lules basals són cèl·lules de mida petita i forma piramidal que se situen a la porció basal de l'epiteli, entremig de les cèl·lules principals i no tenen accés al lumen epididimari. Aquestes cèl·lules són presents al llarg de tot l'epidídim i del conducte deferent (Robaire i Hermo, 1988). El citoplasma és moderadament electrodens i conté pocs orgànuls com mitocondries i cisternes de REL i RER (Briz, 1994; Stoffel i Friess, 1994).

La funció d'aquestes cèl·lules és poc clara. Inicialment, la seva forma i situació feia pensar que podien actuar com una estructura o sistema per regenerar l'epiteli. Posteriorment, en ratolins i humans, es va observar que les cèl·lules basals expressaven antígens de macròfags (Yeung i col., 1994; Seiler i col., 1999), i els enzims glutatíó-S-transferases (GST) (Veri i col., 1993) i superòxid dismutasa (SOD) (Nonogaki i col., 1992), i se'ls han relacionat amb activitats fagocítiques i de protecció immunològica i oxidativa de l'esperma.

#### **1.1.1.3. Cèl·lules apicals**

Les cèl·lules apicals, també anomenades cèl·lules riques en mitocondris o cèl·lules estretes, es troben bàsicament al caput epididimari, entre les cèl·lules principals. La seva superfície apical és arrodonida, sense estereocilis, i normalment tenen un àpex que es projecta basalment. Es caracteritzen per la presència de molts mitocondris, bàsicament al citoplasma apical, on també hi ha vesícules de diverses mides (Sun i Flickinger, 1980; Briz, 1994; Stoffel i Friess, 1994; Adamali i Hermo, 1996).

Es coneix poc sobre les seves funcions específiques però se les relaciona amb processos d'acidificació i alcalinització del fluid epididimari (Rodríguez-Martínez i col., 1990), ja que s'ha descrit que aquestes cèl·lules contenen enzims proteolítics (Adamali i Hermo, 1996) i anhidrases carbòniques al citoplasma (Ekstedt i col., 1991), i bombes de protons a la membrana plasmàtica (Brown i col., 1992; Hermo i col., 2000).

#### **1.1.1.4. Cèl·lules clares**

Les cèl·lules clares són cèl·lules epitelials que es disposen entre les cèl·lules principals i la seva porció apical està en contacte directe amb el lumen. Es troben a l'epidídim de diverses espècies com rosegadors (Sun i Flickinger, 1982), però no en porcí (Stoffel i Friess, 1994) ni altres mamífers com cavalls, marrans, toros, bocs (Goyal, 1985; Goyal i Williams, 1991) i humans (Palacios i col., 1993). S'anomenen així perquè el seu citoplasma és molt electrolúcid. La

membrana plasmàtica apical forma plegaments i ondulacions, i al citoplasma subjacent conté nombroses vesícules, endosomes, cossos multivesiculars i lisosomes. El citoplasma basal presenta un nombre variable de gotes lipídiques (Hermo i col., 1988; Robaire i Hermo, 1988).

Les cèl·lules clares es caracteritzen per la seva capacitat endocítica i absortiva sobretot a la regió caudal de l'epidídim. Concretament, s'ha observat que aquestes cèl·lules endociten les restes de les gotes citoplasmàtiques que es desprenen dels espermatozoides al fluid luminal, durant la seva maduració (Hermo i col., 1988; Robaire i Hermo, 1988). També endociten un gran nombre de proteïnes epididimàries, sovint d'una manera específica segons la regió (Hermo i col., 1992; Vierula i col., 1992).

#### **1.1.1.5. Cèl·lules halo**

Les cèl·lules halo són cèl·lules cuboïdals que es localitzen bàsicament a la porció basal de l'epiteli i són presents al llarg de tot l'epidídim (Robaire i Hermo, 1988). Al citoplasma contenen pocs orgànuls excepte alguns ribosomes, mitocondris i grànuls densos (Briz, 1994; Stoffel i Friess, 1994).

La naturalesa exacta de les cèl·lules halo ha estat controvertida des de que van ser descrites per primera vegada per Reid i Cleland (1957), però estudis posteriors de Flickinger i col. (1997) i Serre i Robaire (1999) han resolt que aquestes cèl·lules corresponen a limfòcits T auxiliars, limfòcits T citotòxics i monòcits, però no a limfòcits B, i suggereixen que són les cèl·lules immunitàries de l'epidídim.

#### **1.1.2.- Beina músculo – conjuntiva**

L'epiteli epididimari de la regió del caput està envoltat per una capa de cèl·lules musculars llises que s'orienten de manera circular. El gruix de la capa muscular augmenta gradualment en direcció distal, alhora que la longitud de les cèl·lules musculars llises també s'incrementa. A la regió caudal s'observen dues capes de teixit muscular llis, una capa interna molt desenvolupada i orientada longitudinalment, i una capa externa poc desenvolupada i orientada circularment. Aquesta musculatura està envoltada per teixit conjuntiu lax, ric en fibroblasts i fibres de col·làgena. El teixit conjuntiu és més fibrós i dens a la regió caudal del conducte epididimari, on les fibres de col·làgena es disposen formant feixos compactes.

Entre el teixit conjuntiu de la beina es troben vasos sanguinis i nervis. L'aport sanguini prové de dos fonts, de l'artèria espermàtica interna que passa pel testicle i subministra sang al conducte eferent, el caput i el corpus; i de l'artèria deferencial que innerva el cauda. Els nervis formen el gran plexe espermàtic, que està situat entre les capes musculars i innerva les cèl·lules musculars llises (Setchell i col., 1994).

### 1.1.3.- Fluid epididimari

El fluid epididimari resulta de les secrecions del testicle però és modificat per l'activitat secretora i absorbida de l'epiteli de l'epidídim i per l'activitat metabòlica dels espermatozoides. En el testicle, les cèl·lules de Sertoli secreten el fluid testicular (Setchell, 1967 i 1969) que transporta els espermatozoides cap al conducte eferent i a la regió proximal de l'epidídim, on una gran proporció del fluid testicular és reabsorbit (Tuck i col., 1970; Wong i col., 1979). A les successives regions de l'epidídim, el transport d'aigua, electròlits i la secreció de substàncies a través de l'epiteli epididimari modifica la composició del fluid de forma contínua.

El transport d'aigua a l'epidídim és molt important perquè afecta la concentració dels diferents constituents del fluid epididimari, i també la concentració espermàtica. A la regió proximal del conducte epididimari la concentració espermàtica augmenta considerablement a causa del moviment d'aigua originat per la reabsorció de fluid, mentre que en les posteriors regions del conducte, un flux revers d'aigua provoca una disminució de la concentració espermàtica (Wong, 1986). L'elevada concentració espermàtica facilita les interaccions entre els espermatozoides, els components luminals i la superfície de les cèl·lules epitelials, les quals són importants per mantenir la viabilitat dels espermatozoides i regular el procés de maduració espermàtica. La fluïdesa de l'ambient i la concentració espermàtica també afecta el temps que requereixen els espermatozoides per travessar l'epidídim.

S'han identificat diversos components presents al fluid epididimari que són secretats per l'epiteli epididimari, entre els quals s'inclouen ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$ ), molècules de baixa pes molecular (glicerilfosfolina, àcid siàlic, carnitina, glicerol, inositol...), lípids, proteïnes (CD 52, clusterina, immobilina, angiotensina...) i enzims (fosfatasa alcalina, fosfatasa àcida,  $\alpha$ -glucosidasa, N-acetilglucosaminidasa...) (Robaire i Hermo, 1988; Syntin i col., 1996).

Estudis amb precursors radioactius i tècniques immunocitoquímiques han demostrat que moltes de les substàncies sintetitzades per les cèl·lules epitelials de l'epidídim i segregades al fluid epididimari són expressades posteriorment a la superfície dels espermatozoides (Smith i col., 1986; Sun i col., 2000). Aquestes substàncies s'uneixen a la membrana plasmàtica dels espermatozoides mitjançant unions covalents directes, per l'acció d'enzims com transferases, o per l'intercanvi directe amb la membrana mitjançant l'ancoratge a lípids com el glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Moore i col., 1992; Vreeburg i col., 1992; Kirchhoff i Hale, 1996). Aquestes molècules són importants per promoure el potencial de motilitat progressiva, per regular la inducció de la reacció acrosòmica, i també es relacionen amb l'adquisició dels receptors de la zona pellúcida, que proporcionen als espermatozoides la capacitat de reconèixer i unir-se a l'oòcit i de fusionar-se posteriorment amb l'oolemma (Biegler i col., 1994; Bongso i Trounson, 1996).

La composició del fluid epididimari canvia contínua i progressivament al llarg del conducte, i molts dels seus components, absents en altres fluids del cos, es troben en concentracions inusuals. Aquesta especificitat es manté gràcies a l'activitat secretora i absorbiva de les cèl·lules del conducte epididimari, i també gràcies a la presència de la barrera hemato-epididimària, que restringeix l'intercanvi entre el fluid luminal i el plasma sanguini. Així doncs, els espermatozoides es mantenen en un microambient molt específic de temperatura, pressió d'oxigen, pH i substrats disponibles.

## 1.2. FUNCIONS EPIDIDIMÀRIES

El conducte epididimari està implicat en el transport, maduració i emmagatzematge dels espermatozoides procedents del testicle. Aquestes funcions es realitzen gràcies a l'activitat de l'epiteli epididimari, que regula l'ambient luminal mitjançant absorció i secreció de proteïnes i altres substàncies, i que indueixen els canvis necessaris per tal que els espermatozoides esdevinguin fèrtils i alhora els protegeix.

### 1.2.1. Secreció proteica a l'epidídim

La primera prova que les cèl·lules epitelials epididimàries eren capaces de sintetitzar i secretar proteïnes es va obtenir a partir d'estudis autoradiogràfics entre els anys 1960 i 1970 (Neutra i Leblond, 1966; Vendrely i Durliat, 1968). Mitjançant l'utilització de gels d'electroforesis de poliacrilamida es van caracteritzar moltes proteïnes presents al fluid epididimari, i es va determinar que la majoria d'aquestes proteïnes tenien poca similitud amb les proteïnes presents a la sang o al fluid de la rete testis (Amann i col., 1973; Koskimies i Kormanó, 1975), i demostrava, per tant, que eren nous components secretats per les cèl·lules epitelials de l'epidídim.

#### 1.2.1.1. Mètodes d'estudi

Per estudiar de la secreció proteica en el lumen epididimari s'han desenvolupat diverses tècniques. Una de les més comuns, és la utilització de precursors d'aminoàcids radioactius com <sup>35</sup>S-metionina, que permet estudiar les proteïnes sintetitzades *de novo* per les cèl·lules, que són marcades radioactivament. Inicialment s'incubava el teixit epididimari amb <sup>35</sup>S-metionina *in vitro* (Klinefelter i Hamilton, 1985; Holland i Orgebin-Crist, 1988) i s'estudiaven les proteïnes sintetitzades i secretades al medi de cultiu, però no totes eren d'origen epididimari; algunes d'elles provenien de cèl·lules que envoltaven l'epiteli epididimari o de cèl·lules alterades. Posteriorment es van desenvolupar tècniques de marcatge *in vivo*, en les quals els precursors radioactius s'injectaven al testicle, als vasos sanguinis o als espais intersticials entre els túbuls epididimaris (Vreeburg i col., 1990; Vreeburg i col., 1992; Turner i col., 1994). D'aquesta

manera, les proteïnes sintetitzades i secretades a un costat del túbul podien recollir-se a l'altre costat pel pas de fluid a través de l'òrgan. També es va desenvolupar un mètode mixte *in vivo/in vitro*, en el que es marcaven *in vivo* fragments de túbuls epididimaris tancats i s'incubaven en medi de cultiu. Després de la incubació, el fluid luminal present a l'interior dels fragments es recollia per microperfusió. El fluid només contenia proteïnes sintetitzades i secretades per les cèl·lules epitelials de la regió incubada (Syntin i col., 1996).

Les proteïnes obtingudes amb qualsevol d'aquestes tècniques s'identifiquen i es caracteritzen mitjançant electroforesis 1D i 2D en gels de poliacrilamida. El 1983, Brooks va realitzar la primera electroforesi 2D de les proteïnes secretades en l'epidídim de rata, utilitzant el mètode d'O'Farrel (1975). Les electroforesis 2D tenen una elevada resolució i permeten caracteritzar un major nombre de proteïnes que amb els gels d'electroforesis 1D.

Fins el moment s'han identificat una gran part de les proteïnes secretades per l'epidídim de diverses espècies. De totes maneres, la quantitat de proteïnes secretades per l'epidídim és normalment subestimada ja que la detecció de proteïnes és limitada, donat que és difícil detectar aquelles proteïnes que se secreten en poca quantitat. A més, la separació de components d'elevat pes molecular (>255-300 kDa) i de proteïnes bàsiques (pH>8.5) per isoelectroenfoc (IEF) en gels de poliacrilamida no és del tot bona.

### **1.2.1.2. Vies de secreció**

S'han proposat dues vies de secreció de proteïnes a l'epidídim, la via merocrina i la via apocrina. Estudis autoradiogràfics i immunocitoquímics al microscopi electrònic han permès localitzar proteïnes secretades per via merocrina mitjançant processos d'exocitosis. Aquestes proteïnes es formen al reticle endoplasmàtic, es glicosilen a l'aparell de Golgi, i són empaquetades en vesícules de secreció que es fusionen amb la membrana apical i alliberen el contingut al lumen (Flickinger, 1981; Hermo i col., 1994). En altres estudis s'ha descrit la presència de "blebs" o protrusions a la superfície apical de les cèl·lules epitelials, suggerint que en l'epidídim existeix una via de secreció apocrina, mitjançant aposomes, com en altres parts de l'aparell genital masculí (prostasomes, vesiculosomes o seminosomes). A diferència de l'anterior, la secreció apocrina no inclou l'AG ni la formació de vesícules de secreció, sinó la formació de "blebs" a la superfície apical de les cèl·lules, que es desprenen de la superfície i, un cop alliberades al lumen epididimari, es fragmenten i alliberen el seu contingut al lumen. Els "blebs" contenen alguns orgànuls com cisternes de RE, vesícules de varies mides, poliribosomes i en alguns casos mitocòndries, sàculs de l'AG i lisosomes. S'han observat "blebs" a les cèl·lules principals i cèl·lules apicals de l'epidídim de rates (Fornes i col., 1995), ratolins (Hermo i Jacks, 2002), gats (Arrighi i col., 1986), toros (Agrawal i Vanha-Perttula, 1988), primats (Smithwick i Young, 1997) i humans (Aumuller i col., 1997; Aumuller i col., 1999). Les proteïnes secretades

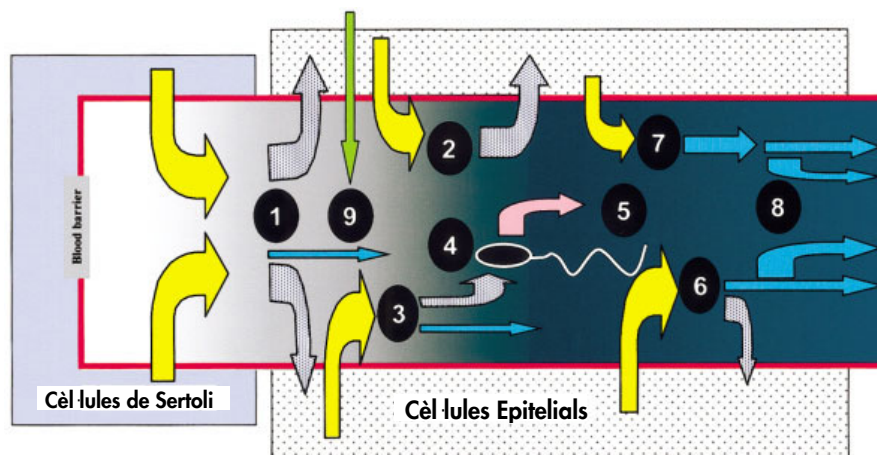
de manera apocrina presenten algunes característiques peculiars: (1) la seva biosíntesi (sense seqüència de pèptid senyal) i les modificacions post-translacionals (incloent una forma de glicosilació inusual) tenen lloc al citoplasma, (2) el seu extrem N-terminal està bloquejat per acetilació, (3) el transport intracel·lular té lloc sense la participació del sistema endomembranós i (4) l'alliberament al lumen implica la formació de "blebs" apicals. S'ha suggerit que el mecanisme de secreció apocrina és una alternativa per secretar certes proteïnes específiques, majoritàriament proteïnes associades a les membranes (GPI-anchored proteins) i proteïnes solubles, la biosíntesi de les quals té lloc al citoplasma sense la participació del RE i l'AG, ni vesícules de secreció. S'ha descrit que aquestes proteïnes interaccionen amb els espermatozoides i afecten la seva motilitat (Aumuller i col., 1997; Aumuller i col., 1999). De totes maneres aquest mecanisme no és del tot conegut i no se sap com la coordinació i/o regulació apocrina i merocrina pot tenir lloc en la mateixa cèl·lula.

### 1.2.1.3. Proteïnes del fluid epididimari

Les proteïnes presents al fluid epididimari procedeixen de la rete testis i de la secreció epididimària. De totes maneres, quasi totes les proteïnes testiculars que entren a l'epidídim són ràpidament absorbides en la regió proximal de l'epidídim; així doncs, la composició de proteïnes del lumen epididimari està lligada bàsicament a la secreció específica de les cèl·lules epitelials de cada regió epididimària.

L'activitat secretora de l'epidídim és molt elevada. Per exemple, en cavall s'han identificat 117 proteïnes secretades al llarg de tot el conducte epididimari (Fouchecourt i col., 2000), en porc s'han trobat un total de 125 proteïnes (Syntin i col., 1996) i en rata s'han observat 87 proteïnes secretades a la regió proximal de l'epidídim (Turner i col., 2000).

Tan bon punt una proteïna és secretada al lumen, la seva concentració canvia contínuament al llarg del trànsit per les diferents regions epididimàries. No hi ha una relació entre la intensitat de secreció d'una proteïna i la seva acumulació en el fluid epididimari. La concentració luminal d'una proteïna en una regió epididimària particular és el resultat de la seva secreció, però també de la seva reabsorció, degradació i dilució a causa del moviment d'aigua a través de l'epiteli epididimari. Algunes proteïnes secretades a la part proximal de l'epidídim són reabsorbides molt ràpidament, com per exemple dues isoformes de la clusterina (Fouchecourt i col., 2000) o la RNAsa A10 (train A) (Castella i col., 2004), però altres com la proteïna d'unió a l'àcid retinoic (E-RABP), la glutatió peroxidasa (GPX), la prostaglandina D2 sintetasa (PGDS) i la lactoferrina es reabsorbeixen molt lentament. Les proteïnes que es reabsorbeixen ràpidament o que interaccionen amb els espermatozoides són presents al lumen epididimari en baixes concentracions, mentre que les proteïnes que es reabsorbeixen lentament s'acumulen en grans quantitats (Figura 3).



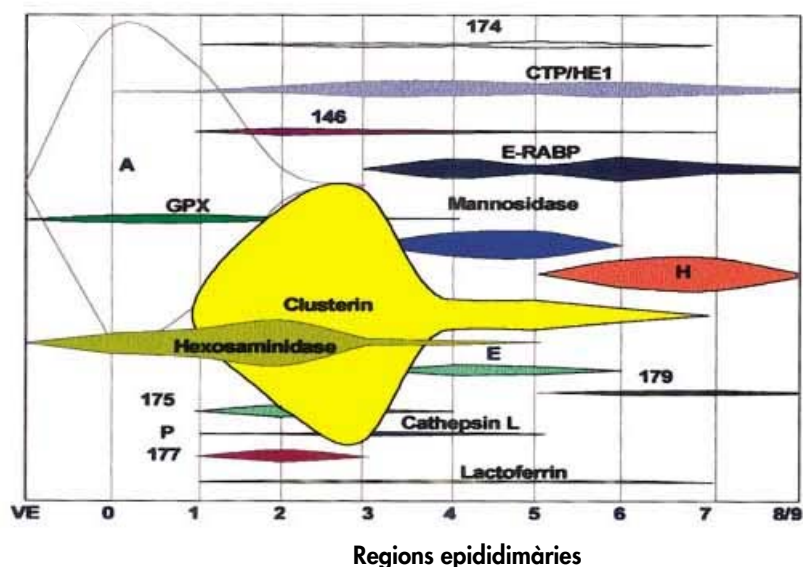
**Figura 3.-** Representació esquemàtica de la circulació proteica al llarg del conducte epididimari segons (Dacheux i col., 2003). La majoria de les proteïnes secretades per les cèl·lules de Sertoli són reabsorbides al conducte eferent i a la part proximal de l'epidídim (1). Les proteïnes secretades per l'epiteli epididimari (3), poden ser completament reabsorbides per l'epiteli (2), parcialment reabsorbides per l'epiteli (6), absorbides pels espermatozoides (4) o no reabsorbides (7) però si modificades (8). Les proteïnes presents al fluid epididimari i que no són secretades per l'epiteli poden provenir dels espermatozoides (5) o de la sang (9).

L'evolució de les proteïnes durant el trànsit epididimari no es deu només a canvis en la concentració (quantitativa) sinó també a canvis bioquímics, que tenen lloc directament al lumen (modificacions post-secretòries) i modifiquen la massa molecular i el punt isoelèctric (pI) de la proteïna, i donen lloc a un elevat polimorfisme proteic (Baker i col., 2005). Aquests canvis són específics de cada proteïna i de cada regió. A més, les proteïnes experimenten altres modificacions post-secretòries com són la proteòlisi i la deglicosilació, que també influencien el nombre d'isoformes d'una proteïna presents al lumen.

L'activitat secretora de l'epiteli epididimari varia segons les regions de l'epidídim i en totes les espècies estudiades aquesta activitat és superior al caput que al cauda. L'activitat secretora de la regió proximal és entre 3 (ratolí) i 10 (porc) vegades superior que a la regió distal. Concretament, en rosegadors el 60% de les proteïnes sintetitzades per l'epiteli epididimari és secretat al lumen del caput epididimari, mentre que al corpus i cauda la proporció disminueix fins a un 20-40% (Vreeburg i col., 1990; Vreeburg i col., 1992; Turner i col., 1994). En cavall el 73% de la secreció de l'epidídim es dona en el lumen de la regió del caput (Fouchecourt i col., 2000). En porc la secreció epididimària de les regions caput, corpus i cauda representa un 83%, 16% i 1%, respectivament, del total de secreció de l'epidídim (Syntin i col., 1996).

En cadascuna de les regions epididimàries se secreten unes proteïnes diferents. En porc, el caput proximal es caracteritza per la síntesis i secreció de glutatió peroxidasa (GPX),  $\beta$ -hexosaminidasa (Hexo), i RNAsa A10 (train A), el caput distal es caracteritza per la intensa secreció de

clusterina, i la presència de procatepsina L, lactoferrina, proteïna d'unió a colesterol (HE1) i dos proteïnes no identificades (train D i train Q). La secreció d' $\alpha$ -mannosidasa, proteïna d'unió a l'àcid retinoic (E-RABP) i una proteïna no identificada (train E) caracteritza el corpus proximal. Dues proteïnes no identificades (train M i train H) són específiques del corpus distal; mentre que només dues proteïnes poc abundants apareixen al cauda (Syntin i col., 1999) (Figura 4).



**Figura 4.-** Diagrama de les proteïnes secretades per les diferents regions de l'epidídim de *Sus domesticus* segons Syntin i col. (1996).

La successiva secreció de diferents proteïnes al llarg del túbul epididímar produeix un canvi continu de la composició del fluid epididímar. Aquests canvis estan directa o indirectament involucrats en la maduració dels espermatozoides presents al fluid epididímar.

#### 1.2.1.4. Expressió gènica

Per entendre el complex procés de maduració espermàtica, no només cal identificar les proteïnes secretades per l'epiteli epididímar i que interaccionen amb els espermatozoides, sinó que també cal conèixer les vies específiques de transducció de senyals i les proteïnes reguladores que estan involucrats en aquests esdeveniments.

Hi ha un gran nombre de gens que codifiquen diferents tipus de proteïnes que s'expressen de manera regionalitzada a l'epidídim. Molts d'aquests gens codifiquen per proteïnes que seran secretades al lumen epididímar i tindran un efecte directe o indirecte sobre la maduració espermàtica, mentre que altres gens codifiquen per proteïnes cel·lulars que formen part de les vies de transducció dels senyals i tenen funcions reguladores. Aquestes proteïnes responen a factors externs del lumen epididímar i tradueixen el senyal al nucli de les cèl·lules. L'expressió d'aquests mRNAs és específica segons la regió i això implica que també ho siguin les vies de



transducció de senyals, per tant, les regions epididimàries només poden respondre a senyals extracel·lulars que resultin de l'expressió d'un gen específic de la regió.

### **1.2.2. Protecció dels espermatozoides**

Les cèl·lules epitelials de l'epidídim juguen un paper important en la protecció dels espermatozoides. S'han descrit dos tipus de sistemes de protecció, un basat en la protecció dels espermatozoides enfront l'oxidació i un altre relacionat amb el sistema immunitari.

Els espermatozoides són capaços de fecundar l'oòcit gràcies a les propietats fusogèniques de la seva membrana plasmàtica, que és particularment rica en àcids grassos poliinsaturats (PUFA). Aquesta dominància de PUFA fa que els espermatozoides siguin altament susceptibles a la peroxidació lipídica produïda per les espècies d'oxigen reactives (ROS) presents al fluid epididimari i als propis espermatozoides. Les ROS oxiden lípids, aminoàcids i carbohidrats de la membrana plasmàtica dels espermatozoides, i provoquen una disminució de la fluïdesa de la membrana plasmàtica (Ohyasiki i col., 1988), alteracions en els mecanismes d'intercanvi de ions necessaris per a la motilitat (Rao i col., 1989) i pèrdua irreversible de la integritat estructural dels espermatozoides (Jones i col., 1978). Tot això fa disminuir la capacitat dels espermatozoides d'unir-se a l'oòcit (Aitken i Clarkson, 1988) i de fecundar-lo *in vitro* (Aitken i Clarkson, 1987). Les cèl·lules epitelials epididimàries secreten diversos enzims antioxidants per controlar els nivells de ROS al fluid epididimari com el glutatió peroxidasa (GPX), catalasa i superòxid dismutasa (SOD) (Sanocka i Kurpisz, 2004).

La barrera hemato-epididimària, a més de crear un ambient luminal especialitzat per a la maduració dels espermatozoides, els protegeix del sistema immunitari de l'organisme (Yap i col., 1998). Després de l'espermiació, els espermatozoides comencen a expressar un nombre de proteïnes que es troben únicament a la seva membrana plasmàtica. Com a conseqüència de l'expressió d'aquestes proteïnes, els espermatozoides són considerats cèl·lules foranes pel sistema immunitari, i per tant, durant el trànsit per l'epidídim, han de ser protegits contra la resposta autoimmunitària. Aquesta barrera evita que l'organisme fabriqui anticossos contra els antígens presents a la superfície dels espermatozoides i també protegeix els espermatozoides contra possibles substàncies nocives del torrent sanguini. Les cèl·lules basals, que corresponen a macròfags tissulars, també tenen un paper protector en el mecanisme de defensa immunitària local de l'epiteli (Yeung i col., 1994; Seiler i col., 1999). Igualment, les cèl·lules halo, que corresponen a limfòcits T i monòcits, actuen com una barrera immunològica per protegir l'epiteli (Flickinger i col., 1997; Serre i Robaire, 1999). També s'han descrit diverses proteïnes involucrades en la protecció immunològica dels espermatozoides, com la lactoferrina, que és

secretada per les cèl·lules epitelials epididimàries de moltes espècies, majoritàriament a la part distal. Una de les seves funcions és el transport de metalls, però també és un component del sistema immunitari no específic, ja que té activitat antibacteriana, antimicòtica, antiviral, antineoplàstica i antiinflamatòria (Wichmann i col., 1989). Altres proteïnes que s'han identificat com a potencials agents antimicrobians són HE4 (Kirchhoff i col., 1991), HE2/EP2 (Frohlich i col., 2000) i  $\beta$ -defensina (Bind1b) (Li i col., 2001).

### 1.2.3. Transport dels espermatozoides

Els espermatozoides són transportats del testicle, on són sintetitzats, al cauda distal, on són emmagatzemats. Aquest transport es dona a partir de contraccions regulars i espontànies de la musculatura del conducte epididimari, que també agiten el contingut luminal i afavoreix la ràpida absorció dels metabòlits per l'epiteli epididimari (Robaire i Hermo, 1988).

El temps requerit per aquest transport és d'una o dues setmanes aproximadament (Robaire i Hermo, 1988; Turner i col., 1990), però varia segons les espècies i es relaciona amb la dificultat amb què maduren els espermatozoides. En l'espècie porcina, l'espermatozoide requereix entre 9 i 14 dies per travessar l'epidídim; aproximadament 3 dies per travessar el caput, 2 dies per travessar el corpus i de 4 a 9 dies per travessar el cauda (Swierstra, 1968). En humans, a causa de la curta llargada del conducte epididimari, els temps per transportar els espermatozoides és de 2 a 6 dies (Johnson i Varner, 1988).

La velocitat de transport varia segons la regió de l'epidídim. A la regió proximal, on hi ha una major absorció d'aigua, el fluid és poc viscos i el transport és ràpid; mentre que a la part distal el fluid és més viscos i el transport s'alenteix (Turner i col., 1990).

### 1.2.4. Maduració espermàtica

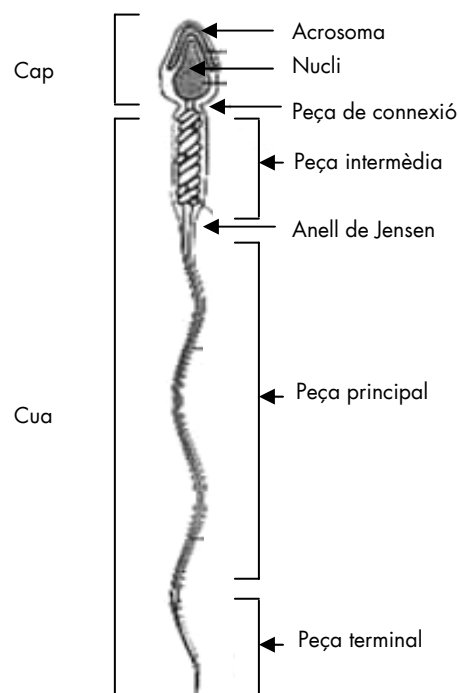
La maduració espermàtica fa referència als canvis post-testiculars que experimenten els espermatozoides en la seva capacitat funcional durant el trànsit per l'epidídim. Aquest procés de maduració permet als espermatozoides adquirir les propietats necessàries per fecundar a l'òocit, com són la motilitat progressiva i la capacitat fecundant. Aquests canvis inclouen: (1) la remodelació bioquímica de les proteïnes, glicoproteïnes i lípids de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide (Jones, 1998), (2) l'estabilització de la cromatina nuclear i de les fibres denses per ponts disulfur (Calvin i Bedford, 1971), (3) la migració i alliberament de la gota citoplasmàtica (Bedford, 1975), (4) la modificació de l'acrosoma, i (5) l'alteració dels patrons metabòlics i de l'estat estructural dels orgànuls específics de la cua (Cooper, 1998; Stoffel i col., 2002). La majoria d'aquests canvis s'han atribuït a la interacció seqüencial dels espermatozoides amb les secrecions específiques de l'epiteli epididimari acumulades a les diferents regions d'aquest conducte (Anakwe i col., 1990; Cooper i col., 1990; Sun i col., 2000).

### 1.2.4.1. Remodelació de la membrana plasmàtica

Quan l'espermatozoide passa a través de l'epidídim, la seva membrana plasmàtica interacciona amb l'ambient luminal i experimenta una sèrie de canvis en dominis específics. Aquests canvis inclouen l'addició de noves proteïnes sintetitzades per les cèl·lules epitelials de l'epidídim; la pèrdua, proteolisi o redistribució de proteïnes testiculars presents a la membrana de l'espermatozoide (Blobel i col., 1990; Gatti i col., 1999); i la modificació de la composició lipídica de la membrana (Ladha, 1998). Moltes d'aquestes proteïnes modificades post-testicularment s'han relacionat amb la capacitat dels espermatozoides per reconèixer i unir-se a la zona pel·lúcida i a la membrana de l'oòcit, o amb la iniciació del moviment.

### 1.2.4.2. Migració i alliberament de la gota citoplasmàtica

Els espermatozoides de la regió del caput epididimari presenten una expansió de citoplasma a la peça de connexió anomenada gota citoplasmàtica. Es tracta d'una porció de citoplasma que procedeix de les espermatides i que es manté unida a l'espermatozoide quan aquest s'allibera dels túbuls seminífers en l'espermació. Durant la maduració espermàtica a l'epidídim, la gota citoplasmàtica migra de la peça de connexió a l'anell de Jensen (Bloom i Nicander, 1961; Bedford, 1975) (Figura 5). Concretament, en porcs, la migració de la gota citoplasmàtica té lloc durant el seu trànsit pel corpus epididimari (Harayama i Kato, 1992) i és alliberada durant o poc després de l'ejaculació (Kato i col., 1996).



**Figura 5.-** Esquema d'un espermatozoide de mamífer

Es desconeix quins són els factors que provoquen la migració de la gota citoplasmàtica, però en rates, Akbarsha i col. (2000) suggereixen que és induïda per un producte específic secretat per les cèl·lules del corpus.

Pel que fa a l'alliberament de la gota citoplasmàtica, Harayama i col. (1996) suggereixen que, en porcs, és induït per la fructosa produïda per les vesícules seminals i per un increment de la concentració intracel·lular d'adenosina 3',5'-monofosfat cíclic (cAMP). En toros i bocs es creu que la proteïna d'unió a fosfolípids (PBP) sintetitzada per les vesícules seminals indueix l'alliberament de la gota citoplasmàtica distal (Bialy i Smith, 1958; Matousek i Kysilka, 1980). També s'ha suggerit que els canvis regionals en la composició del fluid epididimari (Thundathil i col., 2001), així com les forces generades per l'activitat peristàltica (Cooper i Yeung, 2003), intervenen en el desplaçament i l'alliberament de la gota citoplasmàtica.

Estudis ultraestructurals demostren que la gota citoplasmàtica conté vesícules membranoses procedents de l'AG i del RER (Bloom i Nicander, 1961), les quals podrien actuar com a substrats lipídics per al metabolisme energètic de l'espermatozoide (Voglmayr, 1975). Les gotes citoplasmàtiques no tenen activitat endocítica, però diversos estudis demostren que existeix una relació estructural entre les vesícules membranoses de l'interior de les gotes citoplasmàtiques i la membrana plasmàtica de l'espermatozoide (Bearer i Friend, 1990; Oko i col., 1993). Això fa pensar que algunes proteïnes de les vesícules podrien ser transferides a la membrana plasmàtica de l'espermatozoide com una modificació post-testicular i, per tant, podrien tenir una funció important en la maduració espermàtica.

La presència d'una elevada proporció d'espermatozoides amb gota citoplasmàtica a l'ejaculat s'associa freqüentment amb alteracions de la funció epididimària i amb una baixa capacitat fecundant (Gomez i col., 1996; Keating i col., 1997; Amann i col., 2000; Thundathil i col., 2001). Això es dona per la presència de molècules ROS, generades pels enzims presents dins la gota citoplasmàtica (hidrolases, creatine kinase i glucosa-6-fosfat deshidrogenasa). Aquestes molècules ROS oxiden els lípids de la membrana plasmàtica dels espermatozoides i produeixen danys als àcids nucleics, i perjudica la viabilitat i funció dels espermatozoides.

### **1.2.4.3. Adquisició i desenvolupament de la motilitat**

Encara que els espermatozoides madurs del cauda epididimari estiguin quiescents en el seu fluid nadiu, diluïts en medi de cultiu presenten motilitat progressiva. Aquesta motilitat és crucial per al transport en el tracte femení i per a la penetració del cúmulus oòfor i la zona pel·lúcida de l'oòcit (Bedford, 1998).

La adquisició de la motilitat progressiva és un dels canvis més importants de la maduració espermàtica. El desenvolupament de la motilitat inclou primer, l'adquisició del potencial per moure el flagel i després la coordinació i la modulació del moviment del flagel, que donen lloc a

la motilitat progressiva. La motilitat de l'espermatozoide immadur (del testicle i caput epididimari) es caracteritza per un batec asimètric del flagel, que dona lloc a espermatozoides estàtics sense propulsió o amb moviment irregular. Al llarg de l'epidídim el moviment es torna més regular; inicialment és curvilini, però posteriorment adquireix una progressió lineal i una major velocitat. En porcs s'ha observat que els espermatozoides passen de ser immòbils a tenir moviment vibratori a la regió del caput, a presentar moviment circular no progressiu al corpus i finalment motilitat progressiva i lineal al cauda medial (Briz, 1994). En primats l'adquisició de la motilitat progressiva es dona a la regió entre el caput i corpus, en ratolí entre el corpus proximal i medial, en humà i conill d'Índies al corpus medial i en hàmmster entre el cauda proximal i medial (Bork i col., 1988; Yeung i Cooper, 2002).

En la regulació de la motilitat espermàtica hi tenen un paper important el cAMP i la fosforilació proteica. Diversos estudis han demostrat que el factor clau per a la inducció de la motilitat *in vitro* d'espermatozoides immadurs és l'increment de cAMP intracel·lular (Tash i Means, 1983; Hoskins i Vijayaraghavan, 1990). També s'ha demostrat que la motilitat progressiva de l'espermatozoide del caput pot ser induïda en un medi que contingui fluid epididimari del cauda i teofil·lina (Hoskins i col., 1975; Cornwall i col., 1986; Jaiswal i Majumder, 1998), o després del cocultiu amb cèl·lules epitelials del corpus (Moore i col., 1986) i cauda (Moore i col., 1992). La carnitina i l'acetilcarnitina presents al fluid epididimari també incrementen la motilitat espermàtica dels espermatozoides del caput epididimari (Hinton i col., 1981). La concentració d'aquests components es correlaciona amb els percentatges d'espermatozoides amb motilitat progressiva en porc i bocs (Dacheux i col., 1990), però no en rata o hàmmster (Jeulin i Lewin, 1996).

### **1.2.5. Emmagatzematge dels espermatozoides**

Aproximadament el 55-65% de l'esperma epididimària és emmagatzemat al cauda epididimari de moltes espècies. En concret, en l'espècie porcina, el cauda conté el 54% de l'esperma (Amann, 1981). Aquesta reserva extragonadal permet l'ejaculació d'un nombre d'espermatozoides superior al que el testicle produeix diàriament.

El temps normal d'emmagatzematge dels espermatozoides de mamífer en el cauda epididimari varia entre 3 dies i 2-3 setmanes (Amann, 1981; Robaire i Hermo, 1988; Turner, 1995; Moore i Akhondi, 1996) encara que poden ser guardats durant períodes més llargs (Setchell i col., 1993). Concretament, en porc, els espermatozoides poden emmagatzemar-se al cauda durant tres setmanes (Egbunike i Elemo, 1978). Malgrat tot, no poden emmagatzemar-se indefinidament perquè amb el temps els espermatozoides degeneren, i en períodes molt llargs d'abstinència es troben espermatozoides a la orina.

Durant el període d'emmagatzematge els espermatozoides es mantenen quiescents (en un estat metabòlic baix) i immòbils, tot i que ja haurien adquirit la capacitat per moure's (Hinton i col., 1979). La quiescència metabòlica dels espermatozoides és induïda per diversos mecanismes (Cooper, 1998) com: (1) la baixa temperatura del conducte, (2) la disminució de la concentració de sodi luminal i l'augment de potassi, que prevenen l'eflux de protons i l'augment del pH intracel·lular que activaria la motilitat, (3) l'elevada concentració d'espermatozoides, (4) la secreció d'una mucoproteïna viscosa, (5) la baixa pressió d'oxigen, (6) la falta de substrat utilitzable, (7) la producció d'àcids que mantenen el pH intracel·lular baix, i (8) baixos nivells de bicarbonat en el fluid (Rodríguez-Martínez i col., 1990). A més el fluid luminal del cauda conté factors inhibidors de la motilitat (Cosentino i Cockett, 1986).

### 1.3. REGULACIÓ DE LES FUNCIONS EPIDIDIMÀRIES

Hi ha moltes evidències que el conducte epididimari dels mamífers és dependent d'andrògens. De tota manera la seva regulació és complexa i existeixen altres substàncies circulants que també ajuden a regular les funcions epididimàries com: estrògens, retinoids, progestines, vitamina D, melatonina (Robaire i Hermo, 1988; Heikinheimo i col., 1995; Shiu i col., 2000), factors secretats pel testicle i que entren a l'epidídim pel conducte eferent com la proteïna d'unió a andrògens (ABP) i factors de creixement com el factor de creixement de fibroblasts bàsic (bFGF) (Hinton i col., 1998). També s'ha demostrat que la temperatura és important pel manteniment de la funció epididimària.

#### 1.3.1. Andrògens

L'estructura i funció de l'epiteli epididimari és dependent d'andrògens, bàsicament de la testosterona, que prové de la circulació sistèmica o directament del testicle, on la testosterona és produïda per les cèl·lules de Leydig (Turner i col., 1984).

Fluid	Rata		Toro	
	T	DHT	T	DHT
RTF	17.8 ± 2.1	2.5 ± 2.1	33.1 ± 2.6	11.5 ± 0.3
Caput	5.4 ± 0.8	58.7 ± 6.5	—	—
Cauda	7.7 ± 1.2	4.4 ± 1.1	11.5 ± 0.7	20.2 ± 1.1

**Taula 1.-** Concentracions (mg/ml) de testosterona (T) i dihidrotestosterona (DHT) en el fluid de la rete testis (RTF), del caput i del cauda epididimari en rata (Turner i col., 1984) i toro (Ganjam i Amann, 1976).

A l'epidídim la testosterona és convertida a DHT per l'enzim 5 $\alpha$ -reductasa, bàsicament a la regió proximal on aquest enzim és molt més actiu que a la resta de regions de l'epidídim (Aafjes i Vreeburg, 1972) (Taula 1).

La falta d'andrògens provoca canvis morfològics en l'estructura de l'epidídim, tals com la disminució del diàmetre luminal i l'alçada de les cèl·lules, un major desenvolupament de l'estroma intertubular i la desorganització de la membrana basal (Delongas i col., 1987). Les cèl·lules principals de l'epiteli epididimari són particularment sensibles als nivells d'andrògens i la seva absència provoca una disminució de la quantitat de RE, un augment del nombre de lisosomes i vacuoles, la desaparició de les vesícules apicals, un augment de l'endocitosi (Orgebin-Crist i Davies, 1974; Moore i Bedford, 1979) i, en conseqüència, l'alteració de la funció secretora d'aquestes cèl·lules. La quantitat de receptors d'andrògens (AR) epididimaris i l'activitat 5 $\alpha$ -reductasa també disminueixen per falta d'andrògens (Larminat i col., 1978; Pujol i Bayard, 1979). També s'ha observat que en absència d'andrògens els espermatozoides esdevenen immòbils, perden la capacitat de fecundar i moren (White, 1932; Dyson i Orgebin-Crist, 1973).

### **1.3.1.1. Mecanismes d'acció dels andrògens en l'epidídim**

S'han identificat dues proteïnes relacionades amb el mecanisme d'acció dels andrògens a l'epidídim, el receptor d'andrògens (AR) i la proteïna d'unió a andrògens (ABP). AR és un membre de la superfamília de receptors d'esteroides que s'expressa en diversos teixits animals. Concretament, s'ha observat la presència de AR al nucli de les cèl·lules principals de l'epidídim de diverses espècies com rata, (Ritzen i col., 1971), conill (Danzo i col., 1973), gos (Younes i col., 1979), be (Carreau i col., 1984), primat (Zhang i col., 1997) i humà (Ungefroren i col., 1997). La unió de la testosterona a AR activa el DNA i la transcripció de diverses proteïnes amb activitats intercel·lulars diferents. La proteïna ABP és sintetitzada als testicles per les cèl·lules de Sertoli; un 80% és secretat al fluid testicular i transportat a l'epidídim a través del conducte eferent (French i Ritzen, 1973), mentre que un 20% s'allibera a la sang (Weddington i col., 1975). La proteïna ABP s'ha identificat en moltes espècies com rata (Ritzen i col., 1971), conill (Danzo i Eller, 1975; Danzo i Eller, 1984), conill d'Índies (Danzo i col., 1982), boc (Carreau i col., 1984), primat i humà (Vigersky i col., 1976). Aquesta proteïna té una elevada afinitat per la DHT i per la T, i se li atribueix un paper de molècula transportadora de testosterona. S'ha vist que l'ABP present al fluid epididimari s'uneix a la testosterona i la transporta a l'interior de les cèl·lules principals de la regió proximal de l'epidídim (Gerard i col., 1988; Gueant i col., 1991). A l'interior de les cèl·lules principals la testosterona se separa de l'ABP i es converteix a DHT.

Així doncs, a l'epidídim la testosterona pot trobar-se lliure o unida a ABP, però és quan s'uneix a AR que desenvolupa la seva funció. El factor limitant que determina l'acció de la testosterona a

les cèl·lules no és clar, però diversos estudis indiquen que no és el nombre absolut de AR presents a les cèl·lules el factor limitant, sinó la quantitat de lligant. En alguns teixits, com el múscul, la testosterona actua directament sobre el AR, però en altres, com el cervell, la testosterona s'aromatitza a estradiol i s'uneix al receptor d'estradiol, o es converteix a DHT que s'uneix al receptor d'androgen amb més afinitat que la testosterona (Blanchard i Robaire, 1997). Aquesta segona via és la que succeeix a la majoria de teixits androgen dependents com l'epidídim, pròstata i vesícules seminals. En aquest cas el factor limitant és l'enzim esteroide 5 $\alpha$ -reductasa.

### 1.3.1.2. Funcions androgen dependents de l'epidídim

Les cèl·lules epitelials epididimàries duen a terme un gran nombre de funcions que assegurin que el procés de maduració dels espermatozoides es realitzi adequadament. Molts d'aquests processos individuals són regulats per andrògens com:

- El transport de ions (Wong i Yeung, 1977) i petites molècules com la carnitina (Bohmer i Hansson, 1975) i l'inositol (Pholpramool i col., 1982) a través de l'epiteli epididimari.
- L'activitat de les anhidrases carbòniques presents a l'epidídim, que acidifiquen el fluid luminal i regulen la motilitat espermàtica (Kaunisto i col., 1999).
- El manteniment de la barrera hemato-epididimària per unions gap i unions estretes (Cyr i col., 1996).
- L'emmagatzematge dels espermatozoides densament empaquetats al cauda epididimari i el manteniment en estat quiescent abans de l'ejaculació (Bedford i Hoskins, 1990).
- L'expressió de diversos receptors d'hormones, com AR (Zhu i col., 2000).
- La funció metabòlica de l'epidídim (Brooks, 1981). S'ha vist que en presència d'andrògens, els lípids són el substrat principal. En canvi, en absència d'andrògens el metabolisme intermediari de l'epidídim esdevé completament dependent de carbohidrats com a conseqüència de la disminució de la capacitat de sintetitzar lípids (Brooks, 1977).
- La transcripció i estabilitat de diversos mRNAs, així com la concentració de moltes proteïnes epididimàries. Concretament en porcí, aproximadament el 48% de les proteïnes secretades a l'epidídim són dependents de la presència d'andrògens, estimulades (33,6%) o reprimides (14,4%). La secreció del caput proximal és la més afectada per l'absència d'andrògens, amb una elevada disminució de proteïnes específiques com Train A, GPX i HE1. Al caput distal i corpus, la síntesi de les proteïnes lactoferrina, HE1 i E-RABP també disminueix per l'absència d'andrògens, mentre que la secreció de clusterina augmenta (Syntin i col., 1999).



La regió proximal de l'epidídim és més androgen dependent que la regió distal, ja que l'artèria que innerva aquesta regió ha passat prèviament pel testicle i conté una concentració molt més elevada d'andrògens.

### **1.3.2. Temperatura**

La temperatura també s'ha descrit com un factor important en el control de les funcions testiculars i epididimàries. S'ha demostrat que les elevades temperatures disminueixen l'absorció d'aigua del lumen epididimari i redueixen l'expressió de certs gens, la secreció proteica i l'activitat enzimàtica (Bedford, 1991). Concretament, s'ha demostrat que la temperatura corporal (37-38°C) provoca la disminució o inhibició de proteïnes present al fluid luminal del cauda epididimari de rata *in vivo* (Esponda i Bedford, 1986) i de conill *in vitro* (Regalado i col., 1993) i suggereixen que estan relacionades amb l'emmagatzematge de l'espermatozoide en aquesta regió. Igualment, la temperatura corporal provoca una disminució dels nivells de diversos mRNAs *in vitro*, com per exemple CD52/HE5, que codifica per una glicoproteïna d'unió a glicosilfosfatidilinositol (GPI) i que és present a la membrana dels espermatozoides (Pera i col., 1996; Kirchhoff i col., 2000).

## **1.4. CULTIU DE LES CÈL·LULES EPIDIDIMÀRIES**

Els mètodes per estudiar la maduració espermàtica són molts i diversos. Les tècniques de canulació i micropunció han proporcionat molta informació sobre les característiques del medi luminal, així com la fisiologia i l'estat bioquímic dels espermatozoides en les diferents regions del conducte. De totes maneres, l'obtenció de les mostres és complicada i, a més, resulta difícil estudiar les funcions pròpies de l'epiteli epididimari sense interferència de factors testiculars. La intrínseca complexitat de les funcions realitzades per l'epidídim i l'amplitud amb la qual aquestes funcions canvien en les diverses regions d'aquest òrgan ha afavorit el desenvolupament de mètodes d'estudi *in vitro* basats en el cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries. Aquests mètodes no poden reproduir exactament el microambient de l'epidídim *in vivo* però proporcionen informació útil sobre la funció epididimària. Els mètodes de cultiu s'han utilitzat per estudiar les interaccions específiques entre les cèl·lules epitelials i els espermatozoides, així com per identificar i caracteritzar les secrecions de les cèl·lules epitelials.

### **1.4.1. Mètodes de cultiu**

Els primers intents de cultivar l'epiteli epididimari al laboratori es basaven en el cultiu de l'òrgan i s'incubaven llargs segments del túbul epididimari, corresponents a les diverses regions (Orgebin-Crist i Jahad, 1979; Tezon i Blaquier, 1981; Klinefelter i Hamilton, 1984). Aquests cultius eren

útils i permetien estudiar tot el túbul epididimari amb les contribucions metabòliques tant de les cèl·lules musculars peritubulars com de les cèl·lules epitelials. La incubació d'aquests fragments durant curts períodes mantenia l'activitat secretora de les cèl·lules epitelials i s'induien alguns canvis relacionats amb la maduració espermàtica com són l'adquisició de la motilitat i, en algunes ocasions, l'augment de la capacitat fecundant. A més, aquests cultius van demostrar que la maduració epididimària era dependent d'andrògens i van establir la necessitat de suplementar el medi de cultiu amb andrògens (Vazquez i col., 1986). Però aquests fragments de túbul epididimari només es mantenien viables i funcionals durant uns quants dies i l'accés al lumen del túbuls era limitat.

Un mètode alternatiu va ser el cultiu de cèl·lules epitelials epididimàries aïllades, que es purificaven a partir de microdissecció i digestions enzimàtiques de l'epidídim (Kierszenbaum i col., 1981; Joshi, 1985). Malauradament, la disgregació de l'arquitectura epitelial i la manca de làmina basal i altres elements peritubulars provocaven una ràpida desdiferenciació i la pèrdua de funció de les cèl·lules epitelials epididimàries. Per mantenir la funció i la polaritat de les cèl·lules epitelials en cultiu, es van utilitzar suports semipermeables i de matriu extracel·lular (Byers i col., 1986; Cooper i col., 1990; Klinefelter, 1992; Raczek i col., 1994, 1995).

Actualment, la majoria de mètodes de cultiu de l'epiteli epididimari es basen en la utilització de fragments o plaques d'epiteli obtingudes a partir de successives digestions amb col·lagenasa. Aquesta tècnica permet la formació de monocapes confluentes de cèl·lules epitelials epididimàries que migren des dels fragments. Aquestes monocapes romanen polaritzades i mantenen les seves característiques estructurals i la seva activitat secretora durant llargs períodes de temps en presència d'andrògens (Moore i Akhondi, 1996; Akhondi i col., 1997). Aquest mètode s'ha utilitzat pel cultiu de les cèl·lules epitelials de diverses espècies com hámster (Moore i col., 1986), ratolí (Bongso i Trounson, 1996; Carballada i Saling, 1997), gos (Pera i col., 1996), toro (Gagnon i col., 2000; Lin i col., 2000, 2002; De Pauw i col., 2003) i humà (Moore i col., 1992; Akhondi i col., 1997).

#### **1.4.2. Coïncubació de cultius epididimaris amb espermatozoides**

El cocultiu d'espermatozoides amb cèl·lules epitelials epididimàries ha permès observar la unió dels espermatozoides amb molècules presents al fluid epididimari i la inducció de diversos canvis relacionats amb la maduració espermàtica. En hámster, es va identificar un determinant de 34 kDa que era secretat per les cèl·lules principals del corpus proximal *in vivo* i *in vitro* (Smith i col., 1986), i que es transferia al cap de l'espermatozoide durant el cocultiu, i es va relacionar amb el desenvolupament de la motilitat progressiva. Klinefelter i col. (1992) també van descriure un grup de proteïnes de 34-36 kDa que s'expressaven a les cèl·lules epitelials de rata en cultiu i que s'unien als espermatozoides. El tractament amb etadimetasulfonat (EDS) disminuïa la secreció

d'aquestes proteïnes a nivells quasi indetectables i s'inhibia la maduració espermàtica, suggerint la seva importància en el procés de maduració dels espermatozoides. Moore i Akhondi (1996) van descriure dues proteïnes de 44 kDa, secretades per les cèl·lules epitelials de l'epidídim de rata i humà, que s'unien als espermatozoides en cocultiu i que també estaven implicades en el manteniment de la seva viabilitat i capacitat fecundant. Altres experiments de cocultiu utilitzant espermatozoides epididimaris immadurs d'humà van permetre identificar proteïnes de 20-22 kDa, 38-40 kDa i 66-69 kDa relacionades amb la maduració espermàtica (Tezon i col., 1985; Moore i col., 1992). En boví, s'ha descrit una proteïna de 42 kDa, identificada com a estrogensulfotransferasa, que és secretada per les cèl·lules epitelials del cauda epididimari, i que s'uneix fortament a la membrana dels espermatozoides i ajuda a mantenir la seva motilitat *in vitro* (Reyes-Moreno i col., 2002). Recentment, s'ha descobert una proteïna  $\beta$ -defensina (Bind1b) específica de l'epidídim, que s'uneix al cap dels espermatozoides i indueix la motilitat progressiva dels espermatozoides immadurs de rata (Zhou i col., 2004). L'adquisició de la motilitat espermàtica i el desenvolupament de la capacitat fecundant d'espermatozoides immadurs en cocultiu amb cèl·lules epitelials epididimàries també ha estat descrit per altres autors (Akhondi i col., 1997; Bongso i Trounson, 1996; Lin i col., 2000, 2002).

El cocultiu d'espermatozoides amb cultius d'origen no epididimari no promou la maduració espermàtica, però en alguns casos poden millorar la motilitat espermàtica i la viabilitat (Akhondi i col., 1997). S'ha demostrat que les cèl·lules de l'oviducte tenen un efecte beneficiós sobre els espermatozoides ejaculats humans, pel que fa a la viabilitat, la inducció de la capacitat i de la motilitat hiperactiva (Chian i Sirard, 1995; Kervancioglu i col., 1995; Pacey i col., 1995). Aquests efectes semblen ser més específics que amb altres tipus de línies cel·lulars d'origen no reproductiu (ex. Vero cells, Kervancioglu i col., 1995).

Els cultius de cèl·lules epitelials epididimàries també proporcionen un mètode ràpid per a l'estudi *in vitro* de l'efecte de substàncies tòxiques. Els cultius s'exposen a l'agent tòxic durant un curt període de temps i posteriorment es co-incuben amb espermatozoides epididimaris. S'estudia l'efecte d'aquest tòxic sobre les cèl·lules epitelials epididimàries i sobre els espermatozoides (Smayawardhena i Moore, 1999; Klinefelter i col., 1992).

L'eficiència dels experiments de cocultiu en promoure els canvis relacionats amb l'adquisició de la maduració espermàtica depèn de diversos factors relacionats tant amb les cèl·lules epitelials en cultiu com amb els espermatozoides. Alguns d'aquests factors són:

- L'edat del cultiu: Quan els espermatozoides de hàmsster són co-incubats amb cultius de cèl·lules epitelials de 5-7 dies mostren un augment significatiu de la motilitat progressiva (associat amb la capacitat fecundant) i el temps de supervivència comparat amb cultius

mantinguts durant més o menys dies (Moore i col., 1998). Aquest efecte beneficiós està associat amb l'expressió relativa dels AR en les cèl·lules principals en cultiu.

- L'estadi de maduració dels espermatozoides: Els espermatozoides de la regió distal del corpus tenen motilitat progressiva dèbil, baixa capacitat d'unió a la zona pel·lúcida i, per tant, baixa capacitat fecundant *in vitro*. Però quan s'incuben amb cultius de cèl·lules epitelials del cauda proximal, la unió als oòcits millora significativament, suggerint que la seva superfície cel·lular ha estat modificada, però la capacitat fecundant es manté baixa perquè la motilitat no ha millorat. Per contra, quan es co-incuben espermatozoides procedents del caput amb cèl·lules epitelials del corpus, la motilitat espermàtica millora després de 24h d'incubació, però no millora la unió a la zona pel·lúcida (Smith i col., 1986). A més, s'ha observat que *in vitro*, el percentatge de motilitat i les velocitats dels espermatozoides immadurs es deterioren més ràpid que els dels espermatozoides madurs (Perez-Sanchez i col., 1996).
- El temps de vida dels espermatozoides: Una vegada els espermatozoides es treuen del lumen epididimari i es dilueixen s'activen, i el seu temps de vida *in vitro* és limitat. Per tant, és difícil induir la maduració espermàtica mitjançant el cocultiu amb cèl·lules epitelials epididimàries i posteriorment comprovar la seva capacitat fecundant dins el temps de vida de l'espermatozoide. L'ideal seria recuperar els espermatozoides del lumen epididimari en el seu estat immòbil i inactiu, i mantenir-los així durant el període de cocultiu. Això no ha estat possible fins al moment.



## **2 OBJECTIUS**



L'objectiu principal d'aquest treball és desenvolupar un sistema de cultiu que mimetitzi l'ambient epididimari i reproduïxi les condicions epididimàries *in vivo* per tal d'estudiar la seva fisiologia i funcions. La funció principal de l'epidídim és la maduració espermàtica, que té lloc gràcies a la interacció dels espermatozoides amb factors, principalment proteïnes, secretats per les cèl·lules epitelials epididimàries.

Un sistema de cultiu que reproduïxi la maduració espermàtica *in vitro* requereix el cocultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries amb espermatozoides immadurs. Les cèl·lules epitelials epididimàries han de preservar la integritat estructural al llarg de la duració del cultiu i han de mantenir la síntesi i secreció de les proteïnes específiques de l'epidídim. A més, les cèl·lules epitelials han de mantenir la viabilitat dels espermatozoides durant el període de cocultiu i afavorir processos que són claus per a la maduració espermàtica, com la migració de la gota citoplasmàtica i l'adquisició de la motilitat progressiva de l'espermatozoide.

Així doncs, els objectius concrets són els següents:

1. Establiment del cultiu de les cèl·lules epitelials procedents de les tres regions epididimàries (caput, corpus i cauda) de *Sus domesticus*.
2. Estudi estructural i ultraestructural de les cèl·lules epitelials epididimàries cultivades i comparació amb les cèl·lules epitelials epididimàries *in vivo*.
3. Anàlisi proteòmic per a la determinació de les proteïnes sintetitzades i secretades per les cèl·lules epitelials epididimàries cultivades i comparació amb cèl·lules epitelials epididimàries *in vivo*.
4. Avaluació dels canvis maduratius que experimenten els espermatozoides immadurs en cocultiu amb les cèl·lules epitelials de les tres regions epididimàries.





# **3 MATERIAL I MÈTODES**



### 3.1.- MÈTODES DE CULTIU

#### 3.1.1.- Obtenció i cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries

Una vegada sacrificats els animals, es van extreure els testicles amb els corresponents epidídims adherits, i es van transportar immediatament al laboratori, dins d'un recipient amb PBS (Gibco) suplementat amb 50 U ml<sup>-1</sup> de penicilina G i 50 µg ml<sup>-1</sup> estreptomicina (Gibco). Un cop al laboratori, i sota condicions estèrils (Cabina de flux laminar Faster BIO 48, Cultek), es van separar els epidídims dels testicles i es van identificar les tres regions epididimàries (caput, corpus i cauda). Utilitzant material de dissecció estèril es va agafar una mostra de teixit de cadascuna de les regions i es van guardar en un recipient amb PBS suplementat amb antibiòtics fins al moment de la seva disgregació. El teixit epididimari de cada regió es va posar en una placa de petri de 150 mm de diàmetre (Nunc) amb PBS suplementat amb antibiòtics i es va tallar en fragments de 2-5 mm de longitud utilitzant material de dissecció estèril. Els fragments del teixit es van traslladar a tubs de centrífuga de 50 ml (Nunc) i es van rentar per sedimentació 3 vegades amb PBS suplementat amb antibiòtics per tal d'eliminar els espermatozoides del teixit. Seguidament, els fragments es van resuspendre en PBS suplementat amb antibiòtics i amb 300 U ml<sup>-1</sup> de col·lagenasa (tipus VII, Sigma) i es van incubar al bany a 37°C. Els fragments que procedien de les regions del caput i corpus es van incubar durant 2 hores i els fragments que procedien de la regió caudal durant 3 hores. Durant el període d'incubació amb col·lagenasa, les mostres es van pipetejar vigorosament diverses vegades per afavorir la disgregació dels fragments. La digestió enzimàtica es va aturar afegint medi de cultiu (veure apartat següent) i les mostres es van deixar sedimentar 10 minuts. Es va eliminar el sobrenedant i es van fer 3 rentats de 5 minuts a 200 g amb medi de cultiu. Tot seguit es va procedir a la segona digestió amb col·lagenasa resuspenent el pellet amb medi de cultiu suplementat amb 150 U ml<sup>-1</sup> de colagenasa. Els fragments es van incubar al bany a 37°C, els de caput durant 1 hora, els de corpus 2 hores i els de cauda 3 hores. Igual que abans, durant la incubació, les mostres es van tornar a pipetejar vigorosament diverses vegades per afavorir la disgregació del teixit. La digestió enzimàtica es va aturar afegint medi de cultiu i les mostres es van rentar 3 vegades durant 5 minuts a 200 g amb medi de cultiu per treure les restes d'enzim, de teixit i d'espermatozoides. Es van transferir 30 fragments per pou en plaques de cultiu de 24 pous (Nunc) amb 1 ml de medi de cultiu, i es van incubar a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> i humitat del 100% (Incubador Heraeus BB 16). El medi de cultiu es va canviar cada 48 hores, substituint el 50% del medi a cada pou. A dia 6 de cultiu es van treure, per aspiració, els fragments que no s'havien adherit a les plaques de cultiu i a partir d'aquest moment es va canviar el 90% del medi cada 48 hores.

Les mostres destinades a l'estudi ultraestructural es van tractar de la mateixa manera, però es van sembrar en inserts de policarbonat de 12 mm de diàmetre i porus de 0.4  $\mu\text{m}$  (Millipore). Els inserts es van posar dins els pous de les plaques de cultiu de 24 pous amb 1 ml de medi de cultiu dins el pou i 500  $\mu\text{l}$  dins l'insert. En aquest cas es van sembrar 15 fragments per insert.

Les mostres destinades al marcatge amb anticossos anti-citoqueratines també es van tractar de la mateixa manera però els 30 fragments es van sembrar sobre cobreobjectes de vidre rodons tractats prèviament amb gelatina 0.1% (Merck) en PBS, que també es van posar dins els pous de les plaques de cultiu de 24 pous.

Per a l'estudi de la secreció proteica es van sembrar 10 fragments per pou en plaques de cultiu de 48 pous amb 0.5 ml de medi de cultiu.

### **3.1.2.- Medi de cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries (ECM)**

El medi utilitzat pel cultiu de les cèl·lules epitelials de l'epidídim de *Sus domesticus* va ser modificat a partir dels medis de cultiu utilitzats en rosegadors i humans (Moore i col., 1986, 1992). El medi RPMI 1640 (Gibco) es va suplementar amb 10% de sèrum fetal (Foetal Calf Serum Gold, PAA laboratoires), 1 mM de sodi-piruvat (Gibco), 100 nM d'insulina (Sigma), 200 nM d'hidrocortisona (Sigma), 200 nM de testosterona (Fluka), 1  $\mu\text{M}$  de dihidrotestosterona (Fluka), 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  d'apo-transferrin (Sigma), 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  d'acetat retinol (Sigma), 25 mM d'Hepes (Gibco) i 50 U  $\text{ml}^{-1}$  de penicilina-streptomicina (Gibco). Totes les solucions d'esteroides i retinol acetat van ser preparades en etanol absolut abans d'afegir-les al medi RPMI 1640. El medi va ser filtrat amb filtres de 0.22  $\mu\text{m}$  de diàmetre (Pall-Gelman) i guardat a 4°C.

### **3.1.3.- Cultiu de les cèl·lules epitelials de ronyó (LLC-PK1)**

1. Es descongela el vial de cèl·lules epitelials porcines de ronyó, comprat a ATCC (ATCC-LGC Prochem), mitjançant agitació suau en un bany a 37°C. Per reduir la possibilitat de contaminació s'aguanta pel tap de rosca que es manté sempre fora de l'aigua. La descongela ha de ser ràpida, aproximadament 2 min.
2. Es treu el vial del bany d'aigua de seguida que el contingut es descongela, i es descontamina netejant amb etanol 70%. Totes les manipulacions a partir d'aquest moment es duen a terme sota condicions estèrils estrictes.
3. Es centrifuga la suspensió cel·lular a 125 g durant 5-10 min i es descarta el sobrenedant, que conté l'agent crioprotector que és nociu per a les cèl·lules.

4. Es transfereix el contingut del vial a un flascó de cultiu de 75 cm<sup>2</sup> i es dilueix amb el medi de cultiu recomanat, M199 (Gibco) suplementat amb 3% FCS i 50 Uml<sup>-1</sup> de penicil·lina G i 50 µgm<sup>-1</sup> estreptomina. És important deixar el medi de cultiu a l'incubador 15 min abans de transferir-hi les cèl·lules, perquè adquireixi el seu pH normal (7.0-7.6).
5. S'incuba el cultiu a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> i humitat del 100%.

En el moment de l'experimentació el medi de cultiu es va canviar per ECM per tenir les mateixes condicions que els cultius de cèl·lules epitelials.

### 3.1.4.- Procés de tripsinització

La tripsina és un enzim que trenca les unions cel·lulars entre les cèl·lules i entre les cèl·lules i el substrat. S'utilitza per obtenir una suspensió cel·lular a partir de cèl·lules que formen una monocapa. En aquest treball les monocapes cel·lulars es van tripsinitzar per al recompte de la viabilitat i concentració cel·lular, per a la immunofluorescència indirecta de cèl·lules en suspensió i per a l'extracció de l'RNA.

1. Es retira el medi dels pous de cultiu aspirant amb una pipeta de vidre estèril connectada a una trampa de buit.
2. Es renten les cèl·lules amb PBS durant 1 minut. Aquest rentat permet eliminar les restes de medi amb sèrum que queden en el cultiu, les quals contenen inhibidors de proteases i que podrien inhibir l'acció de la tripsina.
3. S'afegeix als pous 500 µl de tripsina 1 M (Gibco) i es col·loca la placa de cultiu a l'incubador durant uns 5-10 minuts, fins que s'observa al microscopi de contrast de fases invertit que les cèl·lules comencen a desenganxar-se (adopten una morfologia rodona i refringent). Per acabar de separar-les es dona un cop sec a la placa de cultiu. La reacció s'atura afegint medi de cultiu.
4. Es recull el medi amb les cèl·lules i es centrifuga en un tub estèril a 200 g durant 10 minuts.
5. S'elimina el sobrenedant, es resuspèn el sediment en sec i s'afegeix medi de cultiu nou.

### 3.1.5.- Recompte del nombre de cèl·lules

1. Es tripsinitzen les cèl·lules segons el procés descrit a l'apartat anterior. Cal procurar que la monocapa quedi ben disgregada abans de la centrifugació, i que després quedi el sediment ben desfet per tal que no quedin agrupacions que alterarien els resultats del recompte.
2. Una vegada ressuspeses les cèl·lules en medi de cultiu, es pren una alíquota de 10 µl i es col·loca en un eppendorf. S'afegeix blau tripà 0.1% (Sigma) a la dilució requerida i es barreja.

3. Es prenen 10 µl de la barreja, es col·loquen en un hemocitòmetre i s'examina al MO de contrast de fases invertit. Les cèl·lules vives mantenen la seva membrana intacta i impermeable al colorant i s'observen com punts refringents i clars; mentre que les cèl·lules mortes, que tenen la membrana trencada i per tant permeable al colorant, s'observen com opaques i tenyides de blau.
4. Es compta el total de cèl·lules de la zona de recompte de l'hemocitòmetre diferenciant les cèl·lules vives de les mortes. La concentració cel·lular (cèl·lules/ml) s'obté dividint el nombre total de cèl·lules per  $10^4$  (volum de la zona de recompte en ml) i multiplicant pel factor de dilució quan s'afegeix el blau tripan. La viabilitat es calcula dividint el nombre de cèl·lules vives pel total de cèl·lules comptades i multiplicant per 100.

### **3.2.- MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA**

Per a l'estudi ultraestructural de les cèl·lules epitelials epididimàries en monocapa i dels fragments epididimaris cultivats les mostres es van processar per ser observades al microscopi electrònic de transmissió.

#### **3.2.1.- Microscòpia electrònica de les cèl·lules epididimàries en monocapa**

1. Es retira el medi dels pous de cultiu aspirant amb una pipeta de vidre estèril connectada a una trampa de buit i es renten amb PBS.
2. Es fixen amb una solució de glutaraldehid 2.5% (Electron Microscopy Sciences) en tampó cacodilat 0.1M (pH 7.4) (Agar Scientific LTD) a 4°C durant 1 hora.
3. Es renten 3 vegades amb tampó cacodilat 0.1M durant 90 minuts, fent tres canvis de 30 minuts cadascun.
4. Es postfixen amb una solució de tetraòxid d'osmi 1% (Electron Microscopy Sciences) i tampó cacodilat 0.1M durant 60 minuts a 4°C i foscor.
5. Es renten tres vegades amb tampó cacodilat 0.1M durant 90 minuts, fent 30 minuts per rentat, a 4°C i posteriorment amb aigua bidestil·lada durant 30 minuts, fent tres canvis de 10 minuts cadascun, també a 4°C.
6. Es deshidraten en una sèrie creixent d'acetona a 4°C: Acetona 30°, durant 15 minuts; Acetona 50°, durant 15 minuts; Acetona 70°, de 15 minuts a 12 hores; Acetona 95°, durant 15 minuts; Acetona 100°, fent 3 canvis de 5 minuts.
7. S'inclouen amb resina Spurr (Agar Scientific LTD), a temperatura ambient i usant un rotor: Acetona 100°-Spurr (3:1), durant 2 hores; Acetona 100°-Spurr (2:2), durant 2 hores; Acetona 100°-Spurr (1:3), durant 2 hores; Spurr, durant 2 hores; Spurr, durant 12 hores; Spurr, durant 3 hores i finalment es polimeritza a 60°C durant 48 hores.

8. Amb un ultramicrotòtom (LKB supernova, Leyca) es fan seccions semifines (1µm) i ultrafines (80nm). Les seccions semifines es tenyeixen amb blau de metilè 0.5% (Panreac) i s'observen al microscopi òptic convencional. Les seccions ultrafines es tenyeixen amb acetat d'uranil 2% (Panreac) durant 30 minuts i citrat de plom 0.4% (Electron Microscopy Science) amb NaOH 0.1N durant 10 minuts, i s'observen i fotografien al microscopi electrònic de transmissió (Zeiss EM-910) a 60-80 Kw.

### 3.2.2.- Microscòpia electrònica dels fragments epididimaris

1. Es retira el medi dels pous de cultiu aspirant amb una pipeta de vidre estèril connectada a una trampa de buit i es renten amb PBS.
2. Es fixen amb una solució de glutaraldehid 4% (Electron Microscopy Sciences) en tampó cacodilat 0.1M (pH 7.4) (Agar Scientific LTD) a 4°C durant un mínim de 24 hores.
3. Es renten 3 vegades amb tampó cacodilat 0.1M durant 90 minuts, fent tres canvis de 30 minuts cadascun.
4. Es postfixen amb una solució de tetraòxid d'osmi 2% (Electron Microscopy Sciences) en tampó cacodilat 0.1M durant 2 hores a 20°C.
5. Es renten tres vegades amb tampó cacodilat 0.1M durant 90 minuts, fent 30 minuts per rentat, a 4°C i posteriorment amb aigua bidestil·lada durant 30 minuts, fent tres canvis de 10 minuts cadascun, també a 4°C.
6. Es deshidraten en una sèrie creixent d'etanol a 4°C: etanol 70°, durant 10 minuts; etanol 95°, durant 10 minuts; etanol 100°, durant 10 minuts i s'incuben 5 min amb òxid de propilè (Electron Microscopy Sciences).
7. S'inclouen amb resina Epon (Agar Scientific LTD), a 20°C: òxid de propilè - Epon (2:1), durant 45 min; òxid de propilè - Epon (1:1), durant 45 min; òxid de propilè - Epon (1:2), durant 45 min; Epon, durant 12 hores; i finalment es polimeritza a 60°C durant 48 hores.
8. Amb un ultramicrotòtom (LKB supernova, Leyca) es fan seccions semifines (1µm) i ultrafines (80nm). Les seccions semifines es tenyeixen amb blau de metilè 0.5% (Panreac) i s'observen al microscopi òptic convencional. Les seccions ultrafines es tenyeixen amb acetat d'uranil 5% (Panreac) durant 30 minuts i citrat de plom 0.4% (Electron Microscopy Science) amb NaOH 0.1N durant 10 minuts, i s'observen i fotografien al microscopi electrònic de transmissió (Zeiss EM-910) a 60-80 Kw.

### 3.3.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Per tal de determinar la presència de cèl·lules epitelials als cultius es va fer un marcatge amb un anticòs anti-citoqueratines, un marcador específic de les cèl·lules epitelials. La utilització d'un anticòs secundari unit al fluorocrom FITC va permetre la seva observació al microscopi òptic de



fluorescència. Aquest marcatge també es va realitzar sobre cèl·lules en suspensió i es va determinar el percentatge de cèl·lules epitelials mitjançant citometria de flux.

### **3.3.1.- Immunofluorescència indirecta de les cèl·lules en monocapa**

1. Es retira el medi dels pous de cultiu aspirant amb una pipeta de vidre estèril connectada a una trampa de buit i es renten amb PBS.
2. Es fixen amb una solució formada per formaldehid 3% (Merck), sacarosa 60 mM (Serva, Innogenetics) i PB 0.1M (Merck) durant 30 minuts.
3. Es renten amb PBS 10 mM durant un total de 10 minuts, fent 3 canvis de tampó.
4. Es permeabilitzen amb PBS 10 mM i tritó X100 0.1% (Sigma) durant 10 minuts.
5. Es renten durant 5 minuts amb PBS 10 mM.
6. Es bloquegen amb una solució formada per PBS 10 mM, glicina 20 mM (Serva, Innogenetics) i BSA 1% (Sigma) durant 10 minuts.
7. S'incuben en cambra humida amb un anticòs monoclonal de ratolí contra les citoqueratines 4, 5, 6, 8, 10, 13 & 18 (Chemicon, Pacisa-Giralt), diluït a una concentració final 1/20 en la mateixa solució de bloqueig, durant 45 minuts a 37°C en estufa.
8. Es fan dos rentats amb PBS 10 mM durant un total de 10 minuts, fent dos canvis de tampó.
9. S'incuben en cambra humida amb l'anticòs secundari RAM-FITC (Dako), diluït a una concentració final 1/50 en la mateixa solució de bloqueig, durant 30 minuts a 37°C en estufa.
10. Es fa un últim rentat amb PBS 10 mM durant un total de 10 minuts, fent 2 canvis de tampó.
11. S'incuba en cambra humida i a temperatura ambient amb bis-benzimida 5 µM (Sigma), un fluorocrom nuclear, durant 7 minuts.
12. Es munta en portaobjectes amb Mounting Medium (Sigma) per ser examinades al microscopi òptic de fluorescència (Leica DMR-XA).

### **3.3.2.- Immunofluorescència indirecta de les cèl·lules en suspensió**

1. Es retira el medi dels pous de cultiu aspirant amb una pipeta de vidre estèril connectada a una trampa de buit i es renten amb PBS.
2. Es tripsinitzen les cèl·lules i es dilueixen a raó de  $0.5 \times 10^6$  cel / tub.
3. Es fixen amb una solució formada per formaldehid 3%, sacarosa 60 mM i PB 0.1M durant 30 minuts.
4. Es renten amb PBS 10 mM durant un total de 10 minuts, fent 3 canvis de tampó i centrifugant 5 minuts a 200 g a cada rentat.
5. Es permeabilitzen amb PBS 10 mM i tritó X100 0.1% durant 10 minuts.
6. Es renten durant 5 minuts amb PBS 10 mM i es centrifuguen 5 minuts a 200 g.

7. Es bloquegen amb una solució formada per PBS 10 mM, glicina 20 mM i BSA 1% durant 10 minuts.
8. S'incuben amb un anticòs monoclonal de ratolí contra les citoqueratines 4, 5, 6, 8, 10, 13 & 18 (Chemicon, Pacisa-Giralt), diluït a una concentració final 1/20 en la mateixa solució de bloqueig, durant 45 minuts a 37°C en estufa.
9. Es fan dos rentats amb PBS 10 mM durant un total de 10 minuts, fent dos canvis de tampó i centrifugant 5 minuts a 200 g a cada rentat.
10. S'incuben amb l'anticòs secundari RAM-FITC (Dako), diluït a una concentració final 1/50 en la mateixa solució de bloqueig, durant 30 minuts a 37°C en estufa.
11. Es fa un últim rentat amb PBS 10 mM durant un total de 10 minuts, fent 2 canvis de tampó i es centrifuga durant 5 minuts a 200 g.
12. Una vegada resuspeses les cèl·lules amb PBS 10 mM es filtren amb un filtre de 0.50 µm (Entomopraxis) i es passen pel citòmetre de flux (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Per a l'anàlisi de les mostres mitjançant el citòmetre de flux, cada usuari estableix un protocol d'adquisició de la mostra on escull i combina els paràmetres que vol analitzar. Les dades obtingudes de cada mostra es reflecteixen en histogrames uniparamètrics o biparamètrics:

- els histogrames uniparamètrics mostren la distribució del total de cèl·lules analitzades (events) segons cada paràmetre analitzat (FS, SS, FL1, FL2, FL3, etc);
- els histogrames biparamètrics informen de la relació entre dos paràmetres determinats.

Els paràmetres que s'han utilitzat en aquest estudi són FS, SS i FL1. FS i SS s'associen amb la mida cel·lular i la complexitat citoplasmàtica, respectivament; i s'utilitzen per localitzar la població cel·lular, descartar el soroll de fons i definir la finestra d'anàlisi. FL1 correspon a la intensitat de fluorescència generada a partir de l'excitació del fluorocrom FITC, amb el qual s'han marcat les mostres.

La positivitat del marcatge es determina a partir de la comparació amb un control negatiu o isotípic, que són cèl·lules del mateix origen però que no s'han marcat amb l'anticòs específic. La fluorescència observada en la població cel·lular tenyida amb aquest anticòs permet definir un nivell de fluorescència que després es farà servir per diferenciar la població positiva que expressa l'antigen que s'estudia, de la negativa. La població negativa pot tenir certa unió inespecífica de l'anticòs. En escollir el nivell de fluorescència que discrimina els positius dels negatius o dels inespecífics, s'accepta que per damunt d'aquest nivell no hauria de quedar més de 1% de les cèl·lules del control negatiu. Una inespecificitat més elevada falsejaria la interpretació dels positius resultants després de la tinció amb l'anticòs d'interès.

### **3.4.- COCULTIU AMB ESPERMATOZOIDES**

#### **3.4.1.- Recol·lecció i preparació dels espermatozoides per cocultiu**

Per als experiments de cocultiu, es van utilitzar espermatozoides immadurs procedents del caput proximal. Per a la seva obtenció, el teixit epididimari d'aquesta regió es va posar en plaques de cultiu de 90 mm amb 10 ml de medi de cultiu RPMI 1640, es va trossejar i es va incubar durant 45 min a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> i humitat del 100%. En aquestes condicions, la majoria del contingut luminal dels túbuls epididimaris es va despendre al medi de cultiu, a causa de les contraccions del múscul que envolta el túbul. Després de la incubació, es va recollir el medi i els espermatozoides es van rentar 2 vegades durant 5 minuts a 200 g amb medi de cultiu RPMI 1640 i es van resuspendre amb 15 ml d'ECM. Els espermatozoides es van co-incubar amb cultius de cèl·lules epitelials a una concentració de  $1 \times 10^6$  spz/ml.

#### **3.4.2.- Anàlisi de les característiques dels espermatozoides**

Per estudiar l'efecte del cocultiu sobre els espermatozoides es van avaluar els canvis que experimenten els espermatozoides en relació a la motilitat, morfologia i integritat de la membrana.

##### **3.4.2.1.- Concentració**

1. Es dipositen 10 µl de la suspensió d'espermatozoides prèviament diluïda (1/10) a la cambra de Neubauer.
2. Es compten el total de cèl·lules presents a la zona de recompte de la cambra de Neubauer sota el microscopi de contrast de fases invertit i es fa el promig. Les cèl·lules comptades es converteixen en cèl·lules/ml dividint la xifra obtinguda per  $10^4$  (volum de la zona de recompte en ml) i multiplicant pel factor de dilució (1/10).

##### **3.4.2.2.- Integritat de la membrana (tinció eosina-nigrosina)**

1. Es posen 5 µl de la solució d'espermatozoides sobre un portaobjectes col·locat prèviament sobre una placa escalfadora a 37°C i es barreja amb 5 µl d'Eosina Y 1%.
2. Després de 30 segons, s'afegeix 5 µl de nigrosina 10%, es barreja i es fa l'extensió.
3. Es deixa assecar a l'aire i s'observa al microscopi de camp clar a 400 X. Es compten un total de 200 espermatozoides establint el nombre d'espermatozoides tenyits de vermell (espermatozoides morts o amb la membrana alterada) i el nombre d'espermatozoides no tenyits (espermatozoides vius o amb la membrana intacta). El percentatge d'espermatozoides amb la membrana intacta es calcula restant el nombre d'espermatozoides morts del nombre

d'espermatozoides totals i dividint la xifra obtinguda pel nombre d'espermatozoides totals. Per donar el resultat com a percentatge es multiplica tot per 100.

### 3.4.2.3.- Motilitat

1. S'incuba la solució d'espermatozoides durant 5 min a 37°C.
2. Es posen 5 µl a la cambra de Makler.
3. La motilitat dels espermatozoides s'analitza amb el programa informàtic CASA (computer-assisted sperm analysis) al microscopi òptic de contrast de fases negatiu a 100 X. Es compten un total de 200 espermatozoides per mostra.

S'han considerat espermatozoides mòbils aquells espermatozoides que tenen una trajectòria progressiva (moviment progressiu) i aquells que no són progressius però que tenen moviment del flagel (moviment vibratori).

### 3.4.2.4.- Morfologia

1. Es posen 5 µl de la solució d'espermatozoides entre un portaobjectes i un cobreobjectes.
2. S'observa amb el microscopi òptic de contrast de fases positiu a 200X i s'analitza amb el programa CASA. Es compten un total de 1000 espermatozoides i es classifiquen segons la seva morfologia.

S'ha seguit la següent classificació morfològica: espermatozoides amb gota proximal, espermatozoides amb gota distal, espermatozoides sense gota i espermatozoides anormals, considerant com a anormals tots aquells espermatozoides que presenten anomalies en la forma i mida del cap i/o en la longitud i forma del flagel.

## 3.5.- ANÀLISI DE PROTEINES

### 3.5.1.- Marcatge amb [<sup>35</sup>S] metionina-cisteïna

El marcatge amb [<sup>35</sup>S] metionina-cisteïna permet estudiar les proteïnes sintetitzades *de novo* i secretades per les cèl·lules durant el període d'incubació.

1. Es retira el medi dels pous de cultiu aspirant amb una pipeta de vidre estèril connectada a una trampa de buit.
2. Es renten les cèl·lules amb DMEM- (Gibco). Aquest rentat permet eliminar les restes de medi amb sèrum que queden al cultiu, les proteïnes del qual podrien emmascarar els resultats.

3. S'afegeix als pous DMEM- suplementat amb 100  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ] (In vitro Cell Labelling Mix, Redivue PRO-MIX) i s'incuba durant 4h a la temperatura de cultiu.
4. Es recull el medi i es centrifuga en un tub estèril a 15000 g durant 5 minuts.
5. Es guarda el sobrenedant a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al moment de la seva utilització.

### 3.5.2.- Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS ha estat un mètode utilitzat de manera rutinària per a la determinació del contingut proteic de cadascuna de les fraccions cel·lulars, ja que separa les proteïnes en funció de la seva massa molecular. Concretament en aquest treball s'ha utilitzat per a la determinació del contingut proteic present al medi de cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries de *Sus domesticus in vitro*.

#### 3.5.2.1. Electroforesi unidimensional

Les electroforesis unidimensionals es van realitzar amb l'aparell d'electroforesi Mini-Protean II (Bio-Rad) utilitzant gels de dimensions 8.6 x 6.8 cm. Els gels separadors tenien un gradient d'acrilamida 6-16%.

##### Preparació dels gels:

1. Es prepara el gel separador amb gradient d'acrilamida 6-16%.

Gel de separació (per a 2 gels)	6%	16%
Solució L2X	1.3 ml	1.3 ml
Acilamida 30% (Carl Roth, GmbH i Co)	1 ml	2.7 ml
Glicerol bidestil·lat (Merck)	0 ml	1 ml
Aigua destil·lada	2.7 ml	0 ml
<b>Desgasificar</b>		
Persulfat 10% (Sigma)	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
Temed (Sigma)	4 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$

La solució L2X es prepara dissolent 72.6 gr de TrisHCl (Sigma) i 1.6 gr d'SDS (Sigma) en aigua destil·lada fins a 200 ml. S'ajusta el pH a 8.8 amb HCl.

2. Es prepara l'aparell d'electroforesi i s'aboca la dissolució del gel separador en el suport evitant la formació de bombolles. El gradient es forma mitjançant la utilització de vasos

comunicants. Amb una pipeta Pasteur s'afegeix una capa fina de butanol per tal de facilitar la polimerització i permetre que el front del gel no es deformi i no es formin bombolles. Es deixa polimeritzar uns 30-50 min. Després es renta amb aigua i s'eliminen les gotes d'aigua amb un paper secant.

3. Es prepara el gel concentrador.

<b>Gel de concentració (per a 2 gels)</b>	
Solució M	1.25 ml
Acrilamida 30%	0.75 ml
Aigua destil·lada	3 ml
Persulfat 10%	50 µl
Temed	5 µl

La solució M es prepara dissolent 12 gr de TrisHCl, 0.8 gr d'SDS en aigua destil·lada fins a 200 ml. S'ajusta el pH a 6.8 amb HCl.

4. S'aboca el gel concentrador sobre el gel de separació ja polimeritzat, es col·loca la pinta per fer les diferents butxaques i es deixa polimeritzar uns 10 min.

#### Preparació de les mostres:

Les mostres es barregen amb blau reductor (a la dilució convenient) i es fan bullir al bany maria durant 5 min abans d'ésser carregades al gel.

Es prepara blau barrejant 2ml de Tris (0.5M, pH 6.8), 1.6 ml de glicerol bidestil·lat, 0.32 gr d'SDS, 0.05 gr de blau de bromofenol (Sigma) i 3.6 ml d'aigua destil·lada. El pH s'ajusta a 6.8 amb HCl. El Blau reductor es prepara després afegint 25 µl de β-mercaptoetanol (Sigma) a 500 µl de blau.

#### Electroforesi:

1. S'omple la cubeta d'electroforesi amb tampó d'electroforesi 1X, evitant la formació de bombolles en l'extrem inferior dels gels per tal d'impedir que aquestes puguin afectar el corrent electroforètic de les mostres.

Es prepara també d'electroforesi 10X dissolent 30.2 gr de Tris, 144 gr de glicina i 10 gr d'SDS en aigua destil·lada fins a 1 litre. Cal filtrar abans d'utilitzar. El tampó d'electroforesi 1X es prepara després barrejant 100 ml de tampó 10X amb 900 ml d'aigua destil·lada.

2. Es carreguen les mostres i es fa córrer el gel a temperatura ambient i amb una intensitat de corrent de 20 mA (180- 200 w). S'atura quan el colorant blau ha migrat completament.

### 3.5.2.2- Electroforesi bidimensional

L'electroforesi bidimensional es basa en la combinació de les tècniques d'isoelectroenfoc, que separen les proteïnes segons els seu punt isoelèctric i l'SDS-PAGE, que separa les proteïnes en funció de la seva massa molecular. El resultat final no és un gel amb bandes sinó amb "spots", cadascun dels quals correspon amb una proteïna de diferent massa molecular i punt isoelèctric.

#### 3.5.2.2.1.- Isoelectroenfoc (1a dimensió)

L'isoelectroenfoc es va realitzar mitjançant gels d'acrilamida 4% preparats dins unes baretes de vidre de 14 cm de longitud i 1.5 mm de diàmetre intern anomenades "slab gels".

##### Preparació dels "slab gels":

1. Es prepara el gel d'acrilamida.

Urea (Sigma)	4.4 gr
Acrilamida 30%	1.06 ml
Aigua destil·lada	3.36 ml
Amfolites pH 3-10 (Pharmacia)	200 µl
Amfolites pH 2-11 (Servalytes)	200 µl
Chaps (Fluka)	160 mg
<b>dissoldre i desgasificar</b>	
Persulfat 10%	16 µl
Temed	10 µl

2. Es posa el gel d'acrilamida a l'interior d'una cubeta amb les baretes de vidre i aigua destil·lada. El gel d'acrilamida puja per capil·laritat dins les baretes de vidre.
3. Es deixa polimeritzar un mínim de 3 h.

Preparació de les mostres:

Les mostres es barregen amb la solució A formada per dithioerythritol 0.15 M (Sigma) i 10% SDS, i es fan bullir al bany maria durant 5 min. Un cop fredes, es barregen amb la solució B que conté urea 9.2 M, dithioerythritol 0.1 M i 2% chaps.

Electroforesi:

- Es munten els "slabs gels" ja polimeritzats al seu suport i s'afegeixen les corresponents solucions amortidores a l'ànode i al càtode:
  - Solució àcida (ànode): 25 mM  $H_3PO_4$
  - Solució bàsica (càtode): 0.1 M NaOH
- Es dipositen les mostres a la part superior dels "slab gels" (càtode).
- Es connecta l'aparell i es fan córrer els gels en 2 fases:

Fase	Voltatge	mA	Temps (h)	Vh
1	700	20	20	10000
2	3000	20	2	2000

**3.5.2.2.2. Electroforesi (2a dimensió)**

Les SDS-PAGE es van realitzar amb l'aparell d'electroforesi Protean II xi (Bio Rad) utilitzant gels d'acrilamida de dimensions 16 x 20 cm.

Els gels separadors tenien un gradient d'acrilamida 6-16%.

Preparació dels gels:

- Es prepara el gel separador amb gradient d'acrilamida 6-16%.

Gel de separació (per a 2 gels)	6%	16%
Solució L2X	3.5 ml	3.5 ml
Acilamida 30%	5.7 ml	15.1 ml
Glicerol bidestil·lat	1.5 ml	5.8 ml
Aigua destil·lada	17.7 ml	3.9 ml
<b>Desgasificar</b>		
Persulfat 10%	82.2 µl	82.2 µl
Temed	25 µl	25 µl



2. Es prepara l'aparell d'electroforesi i s'aboca la dissolució del gel separador al suport evitant la formació de bombolles. El gradient es forma mitjançant la utilització de vasos comunicants. Amb una pipeta Pasteur s'afegeix una capa fina de butanol per tal de facilitar la polimerització i permetre que el front del gel no es deformi i no es formin bombolles. Es deixa polimeritzar unes quantes hores. Després es renta amb aigua i s'elimina les gotes l'aigua amb un paper secant.
3. Es prepara el gel concentrador.

<b>Gel de concentració (per a 2 gels)</b>	
Solució M	5 ml
Acrilamida 30%	3 ml
Aigua destil·lada	12 ml
Persulfat 10%	60 µl
Temed	40 µl

4. S'aboca el gel concentrador sobre el gel de separació ja polimeritzat, i es deixa polimeritzar uns 10 min.

#### Electroforesi:

1. S'omple la cubeta d'electroforesi amb tampó d'electroforesi 1X, evitant la formació de bombolles en l'extrem inferior dels gels, les quals podrien afectar el corrent electroforètic de les mostres.
2. Es posa el "slab gel" a la superfície superior del gel d'acrilamida (1.5 mm gruix) amb tampó d'electroforesi i es cobreix amb 250 µl de blau reductor. Cada "slab gel", que correspon a una mostra, es posa en un gel d'acrilamida.
3. Es fa córrer el gel a temperatura ambient i amb una intensitat de corrent de 50 mA / gel. S'atura quan el colorant blau ha migrat completament.

### **3.5.3. Tinció dels gels de poliacrilamida**

Per a la visualització de les bandes i "spots" de proteïnes dels gels de poliacrilamida s'han emprat dos sistemes de tinció: la tinció amb blau de Comassie i la tinció amb plata. La tinció amb blau de Comassie permet detectar fins a 0.3-1 µg per banda de proteïna, mentre que la tinció amb plata és molt més sensible i permet detectar fins a 0.2-0.6 ng per banda. En ambdós casos tots els passos es duen a terme a temperatura ambient i agitació suau.

Tinció amb blau de Comassie:

1. Es tenyeix el gel amb una solució formada per blau de comassie (Comassie Brilliant Blue R, Merck) i àcid acètic 20% (1:1) durant 15-20 min.
2. Es retira la solució de tinció i es realitza un rentat amb una solució d'etanol, aigua destil·lada i àcid acètic (3:6:1) per tal d'eliminar l'excés de colorant.

Tinció amb plata:

1. Es fixa el gel amb tampó I format per 50% etanol, 12% àc. acètic i 0,5 ml/l formaldehid 37% durant 1 h amb agitació suau.
2. Es fan 3 rentats de 20 min cadascun amb tampó II format per 50% etanol i 50% aigua destil·lada.
3. Es tracta durant 1 min amb tampó III format per 0.2 gr/l  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
4. Es fan 3 rentats de 20 seg cadascun amb aigua destil·lada.
5. Es tenyeix amb una solució de plata formada per 2 gr/l  $\text{AgNO}_3$  i 0.75 ml/l formaldehid 37% durant 20 min en agitació suau.
6. Es fan 2 rentats de 20 seg cadascun amb aigua destil·lada.
7. Es revela amb tampó IV format per 60gr/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1 ml/l formaldehid 37% i 4mg/l  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en fins a l'aparició de coloració.
8. Es fan 2 rentats de 2 min cadascun amb aigua destil·lada.
9. S'atura la reacció amb tampó V format per 50% metanol i 12% ac. acètic.

**3.5.4. Lectura de la radioactivitat**

La tinció dels gels amb blau de Comassie o plata permet visualitzar totes les proteïnes presents al gel d'electroforesi, però per distingir les proteïnes sintetitzades *de novo*, que estan marcades radioactivament, s'han d'utilitzar tècniques autoradiogràfiques. En aquest treball s'han utilitzat dues tècniques, el revelat amb films de raigs X (Kodak X-Omat AR film, Sigma) i l'exposició sobre una pantalla de fòsfor (Phosphor-Imaging screen). Per dur a terme qualsevol d'aquestes tècniques primer cal assecar els gels en una màquina de buit durant 1 h a 60°C.

En la primera tècnica, els gels, assecats prèviament, es posen en contacte directe amb el film i es guarden a -80°C en foscor absoluta. Després de varis dies els films es revelen en una cambra fosca amb una solució de revelat (KODAK D-19 Developer, Sigma) i una solució fixadora (KODAK Fixer, Sigma).

En la segona tècnica, els gels, assecats prèviament, es posen en contacte amb una pantalla de fòsfor durant 24h en foscor. La radioactivitat present a la pantalla es digitalitza mitjançant el

sistema informàtic Storm (Molecular Dynamics). Les pantalles de fòsfor són 10-100 vegades més sensibles que els films.

### **3.6.- ANÀLISI D'ÀCIDS NUCLEICS**

Per analitzar la presència de diversos gens que codifiquen per proteïnes específiques de les diferents regions de l'epidídim de porcí es va extreure l'RNA de les cèl·lules en cultiu i es va transformar a cDNA mitjançant l'enzim transcriptasa inversa. Posteriorment es va amplificar per PCR i es van separar i visualitzar en gels d'agarosa.

#### **3.6.1.- Extracció d'RNA total**

La quantitat total d'RNA de les cèl·lules en cultiu es va aïllar usant el kit d'extracció RNable (Eurobio). RNable és una solució monofase que conté fenol i tiocianat de guanidina. La mostra biològica s'homogeneïtza amb l'RNable i l'homogenat és separat en fase aquosa i orgànica mitjançant l'addició de cloroform. La subsegüent centrifugació separa eficientment el DNA i les proteïnes de la fase aquosa que conté l'RNA. L'RNA pur i no degradat s'obté de la fase aquosa per la precipitació amb isopropanol i rentat amb etanol. L'RNA aïllat és útil per realitzar Northern blott, RT-PCR, y altres tècniques moleculars. En aquest treball es va utilitzar per RT-PCR.

1. Es retira el medi de cultiu dels pous i es renta amb 1 ml PBS.
2. Es tripsinitza la monocapa de cèl·lules amb 350 µl tripsina/pou durant 15 min a 37 °C.
3. Es posa la suspensió de cèl·lules obtinguda ( $\pm 10^6$  cel/ml) en un eppendorf i es renta amb 1 ml de PBS centrifugant 5 min a 500 g. Es descarta el sobrenedant.
4. S'afegeix 0.4 ml RNable i 40 µl cloroform.  
(Quan es tracta de cultiu de fragments, el teixit es tritura directament amb la solució de 0,4 ml RNable i 40 µl cloroform).
5. S'agita exhaustivament i s'incuba 5 min a 4 °C.
6. Es centrifuga durant 15 min a 12000 g (4°C).
7. Es recull la fase aquosa (fase superior), s'afegeix un volum igual d'isopropanol i s'agita per inversió.
8. S'incuba 15 min a t<sup>a</sup> ambient.
9. Se centrifuga durant 5 min a 12000 g (4°C) i s'elimina el sobrenedant.
10. Es resuspen amb 1 ml etanol 75% fred i s'agita exhaustivament.
11. Se centrifuga durant 5 min a 7500 g (4°C) i s'elimina el sobrenedant.
12. Es repeteixen els darrers 2 passos dues vegades.
13. Es deixa assecar el sediment a l'aire i es resuspen amb 10 µl d'aigua.
14. Es guarda a -80°C fins al moment de la seva utilització.

### 3.6.2.- Estimació de la concentració de RNA

L'estimació de la quantitat de RNA obtingut de les cèl·lules en cultiu es va fer mitjançant la determinació espectrofotomètrica. Aquest mètode és senzill i ràpid i consisteix en mesurar l'absorbància a 260 nm i a 280 nm de la dissolució de RNA de la qual es vol determinar la concentració mitjançant un espectrofotòmetre. El quocient entre l'abs 260 nm i l'abs 280 nm proporciona una mesura analítica de la puresa del RNA. Es considera que la mostra de RNA és pura quan  $A_{260}/A_{280}$  està entre 1.5 i 1.9. La concentració de RNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) es calcula multiplicant l'abs 260 nm pel factor de dilució i per 40 i dividint la xifra obtinguda per 1000. En aquest treball es va realitzar una dilució 1/50 (1  $\mu\text{l}$  de la dissolució de RNA i 49  $\mu\text{l}$  d'aigua miliQ estèril).

### 3.6.3.- Transcripció reversa (RT)

Donat que l'RNA és de cadena senzilla i és sensible a les elevades temperatures, és necessari fer una transcripció reversa (RT) abans de començar la amplificació per PCR. La transcripció reversa genera una còpia de la cadena d'RNA, que és DNA complementari (cDNA) el qual és estable a les altres temperatures i pot resistir la metodologia de la PCR.

1. Es barregen 2  $\mu\text{g}$  de l'ARN obtingut amb 2  $\mu\text{l}$  oligo dT (oligo (dT) 15 Primer, Promega), 2  $\mu\text{l}$  dNTP 5mM (Invitrogen) i s'afegeix aigua destil·lada fins a 12  $\mu\text{l}$ .
2. S'incuba a 70 °C durant 5 min.
3. S'incuba a 4 °C durant 5 min.
4. S'afegeixen 4  $\mu\text{l}$  tampó 5X (Invitrogen), 2  $\mu\text{l}$  DTT (Invitrogen) i 1  $\mu\text{l}$  RNAsine (Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, Promega).
5. S'incuba a 42 °C durant 2 min.
6. S'afegeix 1  $\mu\text{l}$  d'enzim RT (superscript II reverse transcriptase RNase H-, Invitrogen).
7. S'incuba a 42 °C durant 50 min.
8. S'incuba a 70 °C durant 15 min.
9. S'incuba a 4 °C durant 5 min.

### 3.6.4.- Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction o PCR) és un mètode ràpid per a l'amplificació enzimàtica *in vitro* de fragments específics de DNA. En la PCR hi ha tres passos, la desnaturalització de la doble cadena de DNA, la unió dels encebadors i la síntesi de DNA dirigida per una DNA polimerasa resistent a elevades temperatures.

En aquest treball la PCR es va utilitzar per a l'amplificació de diversos gens presents a les cèl·lules epitelials epididimàries de porcí, mitjançant la utilització d'encebadors sintetitzats específicament per a aquesta tasca i que es detallen a continuació.

Barreja de la reacció:

Tampó de la polimerasa (10X) (Invitrogen)	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen)	1 µl
dNTP 5mM (Invitrogen)	2 µl
cDNA obtingut	2 µl
oligonucleòtid "Forward" (300 µM)	1 µl
oligonucleòtid "Reverse" (300 µM)	1 µl
Aigua mili-Q estèril	14.5 µl
Enzim DNA polimerasa (1/10) (Eurogentec)	1 µl

Els oligonucleòtids utilitzats han estat sintetitzats per Eurogentec:

Gen	Forward	Reverse
Train A	5'-GAG-GAA-AGT-GAT-CAG-CTA-CTG-AGT-GAG-3'	5'-GCT-CTG-AGC-ATC-TTG-TTT-CCT-CC-3'
GPX	5'-GAC-GTG-ACA-GGC-ACC-ATC-TA-3'	5'-GGG-AAA-GCC-CAA-CAC-AAC-TA-3'
Hexo	5'-TTC-CCT-GTG-ATC-CTT-TCT-GC-3'	5'-TTG-CTC-GAG-GCC-ATA-GTC-TT-3'
Clus	5'-CCA-GCC-CTT-CTT-CGA-CA-3'	5'-CAG-AGT-GAT-GGG-GTA-GGA-3'
HE1	5'-GAG-AGG-AGG-GCA-TGA-GAA-TG-3'	5'-CCA-GCT-AGT-GGG-ATG-TGG-TT-3'
Cyclo	5'-TAA-CCC-CAC-CGT-CTT-CTT-3'	5'-TGC-CAT-CCA-ACC-ACT-CAG-3'
AR	5'-GCA-ACT-TCT-TCA-GCA-GCA-3'	5'-GGG-TGC-TAC-ATC-GTC-CA-3'

Programa (termociclador):

1. Denaturalització	94 °C	3 min
2. 20-25 cicles:	94 °C	45 seg (denaturalització)
	55 °C	45 seg (unió)
	72 °C	1 min (extensió)
3. Extensió	72°C	5 min
4. Conservació	4°C	indefinidament

### 3.6.5.- Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

Aquesta tècnica es va utilitzar per visualitzar la presència/absència dels diferents gens epididimaris estudiats a les cèl·lules epitelials en cultiu després de la seva amplificació mitjançant PCR. Per la longitud dels fragments que es volien visualitzar el percentatge d'agarosa utilitzat era sempre de 1.5 %.

#### Preparació del gel d'agarosa 1.5 %:

1. Es barreja 0.45 gr d'agarosa (Sigma) i 30 ml d'amortidor TAE 1X.  
Es prepara amortidor TAE 10X dissolent 48.4 gr de Tris-base, 11.42 ml d'àcid acètic i 7.44 gr de Na<sub>2</sub>EDTA en aigua destil·lada fins a 1 litre. L'amortidor TAE 1X es prepara després barrejant 100 ml de TAE 10X amb 900 ml d'aigua destil·lada.
2. Es fa arrencar el bull al microones per fondre l'agarosa i es deixa refredar sota l'aixeta.
3. S'afegeix 1.5 µl de bromur d'etidi 10 mg/ml i es barreja. El bromur d'etidi serveix per tenyir els àcids nucleics durant el procés electroforètic i poder-los visualitzar posteriorment sobre un transil·luminador UV.
4. Es posa la solució al suport d'electroforesi i es deixar polimeritzar. En el procés d'abocar l'agarosa cal anar en compte que no es formin bombolles que podrien interferir el posterior corriments de les mostres.

#### Preparació de les mostres:

Es barregen 5µl de les mostres obtingudes en la PCR amb 2µl de blau de bromofenol i 5µl d'aigua destil·lada. El colorant blau de bromofenol és necessari per visualitzar el corriments de les mostres.

#### Electroforesi:

1. S'omplen les cubetes d'electroforesi (Mini-Sub Cell GT, Bio Rad) amb tampó TAE 1X.
2. Es carreguen les mostres al gel d'agarosa. Juntament amb les mostres es carreguen els marcadors de massa molecular adequats, els quals es dilueixen de manera similar a les mostres: es barregen 3µl del marcador amb 2µl de colorant i 7µl d'aigua destil·lada.
3. Es fa migrar el gel utilitzant un voltatge de 80-100 V. L'electroforesi s'atura quan el colorant assoleix els ¾ del recorregut del gel.
4. Els gels s'observen sobre un transil·luminador UV (TFX-20.M, Vilber Lourmat) i es fotografien (Camera System Polaroid MP4+).



# **4 RESULTATS**





# **ARTICLE I:**

**In vitro culture of epithelial cells from the caput,  
corpus and cauda epididymis of *Sus domesticus***



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Theriogenology 62 (2004) 929–942

[www.elsevier.com/locate/theriogenology](http://www.elsevier.com/locate/theriogenology)

Theriogenology

## In vitro culture of epithelial cells from the caput, corpus, and cauda epididymis of *Sus domesticus*

Judit Bassols<sup>\*</sup>, Elisabeth Kádár, M Dolors Briz, Elisabeth Pinart, Sílvia Sancho, Núria Garcia-Gil, Elena Badia, Anna Pruneda, Eva Bussalleu, Marc Yeste, Sergi Bonet

*Biotechnology of Porcine Reproduction, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Girona, Campus Montilivi sn, 17071 Girona, Spain*

Received 6 August 2003; received in revised form 10 December 2003; accepted 14 December 2003

### Abstract

This work describes a protocol to culture epididymal epithelial cells from the caput, corpus, and cauda regions of *Sus domesticus*. Epididymal epithelial fragments were obtained by dissection and enzymatic digestion with collagenase. About 30 epididymal fragments from each epididymal region were cultured in 24-well culture plates with supplemented RPMI-1640 medium at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in air, and 100% humidity. A confluent monolayer of polygonal and tightly packed epithelioid cells from the three epididymal regions was obtained after 12–16 days in culture and maintained in vitro for more than 60 days. The proportion of epididymal epithelial cells in these cultures was assessed by immunofluorescent staining for cytokeratins. Throughout the 2 months of culture, about 80% of the cells were cytokeratin-positive. Electron microscopy observations indicated that cultured cells from caput, corpus, and cauda epididymal regions were tightly adhered to each other by junctional complexes and that stereocilia were present in their apical membranes. Moreover, the presence of an extensive rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and numerous vesicles in the cytoplasm suggested that cultured cells maintained secretory and absorptive activities. These results show that the epididymal epithelial cells in culture from *S. domesticus* retain some fundamental features that characterize the epididymal epithelium in the intact organ. This system might be a valuable tool for studying the mechanism of sperm maturation in vitro, including epididymal cell secretions and the analysis of regional differences.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Boar; *Sus domesticus*; Epididymis; Epithelium; Epithelial cells; In vitro culture; Ultrastructure

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +34-972418366; fax: +34-972418150.

E-mail address: [judit.bassols@udg.es](mailto:judit.bassols@udg.es) (J. Bassols).

## **ARTICLE II:**

**Effect of culture conditions on the obtention of boar epididymal epithelial cell monolayers**



ELSEVIER

Animal Reproduction Science xxx (2005) xxx–xxx

---

---

**ANIMAL  
REPRODUCTION  
SCIENCE**

---

---

www.elsevier.com/locate/anireprosci

## Effect of culture conditions on the obtention of boar epididymal epithelial cell monolayers

J. Bassols\*, E. Kádár, M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. Garcia-Gil,  
E. Badia, A. Pruneda, E. Bussalleu, M. Yeste, I. Casas, S. Bonet

*Biotechnology of Porcine Reproduction, Department of Biology, INTEA, Faculty of Sciences, University of Girona,  
Campus Montilivi s/n, 17071 Girona, Spain*

Received 29 July 2005; received in revised form 30 September 2005; accepted 11 October 2005

---

### Abstract

The goal of this study was to investigate the effect of the collagenase digestion time, the initial density of fragments and the culture temperature on the obtention of a boar epididymal epithelial cell culture, which is a useful methodology for the study of epididymal functions. A confluent monolayer of caput, corpus and cauda epididymal epithelial cells was only obtained when an adequate enzymatic digestion of the connective tissue surrounding the epididymal tubule was performed. For the correct digestion of caput and corpus fragments two collagenase digestions of 2 and 1 h, respectively, were enough. Cauda fragments, however, needed two collagenase digestions of 3 h each. A confluent monolayer of caput, corpus and cauda epididymal epithelial cells was obtained regardless of the initial density tested (15, 30, 60 and 90 fragments/well). However, cultures originated from 15 and 30 fragments/well showed higher cell concentration during the first 2 weeks of culture than cultures originated from 60 and 90 fragments/well. A confluent monolayer of caput, corpus and cauda epididymal epithelial cells was obtained at both 32 and 37 °C, but at 32 °C cells grew very slowly and confluence was not reached until a week later than it was with cells growing at 37 °C. In conclusion, we have observed that the time of digestion with collagenase is an important factor for the successful establishment of boar epididymal cell monolayers, and that the initial density of fragments and the culture temperature should be taken into account.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Boar; Epididymis; Epithelial cell monolayers; Collagenase digestion; Culture temperature

---

\* Corresponding author. Tel.: +34 972418366; fax: +34 972418150.

E-mail address: judit.bassols@pas.udg.es (J. Bassols).

## **ARTICLE III:**

**Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures**



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Theriogenology

Theriogenology 64 (2005) 1995–2009

[www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the](http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the)

# Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures

## Evaluation of boar sperm maturation in vitro

J. Bassols<sup>a,\*</sup>, E. Kádár<sup>a</sup>, M. Briz<sup>a</sup>, E. Pinart<sup>a</sup>, S. Sancho<sup>a</sup>,  
N. Garcia-Gil<sup>a</sup>, E. Badia<sup>a</sup>, A. Pruneda<sup>a</sup>, E. Bussalleu<sup>a</sup>,  
M. Yeste<sup>a</sup>, I. Casas<sup>a</sup>, J.L. Dacheux<sup>b</sup>, S. Bonet<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Biotechnology of Porcine Reproduction, Department of Biology, INTEA, Faculty of Sciences,  
University of Girona, Campus Montilivi s/n, 17071 Girona, Spain*

<sup>b</sup> *Equipe "Gamète Mâle et Fertilité" UMR 6175 INRA-CNRS-Université, PRC,  
INRA, 37380 Nouzilly, France*

Received 13 January 2005; received in revised form 29 March 2005; accepted 1 May 2005

---

### Abstract

Boar sperm from the proximal caput epididymis were co-incubated with 1, 4, 7, 10 and 14-day old caput, corpus and cauda epididymal cultures for 24, 48 and 72 h. Boar kidney epithelial cells (LLC-PK1) and ECM alone were used as negative controls. Sperm motility, morphology and membrane integrity were studied to evaluate boar sperm maturation in vitro. Our results showed that epithelial cell monolayers (10, 14-day old) create a suitable microenvironment for the survival of proximal caput sperm and the maintenance of sperm motility over a 72 h period. Moreover, corpus epididymal tubule fragments in culture (1, 4-day old) are capable of promoting the migration of the cytoplasmic droplet along the sperm tail after 24 h of co-incubation.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Boar; Epididymal culture; Sperm motility; Membrane integrity; Cytoplasmic droplet

---

\* Corresponding author. Tel.: +34 972418366; fax: +34 972418150.

E-mail address: [judit.bassols@udg.es](mailto:judit.bassols@udg.es) (J. Bassols).

# **ARTICLE IV:**

**Secretory activity of epididymal tubules and cells  
in culture: a comparative study and proteomic  
approach**



## Secretory activity of epididymal tubules and cells in culture: a comparative study and proteomic approach

Judit Bassols<sup>\*(1)</sup>, Sergi Bonet<sup>(1)</sup>, Françoise Dacheux<sup>(2)</sup>, Jean-Louis Dacheux<sup>(2)</sup>

*(1) Biotechnology of Porcine Reproduction, Department of Biology, Faculty of Sciences,  
University of Girona, Campus de Montilivi, s/n, 17071 Girona, Spain.*

*(2)Equipe "Gamètes Mâles et Fertilité" UMR 6175 INRA-CNRS, 37 380 Nouzilly, France*

---

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the function of a culture system involving intact epididymal tubule fragments and epididymal epithelial cell monolayers from different regions of the boar epididymis using a proteomic approach. The secretory activity of intact proximal and middle caput epididymal fragments and caput, corpus and cauda epithelial cell monolayers was examined during different days of culture. The effects of androgens and temperature on protein secretion were also studied. Our results showed that caput, corpus and cauda epithelial cell monolayers secreted several proteins over 28 days and maintained the transcription of some epididymal-specific genes, but no differences were observed between epididymal regions and days of culture. Their pattern of secretion differed from those reported to be secreted *in vivo* and was similar to that obtained with a pig kidney epithelial cell line (LLC-PK1). In contrast, intact boar epididymal tubules fragments in culture were able to reproduce the environment present in the *in vivo* epididymis for 2-4 days. From day 4 the content of these proteins decreased and some of them began to disappear. The RNA messenger of these proteins behaved in the same way. The secretory patterns of both culture systems (intact epididymal fragments and epididymal epithelial cell monolayers) were the same, regardless of the culture conditions, and did not retain the androgen responsiveness despite the presence of the androgen receptor mRNA, nor did the presence of testicular factors (RTF) modify their secretory pattern.

*Keywords:* Boar, Epididymis, Cell culture, Proteins

---

\*Corresponding author. Tel.: +34-972418366; fax: +34-972418150.

E-mail address: [judit.bassols@pas.udg.es](mailto:judit.bassols@pas.udg.es)

# **5 DISCUSSIÓ GENERAL**



El desenvolupament de sistemes de cultiu *in vitro* de les cèl·lules epitelials epididimàries ha progressat molt durant les últimes dues dècades. Els primers intents de cultivar l'epiteli epididimari al laboratori es basaven en el cultiu de l'òrgan (Orgebin-Crist i Jahad, 1979; Tezon i Blaquier, 1981; Klinefelter i Hamilton, 1984). En aquests cultius les cèl·lules epitelials mantenien l'activitat secretora i induïen alguns canvis implicats en la maduració espermàtica, però només es mantenien viables i funcionals durant curts períodes de temps. Un mètode alternatiu va ser el cultiu de cèl·lules epitelials aïllades, obtingudes a partir de processos enzimàtics que reduïen el teixit epitelial a una suspensió de cèl·lules independents (Kierszenbaum i col., 1981; Klinefelter i col., 1982; Olson i col., 1982; Wagley i col., 1984; Joshi, 1985; Byers i col., 1985; Byers i col., 1986). Aquest mètode implicava la pèrdua de l'arquitectura original de l'epiteli i dels components de la matriu extracel·lular i provocava una mala adhesió i una baixa supervivència de les cèl·lules epitelials en cultiu. Actualment la majoria de mètodes de cultiu de l'epiteli epididimari es basen en la utilització de fragments o plaques d'epiteli obtingudes a partir de successives digestions amb col·lagenasa. Aquesta tècnica permet la formació de monocapes confluents on les cèl·lules epitelials epididimàries romanen polaritzades i mantenen les seves característiques morfològiques i la seva capacitat de sintetitzar i secretar proteïnes durant llargs períodes de temps (Cooper i col., 1989, 1990; Byers i col., 1992; Moore i col., 1992; Akhondi i col., 1997; Carballada i Saling, 1997; Chen i col., 1998; Gagnon i col., 2000; Kirchhoff i col., 2000; Sun i col., 2000; Lin i col., 2000, 2002).

En aquest treball s'han desenvolupat dos mètodes simples i ràpids pel cultiu de les cèl·lules epitelials de les tres regions de l'epidídim de *Sus domesticus*. Un es basa en el cultiu de fragments del túbul epididimari intactes durant una setmana. L'altre mètode es basa en el cultiu de fragments del túbul epididimari digerits amb col·lagenasa, els quals, després d'una setmana, donen lloc a la formació d'una monocapa confluent de cèl·lules epitelials epididimàries. En ambdós casos, s'ha avaluat el nivell de preservació de les característiques epididimàries de les cèl·lules epitelials en cultiu, mitjançant l'estudi de l'estructura i ultraestructura cel·lular; la presència de diverses proteïnes específiques segregades per l'epiteli epididimari de porcí *in vivo*, i els seus corresponents ARNs; i la capacitat dels cultius per mantenir la viabilitat espermàtica i promoure alguns canvis característics de la maduració epididimària com canvis morfològics o l'adquisició de la motilitat espermàtica.

Per l'obtenció de monocapes confluents de cèl·lules epitelials a partir dels fragments epididimaris, el teixit connectiu que envolta els fragments de túbul s'elimina mitjançant microdissecció i successives digestions amb col·lagenasa. La col·lagenasa degrada el teixit connectiu que queda al voltant dels fragments, i permet la seva adhesió a la base de la placa de cultiu. Probablement, el tractament enzimàtic també modifica les interaccions entre les cèl·lules de l'epiteli epididimari,

i indueix la pèrdua de contacte entre les cèl·lules i activa la seva divisió. Aquest fet permet la migració de les cèl·lules epitelials cap a l'exterior dels fragments i la formació de la monocapa confluent. S'ha observat que si els fragments epididimaris no es digereixen amb col·lagenasa o el temps de digestió és insuficient, els fragments no s'adhereixen a la placa de cultiu i no es forma la monocapa cel·lular.

El període de digestió amb col·lagenasa varia segons les espècies i la regió epididimària. En rosegadors, els fragments epididimaris del caput, corpus i cauda es digereixen amb 10 mg/ml de col·lagenasa durant 2h (Moore i col., 1986; Bongso i Trounson, 1996); en boví es digereixen amb 1.5-2.5 mg/ml de col·lagenasa durant 2h (Gagnon i col., 2000; De Pauw i col., 2003), i en marsupials amb 5 mg/ml de col·lagenasa durant 6h (Lin i col., 2000). En humà, els fragments epididimaris del caput i corpus es digereixen amb 2.5 mg/ml de col·lagenasa durant 8-12h, però els fragments epididimaris del cauda no es poden digerir adequadament perquè la beina músculo-conjuntiva que envolta aquesta regió epididimària és molt gruixuda (Akhondi i col., 1997). Seguint el procediment utilitzat pel cultiu de l'epiteli del conducte eferent de porcí (Heiniger i col., 1996), en aquest treball, els fragments del caput, corpus i cauda epididimari s'han digerit mitjançant dos incubacions consecutives amb 300 U/ml (30 mg/ml) i 150 U/ml (15 mg/ml) de col·lagenasa respectivament. S'ha observat que els fragments de caput i corpus requereixen períodes similars de digestió amb col·lagenasa (2h en la primera digestió i 1h en la segona), en canvi, ha estat necessari augmentar el temps amb col·lagenasa per digerir correctament els fragments de cauda (3h en la primera digestió i 3h en la segona). Aquest fet s'explicaria perquè la quantitat de teixit connectiu que envolta el conducte epididimari a la regió caudal és superior que en les regions del caput i corpus (Stoffel i Friess, 1994).

El temps requerit perquè els fragments epididimaris digerits amb col·lagenasa s'adhereixin a la placa de cultiu i es formi una monocapa confluent també divergeix segons les espècies. Mentre que en porcí els fragments epididimaris s'adhereixen a la placa de cultiu entre les primeres 36 i 72 hores, en marsupial els fragments s'adhereixen després de 24-48 hores (Lin i col., 2000), en toro després de 12 hores (Gagnon i col., 2000), en rates al cap d'unes 18 hores (Chen i col., 1998), i en humans tarden entre 3 i 6 dies (Cooper i col., 1990; Akhondi i col., 1997). Igualment, les monocapes de cèl·lules epitelials epididimàries, arriben a una confluència del 80-90% al cap de 12-16 dies en porcí, entre 3-7 dies en marsupials (Lin i col., 2000) i rosegadors (Cooper i col., 1989; Byers i col., 1992; Carballada i Saling, 1997; Chen i col., 1998; Kirchhoff i col., 2000; Sun i col., 2000), 5-7 dies en l'espècie bovina (Gagnon i col., 2000) i 8-13 dies en humà (Cooper i col., 1990; Sun i col., 2000). La duració dels cultius de les cèl·lules epitelials epididimàries és també espècie dependent. En porcí, la monocapa confluent es manté viable durant dos mesos, al igual que en marsupials (Lin i col., 2000), en contrast amb les monocapes de cèl·lules epitelials epididimàries humanes que es mantenen unes 6-8 setmanes (Cooper i col., 1990; Akhondi i col., 1997); i les de rata que degeneren al cap de 9-14 dies de

cultiu (Olson i col., 1983; Cooper i col., 1989; Sun i col., 2000). Aquestes diferències d'adhesió, proliferació i viabilitat de les cèl·lules epitelials epididimàries en monocapa de les diferents espècies poden ser causades per un factor intrínsec de cada espècie, com per exemple diferents requeriments de les cèl·lules per una adequada adhesió (Cooper i col., 1990) o diferències en la composició de proteïnes d'adhesió presents en les membranes plasmàtiques (Lin i col., 2000). En qualsevol cas, també s'ha de tenir en compte la gran variabilitat d'autors i metodologies emprades.

Varis autors comenten la importància d'una concentració cel·lular inicial òptima per l'obtenció de monocapes de cèl·lules epitelials epididimàries (Byers i col., 1992; Heiniger i col., 1996). En els cultius de cèl·lules epitelials aïllades, la concentració cel·lular inicial no varia entre espècies i es sembren unes  $0.5-2.0 \times 10^6$  cel/cm<sup>2</sup>; (Byers i col., 1985, 1992; Cooper i col., 1989, 1990; Klinefelter i col., 1992). En els cultius de fragments epididimaris digerits amb col·lagenasa, la concentració inicial tampoc varia entre espècies i es sembren uns 20-50 fragments de 2-5 mm de llargada en plaques de 24 pous (10-25 fragm/cm<sup>2</sup>) (Moore i col., 1986, 1992; Akhondi i col., 1997; Lin i col., 2000). En aquest treball s'han assajat diverses concentracions inicials de fragments digerits amb col·lagenasa (15, 30, 60 i 90 fragments/pou) i en tots els casos s'han obtingut monocapes de cèl·lules epitelials epididimàries. Ara bé, durant les dues primeres setmanes de cultiu, les monocapes formades a partir d'una densitat baixa de fragments assoleixen confluències significativament superiors que les formades a partir d'una densitat elevada de fragments. Possiblement una densitat elevada de fragments alenteix el procés d'adhesió a la placa de cultiu, la migració de les cèl·lules i la posterior formació de la monocapa. Per altre banda, Raczek i col. (1994) observen que quan es cultiven pocs fragments no s'aconsegueix confluència. Possiblement, si es sembren pocs fragments, el nombre de cèl·lules en cultiu no és suficient per formar la monocapa confluent. Aquests resultats demostren que la concentració inicial de fragments és important per l'obtenció d'una monocapa confluent de cèl·lules epitelials epididimàries, i no depèn de l'espècie ni de la regió epididimària utilitzada.

La formació de la monocapa cel·lular a partir del cultiu de fragments epididimaris digerits amb col·lagenasa implica la obtenció de monocapes amb diferents tipus cel·lulars, ja que els fragments incorporen cèl·lules mioides, fibroblasts i endotelials que estan fortament associades al túbul. Diversos autors consideren que en aquests cultius hi pot haver problemes per contaminació de les cèl·lules no epitelials, com fibroblasts, que tenen una taxa de proliferació molt elevada, i poden emascarar les cèl·lules epitelials de la monocapa. Contràriament, altres autors suggereixen que la presència de cèl·lules peritubulars pot ser beneficiosa perquè segreguen factors crítics per la propagació i manteniment de les cèl·lules epitelials epididimàries en cultiu (Lin i col., 2000). En aquest sentit, els treballs de Carballada i Saling (1997) demostren que els fibroblasts no promouen directament el creixement ni afecten a la diferenciació de les cèl·lules epitelials en cultiu, però si podrien proporcionar alguns senyals a les cèl·lules epitelials,

bàsicament factors solubles, que ajudarien a perfeccionar el seu patró de diferenciació i a mantenir la seva activitat en cultiu. Un altre efecte beneficiós pot atribuir-se a la protecció que proporcionen les cèl·lules peritubulars a les cèl·lules epitelials durant la digestió enzimàtica (Lin i col., 2000). A més, s'ha demostrat que les cèl·lules no epitelials presents als cultius no proliferen si les cèl·lules epitelials formen una extensa monocapa (Lin i col., 2000). Igualment, Akhondi i col. (1997) suggereixen que les cèl·lules epitelials inhibeixen activament la proliferació de les cèl·lules no epitelials. Per altra banda, la utilització d'un medi de cultiu amb D-valina enlloc de L-valina evita la proliferació de cèl·lules no epitelials. Les cèl·lules epitelials contenen l'enzim D-aminoàcid oxidasa i poden convertir la D-valina a l'aminoàcid essencial L-valina, reacció que no poden dur a terme els fibroblasts ni les cèl·lules peritubulars (Olson i col., 1983; Orgebin-Crist i col., 1984). En aquest treball s'ha determinat el percentatge de cèl·lules epitelials de les monocapes obtingudes, mitjançant la localització per immunofluorescència de citoqueratines, el qual és un marcador específic reconegut per les cèl·lules epitelials (Olson i col., 1982, 1983). Els resultats obtinguts demostren que les monocapes del caput, corpus i cauda epididimari contenen un percentatge de cèl·lules citoqueratina positives iguals o superior al 80% durant els diferents dies de cultiu analitzats. Això indica que la majoria de les cèl·lules de la monocapa són epitelials. L'estabilitat del percentatge de cèl·lules citoqueratina positives durant tot el període de cultiu demostra la inhabilitat de les cèl·lules no epitelials per proliferar en aquests cultius, ja sigui per la presència de la D-valina al medi de cultiu i/o per la formació de la monocapa de cèl·lules epitelials. Aquests resultats són comparables amb els obtinguts per altres autors (Pera i col., 1996; Gagnon i col., 2000; Kirchhoff i col., 2000), fins i tot aquells que només cultiven cèl·lules epitelials purificades prèviament en un gradient discontinu de Percoll (Finaz i col., 1991). Això demostra la validesa d'aquest sistema per obtenir monocapes de cèl·lules epitelials epididimàries sense necessitat de separar els diferents tipus cel·lulars mitjançant la utilització de tècniques més complexes i que, com s'ha comentat anteriorment, comprometen el manteniment de la integritat cel·lular i la arquitectura epitelial.

Està ben establert que el nombre de cèl·lules de la monocapa augmenta majoritàriament per migració de les cèl·lules epitelials a partir dels fragments que s'adhereixen a la placa de cultiu. En canvi, no està tan clar si el nombre de cèl·lules de la monocapa també pot augmentar per la proliferació mitòtica de les cèl·lules epitelials epididimàries en cultiu. La presència de cèl·lules epitelials epididimàries en proliferació ha estat descrita per varis autors en els cultius de diverses espècies mitjançant el marcatge amb <sup>3</sup>H-timidina (Kierszenbaum i col., 1981; Wagley i col., 1984; Carballada i Saling, 1997) i 5-bromo-2'-deoxiuridina (Pera i col., 1996). De totes maneres, alguns autors han suggerit que aquesta proliferació podria atribuir-se a cèl·lules no epitelials del cultiu (Klinefelter i col., 1982; Orgebin-Crist i col., 1984), basant-se en que la taxa de renovació de les cèl·lules epitelials epididimàries *in vivo* és molt lenta i aquestes cèl·lules han estat classificades com una població no proliferativa (Clermont i Flannery, 1970). En el present

estudi s'han observat freqüents figures mitòtiques en cèl·lules citoqueratina positives, és a dir, cèl·lules epitelials. Igualment, mitjançant l'establiment de cultius secundaris s'ha observat que les cèl·lules epitelials dupliquen el seu nombre després de tres dies de cultiu, i no augmenta el nombre de cèl·lules citoqueratina negatives. Per tant, aquests resultats demostren que les cèl·lules epitelials de les tres regions de l'epidídim de *Sus domesticus* es divideixen en cultiu.

Un factor que s'ha de tenir en compte quan es cultiva l'epiteli epididimari és la temperatura de cultiu, la qual s'ha descrit com un factor important en el control de la síntesi i secreció proteica en els testicles i l'epidídim (Esponda i Bedford, 1986; Bedford, 1991). En mamífers, la temperatura escrotal de l'epidídim (32-33°C) és inferior que la temperatura basal del cos (37-38°C). Això fa pensar que les condicions òptimes per aquestes cèl·lules serien 32-33°C, però molts autors cultiven les cèl·lules epitelials a 37-38°C. En aquest estudi s'ha observat que la temperatura no afecta a les monocapes de cèl·lules epitelials epididimàries, ja que aquestes s'obtenen tant a 32°C com a 37°C i les cèl·lules mantenen les mateixes característiques morfològiques i es divideixen a ambdues temperatures. La única diferència és que a 32°C la confluència s'adquireix més lentament que a 37°C. Aquests resultats coincideixen amb estudis previs de Carballada i Saling (1997) i Pera i col. (1996). Aquests últims, mitjançant marcatge amb BrdU, van demostrar que les cèl·lules epitelials epididimàries de gos es dividien tant a 33°C com a 37°C, però a 37°C el marcatge amb BrdU era superior. El major desavantatge dels cultius primaris és la seva durada, ja que les cèl·lules tenen un nombre limitat de divisions i en molts casos degeneren després de varis passatges. Aquests resultats suggereixen que si es volen obtenir cultius de llarga durada és millor cultivar els fragments epididimaris a 32°C. Per altre banda, sembla ser que la supervivència dels espermatozoides i la inducció de la seva maduració és promoguda a 37-38°C, i per tant, aquesta seria la temperatura a utilitzar si es volen fer experiments de cocultiu amb espermatozoides (Moore i col., 1992; Bongso i Trounson, 1996; Akhondi i col., 1997; Gagnon i col., 2000; Lin i col., 2000).

La caracterització ultraestructural de les cèl·lules en cultiu i la determinació del seu estat de polarització i diferenciació és crític per la validació d'un sistema de cultiu. Igualment, l'evidència de semblances morfològiques i estructurals entre les cèl·lules en cultiu i les natives és el pre-requisit per qualsevol conclusió relacionada amb la funció d'aquestes cèl·lules.

L'estudi histològic dels fragments epididimaris intactes mostra que, durant les primeres hores de cultiu, aquests presenten una estructura completament normal i similar a l'òrgan *in vivo*, el qual està format per un epiteli columnar pseudo-estratificat amb estereocilis apicals (Briz, 1994; Stoffel i Friess, 1994). Però a partir de les 48 hores de cultiu, s'observa una pèrdua progressiva de la integritat estructural de l'epiteli: disminueix l'alçada de les cèl·lules i dels estereocilis, i apareixen grànuls densos al citoplasma i espais intercel·lulars. Després d'una setmana en cultiu s'observa



una clara degeneració cel·lular, tal com s'havia descrit prèviament en cultius d'òrgans (Hoffman i col., 1976).

Per altra banda, la monocapa de cèl·lules epitelials que s'ha format a partir dels fragments digerits amb col·lagenasa, presenten una forma i un nivell d'estructuració molt divers. A diferència de l'òrgan *in vivo*, les cèl·lules en cultiu són aplanades i poligonals i s'estructuren en una capa cel·lular. La forma allargada de les cèl·lules en cultiu fa que la posició relativa dels seus orgànuls difereixi de les cèl·lules *in vivo* i que l'alçada d'aquestes cèl·lules sigui molt inferior que en l'epiteli original. Aquesta última característica també s'ha observat en cultius de cèl·lules epitelials epididimàries d'altres espècies (Wagley i col., 1984; Yeung i col., 1989; Cooper i col., 1990; Raczek i col., 1992, 1994; Akhondi i col., 1997; Chen i col., 1998). El fet que la morfologia de les cèl·lules epitelials es transformi de columnar o cuboidal a aplanada i poligonal en cultiu, fa que sigui extremadament difícil distingir morfològicament els diferents tipus cel·lulars que integren l'epiteli epididimari intacte. Segons Yeung i col. (1989), les cèl·lules epitelials epididimàries en cultiu són majoritàriament cèl·lules principals, i les altres tipologies de cèl·lules epitelials presents a l'epidídim no es reconeixen en cultiu, ja sigui perquè s'han eliminat durant el procés de digestió, perquè no s'han unit a la placa de cultiu o perquè s'ha donat un procés de desdiferenciació. En aquest estudi, tampoc s'han pogut distingir els diversos tipus cel·lulars epitelials presents en l'epidídim *in vivo*, però les característiques ultraestructurals de les cèl·lules epitelials de la monocapa semblen indicar que es tracta majoritàriament de cèl·lules principals.

L'estudi al microscopi electrònic de les cèl·lules epitelials presents a les monocapes de les tres regions de l'epidídim, mostra que aquestes cèl·lules no presenten les diferències regionals pròpies de l'epiteli epididimari de *Sus domesticus* en condicions fisiològiques, però mantenen moltes de les seves característiques ultraestructurals durant més de 35 dies en cultiu. Aquestes característiques inclouen: la polaritat cel·lular, la integritat epitelial i les activitats absortives i secretores. La polaritat cel·lular és evident per la presència de nombrosos estereocilis apicals, malgrat la seva longitud és molt inferior que en les cèl·lules *in vivo*. Aquesta reducció de la longitud dels estereocilis en cultiu també ha estat descrita per altres autors i sembla ser una característica de les cèl·lules epitelials epididimàries en cultiu (White i col., 1982; Klinefelter i Hamilton, 1984; Byers i col., 1985). La integritat epitelial es manté per la presència d'interdigitacions i de complexes d'unió entre les membranes laterals i basals de les cèl·lules. La presència de vesícules de pinocitosi al citoplasma apical i cossos multivesiculars i residuals suggereix que aquestes cèl·lules mantenen les seves característiques absortives. Igualment, la presència de reticle endoplasmàtic rugós i aparell de Golgi desenvolupats, nombrosos ribosomes i vesícules en situació perinuclear suggereix que aquestes cèl·lules mantenen la seva capacitat de sintetitzar i secretar proteïnes.

La proteòmica proporciona un conjunt de tècniques molt poderoses per a l'estudi dels mecanismes cel·lulars, concretament de la funció dels gens a nivell de proteïnes. Mitjançant l'ús d'aquestes tècniques, s'ha estudiat l'activitat de síntesi i secreció proteica dels fragments epididimaris intactes en cultiu i de les monocapes de cèl·lules epitelials epididimàries, i s'ha comparat amb la de l'epiteli epididimari *in vivo*, el proteoma i secretoma del qual són actualment molt estudiats (Dacheux i col., 2003). També s'han cultivat fragments epididimaris intactes tancats pels dos costats, que permet distingir entre les proteïnes secretades a l'exterior del túbul, presents al medi de cultiu; i les proteïnes secretades a l'interior del túbul, presents al fluid luminal. S'han cultivat diverses regions epididimàries però la majoria d'experiments per estudiar l'activitat proteica s'han centrat en la regió del caput, la qual és la regió epididimària més activa en porcí (6-8 vegades més activa que la regió caudal). Com a marcadors epididimaris s'han elegit les proteïnes  $\beta$ -hexosaminidasa (Hexo), glutatió peroxidasa (GPX), proteïna d'unió a colesterol (HE1) i RNAsa A10 (Train A), que han estat caracteritzades i identificades per Syntin i col., (1996) del fluid epididimari de les diverses regions de l'epidídim de porcí *in vivo*.

En els cultius de fragments epididimaris intactes, la secreció de les proteïnes epididimàries estudiades es redueix progressivament del sobrenedant dels cultius després de 4 dies, essent indetectables després d'una setmana en cultiu. La ràpida desaparició de la secreció d'aquestes proteïnes podria estar relacionada amb el fet que en aquest experiment les cèl·lules epitelials reben el mateix medi per les superfícies apical i basal, a diferència de la situació *in vivo*, on l'epiteli epididimari és altament polaritzat i la part apical està en contacte directe amb el fluid luminal. De totes maneres, en els cultius de fragments epididimaris tancats, que preserven el contingut luminal original, també s'observa la desaparició d'aquestes proteïnes. Aquesta pèrdua de l'activitat secretora de les proteïnes específiques de l'epidídim evoluciona paral·lelament amb la desorganització de l'estructura de l'epiteli epididimari i la pèrdua de la integritat cel·lular observades a nivell histològic i comentades anteriorment. A més, la disminució de la síntesi i secreció d'aquestes proteïnes està correlacionada amb la disminució dels seus corresponents mRNAs, els quals desapareixen al mateix temps que la secreció proteica.

Totes aquestes observacions indiquen que les condicions de cultiu utilitzades en aquest estudi no són suficients per preservar l'estructura i l'activitat normal de les cèl·lules epitelials dels fragments epididimaris intactes durant llargs períodes de temps. Contràriament a aquests resultats, l'epiteli epididimari de ratolí manté la seva integritat estructural en cultiu durant set dies, en una cambra de perfusió (Klinefelter i col., 1982). A diferència del sistema de cultiu utilitzat en aquest treball, en la cambra de perfusió hi ha una recirculació continua de medi de cultiu i gas, gràcies a l'ús d'una bomba peristàltica. A més, en la cambra d'incubació, el gas és dispersat en forma de petites bombolles per oxigenar millor el medi de cultiu. De totes maneres, en aquests treballs no es proporciona informació concreta de les activitats sintètica i secretora d'aquest teixit.

Paral·lelament a la disminució i desaparició de la secreció de les proteïnes epididimàries estudiades, al sobrenedant dels cultius de fragments epididimaris intactes apareixen altres proteïnes no secretades normalment per l'epiteli epididimari *in vivo*. Aquestes proteïnes també són presents al medi de cultiu dels fragments tancats pels dos costats, i suggereix que probablement són secretades per les cèl·lules peritubulars. D'aquestes noves proteïnes, la més espectacular és la síntesi i secreció progressiva de clusterina en els cultius de fragments intactes del caput proximal. La clusterina és secretada al caput epididimari de porcí *in vivo* després de 3 dies de castració (Syntin i col., 1999) i s'ha descrit que la seva transcripció és reprimida pels andrògens (Mattmueller i Hinton, 1992). En canvi, no sembla que la secreció de clusterina estigui relacionada amb la deficiència d'andrògens al medi de cultiu, ja que el suplement amb elevades concentracions d'andrògens al medi de cultiu no n'evita la secreció. La secreció de clusterina també s'ha relacionat amb la presència d'apoptosis cel·lular (Araki i col., 2005). Però sorprenentment, en aquest treball no s'observa secreció de clusterina en els cultius de fragments d'altres regions epididimàries que presenten signes d'apoptosis similars. Aquest fet pot suggerir que el gen encarregat de l'activació de la secreció de clusterina és induït i regulat específicament a la regió del caput proximal. A més, en els fragments epididimaris del caput proximal tancats pels dos costats no s'observa secreció de clusterina, i suggereix que el factor que regula aquesta secreció és present en el lumen d'aquests fragments.

Les cèl·lules epitelials epididimàries en monocapa sintetitzen i secreten moltes proteïnes durant el període de cultiu. De totes maneres, el patró de secreció és el mateix independentment de la duració del cultiu i de l'origen epididimari de les cèl·lules epitelials. Hi ha molt poques similituds electroforètiques i immunològiques entre aquestes proteïnes i les proteïnes secretades específicament per les cèl·lules epididimàries *in vivo*. Contràriament, moltes d'aquestes proteïnes són similars a les proteïnes secretades per les cèl·lules LLC-PK1, una línia de cèl·lules epitelials de ronyó de porcí que s'ha usat com a control de l'especificitat secretora. La pèrdua de l'especificitat epididimària s'observa abans de la formació de la monocapa, en el cultiu dels fragments epididimaris digerits amb col·lagenasa, els quals, després de 6 dies en cultiu, presenten un patró de secreció diferent del descrit *in vivo*. A més, aquesta pèrdua de l'especificitat epididimària probablement s'accentua quan les cèl·lules epitelials comencen a multiplicar-se i a escampar-se per la placa de cultiu. De totes maneres, aquestes cèl·lules conserven una part de l'especificitat epididimària a nivell transcripcional, ja que presenten mRNAs d'algunes proteïnes epididimàries com HE1, hexosaminidasa i clusterina. En canvi, mitjançant estudis de proteòmica no s'han detectat cap d'aquestes proteïnes en el sobrenedant dels cultius. Pot ser que la maquinària cel·lular sigui ineficient per traduir aquests missatgers o que la concentració de proteïna sintetitzada sigui insuficient per poder ésser detectada. En els cultius de cèl·lules epididimàries d'altres espècies també es detecten diversos mRNAs específics

de l'epidídim però rarament es descriu la presència de les seves corresponents proteïnes al medi de cultiu.

S'ha descrit que la temperatura afecta l'expressió de diversos mRNAs epididimaris específics de les cèl·lules epitelials en cultiu. En el nostre estudi no s'observen diferències en el patró de secreció proteica ni en els mRNAs transcrits en els cultius dels fragments epididimaris intactes ni en les monocapes de cèl·lules epitelials incubats a 32°C i 37°C. És probable que cap dels gens estudiats estigui regulat per la temperatura, ja que no s'ha estudiat cap dels gens que responen als canvis de temperatura en altres espècies, com el gen CD52 (Pera i col., 1996).

Moltes de les funcions epididimàries són dependents de factors testiculars i d'andrògens, principalment la regió anterior de l'epidídim. Malgrat tot, no s'ha observat cap efecte en l'activitat proteica quan el contingut luminal dels fragments intactes del caput epididimari tancats s'ha substituït per fluid de la rete testis (RTF), que suposadament conté factors testiculars que regulen l'activitat secretora de l'epiteli epididimari *in vivo*, o quan el RTF s'ha afegit al medi de cultiu. Igualment, l'absència d'andrògens o l'augment de la concentració d'andrògens al medi de cultiu no modifica la síntesi i secreció de cap de les proteïnes estudiades ni dels mRNAs usats com a marcadors epididimaris en els cultius de fragments intactes ni en les monocapes de cèl·lules epitelials. La pèrdua del control androgènic en la secreció proteica podria relacionar-se amb la desaparició del receptor d'andrògens. En aquest treball no es té evidència que aquests receptors siguin presents en cap dels cultius (fragments epididimaris intactes i monocapes de cèl·lules epitelials), però si el seu mRNA, que és present en les cèl·lules epitelials de tots els cultius i durant tot el període de cultiu. La pèrdua de la sensibilitat pels andrògens també s'ha descrit en moltes línies cel·lulars epididimàries (Araki i col., 2002; Sipila i col., 2004), fins i tot quan el AR nuclear és present (Telgmann i col., 2001; Dufresne i col., 2005). Els resultats obtinguts en aquest treball amb monocapes de cèl·lules epitelials de l'epidídim de porcí, difereixen dels obtinguts amb monocapes de cèl·lules epitelials de l'epidídim de boví i humà, les quals són regulades hormonalment després de 7-10 dies en cultiu (De Pauw i col., 2003; Castellon i col., 2005). Aquestes discrepàncies es poden relacionar amb diferències segons l'espècie, en la durada del cultiu o en la homogeneïtat de les cèl·lules. A més, en aquests treballs estudien totes les proteïnes presents al medi de cultiu i no només les proteïnes sintetitzades *de novo*, marcades amb <sup>35</sup>S.

Finalment, per estimar la funcionalitat dels cultius, s'ha estudiat la capacitat d'aquests per mantenir la viabilitat espermàtica i promoure alguns canvis característics de la maduració epididimària com canvis morfològics o l'adquisició de la motilitat espermàtica, mitjançant el cocultiu d'espermatozoides immadurs procedents del caput proximal amb cultius de fragments de les tres regions epididimàries digerits amb col·lagenasa (1-4 dies) i monocapes cel·lulars de les tres regions epididimàries (7-14 dies).

El requisit necessari perquè els espermatozoides siguin viables i mantinguin el metabolisme i les funcions apropiades és la presència de la membrana plasmàtica intacte (Harrison, 1997). El percentatge d'espermatozoides amb la membrana intacte disminueix en cultiu, però aquesta disminució és més ràpida quan els espermatozoides immadurs es coculturen amb ECM sol i amb fragments epididimaris digerits amb col·lagenasa que amb les monocapes confluents de cèl·lules epitelials epididimàries o amb cèl·lules LLC-PK1. Això suggereix que les monocapes confluents de cèl·lules epitelials, independentment del seu origen, tenen un efecte beneficiós en el manteniment de la integritat de la membrana plasmàtica dels espermatozoides.

La majoria dels espermatozoides procedents del caput proximal mostren motilitat vibratòria i no progressiva, mentre que els altres són completament immòbils, ja que la motilitat espermàtica augmenta i esdevé progressiva al llarg de les diverses regions epididimàries (Yeung i col., 1993; Soler i col., 1994). Diversos autors han intentat reproduir l'adquisició de la motilitat progressiva *in vitro* i han observat un augment significatiu d'espermatozoides epididimaris i ejaculats amb moviment progressiu en cocultiu amb cèl·lules epitelials epididimàries (Moore i col., 1986, 1992; Bongso i Trounson, 1996; Lin i col., 2000). En aquest estudi, no s'ha observat un augment del nombre d'espermatozoides mòbils ni l'adquisició de la motilitat progressiva però, en cocultiu amb les monocapes de cèl·lules epitelials epididimàries i de cèl·lules LLC-PK1 el nombre d'espermatozoides mòbils es manté estable durant un període de 72h. La inhabilitat d'aquests cultius per induir la motilitat progressiva dels espermatozoides del caput proximal en cocultiu pot ser causada per l'origen dels espermatozoides, els quals són molt immadurs i encara no han passat per cap de les regions epididimàries i no han experimentat cap canvi relacionat amb la maduració espermàtica. Per tant, els espermatozoides immadurs utilitzats en aquest treball mai adquiriran el mateix nivell de maduració *in vitro*, que els espermatozoides del corpus o cauda epididimari o ejaculats que ja han experimentat alguns canvis maduratius *in vivo*.

S'ha observat que els cultius de les diverses regions epididimàries tenen el mateix efecte sobre la motilitat espermàtica i la integritat de la membrana. A més, les cèl·lules LLC-PK1 tenen el mateix efecte que les monocapes confluents (10-14 dies) de cèl·lules epitelials epididimàries. Això suggereix que el mecanisme pel qual aquestes cèl·lules mantenen la integritat de la membrana i la motilitat espermàtica és un factor comú produït per totes les cèl·lules epitelials, no específic de l'epidídim. No s'ha descrit el mecanisme pel qual es manté la integritat de la membrana i la motilitat espermàtica en cultiu, però les proteïnes secretades per l'epiteli i les interaccions entre l'epiteli i els espermatozoides podrien ser-ne els responsables. Moore (2002) va descriure que els espermatozoides ejaculats en contacte directe amb cèl·lules epitelials epididimàries sobreviuen més temps i mostren millor motilitat que els espermatozoides separats de les cèl·lules epitelials epididimàries per inserts semipermeables. La prolongació de la supervivència s'ha associat amb la unió del segment equatorial del cap de l'espermatozoide amb la membrana apical de les cèl·lules epitelials (Akhondi i col., 1997). Pel que fa a la motilitat espermàtica, Reyes-Moreno i

col. (2002) van demostrar que la motilitat dels espermatozoides de boví es mantenia amb medi condicionat (CM), obtingut del cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries, indicant que probablement la motilitat espermàtica es manté per un factor soluble específic secretat per les cèl·lules epitelials epididimàries al medi de cultiu. També s'ha observat que la viabilitat i motilitat espermàtiques pot mantenir-se amb petites molècules secretades per les cèl·lules de l'embrió de pollastre (Ashizawa i Katayama, 1992), proteïnes purificades del fluid oviductal (Abe i col., 1995; Lapointe i col., 1998; Boquest et al., 1999), CM de cèl·lules oviductals en cultiu (Sato i col., 1995; Lapointe i Sirard, 1998) i coïncubació amb cultius de diversos teixits (Ashizawa i col., 1982; Ijaz i col., 1994; Ellington i col., 1998; Lapointe i col., 2000). En tots els casos, l'efecte pot resultar de la inhibició del dany estructural de la membrana dels espermatozoides (Ashizawa i Katayama, 1992; Hinton i col., 1995; Lapointe i col., 1998).

Una de les característiques principals dels espermatozoides immadurs és la presència de la gota citoplasmàtica proximal la qual, en porcí, es manté unida a la cua de l'espermatozoide durant tot el trànsit epididimari (Harayama i col., 1996; Pruneda i col., 2005), migra de la peça de connexió a l'anell de Jensen quan l'espermatozoide es troba a la regió del corpus (Harayama i Kato, 1992) i s'allibera durant o poc després de l'ejaculació (Kato i col., 1996). En aquest estudi s'ha observat una disminució del nombre d'espermatozoides amb gota proximal i un augment del nombre d'espermatozoides amb gota distal després de la coïncubació durant 24h amb cultius de fragments del corpus epididimari. No es coneix què causa la migració i alliberament de la gota citoplasmàtica, però Akbarsha i col. (2000) van suggerir que un producte específic secretat per les cèl·lules del corpus epididimari podria ser el responsable de la migració de la gota citoplasmàtica en rates. Segons aquesta hipòtesis, els fragments del corpus epididimari digerits amb col·lagenasa mantindrien les activitats de síntesi i secreció proteiques durant els primers 1-4 dies en cultiu, concretament la secreció de factor(s) responsable(s) de la migració de la gota citoplasmàtica, tot i la disrupció que experimenta l'epiteli epididimari en aquests cultius durant la formació de la monocapa cel·lular. Pel que fa a l'alliberament de la gota citoplasmàtica, Harayama i col. (1996) suggereixen que, en porc, és induït per la fructosa originada de les vesícules seminals. Igualment en toro i cabró s'ha descrit que la proteïna PBP sintetitzada en les vesícules seminals induïx l'alliberament de la gota citoplasmàtica (Matousek i Kysilka, 1980). En aquest treball s'observa una petita proporció d'espermatozoides sense gota citoplasmàtica que augmenta després de 24h de cultiu. Cooper i Yeung (2003) consideren que pot ser degut a la ruptura de la gota, per la pressió osmòtica del medi. Els ejaculats que contenen un elevat nombre d'espermatozoides amb gota citoplasmàtica proximal es relacionen amb una alterada funció epididimària i una baixa capacitat fecundant (Bedford, 1975; Huszar i Vigue, 1994; Gomez i col., 1996; Keating i col., 1997; Zini i col., 1998; Amann i col., 2000; Petrunkina i col., 2001; Thundathil i col., 2001). S'ha suggerit que els espermatozoides amb gota citoplasmàtica proximal són deficientes amb la proteïna d'unió a l'oòcit i, per tant, no poden

fecundar-lo (Thundathil i col., 2001). A més, la retenció de la gota citoplasmàtica proximal provoca una elevada concentració d'enzims citoplasmàtics com hidrolases, creatin quinases i glucosa fosfat deshidrogenases (Huszar i col., 1990; Gomez i col., 1996) que provoquen un augment d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Les ROS són responsables de la peroxidació dels lípids de la membrana plasmàtica dels espermatozoides, la qual cosa provoca una disminució de la fluïdesa de la membrana plasmàtica, alteracions en els mecanismes d'intercanvi de ions necessaris per la motilitat i pèrdua irreversible de la integritat estructural dels espermatozoides. Tot això comporta una disminució de la taxa de fecundació dels espermatozoides (Aitken i Clarkson, 1987, 1988). A més, les ROS són capaces de difondre pel medi i peroxidar els lípids de membrana dels espermatozoides, aparentment normals, que coexisteixen en el semen amb espermatozoides que contenen gota citoplasmàtica proximal, i fan que aquests espermatozoides normals esdevinguin també funcionalment deficients (Aitken i col., 1992).

Així doncs, els sistemes de cultiu desenvolupats en aquest treball permeten el manteniment parcial del fenotip epididimari durant llargs períodes de temps, mitjançant el cultiu de cèl·lules epitelials epididimàries en monocapa, com si de línies cel·lulars es tractés; i el manteniment complet de les característiques i funcions epididimàries durant un període de temps breu, mitjançant el cultiu de fragments epididimaris intactes o digerits amb col·lagenasa, els quals són capaços de promoure modificacions en l'esperma immadura com la migració de la gota citoplasmàtica. Propers estudis del grup d'investigació s'encaminaran a comprovar si la migració de la gota citoplasmàtica *in vitro* augmenta la capacitat fecundant dels espermatozoides immadurs. Si així és, aquest sistema de cultiu serà un mètode útil per millorar la qualitat dels ejaculats que tenen un nombre elevat d'espermatozoides immadurs, contribuint així al millor rendiment dels centres d'Inseminació Artificial.

## **6 CONCLUSIONS**





1. La formació d'una monocapa cel·lular a partir de fragments de les tres regions epididimàries, requereix una digestió prèvia amb col·lagenasa. Els fragments epididimaris de la regió caudal requereixen un període de digestió amb col·lagenasa superior que els fragments de les regions caput i corpus.
2. Els fragments epididimaris digerits amb col·lagenasa s'adhereixen a la placa de cultiu entre les primeres 36 i 72 hores, formen una monocapa de cèl·lules epitelials que adquireix confluència després de 12-16 dies i es mantenen viables durant dos mesos en cultiu.
3. La concentració inicial de fragments òptima per l'obtenció de la monocapa de cèl·lules epitelials epididimàries és de 15 i 30 fragments/pou, ja que assoleixen confluències significativament superiors que les formades a partir de 60 i 90 fragments/pou durant les dues primeres setmanes de cultiu.
4. En les condicions de cultiu establertes, les cèl·lules epitelials de les monocapes de caput, corpus i cauda epididimària es divideixen en cultiu.
5. Els fragments epididimaris intactes mantenen la integritat estructural durant les primeres 48 hores de cultiu, però durant els següents dies aquesta es va perdent progressivament i, després de 4-8 dies, apareixen signes de degeneració cel·lular.
6. Les cèl·lules epitelials de les monocapes de les tres regions de l'epidídim no presenten les diferències regionals pròpies de l'epiteli epididimari *in vivo*, però mantenen moltes de les seves característiques ultraestructurals durant més de 35 dies en cultiu. Aquestes són la presència d'estereocilis apicals, unions intercel·lulars i orgànuls citoplasmàtics relacionats amb les seves funcions absortiva i secretora.
7. Els cultius de fragments epididimaris intactes, tant oberts com tancats, mantenen la secreció de les proteïnes específiques de l'epidídim i dels seus corresponents mRNAs durant els primers dies de cultiu, però després de 4 dies es redueixen progressivament, i són indetectables després d'una setmana en cultiu.
8. Paral·lelament a la pèrdua de la secreció proteica específica, els fragments epididimaris intactes sintetitzen i secreten unes proteïnes no secretades normalment per l'epiteli epididimari *in vivo*. La més abundant d'aquestes proteïnes és la clusterina, que és secretada pels fragments epididimaris intactes oberts del caput proximal i es relaciona amb processos d'apoptosi cel·lular. La manca de secreció en els cultius de fragments oberts d'altres regions epididimàries suggereix que el gen de la clusterina és induït i regulat específicament en aquesta regió. Igualment, la manca de secreció a l'interior dels fragments epididimaris

intactes tancats suggereix que el factor que regula aquesta secreció és present en el lumen d'aquests fragments.

9. Les cèl·lules epitelials epididimàries en monocapa perden la capacitat de sintetitzar i secretar les proteïnes epididimàries  $\beta$ -hexosaminidasa (Hexo), glutatió peroxidasa (GPX), proteïna d'unió a colesterol (HE1) i RNAsa A10 (Train A) i secreten altres proteïnes inespecífiques que són similars a les secretades per les cèl·lules epitelials de ronyó LLC-PK1. De totes maneres conserven una part de l'especificitat epididimària, ja que mantenen la transcripció dels gens que codifiquen per dues d'aquestes proteïnes  $\beta$ -hexosaminidasa (Hexo) i proteïna d'unió a colesterol (HE1), així com el gen del receptor d'andrògens (AR), considerats tots ells marcadors epididimaris.
10. La temperatura (32 °C vs 37 °C) no afecta la formació de les monocapes de cèl·lules epitelials epididimàries de porcí, ja que s'observa una evolució equivalent del cultiu a ambdues temperatures. La única diferència és que 32°C, les monocapes adquireixen confluència més lentament que a 37°C. La temperatura tampoc afecta el patró de secreció proteica de les cèl·lules epitelials epididimàries en cap dels cultius (fragments o monocapes).
11. La síntesi i secreció de les proteïnes específiques de l'epidídim utilitzades com a marcadors epididimaris, així com la transcripció dels seus corresponents mRNAs, no es veuen modificats per la presència o absència d'andrògens, malgrat la presència del mRNA del receptor d'andrògens; ni de factors testiculars presents al RTF.
12. Les monocapes confluents de cèl·lules epitelials epididimàries creen un microambient adequat pel manteniment de la viabilitat i motilitat dels espermatozoides del caput proximal. Aquest efecte és independent del seu origen (epidídim o ronyó) suggerint que és degut a un factor comú secretat per totes les cèl·lules epitelials, no específic de l'epidídim.
13. Els fragments del corpus epididimari digerits amb col·lagenasa són capaços de promoure la migració de la gota citoplasmàtica dels espermatozoides immadurs durant els dies 1-4 de cultiu. Això suggereix que, al igual que els fragments epididimaris intactes, durant aquest temps es mantenen les característiques fisiològiques del túbul epididimari.

## **7 BIBLIOGRAFIA**



- Aafjes, J.H., and Vreeburg, J.T. (1972) Distribution of  $5\alpha$ -dihydrotestosterone in the epididymis of bull and boar, and its concentration in rat epididymis after ligation of efferent testicular ducts, castration and unilateral gonadectomy. *J. Endocrinol.* 53, 85-93.
- Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T., and Hoshi, H. (1995) Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 226-32.
- Adamali, H.I., and Hermo, L. (1996) Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J. Androl.* 17, 208-22.
- Agrawal, Y., and Vanha-Perttula, T. (1988) Electron microscopic study of the secretion process in bovine reproductive organs. *J. Androl.* 9, 307-16.
- Aitken, R.J., and Clarkson, J.S. (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 81, 459-69.
- Aitken, R.J., and Clarkson, J.S. (1988) Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 9, 367-76.
- Aitken, R.J., Buckingham, D., West, K., Wu, F.C., Zikopoulos, K., and Richardson, D.W. (1992) Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J. Reprod. Fertil.* 94, 451-62.
- Akbarsha, M.A., Latha, P.N., and Murugaian, P. (2000) Retention of cytoplasmic droplet by rat cauda epididymal spermatozoa after treatment with cytotoxic and xenobiotic agents. *J. Reprod. Fertil.* 120, 385-90.
- Akhondi, M.A., Chapple, C., and Moore, H.D. (1997) Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures. *Hum. Reprod.* 12, 514-22.
- Amann, R.P., Killian, G.J., and Benton, A.W. (1973) Differences in the electrophoretic characteristics of bovine rete testis fluid and plasma from the cauda epididymidis. *J. Reprod. Fertil.* 35, 321-30.
- Amann, R.P. (1981) A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.* 2, 37-58.
- Amann, R.P., Seidel, G.E., Jr., and Mortimer, R.G. (2000) Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology* 54, 1499-515.
- Anakwe, O.O., Sharma, S., Hoff, H.P., Hardy, D.M., and Gerton, G.L. (1990) Maturation of guinea pig sperm in the epididymis involves the modification of proacrosin oligosaccharide side chains. *Mol. Reprod. Biol.*, 294-301.
- Araki, Y., Suzuki, K., Matusik, R.J., Obinata, M., and Orgebin-Crist, M.C. (2002) Immortalized epididymal cell lines from transgenic mice overexpressing temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *J. Androl.* 23, 854-69.
- Araki, S., Israel, S., Leskov, K.S., Criswell, T.L., Beman, M., Klovov, D.Y., Sampalath, L., Reinicke, K.E., Cataldo, E., Mayo, L.D., and Boothman, D.A. (2005) Clusterin proteins: stress-inducible polypeptides with proposed functions in multiple organ dysfunction. *BJR. Suppl.* 27, 106-13.
- Arrighi, S., Romanello, M.G., and Domeneghini, C. (1986) Ultrastructural study on the epithelium lining ductus epididymis in adult cats. *Arch. Biol.*, 7-24.

- Ashizawa, K., Tokudome, Y., Okauchi, K., and Nishiyama, H. (1982) Effects of HeLa and BHK-21 cells on the survival of fowl, bull, ram and boar spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 66, 663-6.
- Ashizawa, K., and Katayama, S. (1992) Maintenance of motility of fowl spermatozoa in vitro is prolonged by a low molecular weight factor derived from cultured chick embryo cells. *J. Reprod. Fertil.* 95, 685-91.
- Aumuller, G., Renneberg, H., Schiemann, P.J., Wilhelm, B., Seitz, J., Konrad, L., and Wennemuth, G. (1997) The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424, 193-219.
- Aumuller, G., Wilhelm, B., and Seitz, J. (1999) Apocrine secretion—fact or artifact? *Anat. Anz.* 181, 437-46.
- Baker, M.A., Witherdin, R., Hetherington, L., Cunningham-Smith, K., and Aitken, R.J. (2005) Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 5, 1003-12.
- Bearer, E.L., and Friend, D.S. (1990) Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J. Electron. Microsc. Tech.* 16, 281-97.
- Bedford, J.M. (1975) Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis, pp. 303-317. In D. W. Hamilton, and R.O. Greep (Eds): *Handbook of Physiology*, American Physiological Society, Washington.
- Bedford, J.M., and Hoskins, D.D. (1990) The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. Churchill Livingstone. London.
- Bedford, J.M. (1991) Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: experimental studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 286, 19-32.
- Bedford, J.M. (1998) Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol.Reprod.* 59, 1275-87.
- Bialy, J.D., and Smith, V.R. (1958) Influence of seminal vesicle fluid on morphology of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 422-428.
- Biegler, B.E., Aarons, D.J., George, B.C., and Poirier, G.R. (1994) Induction of physiological acrosome reactions in caput epididymal spermatozoa of mice. *J. Reprod. Fertil.* 100, 219-24.
- Blanchard, Y., and Robaire, B. (1997) Le mode d'action des androgènes et la 5-alpha-réductase. *Médecine/Sciences* 13, 467-473.
- Blobel, C.P., Myles, D.G., Primakoff, P., and White, J.M. (1990) Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *J. Cell. Biol.* 111, 69-78.
- Bloom, G., and Nicander, L. (1961) On the ultrastructure and development of the protoplasmic droplet of spermatozoa. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 833-844.
- Bohmer, T., and Hansson, V. (1975) Androgen-dependent accumulation of carnitine by rat epididymis after injection of [<sup>3</sup>H]butyrobetaine in vivo. *Mol. Cell. Endocrinol.* 3, 103-15.
- Bongso, A., and Trounson, A. (1996) Evaluation of motility, freezing ability and embryonic development of murine epididymal sperm after coculture with epididymal epithelium. *Hum. Reprod.* 11, 1451-6.
- Boquest, A.C., Smith, J.F., Briggs, R.M., Duganzich, D.M., and Summers, P.M. (1999) Effects of bovine oviductal proteins on bull spermatozoal function. *Theriogenology* 51, 583-95.

- Bork, K., Chevrier, C., Paquignon, M., Jouannet, P., and Dacheux, J.L. (1988) Flagellar motility and movement of boar spermatozoa during epididymal transit. *Reprod. Nutr. Dev.* 28, 1307-15.
- Briz, M.D. (1994) Anàlisi microscòpica de l'esperma ejaculada i de la maduració epididimària dels espermatozoides de *Sus domesticus*: Department of Biology, University of Girona, Girona.
- Brooks, D.E. (1977) The androgenic control of the composition of the rat epididymis determined by efferent duct ligation or castration. *J. Reprod. Fertil.* 49, 383-5.
- Brooks, D.E. (1981) Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. *Physiol. Rev.* 61, 515-55.
- Brooks, D.E. (1983) Effect of androgens on protein synthesis and secretion in various regions of the rat epididymis, as analysed by two-dimensional gel electrophoresis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 29, 255-70.
- Brown, D., Lui, B., Gluck, S., and Sabolic, I. (1992) A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epididymis. *Am. J. Physiol.* 263, C913-6.
- Byers, S.W., Djakiew, D., and Dym, M. (1985) Structural features of rat epididymal epithelial cells in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 75, 401-11.
- Byers, S.W., Hadley, M.A., Djakiew, D., and Dym, M. (1986) Growth and characterization of polarized monolayers of epididymal epithelial cells and Sertoli cells in dual environment culture chambers. *J. Androl.* 7, 59-68.
- Byers, S.W., Citi, S., Anderson, J.M., and Hoxter, B. (1992) Polarized functions and permeability properties of rat epididymal epithelial cells in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 95, 385-96.
- Calvin, H.I., and Bedford, J.M. (1971) Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 13, 65-75.
- Carballada, R., and Saling, P.M. (1997) Regulation of mouse epididymal epithelium in vitro by androgens, temperature and fibroblasts. *J. Reprod. Fertil.* 110, 171-81.
- Carreau, S., Drosdowsky, M.A., and Courot, M. (1984) Androgen-binding proteins in sheep epididymis: characterization of a cytoplasmic androgen receptor in the ram epididymis. *J. Endocrinol.* 103, 273-9.
- Castella, S., Benedetti, H., de Llorens, R., Dacheux, J.L., and Dacheux, F. (2004) Train A, an RNase A-like protein without RNase activity, is secreted and reabsorbed by the same epididymal cells under testicular control. *Biol. Reprod.* 71, 1677-87.
- Castellon, E., Rioseco, H., Rojas, J., Royer, M., Salas, E., Contreras, H., and Huidobro, C. (2005) Glutathione peroxidase activity in cell cultures from different regions of human epididymis. *Asian J. Androl.* 7, 33-7.
- Cereijido, M., Valdes, J., Shoshani, L., and Contreras, R.G. (1998) Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 161-77.
- Chen, Y.C., Bunick, D., Bahr, J.M., Klinefelter, G.R., and Hess, R.A. (1998) Isolation and culture of epithelial cells from rat ductuli efferentes and initial segment epididymidis. *Tissue Cell.* 30, 1-13.
- Chian, R.C., and Sirard, M.A. (1995) Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biol. Reprod.* 52, 156-62.
- Clermont, Y., and Flannery, J. (1970) Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. *Biol. Reprod.* 3, 283-92.



- Cooper, T.G., Yeung, C.H., and Meyer, R. (1989) Immature rat epididymal epithelial cells grown in static primary monolayer culture on permeable supports. I. Vectorial secretion. *Cell Tissue Res.* 256, 567-72.
- Cooper, T.G., Yeung, C.H., Meyer, R., and Schulze, H. (1990) Maintenance of human epididymal epithelial cell function in monolayer culture. *J. Reprod. Fertil.* 90, 81-91.
- Cooper, T.G. (1998) Epididymis. Vol 2, pp. 1-17, In J.D. Neill, and E. Knobil (Eds): *Encyclopedia of Reproduction*, Academic press, San Diego.
- Cooper, T.G., and Yeung, C.H. (2003) Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech* 61, 28-38.
- Cornwall, G.A., Smyth, T.B., Vindivich, D., Harter, C., Robinson, J., and Chang, T.S. (1986) Induction and enhancement of progressive motility in hamster caput epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 35, 1065-74.
- Cosentino, M.J., and Cockett, A. (1986) Structure and function of the epididymis. *Urol. Res.* 14, 229-40.
- Cyr, D.G., Hermo, L., and Laird, D.W. (1996) Immunocytochemical localization and regulation of connexin in the adult rat epididymis. *Endocrinology* 137, 1474-84.
- Dacheux, F., and Dacheux, J.L. (1987) The intracellular pathway of antagglutinin secretion in the boar caput epididymidis as revealed by immunogold labelling. *Cell Tissue Res.* 249, 89-99.
- Dacheux, J.L., Chevrier, C., Dacheux, F., Jeulin, C., Gatti, J.L., Pariset, C., and Paquignon, M. (1990) Sperm biochemical changes during epididymal maturation. In N.J. Alexander (Ed.): *Gamete Interaction: Prospects for Immunocontraception*, Wiley-Liss, Inc., New York.
- Dacheux, J.L., Gatti, J.L., and Dacheux, F. (2003) Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.* 61, 7-17.
- Danzo, B.J., Orgebin-Crist, M.C., and Toft, D.O. (1973) Characterization of a cytoplasmic receptor for 5alpha-dihydrotestosterone in the caput epididymidis of intact rabbits. *Endocrinology* 92, 310-7.
- Danzo, B.J., and Eller, B.C. (1975) Androgen binding to cytosol prepared from epididymides of sexually mature castrated rabbits: evidence for a cytoplasmic receptor. *Steroids* 25, 507-24.
- Danzo, B.J., Dunn, J.C., and Davies, J. (1982) The presence of androgen-binding protein in the guinea-pig testis, epididymis and epididymal fluid. *Mol. Cell Endocrinol.* 28, 513-27.
- Danzo, B.J., and Eller, B.C. (1984) Clearance, metabolic fate and tissue distribution of an injected bolus of photoaffinity-labeled rat androgen binding protein. *Biol. Reprod.* 31, 259-70.
- De Larminat, M.A., Monsalve, A., Charreau, E.H., Calandra, R.S., and Blaquier, J.A. (1978) Hormonal regulation of 5alpha-reductase activity in rat epididymis. *J. Endocrinol.* 79, 157-65.
- De Pauw, I.M., Goff, A.K., van Soom, A., Verberckmoes, S., and De Kruif, A. (2003) Hormonal regulation of bovine secretory proteins derived from caput and cauda epididymal epithelial cell cultures. *J. Androl.* 24, 401-7.
- Delongcas, J.L., Gelly, J.L., Leheup, B., and Grignon, G. (1987) Influence of testicular secretions on differentiation in the rat epididymis: ultrastructural studies after castration, efferent duct ligation and cryptorchidism. *Exp Cell Biol* 55, 74-82.
- Dott, H.M., and Dingle, J.T. (1968) Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. *Exp. Cell. Res.* 52, 523-40.

- Dufresne, J., St-Pierre, N., Viger, R.S., Hermo, L., and Cyr, D.G. (2005) Characterization of a novel rat epithelial cell line to study epididymal function. *Endocrinology* Nov;146, 4710-20.
- Dyson, A.L., and Orgebin-Crist, M.C. (1973) Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* 93, 391-402.
- Egbunike, G.N., and Elemo, A.O. (1978) Testicular and epididymal sperm reserves of crossbred European boars raised and maintained in the humid tropics. *J. Reprod. Fertil.* 54, 245-8.
- Ekstedt, E., Ridderstrale, Y., Ploen, L., and Rodriguez-Martinez, H. (1991) Histochemical localization of carbonic anhydrase in the testis and epididymis of the boar. *Acta Anat. (Basel)* 141, 257-61.
- Ellington, J.E., Jones, A.E., Davitt, C.M., Schneider, C.S., Brisbois, R.S., Hiss, G.A., and Wright, R.W., Jr. (1998) Human sperm function in co-culture with human, macaque or bovine oviduct epithelial cell monolayers. *Hum. Reprod.* 13, 2797-804.
- Esponda, P., and Bedford, J.M. (1986) The influence of body temperature and castration on the protein composition of fluid in the rat cauda epididymidis. *J. Reprod. Fertil.* 78, 505-14.
- Finaz, C., Boue, F., Meduri, G., and Lefevre, A. (1991) Characterization of rat epithelial epididymal cells purified on a discontinuous Percoll gradient. *J. Reprod. Fertil.* 91, 617-25.
- Flickinger, C.J. (1981) Regional differences in synthesis, intracellular transport, and secretion of protein in the mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 25, 871-83.
- Flickinger, C.J. (1985) Radioautographic analysis of the secretory pathway for glycoproteins in principal cells of the mouse epididymis exposed to [<sup>3</sup>H] fucose. *Biol. Reprod.* 32, 377-89.
- Flickinger, C.J., Bush, L.A., Howards, S.S., and Herr, J.C. (1997) Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat. Rec.* 248, 380-90.
- Fornes, W.M., Sosa, M.A., Bertini, F., and Burgos, M.H. (1995) Vesicles in rat epididymal fluid. Existence of two populations differing in ultrastructure and enzymatic composition. *Andrologia* 27, 233-7.
- Fouchecourt, S., Metayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., and Dacheux, J.L. (2000) Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol. Reprod.* 62, 1790-803.
- French, F.S., and Ritzen, E.M. (1973) A high-affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. *Endocrinology* 93, 88-95.
- French, F.S., and Ritzen, E.M. (1973) Androgen-binding protein in efferent duct fluid of rat testis. *J. Reprod. Fertil.* 32, 479-83.
- Frohlich, O., Po, C., Murphy, T., and Young, L.G. (2000) Multiple promoter and splicing mRNA variants of the epididymis-specific gene EP2. *J. Androl.* 21, 421-30.
- Gagnon, A., Sullivan, R., and Sirard, M.A. (2000) Epididymal epithelial cells cultured in vitro prolong the motility of bovine sperm. *J. Androl.* 21, 842-7.
- Ganjam, V.K., and Amann, R.P. (1976) Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions. *Endocrinology* 99, 1618-30.
- Gatti, J.L., Druart, X., Guerin, Y., Dacheux, F., and Dacheux, J.L. (1999) A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biol. Reprod.* 60, 937-45.

- Gerard, A., Khanfri, J., Gueant, J.L., Fremont, S., Nicolas, J.P., Grignon, G., and Gerard, H. (1988) Electron microscope radioautographic evidence of in vivo androgen-binding protein internalization in the rat epididymis principal cells. *Endocrinology* 122, 1297-307.
- Gomez, E., Buckingham, D.W., Brindle, J., Lanzafame, F., Irvine, D.S., and Aitken, R.J. (1996) Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J. Androl.* 17, 276-87.
- Goyal, H.O. (1985) Morphology of the bovine epididymis. *Am. J. Anat.* 172, 155-72.
- Goyal, H.O., and Williams, C.S. (1991) Regional differences in the morphology of the goat epididymis: a light microscopic and ultrastructural study. *Am. J. Anat.* 190, 349-69.
- Gueant, J.L., Fremont, S., Felden, F., Nicolas, J.P., Gerard, A., Leheup, B., Gerard, H., and Grignon, G. (1991) Evidence that androgen-binding protein endocytosis in vitro is receptor mediated in principal cells of the rat epididymis. *J. Mol. Endocrinol.* 7, 113-22.
- Harayama, H., and Kato, S. (1992) Changes in motility and morphology of spermatozoa during their transit through the epididymis in Meishan boars at various ages. *Anim. Sci. Technol. (jpn)*, 462-467.
- Harayama, H., Shibukawa, T., Miyake, M., Kannan, Y., and Kato, S. (1996) Fructose stimulates shedding of cytoplasmic droplets from epididymal boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 8, 1039-43.
- Harrison, R.A. (1997) Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 195-211.
- Heikinheimo, O., Mahony, M.C., Gordon, K., Hsiu, J.G., Hodgen, G.D., and Gibbons, W.E. (1995) Estrogen and progesterone receptor mRNA are expressed in distinct pattern in male primate reproductive organs. *J. Assist. Reprod. Genet.* 12, 198-204.
- Heiniger, B.M., Stoffel, M.H., and Friess, A.E. (1996) Ultrastructural validation of an improved culture system for boar efferent duct epithelium. *J. Reprod. Fertil.* 106, 251-8.
- Hermo, L., Dworkin, J., and Oko, R. (1988) Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am. J. Anat.* 183, 107-24.
- Hermo, L., Oko, R., and Robaire, B. (1992) Epithelial cells of the epididymis show regional variations with respect to the secretion of endocytosis of immobilin as revealed by light and electron microscope immunocytochemistry. *Anat. Rec.* 232, 202-20.
- Hermo, L., Oko, R., and Morales, C.R. (1994) Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int. Rev. Cytol.* 154, 106-89.
- Hermo, L., Adamali, H.I., and Andonian, S. (2000) Immunolocalization of CA II and H<sup>+</sup> V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J. Androl.* 21, 376-91.
- Hermo, L., and Jacks, D. (2002) Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 394-410.
- Hinton, B.T., Dott, H.M., and Setchell, B.P. (1979) Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 55, 167-72.
- Hinton, B.T., Brooks, D.E., Dott, H.M., and Setchell, B.P. (1981) Effects of carnitine and some related compounds on the motility of rat spermatozoa from the caput epididymidis. *J. Reprod. Fertil.* 61, 59-64.

- Hinton, B.T., Palladino, M.A., Rudolph, D., and Labus, J.C. (1995) The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 731-45.
- Hinton, B.T., Lan, Z.J., Rudolph, D.B., Labus, J.C., and Lye, R.J. (1998) Testicular regulation of epididymal gene expression. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 47-57.
- Hoffer, A.P., Hamilton, D.W., and Fawcett, D.W. (1973) The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *Anat. Rec.* 175, 169-201.
- Hoffman, L.H., Jahad, N., and Orgebin-Crist, M.C. (1976) The effects of testosterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, 3 $\alpha$ -androstenediol, and 3 $\beta$ -androstenediol on epithelial fine structure of the rabbit epididymis in organ culture. *Cell Tissue Res.* 167, 493-514.
- Holland, M.K., and Orgebin-Crist, M.C. (1988) Characterization and hormonal regulation of protein synthesis by the murine epididymis. *Biol. Reprod.* 38, 487-96.
- Hoskins, D.D., Hall, M.L., and Munsterman, D. (1975) Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 13, 168-76.
- Hoskins, D.D., and Vijayaraghavan, S. (1990) A new theory on the acquisition of sperm motility during epididymal transit. In C. Gagnon (Ed.): *Control of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*, CRC Press, Boca Raton.
- Huszar, G., Vigue, L., and Corrales, M. (1990) Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile oligospermic men. *J. Androl.* 11, 40-6.
- Huszar, G., and Vigue, L. (1994) Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *J. Androl.* 15, 71-7.
- Ijaz, A., Lambert, R.D., and Sirard, M.A. (1994) In vitro-cultured bovine granulosa and oviductal cells secrete sperm motility-maintaining factor(s). *Mol. Reprod. Dev.* 37, 54-60.
- Jaiswal, B.S., and Majumder, G.C. (1998) Biochemical parameters regulating forward motility initiation in vitro in goat immature epididymal spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 10, 299-307.
- Jeulin, C., and Lewin, L.M. (1996) Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum. Reprod. Update* 2, 87-102.
- Johnson, L., and Varner, D.D. (1988) Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biol. Reprod.* 39, 812-7.
- Jones, R., Mann, T., and Sherins, R.J. (1978) Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 201, 413-7.
- Jones, R. (1998) Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 73-84.
- Joshi, M.S. (1985) Isolation and cell culture of the epithelial cells of cauda epididymidis of the bull. *Biol. Reprod.* 33, 187-200.
- Kato, S., Shibukawa, T., Harayama, H., and Kannan, Y. (1996) Timing of shedding and disintegration of cytoplasmic droplets from boars and goat spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 237-241.
- Kaunisto, K., Fleming, R.E., Kneer, J., Sly, W.S., and Rajaniemi, H. (1999) Regional expression and androgen regulation of carbonic anhydrase IV and II in the adult rat epididymis. *Biol. Reprod.* 61, 1521-6.

- Keating, J., Grundy, C. E., Fivey, P.S., Elliott, M., and Robinson, J. (1997) Investigation of the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *J. Reprod. Fertil.* 110, 71-7.
- Kervancioglu, M.E., Djahanbakhch, O., and Aitken, R.J. (1995) Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation. *Fertil. Steril.* 61, 1103.
- Kierszenbaum, A.L., Lea, O., Petrusz, P., French, F.S., and Tres, L.L. (1981) Isolation, culture, and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 1675-9.
- Kirchhoff, C., Habben, I., Ivell, R., and Krull, N. (1991) A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol. Reprod.* 45, 350-7.
- Kirchhoff, C., and Hale, G. (1996) Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 177-84.
- Kirchhoff, C., Carballada, R., Harms, B., and Kascheike, I. (2000) CD52 mRNA is modulated by androgens and temperature in epididymal cell cultures. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 26-33.
- Klinefelter, G.R., Amann, R.P., and Hammerstedt, R.H. (1982) Culture of principal cells from the rat caput epididymidis. *Biol. Reprod.* 26, 885-901.
- Klinefelter, G.R., and Hamilton, D.W. (1984) Organ culture of rat caput epididymal tubules in a perfusion chamber. *J. Androl.* 5, 243-58.
- Klinefelter, G.R., and Hamilton, D.W. (1985) Synthesis and secretion of proteins by perfused caput epididymal tubules, and association of secreted proteins with spermatozoa. *Biol. Reprod.* 33, 1017-27.
- Klinefelter, G.R., Roberts, N.L., and Suarez, J.D. (1992) Direct effects of ethane dimethanesulphonate on epididymal function in adult rats. An in vitro demonstration. *J. Androl.* 13, 409-21.
- Klinefelter, G.R. (1992) A novel system for the co-culture of epididymal epithelial cells and sperm from adult rats. *J. Tiss. Cult. Methods.* 14, 195.
- Koskimies, A.I., and Kormanio, M. (1975) Proteins in fluids from different segments of the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 43, 345-8.
- Ladha, S. (1998) Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J. Membr. Biol.* 165, 1-10.
- Lapointe, S., and Sirard, M.A. (1998) Catalase and oviductal fluid reverse the decreased motility of bovine sperm in culture medium containing specific amino acids. *J. Androl.* 19, 31-6.
- Lapointe, S., Sullivan, R., and Sirard, M.A. (1998) Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 58, 747-53.
- Lapointe, S., Bilodeau, J.F., Lemieux, D., Asselin, E., Fortier, M.A., and Sirard, M.A. (2000) Epithelial and stromal uterine cells cultured in vitro protect bovine sperm from hydrogen peroxide. *Theriogenology* 54, 355-69.
- Li, P., Chan, H.C., He, B., So, S.C., Chung, Y.W., Shang, Q., Zhang, Y.D., and Zhang, Y.L. (2001) An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* 291, 1783-5.
- Lin, M., Zhang, X., Murdoch, R., and Aitken, R.J. (2000) In vitro culture of brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) epididymal epithelium and induction of epididymal sperm maturation in co-culture. *J. Reprod. Fertil.* 119, 1-14.

- Lin, M., Hess, R., and Aitken, R.J. (2002) Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization. *Reproduction* 124, 107-17.
- Matousek, J., and Kysilka, C. (1980) The haemolytic factor (phospholipid-binding protein) of the bull reproductive tract - its synthesis and effect on sperm cytoplasm droplets. *Anim. Reprod. Sci.*, 195-205.
- Mattmueller, D.R., and Hinton, B.T. (1992): Clusterin (SGP-2) in epididymal luminal fluid and its association with epididymal spermatozoa in androgen-deprived rats. *Mol. Reprod. Dev.* 32, 73-80.
- Moore, H.D., and Bedford, J.M. (1979) Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat. Rec.* 193, 293-311.
- Moore, H.D., and Bedford, J.M. (1979) The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymus before and after castration. *Anat. Rec.* 193, 313-27.
- Moore, H. D., Hartman, T. D., and Smith, C. A. (1986): In-vitro culture of hamster epididymal epithelium and induction of sperm motility. *J Reprod Fertil* 78, 327-36.
- Moore, H..D., Curry, M.R., Penfold, L.M., and Pryor, J.P. (1992) The culture of human epididymal epithelium and in vitro maturation of epididymal spermatozoa. *Fertil. Steril.* 58, 776-83.
- Moore, H.D., and Akhondi, M.A. (1996) In vitro maturation of mammalian spermatozoa. *Rev. Reprod.* 1, 54-60.
- Moore, H.D., Samayawardhena, L.A., and Brewis, I.A. (1998) Sperm maturation in vitro: co-culture of spermatozoa and epididymal epithelium. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 23-31.
- Moore, H.D. (2002) Cell and organ epididymal cultures. In B. Robaire, and B.T. Hinton (Eds): *The epididymis: from molecules to clinical practise*, Kluwer Academic Publisher, New York.
- Neutra, M., and Leblond, C.P. (1966) Radioautographic comparison of the uptake of galactose-H and glucose-H<sub>3</sub> in the golgi region of various cells secreting glycoproteins or mucopolysaccharides. *J. Cell Biol.* 30, 137-50.
- Nonogaki, T., Noda, Y., Narimoto, K., Shiotani, M., Mori, T., Matsuda, T., and Yoshida, O. (1992) Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum. Reprod.* 7, 81-5.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-21.
- Ohyasiki, T., Ohtsuka, T., and Mohri, T. (1988) Increase of the molecular rigidity of the protein conformation in the intestinal brush boarder membrane by lipid peroxidation. *Bioch. Bioph. Acta*, 383-392.
- Oko, R., Hermo, L., Chan, P.T., Fazel, A., and Bergeron, J.J. (1993) The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *J. Cell. Biol.* 123, 809-21.
- Olson, G.E., Jonas-Davies, J., Hoffman, L.H., and Orgebin-Crist, M.C. (1982) Structural characterization of isolated rat epididymal epithelial cells. *Gamete Res.* 6, 161-78.
- Olson, G.E., Jonas-Davies, J., Hoffman, L.H., and Orgebin-Crist, M.C. (1983) Structural features of cultured epithelial cells from the adult rat epididymis. *J. Androl.* 4, 347-60.
- Orgebin-Crist, M.C., and Davies, J. (1974) Functional and morphological effects of hypophysectomy and androgen replacement in the rabbit epididymis. *Cell Tissue Res.* 148, 183-201.

- Orgebin-Crist, M.C., and Jahad, N. (1979) The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: stimulation by epididymal cytoplasmic extracts. *Biol. Reprod.* 21, 511-5.
- Orgebin-Crist, M.C., Jonas-Davies, J., Storey, P., and Olson, G.E. (1984) Effect of D-valine and cytosine arabinoside on [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in rat and rabbit epididymal epithelial cell cultures. *In Vitro* 20, 45-52.
- Pacey, A.A., Hill, C.J., Scudamore, I.W., Warren, M.A., Barratt, C.L., and Cooke, I.D. (1995) The interaction in vitro of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube. *Hum. Reprod.* 10, 360-6.
- Palacios, J., Regadera, J., Paniagua, R., Gamallo, C., and Nistal, M. (1993) Immunohistochemistry of the human ductus epididymis. *Anat. Rec.* 235, 560-6.
- Pera, I., Ivell, R., and Kirchhoff, C. (1996) Body temperature (37°C) specifically down-regulates the messenger ribonucleic acid for the major sperm surface antigen CD52 in epididymal cell culture. *Endocrinology* 137, 4451-9.
- Perez-Sanchez, F., Tablado, L., Yeung, C.H., Cooper, T.G., and Soler, C. (1996) Changes in the motility patterns of spermatozoa from the rabbit epididymis as assessed by computer-aided sperm motion analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 364-71.
- Petrunkina, A.M., Gehlhaar, R., Drommer, W., Waberski, D., and Topfer-Petersen, E. (2001) Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction* 121, 889-96.
- Pholpramool, C., White, R.W., and Setchell, B.P. (1982) Influence of androgens on inositol secretion and sperm transport in the epididymis of rats. *J. Reprod. Fertil.* 66, 547-53.
- Pruneda, A., Pinart, E., Dolores Briz, M., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Kadar, 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, 2219-32.
- Pujol, A., and Bayard, F. (1979) Androgen receptors in the rat epididymis and their hormonal control. *J. Reprod. Fertil.* 56, 217-22.
- Raczek, S., Yeung, C.H., Hertle, L., Schulze, H., and Cooper, T.G. (1992) Appearance and endocytic activity of epithelial cells from human efferent ducts in primary monolayer culture. *Cell Tissue Res.* 270, 513-9.
- Raczek, S., Yeung, C.H., Wagenfeld, A., Hertle, L., Schulze, H., and Cooper, T.G. (1994) Epithelial monolayers from human epididymal and efferent duct tubules; testosterone metabolism and effects of culture conditions on cell height and confluence. *Epithelial Cell Biol.* 3, 126-36.
- Raczek, S., Yeung, C.H., Hasilik, A., Robenek, H., Hertle, L., Schulze, H., and Cooper, T.G. (1995) Immunocytochemical localisation of some lysosomal hydrolases, their presence in luminal fluid and their directional secretion by human epididymal cells in culture. *Cell Tissue Res.* 280, 415-25.
- Rao, B., Soufir, J.C., Martin, M., and David, G. (1989) Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.* 24, 127-34.
- Regalado, F., Esponda, P., and Nieto, A. (1993) Temperature and androgens regulate the biosynthesis of secretory proteins from rabbit cauda epididymidis. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 448-53.
- Reid, B.L., and Cleland, K.W. (1957) The structure and function of the epididymis. The histology of the rat epididymis. *Aust. J. Zool.* 5, 223-246.

- Reyes-Moreno, C., Boilard, M., Sullivan, R., and Sirard, M.A. (2002) Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 500-9.
- Ritzen, E.M., Nayfeh, S.N., French, F.S., and Dobbins, M.C. (1971) Demonstration of androgen-binding components in rat epididymis cytosol and comparison with binding components in prostate and other tissues. *Endocrinology* 89, 143-51.
- Robaire, B., and Hermo, L. (1988) Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation, pp. 999-1080. In E. Knobil, and J. Neill (Eds): *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York.
- Rodriguez-Martinez, H., Ekstedt, E., and Einarsson, S. (1990) Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int. J. Androl.* 13, 238-43.
- Sanocka, D., and Kurpisz, M. (2004) Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 12.
- Satoh, T., Abe, H., Sendai, Y., Iwata, H., and Hoshi, H. (1995) Biochemical characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1266, 117-23.
- Seiler, P., Cooper, T.G., Yeung, C.H., and Nieschlag, E. (1999) Regional variation in macrophage antigen expression by murine epididymal basal cells and their regulation by testicular factors. *J. Androl.* 20, 738-46.
- Serre, V., and Robaire, B. (1999) Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol. Reprod.* 61, 705-14.
- Setchell, B.P. (1967) Fluid secretion by the testis. *J. Reprod. Fertil.* 14, 347-8.
- Setchell, B.P. (1969) Do Sertoli cells secrete fluid into the seminiferous tubules? *J. Reprod. Fertil.* 19, 391-2.
- Setchell, B.P., Sanchez-Partida, L.G., and Chairussyuhur, A. (1993) Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 601-12.
- Setchell, B.P., Maddocks, S., and Brook, D.E. (1994) *Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract*. Raven Press. New York.
- Shiu, S.Y., Li, L., Siu, S.W., Xi, S.C., Fong, S.W., and Pang, S.F. (2000) Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. *Biol. Signals Recept.* 9, 172-87.
- Sipila, P., Shariatmadari, R., Huhtaniemi, I.T., and Poutanen, M. (2004) Immortalization of epididymal epithelium in transgenic mice expressing simian virus 40 T antigen: characterization of cell lines and regulation of the polyoma enhancer activator 3. *Endocrinology* 145, 437-46.
- Smayawardhena, L.A., and Moore, H.D. (1999) Effects of pre-exposure of hamster epididymal epithelium cultures with low concentrations of methoxy acetic acid on the motility and survival of co-incubated epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 24, 29.
- Smith, C.A., Hartman, T.D., and Moore, H.D. (1986) A determinant of Mr 34,000 expressed by hamster epididymal epithelium binds specifically to spermatozoa in co-culture. *J. Reprod. Fertil.* 78, 337-45.
- Smithwick, E.B., and Young, L.G. (1997) Sequential histology of the adult chimpanzee epididymis. *Tissue Cell* 29, 383-412.



- Soler, C., Yeung, C.H., and Cooper, T.G. (1994) Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int. J. Androl.* 17, 271-8.
- Stoffel, M.H., and Friess, A.E. (1994) Morphological characteristics of boar efferent ductules and epididymal duct. *Microsc. Res. Tech.* 29, 411-31.
- Stoffel, M.H., Busato, A., and Friess, A.E. (2002) Density and distribution of anionic sites on boar ejaculated and epididymal spermatozoa. *Histochem. Cell. Biol.* 117, 441-5.
- Sun, E.L., and Flickinger, C.J. (1980) Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. *Anat. Rec.* 196, 285-93.
- Sun, E.L., and Flickinger, C.J. (1982) Proliferative activity in the rat epididymis during postnatal development. *Anat. Rec.* 203, 273-84.
- Sun, G.H., Lin, Y.C., Cha, T.L., Yu, D.S., Chang, S.Y., and Liu, H.W. (2000) Conjugation of maturation-related wheat-germ-lectin-binding proteins to caput epididymal sperm in co-cultures with corpus epididymal epithelial cells of BALB/c mouse. *Arch. Androl.* 45, 43-52.
- Sun, G.H., Liu, H.W., Lin, Y.C., Yu, D.S., and Chang, S.Y. (2000) Identification of maturation-related wheat-germ lectin-binding proteins in the culture of human corpus epididymal epithelial cells. *Arch. Androl.* 45, 53-60.
- Swierstra, E.E. (1968) Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anat. Rec.* 161, 171-85.
- Syntin, P., Dacheux, F., Druart, X., Gatti, J.L., Okamura, N., and Dacheux, J.L. (1996) Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol. Reprod.* 55, 956-74.
- Syntin, P., Dacheux, J.L., and Dacheux, F. (1999) Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. *Biol. Reprod.* 61, 1622-35.
- Tash, J.S., and Means, A.R. (1983) Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol. Reprod.* 28, 75-104.
- Telgmann, R., Brosens, J.J., Kappler-Hanno, K., Ivell, R., and Kirchhoff, C. (2001) Epididymal epithelium immortalized by simian virus 40 large T antigen: a model to study epididymal gene expression. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 935-45.
- Tezon, J.G., and Blaquier, J.A. (1981) The organ culture of human epididymal tubules and their response to androgens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 21, 233-42.
- Tezon, J.G., Vazquez, M.H., Pineiro, L., de Larminat, M.A., and Blaquier, J.A. (1985) Identification of androgen-induced proteins in human epididymis. *Biol. Reprod.* 32, 584-90.
- Thundathil, J., Palasz, A.T., Barth, A.D., and Mapletoft, R.J. (2001) The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 181-92.
- Tuck, R.R., Setchell, B.P., Waites, G.M., and Young, J.A. (1970) The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. *Pflugers. Arch.* 318, 225-43.
- Turner, T.T., Jones, C.E., Howards, S.S., Ewing, L.L., Zegeye, B., and Gunsalus, G.L. (1984) On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology* 115, 1925-32.

- Turner, T.T., Gleavy, J.L., and Harris, J.M. (1990) Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. *J. Androl.* 11, 422-8.
- Turner, T.T., Avery, E.A., and Sawchuk, T.J. (1994) Assessment of protein synthesis and secretion by rat seminiferous and epididymal tubules in vivo. *Int. J. Androl.* 17, 205-13.
- Turner, T.T. (1995) On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J. Androl.* 16, 292-8.
- Turner, T.T., Riley, T.A., Vagnetti, M., Flickinger, C.J., Caldwell, J.A., and Hunt, D.F. (2000) Postvasectomy alterations in protein synthesis and secretion in the rat caput epididymidis are not repaired after vasovasostomy. *J. Androl.* 21, 276-90.
- Ungefroren, H., Ivell, R., and Ergun, S. (1997) Region-specific expression of the androgen receptor in the human epididymis. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 933-40.
- Vazquez, M.H., de Larminat, M.A., and Blaquier, J.A. (1986) Effect of androgen on androgen receptors in cultured human epididymis. *J. Endocrinol.* 111, 343-8.
- Vendrely, C., and Durliat, M. (1968) Autoradiographic study of the influence of the male hormone on leucine incorporation in the genital tract of white mice. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 51, 733-40.
- Veri, J.P., Hermo, L., and Robaire, B. (1993) Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. *J. Androl.* 14, 23-44.
- Vierula, M.E., Araki, Y., Rankin, T.L., Tulsiani, D.R., and Orgebin-Crist, M.C. (1992) Immunolocalization of a 25-kilodalton protein in mouse testis and epididymis. *Biol. Reprod.* 47, 844-56.
- Vigersky, R.A., Loriaux, D.L., Howards, S.S., Hodgen, G.B., Lipsett, M.B., and Chrambach, A. (1976) Androgen binding proteins of testis, epididymis, and plasma in man and monkey. *J. Clin. Invest.* 58, 1061-8.
- Voglmayr, J.K. (1975) Metabolic changes in spermatozoa during epididymal transit. In R.O. Greep, and E.B. Astwood (Eds): *Handbook of Physiology: Endocrinology, Male Reproductive System*, Waverly Press, Washington.
- Vreeburg, J.T., Holland, M.K., Cornwall, G.A., and Orgebin-Crist, M.C. (1990) Secretion and transport of mouse epididymal proteins after injection of <sup>35</sup>S-methionine. *Biol. Reprod.* 43, 113-20.
- Vreeburg, J.T., Holland, M.K., and Orgebin-Crist, M.C. (1992) Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa in vivo. *Biol. Reprod.* 47, 588-97.
- Wagley, L.M., Versluis, T.D., Brown, D.V., and Amann, R.P. (1984) Culture of principal cells from the ram epididymis. A comparison of the morphology of principal cells in culture and in situ. *J. Androl.* 5, 389-408.
- Weddington, S.C., Brandtzaeg, P., Hansson, V., French, F.S., Petrusz, P., and Ritzen, E.M. (1975) Immunological cross reactivity between testicular androgen-binding protein and serum testosterone-binding globulin. *Nature* 258, 257-9.
- White, M.G., Huang, Y.S., Tres, L.L., and Kierszenbaum, A.L. (1982) Structural and functional aspects of cultured epididymal epithelial cells isolated from pubertal rats. *J. Reprod. Fertil.* 66, 475-84.
- White, W.E. (1932) The effect of hypophysectomy on the survival of spermatozoa in the male rat. *Anat. Rec.* 54, 253-273.

- Wichmann, L., Vaalasti, A., Vaalasti, T., and Tuohimaa, P. (1989) Localization of lactoferrin in the male reproductive tract. *Int. J. Androl.* 12, 179-86.
- Wong, P.Y., and Yeung, C.H. (1977) Hormonal regulation of fluid reabsorption in isolated rat cauda epididymidis. *Endocrinology* 101, 1391-7.
- Wong, P.Y.D., Au, C.L., and Ngai, H.K. (1979) Some characteristics of salt and water transport in the rat epididymis. In D.W. Fawcett, and J.M. Bedford (Eds): *The Spermatozoon*, Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich.
- Wong, P.Y.D. (1986) Fluid transport and sperm maturation in the epididymis. *Biomed. Res.* 7 (Suppl 2), 233.
- Yap, A.S., Mullin, J.M., and Stevenson, B.R. (1998) Molecular analyses of tight junction physiology: insights and paradoxes. *J. Membr. Biol.* 163, 159-67.
- Yeung, C.H., Cooper, T.G., and Meyer, R. (1989) Immature rat epididymal epithelial cells grown in static primary monolayer culture on permeable supports. II. Histochemistry and ultrastructure. *Cell Tissue Res.* 256, 573-80.
- Yeung, C.H., Cooper, T.G., Oberpenning, F., Schulze, H., and Nieschlag, E. (1993) Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol. Reprod.* 49, 274-80.
- Yeung, C.H., Nashan, D., Sorg, C., Oberpenning, F., Schulze, H., Nieschlag, E., and Cooper, T.G. (1994) Basal cells of the human epididymis—antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol. Reprod.* 50, 917-26.
- Yeung, C.H., and Cooper, T.G. (2002) *Acquisition and development of sperm motility upon maturation in the epididymis*. Kluwer Academic / Plenum Publishers. London.
- Younes, M., Evans, B.A., Chaisiri, N., Valotaire, Y., and Pierrepoint, C.G. (1979) Steroid receptors in the canine epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 56, 45-52.
- Zhang, T., Guo, C.X., Hu, Z.Y., and Liu, Y.X. (1997) Localization of plasminogen activator and inhibitor, LH and androgen receptors and inhibin subunits in monkey epididymis. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 945-52.
- Zhou, C.X., Zhang, Y.L., Xiao, L., Zheng, M., Leung, K.M., Chan, M.Y., Lo, P.S., Tsang, L.L., Wong, H.Y., Ho, L.S., Chung, Y.W., and Chan, H.C. (2004) An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat. Cell. Biol.* 6, 458-64.
- Zhu, L.J., Hardy, M.P., Inigo, I.V., Huhtaniemi, I., Bardin, C.W., and Moo-Young, A.J. (2000) Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol. Reprod.* 63, 368-76
- Zini, A., O'Bryan, M.K., Israel, L., and Schlegel, P.N. (1998) Human sperm NADH and NADPH diaphorase cytochemistry: correlation with sperm motility. *Urology* 51, 464-8.

