

## Reservorios espermáticos en el oviducto de llama y avances en el estudio de los sistemas proteolíticos involucrados

Silvana A. Apichela

Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO). CONICET-UNT.  
Chacabuco 461. San Miguel de Tucumán. Argentina

### Sperm reservoir in the llama oviduct and advances in the study of the proteolytic systems involved

**ABSTRACT.** In South American Camelids, ovulation occurs about 36 hours after mating. A sperm reservoir is formed in the of llama oviduct by sperm adhesion the mucosa, during until at least 28 hours after mating. Contribute to this process the anatomical design of the UUT, the characteristics of epithelial cell surface and a mechanism of recognition of oviductal carbohydrates, galactose and N-acetyl galactosamine, by the sperm. This mechanism would be also favored by seminal plasma components. 35 hours after mating, when ovulation is imminent, no sperm were seen attached to the oviduct, thus proposing a possible involvement of the oviduct in their release. We postulate that the oviduct would secrete enzymes capable of liquefying the seminal plasma to release sperm from the sperm reservoir.

**Key words:** llama, oviduct, sperm reservoir

**RESUMEN.** En los camélidos sudamericanos, la ovulación se produce cerca de 36 hs después de la cópula. Mediante diferentes estudios demostramos que el oviducto de llama forma reservorios espermáticos en la unión útero tubal (UUT) por adhesión de los espermatozoides a la mucosa hasta al menos 28 horas después de la cópula. Contribuyen a este proceso el diseño anatómico de la UUT, las características de superficie de las células epiteliales y el reconocimiento de los carbohidratos oviductales Galactosa y N-Acetil galactosamina por el espermatozoide, al que favorecen también componentes del plasma seminal. Luego de transcurridas 35 horas, cuando la ovulación es inminente, no se observan espermatozoides adheridos al oviducto, por lo que se propone una posible participación del oviducto en su liberación. Postulamos que el oviducto secretaría enzimas capaces de licuar el plasma seminal para liberar los espermatozoides.

**Palabras clave:** llama, oviducto, reservorios espermáticos

### Introducción

El oviducto de mamíferos tiene una posición única en el proceso reproductor. Es aquí donde el espermatozoide espera el arribo del ovocito. Dentro del oviducto tiene lugar la fecundación, y comienza el desarrollo del embrión. Aunque se ha demostrado que algunas de estas funciones pueden ocurrir bajo condiciones especiales in vitro, el gran desafío es conocer como se combinan los componentes del oviducto para hacer posible que todos estos procesos ocurran con éxito y de una manera ordenada, haciendo el posible proceso reproductor.

Existen antecedentes que indican que en los mamíferos el oviducto actuaría como reservorio funcional de espermatozoides. Estos reservorios espermáticos asegurarían que un gran número de espermatozoides se mantengan fértiles hasta el momento de la ovulación. Algunas evidencias indirectas sugieren que la adhesión de los espermatozoides a las células oviductales in vivo sería un requisito para lograr una fecundación exitosa. Otras indican que los espermatozoides liberados del reservorio son los más aptos para fecundar al ovocito. Debido a que

<sup>1</sup>Autor para la correspondencia, e-mail:

en llamas la ovulación ocurre entre las 26 y las 42 horas después de la cópula (Adams *et al.*, 1991), el establecimiento y mantenimiento de reservorios espermáticos en el oviducto parece imprescindible para mantener la fertilidad de los espermatozoides hasta el momento de la fecundación. Nuestra hipótesis es que el oviducto de llama almacena los espermatozoides hasta el momento de la ovulación.

Estudios anatómicos, histológicos, histoquímicos y ultraestructurales mostraron diferencias entre los distintos segmentos oviductales, los que podrían estar asociados a la capacidad para formar reservorios espermáticos, hipótesis que luego se demuestra con ensayos *in vitro*. En los camélidos podemos diferenciar 4 regiones anatómicas de caudal a craneal: infundíbulo, ampolla o ampúla, istmo y unión útero-tubal (UUT). Esta última termina en el útero formando una papila, la cual tiene un esfínter muscular que protruye dentro del cuerno uterino. Ultraestructuralmente, observamos que tanto el oviducto de llama como el de vicuña poseen un epitelio pseudoestratificado con células ciliadas y secretoras (Apichela *et al.*, 2006). Las células ciliadas poseen abundante cantidad de cilias, y las células secretoras abundantes microvellosidades. Los dos segmentos caudales istmo y UUT poseen marcadas diferencias ultraestructurales. La proporción de células ciliadas con respecto a las secretoras es mayor en el istmo, mientras que las células secretoras son más abundantes en la UUT. Las células secretoras de ambos segmentos también presentan morfología diversa, mientras las células del istmo son bulbosas y lisas, las de la UUT son más bajas y cubiertas de microvellosidades. Estas diferencias podrían asociarse a una función específica y distinta en el proceso reproductivo. Además, ambas poseen abundante gránulos de secreción ubicados en el citoplasma apical. Aparentemente el producto de secreción se elimina con pérdida del citoplasma apical. La morfología del epitelio se modifica cuando se libera el producto de secreción observándose la disminución de la altura del epitelio y un aumento de la longitud de las microvellosidades. Todas estas características indican una intensa actividad secretoria.

Considerando estas diferencias, se estudió la formación de reservorios espermáticos por la adhesión de espermatozoides a la mucosa oviductal (Apichela *et al.*, 2009). Se observaron espermatozoides en contacto con el epitelio de la UUT a las 6, 18, 24 y 28 hs post-cópula, atrapados en una sustancia distribuida en parches sobre la mucosa, ausente en las hembras sin aparear. 35 horas después de la cópula no se encontraron espermatozoides en contacto con la mucosa. En istmo no se detectaron espermatozoides adhe-

ridos en ningún caso. Consideramos muy probable que la interacción oviducto-espermatozoides sea importante para proteger la integridad de las membranas impidiendo la capacitación y la reacción acrosómica. De esa forma podrán esperar hasta la ovulación, momento en que por otro mecanismo aún desconocido se desvincularían de la mucosa para ascender hasta el ampúla y fertilizar el ovocito.

El uso de explantos de oviducto para el co-cultivo con espermatozoides durante la FIV se ha usado en numerosas especies de mamíferos, incluida la llama (Del Campo *et al.*, 1994). Se ha sugerido que glicoproteínas secretadas por las células epiteliales no ciliadas del oviducto pueden unirse a la membrana del espermatozoide y reducir la polispermia. Si esto es así, resulta interesante conocer si las diferencias para unir espermatozoides que presentan el istmo y la UUT *in vivo*, se mantienen *in vitro*, a fin de determinar el tipo celular adecuado para realizar cocultivos con espermatozoides. Para ello realizamos ensayos de interacción de espermatozoides con cúmulos de células epiteliales (CCE) pre-cultivadas 24 horas, estableciendo el índice de unión (IU= n° espermatozoides /0.5 mm<sup>2</sup> de CCE). La UUT presentó un IU superior a Istmo (P<0.001, t test), demostrando que mantiene su capacidad diferencial de unir espermatozoides después de 24 horas de cultivo (Apichela *et al.*, 2009).

Estudios *in vitro* también nos permitieron demostrar que el sistema de reconocimiento de carbohidratos de la superficie oviductal - lectinas del espermatozoide, participa en el proceso de adhesión al epitelio de la UUT, siendo Galactosa y N Acetil galactosamina los principales azúcares involucrados en esta interacción (Apichela *et al.*, 2010). La molécula que reconoce este azúcar sería aportada al espermatozoide por el plasma seminal durante la eyaculación, ya que los espermatozoides epididimales no unen este azúcar (Apichela *et al.*, 2008).

Considerando lo expuesto y las particulares características físicas del semen de llama, se estudió la participación del plasma seminal, en especial las secreciones de las glándulas bulbouretrales, en la adhesión de los espermatozoides al oviducto. Mediante microscopía electrónica de barrido en oviductos de hembras apareadas con machos bulboretrectomizados no se observan espermatozoides adheridos al epitelio de la UUT. Se observó nuevamente la sustancia adherente en la UUT de hembras apareadas con machos no bulboretrectomizados (Apichela *et al.*, 2007). Estos resultados indican que el plasma seminal participaría también en la formación del reservorio espermático. Estos resultados indicarían que el plas-

ma seminal, dado sus particulares características físicas en camélidos, participaría en el almacenamiento de espermatozoides en el oviducto y sería un factor importante a considerar en el desarrollo de biotecnología.

Además proponemos que los espermatozoides se liberan del epitelio oviductal por acción de enzimas proteolíticas tipo metaloproteasas (MMPs). Hasta el momento hemos detectado que el oviducto de llama expresa MMP1, MMP 2 y MMP 9. Esto nos permitirá realizar experimentos específicos a fin de determinar

su acción sobre los espermatozoides y el plasma seminal.

En conclusión, los espermatozoides de llama formarían reservorios en el oviducto de llama. Contribuyen a este proceso el diseño anatómico de la UUT, las características de superficie de las células epiteliales y el reconocimiento de los carbohidratos oviductales Galactosa y N-Acetil galactosamina por el espermatozoide, y componentes del plasma seminal.

## Literatura Citada

- Adams, G. P., J. Sumar,, and O. J. Ginther. 1991. Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 24, 127-138.
- Apichela, S., J. N. Valz-Gianinet, S. Schuster, M. A. Jiménez-Díaz, M. Roldán-Olarte, D. C. Miceli. 2010. Lectin binding patterns and carbohydrate mediation of sperm binding to llama oviductal cells in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 118:344-353.
- Apichela, S., G. Chaves, V. Trasorra, M. Carretero, M. Pinto, B. Rutter, M. Jimenez Díaz, A. Agüero, and D. Miceli. 2007. Bulbouretral Glands Secretions Involvement in Lama Oviduct Sperm Reservoir Formation». *Biocell* 31:295.
- Apichela, S., M. A. Jiménez Díaz, J. Valz Gianinet, M. E. Roldán Olarte, and D. C. Miceli. 2008. Llama Sperm Binding to Oviductal Epithelium Involves N-Acetyl Galactosamine Recognition». *Reproduction in Domestic Animals* 43:96. Abstract
- Apichela, S., M. A. Jiménez-Díaz, E. Roldan-Olarte, J. Valz-Gianinet, and D. C. Miceli. 2009. In Vivo and In Vitro Sperm Interaction with Oviductal Epithelial Cells of Llama. *Reproduction in Domestic Animals* 44:943-951
- Apichela, S., M. Jimenez-Diaz, S. Shuster, F. Sinowatz and D. C. Miceli. 2006. Vicuna oviduct mucosa: ultrastructure and lectin affinities. *Small Ruminant Res.* 66:164-168.