

## QUALITAT MICROSCÒPICA DELS ESPERMATOZOIDES A LES REGIONS CEFÀLICA, CORPORAL I CAUDAL DE L'EPIDÍDIM DE *Sus domesticus*

M. DOLORS BRIZ, SERGI BONET I ANNA FRADERA

*Unitat de Biologia Cel·lular. Universitat de Girona*

### SUMMARY

Sperm quality in the three epididymal regions, head, body and tail, has been studied in healthy and sexually mature Landrace boars. The pH of the sperm from the epididymal tail is slightly alkaline, while that of the other two regions is slightly acid. Sperm motility is nil in the first two regions and around 5% in the tail region. Osmotic resistance of the acrosome is very low in the sperm from the head region, and practically 100% in the body and tail regions. Sperm viability decreases very slightly, although progressively with the passage of sperm through the epididymal duct. The percentage of mature and aberrant spermatozoa increases from the head to the tail, while the percentage of immature sperm decreases. The percentage of spermatozoa with the head detached from the tail remains stable in the first two regions of the epididymis, increasing notably in the tail region. The acrosomal protuberance, observed by scanning electron microscopy, is highly developed in the head region, but its volume is considerably reduced in the sperm of the tail region. The electron density of the acrosomal content is lower in sperm from the head region than from the tail. The complex epididymal maturation process of the sperm brings about quantitative and qualitative changes which can be characterised in each of the three epididymal regions. The count carried out in each region of the epididymis indicates that significant differences ( $p < 0.01$ ) exist between the frequencies of each type of malformation and the epididymal region from where the sperm come from. Spermatozoa with folded tails at Jensen's ring originate in the cauda of the epididymis from immature spermatozoa that have not ejected the distal cytoplasmic droplet. Spermatozoa with one head and two fused tails originate in the

epididymal body and spermatozoa with two heads and two fused tails originate in the cephalic region. The frequency of spermatozoa with two fused tails increases as the sperm progress through the epididymal duct.

## INTRODUCCIÓ

La qualitat dels espermatozoides de l'ejaculat de *Sus domesticus* ha estat estudiada al microscopi òptic (29) i als microscopis electrònics de transmissió i de rastreig (8, 9, 10, 11). L'estudi ultraestructural de l'espermatozoide a la regió caudal epididimària fou realitzat per Nicander i Bane (30). Les tres causes fonamentals i no excloents que determinen una baixa qualitat espermàtica són: baixa concentració d'espermatozoides o oligozoospermia, baixa motilitat espermàtica o astenozoospermia i augment de les formes gamètiques anormals o teratozoospermia. Els factors que influeixen en la qualitat espermàtica del mascle reproductor porcí han estat recentment revisats (14, 15). Segons aquests autors, la llum, la temperatura i la humitat ambientals, la nutrició, la raça, les malalties infeccioses i el maneig dels mascles són els factors que més incideixen sobre la qualitat espermàtica de l'ejaculat. De tots ells, el ritme d'extraccions de semen (40) i la temperatura ambiental (27, 41) són els més freqüents i més estudiats. Cadascun d'aquests factors incideix d'una manera específica sobre la qualitat dels espermatozoides i determina l'aparició de més o de noves formes gamètiques aberrants.

Per a un mascle reproductor porcí, el ritme màxim d'extraccions de semen sense que quedi afectada la qualitat espermàtica depèn de la producció espermàtica del nombre d'espermatozoides per ejaculat i del temps que

necessiten els espermatozoides per recórrer el conducte epididimari. Singh (37) i Swierstra (39), estudiaren, per mètodes autoradiogràfics, el temps que triga l'espermatozoide a recórrer l'epidídim, i varen establir tres dies per a la regió cefàlica de l'epidídim, dos dies per a la regió corporal i de quatre a nou dies per a la regió caudal. Durant aquestes quasi dues setmanes de recorregut epididimari, els espermatozoides seguiran un complex procés de maduració que es realitzarà bàsicament en les dues primeres regions de l'epidídim, i s'emmagatzemaran, una vegada madurs, en la cua epididimària (23) fins al moment de l'ejaculació.

En examinar un ejaculat, el coneixement de la qualitat espermàtica en cadascuna de les regions de l'epidídim ens permetrà establir fins a quin extrem s'ha estressat el mascle pel ritme de recollides de semen. Segons Buxadé (12), quan es produeix una ejaculació, surten aproximadament el 60% dels espermatozoides emmagatzemats en la cua epididimària; en tres o quatre extraccions consecutives es buida per complet la cua de l'epidídim i, en forçar-se el pas dels espermatozoides a través de l'epidídim s'obtenen espermatozoides immadurs amb característiques quantitatives i qualitatives pròpies de les regions cefàlica o corporal de l'epidídim i no aptes per a la fecundació. En aquest treball s'estudien en profunditat la qualitat microscòpica dels espermatozoides en les regions cefàlica, corporal i caudal de l'epidídim, i la ultraestructura de les principals malformacions gamètiques d'origen epididimari.

## MATERIAL I MÈTODES

Dos mascles de raça Landrace, sans i sexualment madurs (30 i 36 mesos d'edat), procedents d'un centre d'inseminació, van ser sotmesos des dels 10 mesos d'edat a un ritme d'extraccions de semen de dues vegades per setmana i a un repòs sexual de 48 hores abans de ser sacrificats. Els espermatozoides han estat obtinguts als 22 mesos d'edat a partir de les tres regions epididimàries, cap, cos i cua.

Per a la determinació del pH, deu mostres procedents de cadascuna de les regions epididimàries van ser valorades amb paper sensible al pH 6,4 a 8,0.

Per a la valoració de la motilitat espermàtica, una mostra de 500 espermatozoides per a cadascuna de les regions epididimàries va ser examinada al microscopi de contrast de fases. La motilitat espermàtica ha estat classificada segons el criteri i el mètode establerts per l'OMS (42).

Per a la determinació de la viabilitat espermàtica, una mostra de 500 espermatozoides per a cadascuna de les regions epididimàries va ser examinada al microscopi òptic després d'obtenir frotis tenyits amb eosinagina (42).

La resistència osmòtica dels acrosomes (ORT) fou determinada a partir del recompte de 400 espermatozoides procedents de cadascuna de les regions epididimàries i després de ser sotmesos a l'acció d'una solució isotònica (300 mOsm) i d'una solució hipotònica (150 mOsm) de citrat sòdic (36).

La morfologia dels espermatozoides ha estat estudiada al microscopi òptic i als microscopis electrònics de transmissió i de rastreig.

Per a l'examen de l'esperma al microscopi òptic, les mostres obtingudes han estat rentades en diluent de Kiew i s'han obtingut dilucions d'1:100 (esperma:diluent de Kiew). Les

extensions obtingudes van ser fixades amb Merckofix (Merck-3970) i tenyides pels mètodes de Diff-Quick (Harleco, SA) o Papanicolau (1).

Per establir els percentatges de les diferents formes gamètiques madures, immadures i aberrants s'ha fet el recompte de 900 espermatozoides procedents de cadascuna de les regions epididimàries. Els percentatges d'espermatozoides amb caps despresos de les cues s'han establert a partir del recompte de 500 espermatozoides per a cada regió epididimària. Els percentatges de les diferents malformacions espermàtiques, segons el tipus de malformació, han estat establerts a partir del recompte de 2.000, 4.000, 6.000 i 10.000 cèl·lules per a cadascuna de les tres regions epididimàries. Les freqüències de cadascuna d'aquestes malformacions per a les tres regions epididimàries han estat comparades a partir del test de la  $\chi^2$  de Pearson.

Per a l'estudi de la morfologia externa dels espermatozoides al microscopi electrònic de rastreig, mostres d'espermatozoides procedents de cadascuna de les regions epididimàries van ser rentades amb tampó fosfat de Sörensen 0,16 M i pH 7,2, fixades amb glutaraldehid tamponat al 2,5 %, postfixades en tetraòxid d'osmi al 1 %, deshidratades en sèrie alcohòlica creixent, dipositades en filtres Nuclepore de 0,2  $\mu$ m de diàmetre de porus, sotmeses a punt crític, metal·litzades en un Sputtering-3000 amb una capa d'or-pal·ladi de 50 nm de gruix i observades en un Hitachi S-570 (7) del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Per a l'estudi ultrastructural dels espermatozoides al microscopi electrònic de transmissió, mostres d'espermatozoides procedents de cadascuna de les regions de l'epidídim van ser rentades en tampó fosfat de Sörensen 0,16 M i pH 7,2, fixades en glutaraldehid tamponat

al 2,5 %, postfixades en tetraòxid d'osmi a l'1%, i incloses en resina Spurr ERL 4026 (38). Els talls fins obtinguts han estat contrastats en acetat d'uranil i citrat de plom (35) i observats en un Hitachi HV 12A (7) del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

## RESULTATS

A partir dels espermatozoides procedents de cadascuna de les regions epididimàries s'ha valorat el pH, la motilitat, la viabilitat, la resistència osmòtica dels acrosomes i la qualitat espermàtica (espermatozoides madurs, immadurs i aberrants). Així mateix, s'han comparat les diferents malformacions espermàtiques observades en les regions cefàlica i caudal de l'epidídim. Finalment, s'ha determinat l'origen, el desenvolupament i la ultraestructura dels espermatozoides de cua doblegada per l'anell de Jensen i dels espermatozoides amb dues cues.

No s'observen diferències significatives ( $p < 0.01$ ) entre els valors de pH de l'esperma procedent de les dues primeres regions de l'epidídim ( $pH = 6,5-7,0$ ), però sí entre aquests valors i els de la regió caudal ( $pH = 7,0-7,5$ ). L'esperma al llarg de l'epidídim passa d'un pH lleugerament àcid, en la regió cefàlica, a un pH lleugerament alcalí en la regió caudal.

La motilitat espermàtica en les regions cefàlica i corporal de l'epidídim és nul·la (0%), amb un 100 % d'espermatozoides amb categoria "d" o "0". L'esperma de la regió caudal presenta una lleugera motilitat (5%), i el moviment és del tipus progressiu, però lent (categoria "b" o "2") o no progressiu (categoria "c" o "1").

La viabilitat espermàtica és diferent ( $p < 0,01$ ) en cadascuna de les regions epididimàries, de manera que la mortalitat augmenta des de la regió cefàlica a la regió caudal del conducte epididimari (vegeu la taula I).

TAULA I

### Viabilitat espermàtica (% d'espermatozoides morts i vius) a les tres regions epididimàries

	Regió cefàlica	Regió corporal	Regió caudal
Espermatozoides morts (%)	4,0 ± 1,7	13,2 ± 1,9	24,2 ± 4,2
Espermatozoides vius (%)	96,0 ± 1,7	86,8 ± 1,9	75,8 ± 4,2

La resistència osmòtica dels acrosomes al medi hipotònic (150 m Osm) és significativament diferent ( $p < 0,01$ ) entre l'esperma de la regió cefàlica i el de les regions corporal i caudal (vegeu la taula II). Els espermatozoides procedents del cos i la cua de l'epidídim són molt resistents a les diferències de pressió

osmòtica del medi, mentre que els espermatozoides procedents de la regió cefàlica de l'epidídim són molt sensibles als canvis osmòtics del medi. Així doncs, la resistència osmòtica de l'acrosoma és una propietat que l'espermatozoide adquireix en arribar al cos de l'epidídim.

TAULA II

**Resistència osmòtica dels acrosomes dels espermatozoides procedents de les tres regions epididimàries a pressió osmòtica isotònica (300 mOsm) i hipotònica (150 mOsm)**

Pressió osmòtica del medi	300 mOsm		150 mOsm	
	normal (%)	danyat (%)	normal (%)	danyat (%)
Regió cefàlica	99,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	48,5 ± 1,5	51,5 ± 12,5
Regió corporal	100	0	99 ± 1%	1,0 ± 1
Regió caudal	100	0	100	0

La qualitat espermàtica depèn també de la regió epididimària de la qual procedeix l'esperma ( $p < 0,01$ ). El percentatge d'espermatozoides madurs (vegeu la fig. 1) i aberrants augmenta des de la regió cefàlica i corporal de l'epidídim a la regió caudal; mentre que el percentatge d'espermatozoides immadurs disminueix considerablement amb el pas de l'esperma a través de l'epidídim (vegeu la taula III). En les dues primeres regions epididimàries, el percentatge d'espermatozoides immadurs es

manté, però, si bé en la regió cefàlica són majoritàriament espermatozoides amb gota citoplasmàtica proximal (vegeu la fig. 2), en la regió corporal presenten la gota en posició distal (vegeu la fig 3). Els espermatozoides immadurs procedents de la cua epididimària presenten gota distal. El percentatge d'espermatozoides amb caps aïllats es manté al llarg de

les regions cefàlica i corporal de l'epidídim, però augmenta significativament ( $p < 0,01$ ) en la regió caudal (vegeu la taula IV i la fig. 4).



FIGURA 1. Espermatozoide madur (1.200X).

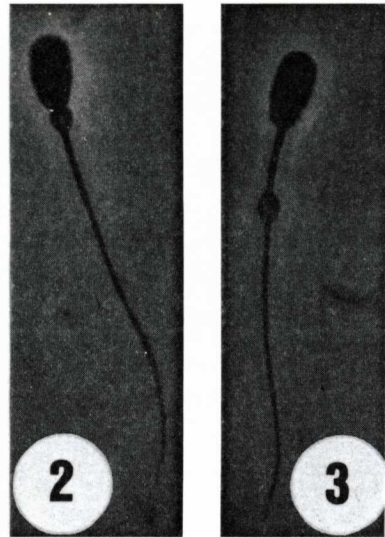


FIGURA 2. Espermatozoide immadur amb gota citoplasmàtica proximal (1.200X).

FIGURA 3. Espermatozoide immadur amb gota citoplasmàtica distal (1.200X).

TAULA III

**Qualitat dels espermatozoides a les tres regions epididimàries**

	(%) madurs	(% immadurs) gota proximal	(% immadurs) gota distal	(%) aberrants
Regió cefàlica	48,7 ± 5,9	49,0 ± 6,2	0,2 ± 0,4	2,1 ± 1,0
Regió corporal	44,2 ± 14,8	0,2 ± 0,4	52,7 ± 14,5	1,9 ± 1,5
Regió caudal	84,9 ± 2,4	0	11,0 ± 3,2	4,1 ± 1,1

Les imatges obtingudes per microscòpia electrònica de rastreig de les mostres d'esperma procedent de les regions epididimàries cefàlica i caudal permeten observar diferències en la morfologia externa del cap dels espermatozoides. Els espermatozoides immadurs amb gota proximal, propis de la regió cefàlica de l'epidídim, presenten un gran desenvolupament apical i lateral de la protuberància acrosòmica (vegeu la fig. 5). Els espermatozoides immadurs amb gota distal,

propis de la regió caudal de l'epidídim, presenten la protuberància acrosòmica considerablement reduïda, restringida només a la porció apical del cap (vegeu la fig 6). També s'observen diferències ultraestructurals entre l'esperma del cap i la cua de l'epidídim. La peça intermèdia dels espermatozoides immadurs procedents del cap epididimari es caracteritza per una beina mitocondrial d'uns 0,2 µm de diàmetre, formada per mitocondris globulars de baixa electrodensitat matricial i mida des-

TAULA IV

**Percentatge d'espermatozoides amb cap isolat de la cua en l'esperma procedent de les tres regions epididimàries**

	Caps isolats (%)	Espermatozoides normals (%)
Regió cefàlica	2,4 ± 0,80	97,6 ± 0,80
Regió corporal	1,6 ± 1,01	98,4 ± 1,01
Regió caudal	6,6 ± 1,62	93,4 ± 1,62

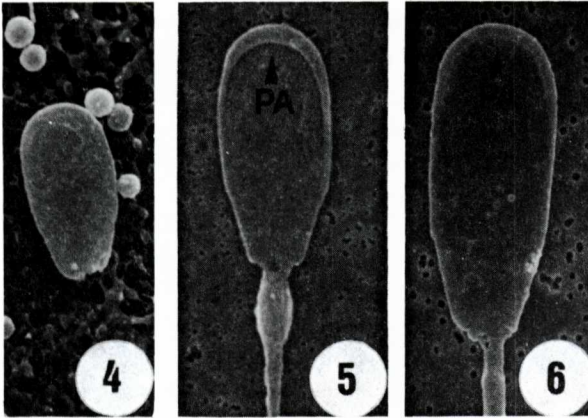


FIGURA 4. Espermatozoide amb el cap isolat (3.300X).

FIGURA 5. Espermatozoide immadur amb gota citoplasmàtica proximal, procedent de la regió cefàlica de l'epidídim. Observeu l'elevat desenvolupament de la protuberància acrosòmica (PA) (3.600X).

FIGURA 6. Espermatozoide immadur amb gota citoplasmàtica distal, procedent de la regió caudal de l'epidídim. Observeu la reducció de la protuberància acrosòmica (PA) (4.700X).

espermatozoides s'observa la baixa electrodensitat de la vesícula acrosòmica i el gran desenvolupament de la protuberància apical (vegeu la fig 7). La peça intermèdia dels espermatozoides madurs i immadurs amb gota citoplasmàtica distal de la regió caudal de l'epidídim presenta mitocondris de mida més homogènia, amb un diàmetre més reduït (0,12-0,15  $\mu\text{m}$ ) i una major electrodensitat matricial (vegeu la fig. 8). El cap d'aquests espermatozoides mostra un augment de l'electrodensitat del contingut acrosòmic, una reducció de la protuberància apical, i una reducció de la dilatació observada entre la membrana plasmàtica i la vesícula acrosòmica (fig. 9), en comparació amb la que presenten els espermatozoides immadurs procedents de la regió cefàlica de l'epidídim.

Les diferents freqüències de les diverses malformacions espermàtiques observades en les regions cefàlica i caudal de l'epidídim han estat comparades pel test de la  $\chi^2$  de Pearson, i els resultats obtinguts es mostren en la taula V. Aquestes dades indiquen que les malformacions de cua doblegada per l'anell de Jensen (vegeu la fig. 10), cua enrotllada (vegeu la fig. 11) i cues fusionades (vegeu la fig. 12) es desenvolupen durant el recorregut de l'esperma a través de l'epidídim i, fonamentalment, en

arribar a la regió caudal. La freqüència d'espermatozoides amb la cua doblegada per la peça intermèdia (vegeu la fig. 13) es redueix significativament amb el pas de l'esperma pel conducte epididimari. I, finalment, les freqüències de les malformacions que afecten la mida del cap de l'espermatozoide (macrocefàlia i microcefàlia) i les de cua doblegada per la peça de connexió i per la peça principal no varien significativament ( $p < 0,05$ ) amb el pas de l'esperma per l'epidídim (vegeu la fig. 14).

L'espermatozoide de cua doblegada per l'anell de Jensen és un gàmeta immòbil, que presenta la peça principal fusionada amb les peces intermèdia i de connexió i amb el cap (vegeu la fig. 10). La presència d'espermatozoides de cua doblegada en l'esperma depèn de la regió epididimària examinada ( $p < 0,01$ ), i és en la cua de l'epidídim on apareix aquesta malformació en un percentatge més elevat,  $0,4 \pm 0,061\%$ , en contraposició al  $0,05 \pm 0,021\%$  de les regions cefàlica i corporal de l'epidídim. Els espermatozoides de cua doblegada per l'anell de Jensen s'originen en la regió caudal de l'epidídim a partir dels espermatozoides immadurs que no han alliberat la gota citoplasmàtica distal (vegeu la fig. 15). Aquests espermatozoides encorben la cua i tanquen progressivament l'angle format per la peça intermèdia i la peça principal i, quan l'angle és

nul i la peça principal corre antiparal·lela sobre la peça intermèdia, el doblegament és irreversible, i queda cimentat per la gota citoplasmàtica. Finalment, la peça principal entrarà en contacte amb la peça intermèdia i amb el cap,

i, fusionant la membrana plasmàtica amb la d'aquestes regions, la peça principal s'incorporarà en el citoplasma que circunda la beina mitocondrial, la làmina densa postacrosòmica i la vesícula acrosòmica (vegeu la fig. 16).

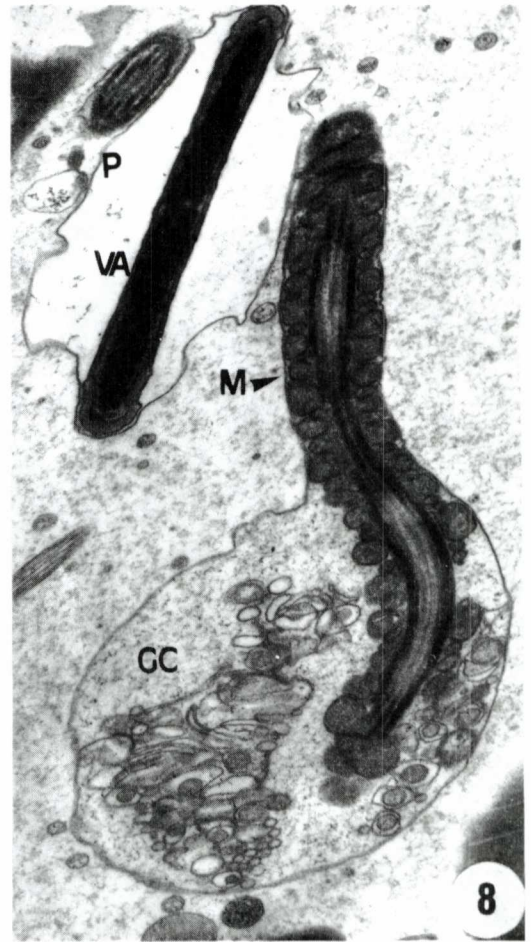
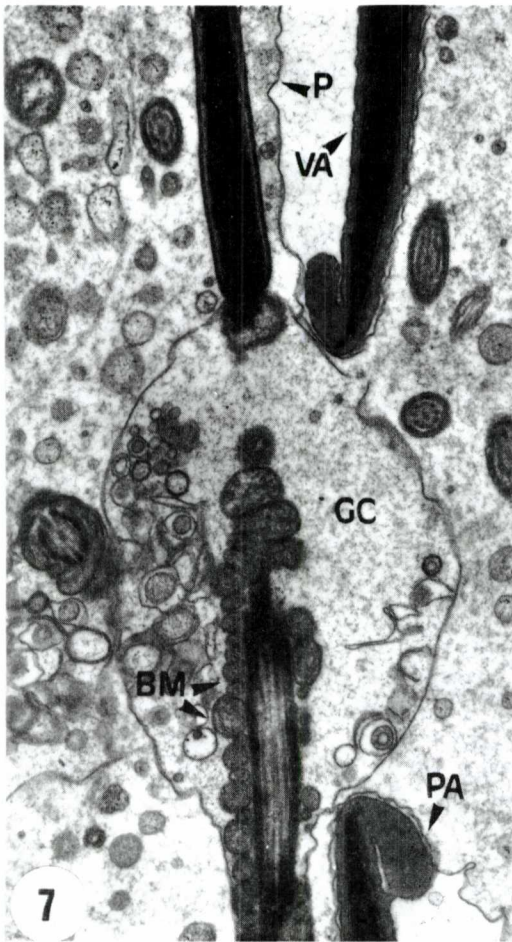


FIGURA 7. Secció longitudinal d'un espermatozoide immadur amb gota citoplasmàtica (GC) proximal procedent de la regió cefàlica de l'epidídim. Noteu el desigual desenvolupament de la beina mitocondrial (BM), la gran protuberància acrosòmica (PA), l'escassa electrodensitat del contingut acrosòmic i l'elevada separació existent entre la membrana plasmàtica (P) i la vesícula acrosòmica (VA) (18.000X).

FIGURA 8. Secció transversal del cap i secció obliqua de la peça intermèdia d'espermatozoides immadurs amb gota citoplasmàtica distal procedents de la regió cefàlica de l'epidídim. Observeu la disposició regular de les mitocondries (M) en la zona de la peça intermèdia no ocupada per la gota citoplasmàtica (GC) i la separació existent entre la membrana plasmàtica (P) i la vesícula acrosòmica (VA) (20.000X).



TAULA V

**Comparació de les freqüències de les diferents malformacions espermàtiques  
 entre les regions cefàlica i caudal de l'epidídim**

Malformació	Regió cefàlica		Regió caudal		p < $\alpha$
	espermatzoïdes normals	aberrants	espermatzoïdes normals	aberrants	
Un cap i dues cues fusionades	6.000	0	5.989	11	0,00091
Dos caps i dues cues fusionades	9.998	2	9.987	13	0,00449
Un cap i una cua enrotllada	3.999	1	3.993	7	0,03381
Dos caps i dues cues enrotllades	6.000	0	5.996	4	0,04546
Cua doblegada per l'anell de Jensen	1.999	1	1.992	8	0,01949
Cua doblegada per la peça de connexió	3.923	77	3.927	73	0,74162
Cua doblegada per la peça intermèdia	3.959	41	3.980	20	0,00695
Cua doblegada per la peça principal	5.989	11	5.988	12	0,83467
Macrocefàlia	3.998	2	3.996	4	0,41404
Microcefàlia	4.000	0	3.999	1	0,31728

$\alpha$ , nivell de significació



FIGURA 9. Secció longitudinal del cap d'un espermatozoide madur. Observeu l'elevada electrodensitat del contingut acrosòmic i la reducció del volum de la protuberància acrosòmica (PA) (2.500X).

Els espermatozoides amb dues cues són aquells que tenen un doscaps i una cua que resulta de la fusió de dues cues normals (vegeu la fig. 12). El percentatge d'espermatozoides amb un cap i dues cues fusionades passa del 0 %, en la regió cefàlica de l'epidídim, al  $0,12 \pm 0,032$  % i  $0,18 \pm 0,038$  % en les regions corporal i caudal, respectivament.

Els espermatozoides amb un cap i dues cues fusionades s'originen en el cos epididimari a partir dels espermatozoides amb un cap i dues cues no fusionades procedents de la regió cefàlica de l'epidídim. Els espermatozoides amb dos caps i dues cues fusionades són més abundants en la regió caudal de l'epidídim ( $0,13 \pm 0,033$  %) que en les regions corporal ( $0,07 \pm 0,025$  %) i cefàlica ( $0,02 \pm 0,014$  %). Els espermatozoides amb dos caps i dues cues fusionades s'originen en la regió cefàlica de l'epidídim per l'aglutinació dels caps de dos espermatozoides (vegeu la fig. 17) i la posterior fusió de les cues durant el recorregut pel conducte epididimari (vegeu la fig. 18). Les cues, coplanars en el cas dels espermatozoides monocefàlics i helicades en el cas dels bicefàlics, presenten dos eixos

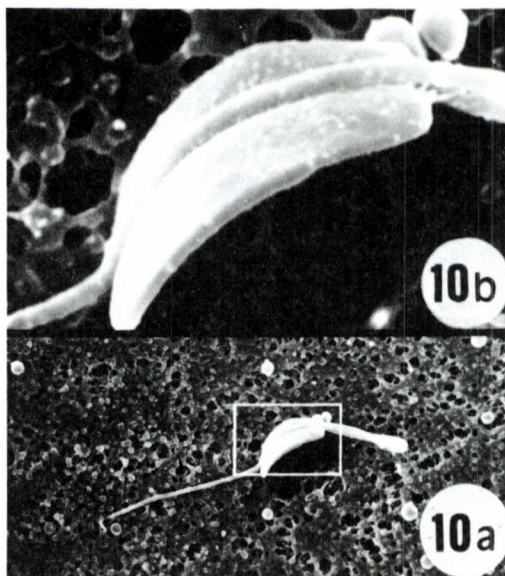


FIGURA 10. a) Espermatozoide amb la cua doblegada per l'anell de Jensen. 1300X. b) Detall en que es mostra la fusió de la peça principal de l'espermatozoide amb el cap (6.600X).

axonemàtics complets (vegeu la fig. 19) que es fusionen per les seves beines mitocondrials per donar lloc a una beina en forma de 8 (vegeu la fig. 20).

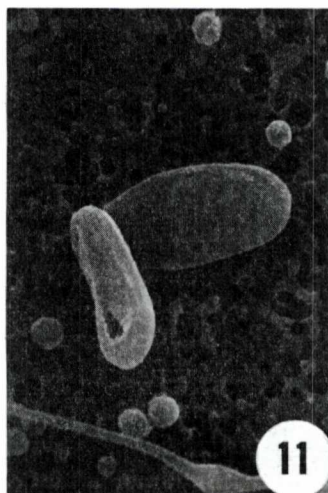


FIGURA 11. Espermatozoide amb la cua enrotllada (3.600X).

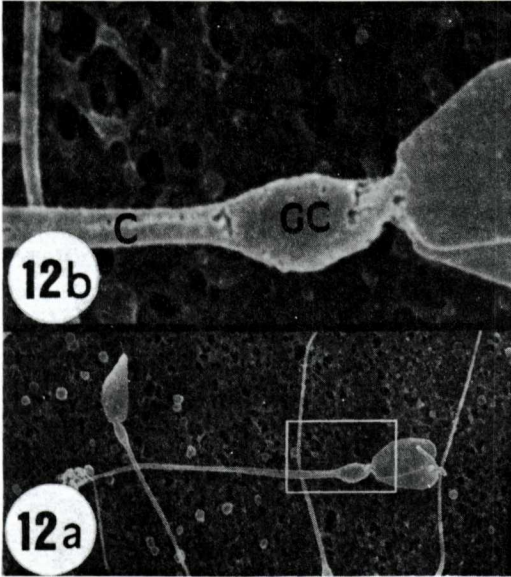


FIGURA 12. a) Espermatozoide de dos caps i dues cues fusionades (1.000X). b) Detall que mostra la posició proximal de la gota citoplasmàtica (GC) i la fusió de les dues cues (C) (5.000X).

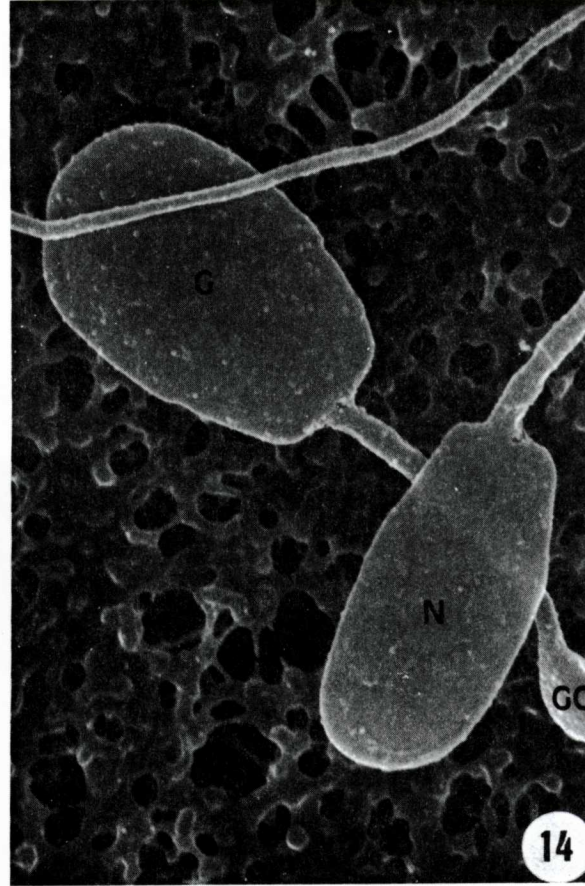


FIGURA 14. Espermatozoides immadurs amb gota citoplasmàtica (GC) distal, un amb cap normal (N) i l'altre amb cap gegant (G) (3.200X).

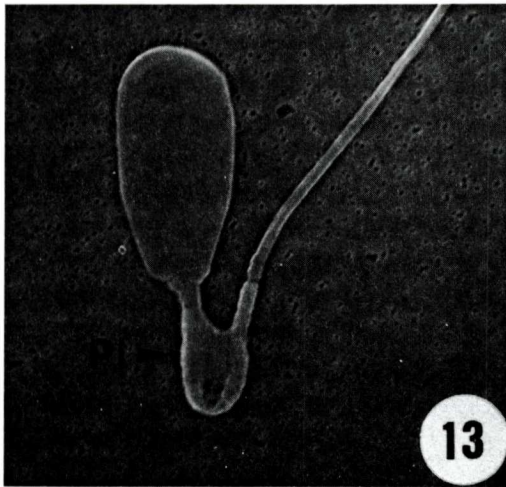


FIGURA 13. Espermatozoide amb la cua doblegada per la peça intermèdia (PI) (1.600X).

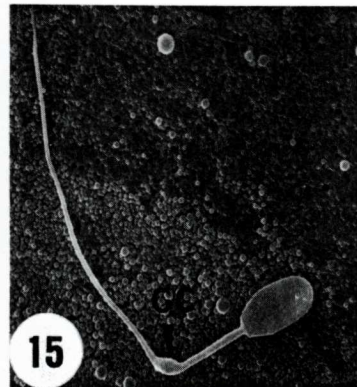


FIGURA 15. Espermatozoide immadur amb gota citoplasmàtica (GC) distal iniciant la corbatura de la cua per l'anell de Jensen (1.500X).

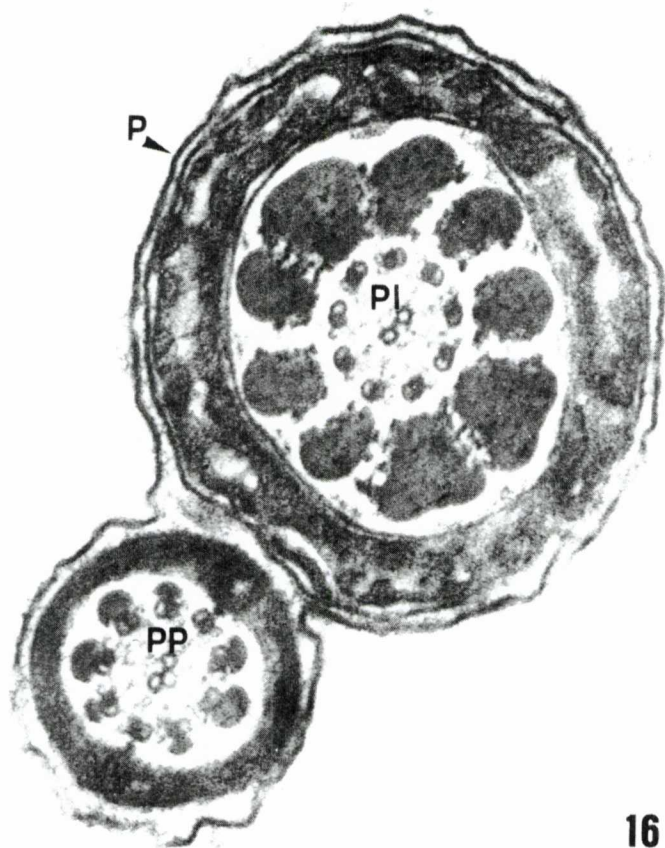


FIGURA 16. Secció transversal de la cua doblegada per l'anell de Jensen d'un espermatozoide. Observeu com les dues peces, intermèdia (PI) i principal (PP), estan fusionades i envoltades per la membrana plasmàtica (P) (90.000X).

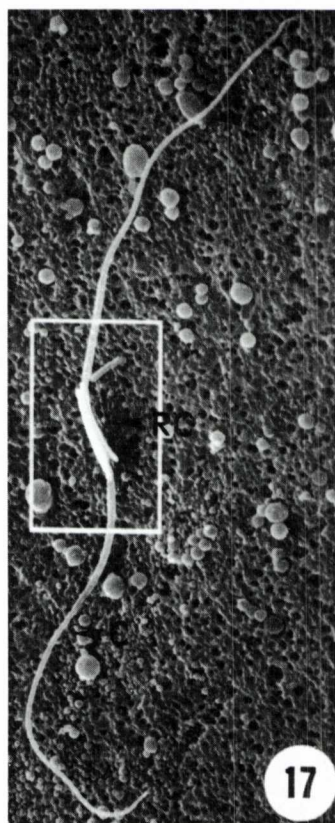


FIGURA 17. Espermatozoides aglutinats pels caps. Observeu que l'aglutinació es produeix per les superfícies planes de les regions cefàliques dels espermatozoides. RC, regions cefàliques; C, cues (1.600X).

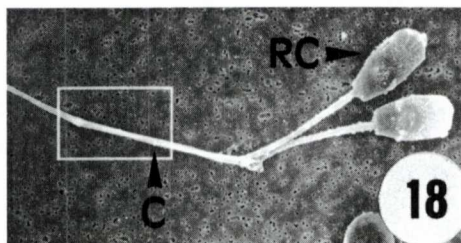


FIGURA 18. Espermatozoides en disposició paral·lela i amb les cues fusionades i espiralitzades. RC, regions cefàliques; C, cues (1.300X).

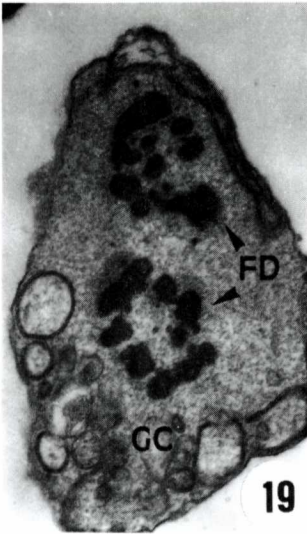


FIGURA 19. Secció transversal per la peça de connexió d'un espermatozoide amb dues cues. GC, gota citoplasmàtica; FD, fibres denses (30.000X).

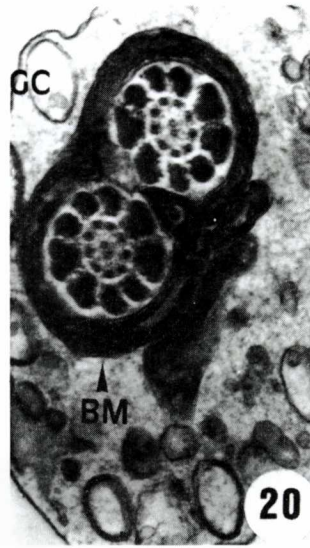


FIGURA 20. Secció transversal per la peça intermèdia d'un espermatozoide amb dues cues. GC, gota citoplasmàtica; BM, beina mitocondrial (35.000X).

## DISCUSSIÓ

El conducte epididimari és l'òrgan on els espermatozoides adquireixen el poder fecundant i és la secreció de l'epiteli epididimari la que intervé directament en aquest procés. Diferents autors (20, 23, 24) demostraren que, si bé els espermatozoides procedents del cap epididimari dels mascles reproductors porcins tenien una capacitat fecundant nul·la, aquells procedents de les regions corporal i caudal de l'epidídim arribaven a percentatges de fecundació del 10-50 % i del 90-100 %, respectivament.

Les diferències de pH observades en el fluid seminal entre les dues primeres regions epididimàries i la regió caudal posen de manifest la funció secretora i absorbiva de l'epiteli epididimari. Zimmerman i col·l. (43) van demostrar, analitzant el fluid epididimari porcí, que si bé la concentració de  $K^+$  es manté en les tres regions epididimàries, les concentracions de  $Na^+$ , de  $Cl^-$  i de  $Mg^{2+}$  es mantenen en les

regions cefàlica i corporal i disminueixen en la regió caudal. La resistència osmòtica dels acrosomes depèn de la pressió osmòtica del fluid epididimari i de la permeabilitat de la membrana plasmàtica dels espermatozoides en cada regió de l'epidídim. La pressió osmòtica del fluid epididimari és més elevada en la regió cefàlica que en la regió caudal. La permeabilitat de la membrana plasmàtica dels espermatozoides a l'eosina és més baixa en l'esperma procedent de la cua epididimària que en el procedent de la regió corporal (32). La major pressió osmòtica del fluid epididimari de la regió cefàlica i l'elevada permeabilitat de la membrana dels espermatozoides en aquesta regió són les causes de la menor resistència dels acrosomes als medis hipotònics (150 mOsm). Aquesta baixa resistència osmòtica dels acrosomes explicaria la major separació observada entre la membrana plasmàtica i la vesícula acrosòmica en els espermatozoides procedents de la regió cefàlica en relació amb els procedents de la regió caudal. Segons

Jovannet (26) i Dacheux i col·l. (17), la motilitat espermàtica es manifesta quan els espermatozoides abandonen l'epidídim o quan són transferits d'aquest a una solució tampó. Aquest fet explicaria que quan són recollits de la regió cefàlica de l'epidídim gairebé no mostrin motilitat, mentre que quan procedeixen de la cua epididimària arriben a descriure un lleuger moviment circular. Al llarg del recorregut dels espermatozoides pel conducte epididimari, característiques com: la reducció de l'acrosoma, l'augment de la densitat del contingut acrosòmic i el descens de la gota citoplasmàtica a través de la peça intermèdia de l'espermatozoide, han estat observades en rosegadors i en l'home per diferents autors (21, 31).

Segons Barth i Oko (3), el percentatge d'espermatozoides amb caps isolats de la cua en l'ejaculat de toro és, normalment, del  $5,1 \pm 0,74\%$  i les causes principals d'aparició en l'ejaculat són hipoplàsia testicular i inflamació de les vesícules seminals o dels conductes epididimaris. En condicions no patològiques, el percentatge de caps isolats en l'ejaculat està en relació directa amb el temps que els espermatozoides romanen emmagatzemats en la cua epididimària. Després de sotmetre un mascle reproductor porcí a un ritme diari d'extraccions de semen durant tres mesos, s'observa un augment del percentatge de formes gamètiques immadures en l'ejaculat de fins un 60% (6). Shilling i Vengust (36) demostren que, en sotmetre un mascle reproductor porcí a un ritme d'extraccions de semen amb dos dies d'interval durant un mes, el volum de l'ejaculat es redueix, la resistència osmòtica dels acrosomes disminueix considerablement i la motilitat espermàtica baixa.

El percentatge d'espermatozoides aberrants en la cua epididimària dels mascles reproductors porcins ha estat establert en no més de l'1 %

(25). Els espermatozoides de cua doblegada constitueixen la forma aberrant més comuna en l'ejaculat de *Sus domesticus* (6). El procés de migració de la gota citoplasmàtica des de la posició proximal a la posició distal de la peça intermèdia, que es dona al llarg de la maduració epididimària de l'esperma, es realitza en menys d'un segon, i és el doblegament de la cua de l'espermatozoide un fet comú durant aquest procés migratori (18). S'han descrit diferents agents causants del doblegament de la cua dels espermatozoides. Diferents autors (5, 13, 19), argumentaren que la debilitat de les fibres denses deguda a un excés de zinc provoca el doblegament de la cua dels espermatozoides. L'elevada secreció de zinc per l'epiteli epididimari caudal s'ha relacionat amb el tractament de mascles reproductors porcins amb estrògens (16). La hiposmolaritat (28) i el xoc tèrmic per refrigeració del semen (33) també han estat descrits com a agents causants dels espermatozoides amb cua doblegada, ja que produirien una desintegració de la gota citoplasmàtica i, en sortir les hidrolases dels lisosomes, provocaria la digestió parcial de les fibres denses de l'axonema. La criptorquídia també ha estat citada com un factor causant del doblegament de la cua dels espermatozoides (34). Holtz (22) determinà també, en el porcí, l'origen epididimari d'una altra malformació semblant a la cua doblegada, la cua enrotllada.

Són escasses les dades publicades referents als espermatozoides amb dues cues, Bishop i col·l. (4) ja observaren aquesta malformació en semen de toro, i Aughey i Renton (2) la trobaren mitjançant microscòpia electrònica en l'esperma d'un toro estèril. És normal que els centríols es repliquin sovint per donar lloc a múltiples cilis en diversos tipus de cèl·lules ciliades. En el desenvolupament de les cèl·lules espermàtiques, la replicació centriolar és su-

primida a fi que només es desenvolupi un únic axonema. Segons Barth i Oko (3), la manca de la supressió de la replicació centriolar podria donar lloc al desenvolupament de cues accessòries. Segons aquests darrers autors, els espermatozoides amb dues cues tenen una motilitat i viabilitat baixes i no estan capacitats per a fecundar.

La maduració epididimària dels espermatozoides és un procés lent i complex, i la qualitat de l'ejaculat depèn de que aquesta maduració hagi estat completa. La presència en l'ejaculat de formes gamètiques pròpiament epididimàries és un signe de la maduració incompleta dels espermatozoides.

## Agraïments

Volem manifestar, molt especialment, el nostre agraïment al Dr. Josep Egozcue, a la Dra. Mercè Durfort i a llurs equips d'investigació pel suport científic-tècnic que en tot moment ens han donat. Aquest treball ha estat finançat a partir d'ajuts concedits per la CIRIT (Generalitat de Catalunya), la Caixa de Barcelona, la Universitat Autònoma de Barcelona, i l'empresa de selecció i multiplicació porcina Hybrids Girona, S A.

## BIBLIOGRAFIA

1. ÁLVAREZ, E. G. (1989) **Andrología: Teoría y Práctica**. Díaz de Santos. Madrid.
2. AUGHEY, E. i J. P. RENTON. (1968) Abnormal spermatozoa in an Ayrshire bull. **Vet. Rec.** 82: 129-131.
3. BARTH, A. D. i R. J. OKO. (1989) **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Iowa State University Press, Ames, pp. 285.
4. BISHOP, M. W. H., R. C. CAMPBELL, J. L. HANCOCK, i A. WALTON. (1954) Semen characteristics and fertility in the bull. **J. Agric. Sci.** 44: 227-248.
5. BLOM, E. i C. WOLSTRUP. (1976) Zinc as a possible causal factor in the sterilizing sperm tail defect, the "Dag defect", in Jersey bulls. **Nord. Vet. Med.** 28: 515-518.
6. BONET, S. (1987) Estudio del eyaculado de un verraco estresado por la frecuencia de recogidas en inseminación artificial. **Scient. gerund.** 13: 35-40.
7. BONET, S. (1988) Contribución al conocimiento microscópico de la calidad espermática de *Sus domesticus*: metodología aplicada. **Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.** 74: 64-65.
8. BONET, S. (1990) Immature and aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. **Anim. Reprod. Sci.** 22: 67-80.
9. BONET, S. i M. CASTELLANOS. (1990) Estudio ultraestructural del espermatozoide maduro de *Sus domesticus*. **Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.** 87: 63-70.
10. BONET, S. i M. BRIZ. (1991) New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. **Theriogenology**, 35: 725-730.
11. BONET, S. i M. BRIZ. (1991) Comparison between the conventional method and the simple desiccation method used in processing porcine sperm for scanning electron microscopy. **J. Microscopy**, 161: 291-294.
12. BUXADÉ, C. C. (1984) **Ganado Porcino**. Mundi Prensa. Madrid.
13. CALVIN, H. I., F. H. HWANG i H. WOHLRAB. (1975) Localization of zinc in a dense fiber connecting piece fraction of rat sperm tails analogous chemically to hair keratin. **Biol. Reprod.** 13: 228-239.
14. CAMERON, R. D. A. (1985) Factors influencing semen characteristics in boars. **Aust. Vet. J.** 62: 293-297.
15. COLENBRANDER, B. i B. KEMP. (1989) Factors affecting semen quality in the boar. **Proc. Xth Symp. Asoci. Nac. Porcinocult. Cient.** Barcelona. 58-66.
16. CUPPS, P. T. i J. R. BRIGGS. (1965) Changes in the epididymis associated with morphological changes in the spermatozoa. **J. Dairy Sci.** 48: 1241.
17. DACHEUX, J. L., M. PAQUIGNON i Y. COMBARNOUS. (1983) Head-to-head agglutination of ram and boar epididymal spermatozoa and evidence for an epididymal antigglutinin. **J. Reprod. Fert.** 67: 181-189.
18. DICKEY, J. F. (1965) An electron microscope study of bovine spermatozoa undergoing maturation in the male reproductive system. Ph. D. thesis. Pennsylvania State University.
19. ELLIASSON, R. i C. LINDHOLM. (1974) Relationship between cellular zinc concentration and morphology of human sperm tails. **Proc. 8th. World Congr. Fertil. Steril.** Buenos Aires.
20. FLICKINGER, C. J. (1979) Synthesis, transport and secretion of protein in the initial segment of the mouse epididymis as studied by electron microscope radioautography. **Biol. Reprod.** 20: 1015-1030.
21. FORNES, M. W. i J. C. DE ROSAS. (1989) Changes in the rat sperm head during epididymal transit. **Gamete Res.** 24: 453-460.
22. HOLTZ, W. V. (1982) Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. **J. Reprod. Fert.** 64: 485-489.

23. HOLTZ, W. i D. SMIDT. (1976) The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. **J. Reprod. Fert.** 46: 227-229.
24. HUNTER, R. H. F., W. HOLTZ i P. J. HENFREY. (1976) Epididymal function in the boar in relation to the fertilizing ability of spermatozoa. **J. Reprod. Fert.** 46: 463-466.
25. JONES, R. C. (1971) Studies of the structure of the head of boar spermatozoa from the epididymis. **J. Reprod. Fert. Suppl.** 13: 51-64.
26. JOVANNET, P. (1981) Movement of human spermatozoa from caput epididymis. **Prog. Reprod. Biol.** 8: 100-101.
27. LARSSON, K. i S. EINARSSON. (1984) Seminal changes in boars after heat stress. **Acta Vet. Scand.** 25: 57-66.
28. LINDHAL, P. E. i L. O. DREVIUS. (1964) Observations on bull spermatozoa in a hypotonic medium related to sperm mobility mechanisms. **Exp. Cell Res.** 36: 632-646.
29. MARTÍN, S. R. (1982) **Reproducción e Inseminación Artificial Porcina**. Aedos. Barcelona.
30. NICANDER, L. i A. BANE. (1962) Fine structure of boar spermatozoa. **Z. Zellforsch. Microsk. Anat.** 57: 390-405.
31. ORGEBIN-CRIST, M. C. (1967) Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis. Fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. **Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.** 7: 373-389.
32. ORTOVANT, R. (1953) Existence d'une phase critique dans la maturation épидидymaire des spermatozoides de bélier et de taureau. **C. R. Soc. Biol.** 147: 1552-1556.
33. PEDERSEN, H. i P. E. LEBECH. (1971) Ultrastructural changes in the human spermatozoa after freezing for artificial insemination. **Fertil. Steril.** 22: 125.
34. PLOEN, L. i N. HAKARSSON. (1978) Abnormal epididymal spermatozoa two to thirty-five days after a brief experimental cryptorchidism in the rabbit. **Int. J. Androl.** 1: 250-261.
35. REYNOLS, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.** 17: 208-216.
36. SHILLING, E. i M. VENGUST. (1987) Frequency of semen collection in boars and quality of ejaculates as evaluated by the osmotic resistance of acrosomal membranes. **Anim. Reprod. Sci.** 12: 283-290.
37. SINGH, G. (1962) Durée de passage dans l'épididyme des spermatozoides des verrats marqués au P<sup>32</sup>. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.** 2: 43-46.
38. SPURR, A. R. (1969) A low viscosity epoxiresin embedding medium for electron microscopy. **J. Ultrast. Res.** 26: 31-43.
39. SWIERSTRA, E. E. (1968) Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoa transit through the epididymis. **Anat. Rec.** 161: 171-186.
40. SWIERSTRA, E. E. (1973) Influence of breed, age and ejaculation frequency on boar semen composition. **Can. J. Anim. Sci.** 53: 43-45.
41. TRUDEAU, V. i L. M. SANFORD. (1986) Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult Landrace boar. **J. Anim. Sci.** 63: 1211-1219.
42. WHO. (1987) **Laboratori Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical Mucus Interaction**. Cambridge University Press. Cambridge.
43. ZIMMERMAN, K. J., B. G. CRABO, R. MOORE, S. WEISBERG, F. C. DEIBEL i E. F. GRAHAM. (1979) Movements of sodium and potassium into epididymal boar spermatozoa. **Biol. Reprod.** 21: 173-179.