

EFFECTES D'UNA ELEVADA FREQUÈNCIA D'EJACULACIÓ EN LA QUALITAT DE L'ESPERMA EPIDIDIMARI DE MASCLES REPRODUCTORS PORCINS

Anna Pruneda,* Elisabeth Pinart, M. Dolors Briz, Silvia Sancho, Núria Garcia-Gil, Elena Badia, Judit Bassols, Eva Bussalleu, Marc Yeste, Isabel Casas, Sergi Bonet

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia. Universitat de Girona.
Montilivi, s/n. 17071 Girona. Tel. 972 418 366. Fax 972 418 150. Adreça electrònica: anna.pruneda@udg.es.

Resum

Per a determinar l'efecte d'una elevada freqüència d'ejaculacions sobre el procés de maduració espermàtica a l'epidídim s'han utilitzat tres mascles porcins postpuberals sotmesos a dues ejaculacions diàries durant quatre dies (mascles estressats) i tres mascles sotmesos a dues ejaculacions setmanals (mascles control). Per a cada mascle s'han analitzat la concentració, vitalitat, motilitat i morfologia espermàtiques al llarg del conducte epididimari; també s'ha determinat la reabsorció o secreció de fluid a cada regió epididimària a partir de la variació de la concentració espermàtica. En els mascles control s'observa una reabsorció de fluid al caput, un balanç net de secreció al corpus i un augment de la concentració espermàtica al cauda; en els mascles estressats es dona una menor reabsorció de fluid al caput, una reabsorció de fluid al corpus, i al cauda no es produeix l'acumulació d'espermatozoides. En els mascles estressats també s'observen anomalies en el desenvolupament de la motilitat espermàtica i el desplaçament de la gota citoplasmàtica al llarg del conducte epididimari. Així doncs, una elevada freqüència d'ejaculació produeix una alteració en el patró de secreció-reabsorció del fluid epididimari, que resulta en una maduració espermàtica defectiva i un desenvolupament anormal de la motilitat espermàtica.

Paraules clau *Sus domesticus*, epidídim, freqüència d'ejaculació, motilitat espermàtica, viabilitat espermàtica.

Abstract

Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from six epididymal regions in boars
This study examines the effect of a high semen-collection rhythm on epididymal sperm maturation. Three post-pubertal boars were submitted to 2 ejaculations daily for 4 days (stressed boars), and three males were ejaculated twice weekly (control males). Sperm concentration, sperm vitality, sperm motility and sperm morphology were analysed along the epididymal duct; moreover, either fluid resorption or fluid secretion was determined in each epididymal region from the variation in sperm concentration. In control boars, fluid resorption was found in the caput, a net secretory role was determined in the corpus and an increase in sperm concentration was observed in the cauda. On the other hand, in stressed boars less fluid resorption was found in the caput, fluid resorption was observed in the corpus and no accumulation of spermatozoa was determined in the cauda. Some anomalies in the development of sperm motility and the displacement of the sperm cytoplasmic droplet along the epididymal duct were also determined in stressed boars. From the results of this study, it can be concluded that a high semen-collection frequency brings about an altered resorption and secretion pattern of the epididymal fluid, which results in defective sperm maturation and abnormal development of sperm motility.

Key words *Sus domesticus*, epididymis, collection frequency, sperm motility, sperm viability.

INTRODUCCIÓ

En mamífers domèstics i en humans es coneix que hi ha diferents factors ambientals, fisiològics i de confinament, com ara el fotoperíode, la temperatura, el règim alimentari, l'estrès, les malalties i l'edat, que poden

afectar la capacitat reproductora dels mascles (Cameron, 1985; Dobson i Smith, 2000; Pinart *et al.*, 2002; Sancho *et al.*, 2004). Un dels factors de confinament que més afecten la qualitat espermàtica dels mascles reproductors és l'estrès produït per un elevat ritme d'extraccions de semen; així doncs, s'ha observat en

diferents espècies que el manteniment de mascles reproductors a una elevada freqüència d'ejaculacions es manifesta en un descens de la motilitat espermàtica i un augment de la freqüència d'espermatozoides immadurs i aberrants en l'ejaculació (Cameron, 1985; Schilling i Vengust, 1987; Bonet *et al.*, 1991; Strzezek *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2000; Pruneda *et al.*, 2005). Aquesta disminució de la qualitat espermàtica de les ejaculacions de mascles estressats per un elevat ritme d'extraccions és conseqüència d'un trànsit accelerat dels espermatozoides a través del conducte epididimari (Schilling i Vengust, 1987; Bonet *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 2000; Pruneda *et al.*, 2005).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar els efectes de l'estrès per l'elevat ritme d'extraccions de semen sobre el procés de secreció i reabsorció de fluid de les cèl·lules de l'epiteli epididimari, i sobre la maduració epididimària dels espermatozoides de *Sus domesticus*.

MATERIAL I MÈTODES

En aquest estudi s'han utilitzat sis mascles sans de la raça Piérain que es van mantenir a un ritme d'extraccions de dues per setmana fins a un any d'edat; posteriorment, tres es van sotmetre a dues ejaculacions diàries durant quatre dies consecutius (mascles estressats), mentre que els altres tres es van mantenir al mateix ritme d'ejaculacions (mascles control).

Passats els quatre dies de tractament es va procedir al sacrifici dels mascles. Immediatament després del sacrifici es van obtenir fragments de les sis regions epididimàries: caput proximal i distal, corpus proximal i distal, i cauda proximal i distal. Per a l'anàlisi de la motilitat, la morfologia i la vitalitat espermàtiques es van disposar fragments de les diferents regions epididimàries en plaques de Petri amb medi RPMI (Gibco, Invitrogen SA, Barcelona, Espanya) suplementat amb 10 % de sèrum fetal boví (PAA Laboratories, LabClinics, Barcelona, Espanya). La vitalitat espermàtica es va determinar mitjançant la tinció supravital d'eosina-nigrosina (Kvist i Björndahl, 2002) i l'anàlisi de la morfologia espermàtica es va realitzar a partir d'extensions tenyides amb el mètode Panòptic ràpid de QCA (Química Clínica Aplicada SA, Tarragona, Espanya) (OMS, 1999; Kvist i Björndahl, 2002). La motilitat espermàtica es va analitzar amb la cambra de Makler (Makler, 1980) després d'incubar els fragments durant quinze minuts a 37° C. Per a la determinació del percentatge de variació de la concentració espermàtica i de fluid reabsorbit a les diferents regions del conducte epididimari es disposen fragments de 30 mg en una placa de Petri amb 1 ml de PBS i es procedeix segons el protocol descrit per Goyal i Williams (1991): a)

seccionament de les mostres en fragments més petits d'1 mm³, que es mantenen en agitació suau durant 1 h; b) transferència del sobrenedant a un tub i posteriorment rentat dels fragments amb 1 ml de PBS net, que també és transferit al tub; c) centrifugació dels 2 ml de sobrenedant a 1.000 g durant deu minuts i resuspensió dels espermatozoides sedimentats amb 2 ml de PBS net; d) determinació de la concentració espermàtica per triplicat per a cada mascle en cadascuna de les regions epididimàries utilitzant la cambra de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) i la il·luminació de contrast de fases, a 125×. Els resultats s'expressen en nombre d'espermatozoides × 10⁶/ml.

A partir del recompte amb la cambra de Makler es va determinar el percentatge de variació de la concentració espermàtica i el percentatge de fluid reabsorbit entre regions, tal com s'explica a continuació:

Percentatge de variació de la concentració espermàtica entre regions:

$$\Delta CE = \frac{CE(rd) - CE(rp)}{CE(rp)} \times 100$$

on: CE(rd) = mitjana de la concentració espermàtica a la regió epididimària distal.

CE(rp) = mitjana de la concentració espermàtica a la regió epididimària proximal.

% ΔCE = percentatge de variació de la concentració espermàtica entre les dues regions.

Percentatge de fluid reabsorbit entre regions:

$$FR = \left(1 - \frac{CE(rp)}{CE(rd)}\right) \times 100$$

on: % FR = percentatge de fluid reabsorbit entre les dues regions

L'anàlisi estadística de les dades es va fer a partir del test de l'anàlisi de variància (ANOVA) per a dos factors, amb un nivell de significació de $P < 0,05$.

Per a cada grup de mascles i per a cada paràmetre espermàtic els resultats s'expressen com la mitjana ± SD ($n = 3$).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per a tots els paràmetres analitzats es van observar diferències significatives entre els mascles control i els mascles estressats, i entre les diferents regions epididimàries (vegeu la taula 1).

Taula 1 Qualitat espermàtica al llarg del conducte epididimari dels mascles reproductors porcíns control i estressats.

Paràmetres espermàtics	Mascles	Caput proximal	Caput distal	Corpus proximal	Corpus distal	Cauda proximal	Cauda distal
Percentatge de variació de la concentració espermàtica (%)	Controls	—	2,777,26 ± 311,12	-57,70 ± 2,53	23,17 ± 12,64	66,23 ± 14,03	97,59 ± 12,36
	Estressats	—	25,37 ± 12,52	19,57 ± 4,10	19,02 ± 3,20	-16,41 ± 2,12	-25,99 ± 0,81
Percentatge de fluid reabsorbit (%)	Controls	—	96,49 ± 0,40	-137,13 ± 14,03	17,34 ± 8,52	38,79 ± 5,52	49,09 ± 3,23
	Estressats	—	18,89 ± 7,83	14,95 ± 2,88	15,62 ± 2,31	-22,01 ± 3,38	-38,14 ± 0,81
Vitalitat espermàtica (%)	Controls	91,44 ± 1,64	89,11 ± 2,36	79,22 ± 2,04	88,33 ± 1,45	82,33 ± 0,67	83,67 ± 1,15
	Estressats	64,67 ± 1,76	79,44 ± 2,01	83,67 ± 1,45	84,89 ± 2,22	88,44 ± 2,83	86,00 ± 3,51
Motilitat espermàtica (%)	Controls	12,15 ± 2,08	38,84 ± 8,16	50,53 ± 8,36	56,45 ± 4,11	72,90 ± 2,86	82,44 ± 2,28
	Estressats	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,67 ± 1,67	8,00 ± 0,67	10,22 ± 0,51	13,00 ± 0,58
Morfologia espermàtica							
Esp. amb gota proximal (%)	Controls	90,56 ± 1,50	18,11 ± 5,70	9,67 ± 0,33	5,00 ± 1,73	7,00 ± 1,67	9,67 ± 1,00
	Estressats	62,00 ± 2,60	7,00 ± 0,88	5,44 ± 0,51	11,44 ± 1,83	9,78 ± 1,83	35,00 ± 2,52
Esp. amb gota medial (%)	Controls	0,44 ± 0,19	53,78 ± 7,60	2,22 ± 1,02	0,89 ± 0,51	1,22 ± 0,84	1,44 ± 0,84
	Estressats	2,00 ± 0,00	55,33 ± 3,84	3,22 ± 0,51	1,00 ± 1,00	1,67 ± 0,58	3,44 ± 1,35
Esp. amb gota distal (%)	Controls	0,00 ± 0,00	22,11 ± 4,76	70,89 ± 10,45	83,89 ± 1,68	79,78 ± 1,07	73,11 ± 3,6
	Estressats	0,11 ± 0,19	20,22 ± 2,34	69,00 ± 3,61	70,89 ± 3,40	68,33 ± 2,00	34,89 ± 4,53

Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD ($n = 3$).

Per a tots els paràmetres analitzats es van observar diferències significatives entre ambdós tipus de mascles i entre les diferents regions epididimàries ($P < 0,05$).

Al caput epididimari dels mascles reproductors control s'observa un augment de la concentració espermàtica, que es correlaciona amb una intensa activitat de reabsorció de fluid; d'altra banda, al corpus epididimari la disminució de la concentració espermàtica s'atribueix a un balanç net de secreció de fluid, mentre que al cauda epididimari l'augment de la concentració espermàtica és conseqüència de la seva funció d'emmagatzematge. Aquest patró d'absorció i secreció de fluid epididimari és similar al descrit a la majoria d'espècies de mamífers (Crabo, 1965; Turner, 1984; Goyal i Williams, 1991). D'altra banda, en els mascles sotmesos a una elevada freqüència d'ejaculació es produeixen canvis en el patró de reabsorció/secreció de fluid al llarg del conducte epididimari. Així doncs, al caput epididimari la reabsorció de fluid és menor que en els mascles control; al corpus no s'observa un balanç net de secreció, i al cauda no es produeix una acumulació d'espermatozoides.

En els mascles control la freqüència d'espermatozoides vius es manté relativament estable al voltant del 85 % al llarg del conducte epididimari. D'altra banda, en els mascles sotmesos a dues ejaculacions diàries durant quatre dies s'observa una disminució de la vitalitat espermàtica, per bé que només al caput proximal. Contràriament, Strzezek *et al.* (1995) determinaren que el manteniment de mascles reproductors porcins a un ritme d'una ejaculació diària durant deu dies es manifestava en un increment del percentatge d'espermatozoides no viables en l'ejaculació. Aquestes divergències estan relacionades molt probablement amb els diferents mètodes emprats en l'anàlisi de la viabilitat espermàtica (Kvist i Björndahl, 2002), tot i que d'altres factors com la raça, l'edat i el confinament s'ha demostrat que tenen un efecte directe sobre la vitalitat espermàtica (Bonet *et al.*, 1991; Strzezek *et al.*, 1995).

En els mascles control la motilitat espermàtica augmenta de forma progressiva al llarg de l'epidídim, mentre que en els mascles estressats la motilitat espermàtica és inferior a totes les regions epididimàries. Estudis previs ja havien demostrat que una elevada freqüència d'ejaculacions provocava una disminució de la motilitat espermàtica en les ejaculacions de mascles porcins (Bonet *et al.*, 1991; Strzezek *et al.*, 1995). La disminució de la motilitat espermàtica és conseqüència del menor temps de residència dels espermatozoides al conducte epididimari (Schilling i Vengust, 1987; Bonet *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 2000) i també del canvi en el patró d'absorció i de secreció de fluid al llarg del conducte descrit al present estudi.

L'anàlisi de la morfologia espermàtica indica que en els mascles control la gota citoplasmàtica migra des d'una posició proximal a una posició distal durant

el seu trànsit a través del caput i el corpus epididimaris. Segons Harayama *et al.* (1996) i Pruneda *et al.* (2005), en els mascles porcins l'expulsió de la gota distal es produeix en el moment de l'ejaculació, i és induïda per la fructosa del fluid de les vesícules seminals (Harayama *et al.*, 1996). En els mascles sotmesos a un elevat ritme d'extraccions, en canvi, un 40 % dels espermatozoides presents al cauda distal mantenen la gota citoplasmàtica en posició proximal. Aquestes anomalies en la migració de la gota citoplasmàtica són conseqüència tant del menor temps de residència dels espermatozoides al conducte epididimari, com del diferent patró de secreció i reabsorció de fluid al caput i al corpus. Probablement, aquests canvis en el patró de secreció i reabsorció de l'epiteli epididimari provoquen alteracions en el balanç iònic i proteic del fluid epididimari, que interfereixen en la migració de la gota citoplasmàtica al llarg del conducte (Haidl *et al.*, 1993; Yeung *et al.*, 1993).

Així doncs, els resultats d'aquest estudi indiquen que una elevada freqüència d'ejaculació produeix una alteració en el patró de secreció-reabsorció del fluid al caput i al corpus epididimaris, que resulta en una maduració espermàtica defectiva i un desenvolupament anormal de la motilitat espermàtica.

BIBLIOGRAFIA

- BONET, S.; BRIZ, M.; FRADERA, A. (1991). «The sperm quality and fertility of boars after two different ejaculation frequencies». *Scientia Gerund.*, 17:77-84.
- CAMERON, R. D. (1985). «Factors influencing semen characteristics in boars». *Aust. Vet. J.*, 62:293-297.
- CRABO, B. (1965). «Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars». *Acta Vet. Scand.*, 6(5):1-94.
- DOBSON, H.; SMITH, R. F. (2000). «What is stress, and how does it affect reproduction?» *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:743-752.
- GOYAL, H. O.; WILLIAMS, C. S. (1991). «Regional differences in the morphology of the goat epididymis: a light microscopic and ultrastructural study». *Am. J. Anat.*, 190:349-369.
- HAIDL, G.; BADURA, B.; HISCH, K. D.; GHYCZY, M.; CARREIB, J.; SCHILL, W. B. (1993). «Disturbances of sperm flagella due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids». *Hum. Reprod.*, 8(7):1070-1073.
- HARAYAMA, H.; SHIBUKAWA, T.; MIYAKE, M.; KANNAN, Y.; KATO, S. (1996). «Fructose stimulates shedding of cytoplasmic droplets from epididymal boar spermatozoa». *Reprod. Fert. Dev.*, 8:1039-1043.
- KVIST, U.; BJÖRND AHL, L. (2002). *Manual on Basic Semen Analysis*. ESHRE Monographs. Oxford: Oxford University Press.

- MAKLER, A. (1980) «The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation». *Fertil. Steril.*, 33:337-338.
- OMS (1999). *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. 4a ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- PINART, E.; BONET, S.; BRIZ, M.; PASTOR, L. M.; SANCHO, S.; GARCÍA, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J. (2002). «Histological study of the interstitial tissue in scrotal and abdominal boar testes». *Vet. J.*, 163:68-76.
- PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; KÁDÁR, E.; BASSOLS, J.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; 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*. [En premsa]
- SANCHO, S.; PINART, E.; BRIZ, M.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; KADAR, E.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; COLL, M. G.; BONET, S. (2004). «Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods». *Theriogenology*, 62:1271-1282.
- SCHILING, E.; VENGUST, M. (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.
- STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; GLOGOWSKI, J.; WYSOCKI, P.; BORKOWSKI, K. (1995). «Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers». *Reprod. Dom. Anim.*, 30:85-94.
- TANAKA, A.; KUWABARA, S.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; MURAI, M.; TSUTSUI, T. (2000). «Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats». *J. Vet. Med. Sci.*, 62(11):1157-1161.
- TURNER, T. T. (1984). «Resorption versus secretion in the rat epididymis». *J. Reprod. Fertil.*, 72:509-514.
- YEUNG, C. H.; COOPER, T. G.; OBERPENNING, F.; SCHULZE, H.; NIESCHLAG, E. (1993). «Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis». *Biol. Reprod.*, 49:274-280.