



Universitat de Girona

**ESTUDI CITOLÒGIC I BIOQUÍMIC DEL FLUID  
EPIDIDIMARI DE *Sus domesticus***

**Anna PRUNEDA SAIS**

**ISBN: 84-690-0189-2  
Dipòsit legal: GI-933-2006**



Universitat de Girona

**ESTUDI CITOLÒGIC I BIOQUÍMIC DEL  
FLUID EPIDIDIMARI DE  
*Sus domesticus***

**Anna Pruneda Sais**

**2006**





**ESTUDI CITOLÒGIC I BIOQUÍMIC DEL FLUID  
EPIDIDIMARI DE *Sus domesticus***

Memòria presentada per optar al grau de  
Doctor per la Universitat de Girona, per:

**Anna Pruneda Sais**

**Vistiplau dels directors,**

**Dr. Sergi Bonet Marull**  
Àrea de Biologia Cel·lular  
Universitat de Girona

**Dra. Elisabet Pinart Nadal**  
Àrea de Biologia Cel·lular  
Universitat de Girona

**Girona, 2006**



*Als meus pares*

*A en Pere*



# Agraïments

Tot i que semblava que mai arribaria aquest moment ara aquesta tesi ja és una realitat, i només em queda donar les GRÀCIES a totes les persones que d'una manera o altre han estat al meu costat durant tot aquest temps.

A en Sergi per haver-me donat l'oportunitat de formar part d'aquest grup, per haver confiat plenament en mi i per la seva supervisió.

A la Beth per l'entusiasme, els bons consells, el recolzament i les seves pacients correccions. Gràcies Beth per haver-me ajudat sempre que ho he necessitat, fins i tot en la distància!

També a la Mailo, la Sílvia, la Núria, l'Elena, la Judit, l'Eva, en Marc, l'Isabel i la Cesca per les bones estones compartides al llarg d'aquests quatre anys (tan a dins com a fora de la universitat), per les xerrades, els ànims, i sobretot, per haver-me ajudat en tot el que heu pogut!

Als becaris (Gis, Marçal, Olga, Glòria, Sílvia, Montse, Pep, Olaya, Gela, Àlex S., Núria, Anna, Àlex P., Maria, Maria Rosa ...) per tots els moments viscuts al llarg d'aquests quatre anys, pels cafès, sopars ...

A en Trevor i la Ching-Hei de l'*Institute of Reproductive Medicine* de Münster els hi dec bona part d'aquesta tesi. Gràcies a tots dos per haver convertit la meva estada a Münster en una experiència inoblidable i sobretot, per haver-me ajudat tant! L'estada no hagués estat el mateix sense els vespres amb la Jen i l'Stu, les estones al laboratori amb la Jolanta i la Barbara intentant ensenyar-me alemany, ni sense les meves canàries (Sheila, Lydia i Meilyn).



A la Laura, la Gloria i la Rocio per preocupar-se de mi i fer-me desconnectar de tant en tant; a les biòlogues (Ester, Mònica i Rosa) pel seu suport incondicional.

La realització d'aquesta tesi no hagués estat possible sense el suport i els ànims dels meus pares. Moltes gràcies per creure en mi més del que hi creia jo mateixa i per haver aguantat estoicament els meus nervis i mals moments. Gràcies a la meva àvia, a la Núria i en Víctor, i sobretot, a en Joan, el petitó de la família, pels bons moments que m'ha fet passar.

I a en Pere, ... gràcies per tot! Per haver compartit amb mi els bons i els mals moments, per haver-me animat sempre a continuar endavant, i per haver-me fet riure quan més ho he necessitat!

A tots, **MOLTES GRÀCIES!**

# Índex

Índex.....	1
Abreviatures.....	3
Resum/Resumen/Summary.....	5
<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>9</b>
1. Objectius.....	11
2. Característiques generals de l'epidídim.....	15
2.1. Estructura macroscòpica.....	15
2.2. Estructura microscòpica.....	15
2.3. El fluid epididimari.....	18
a) Formació del fluid epididimari.....	18
b) Manteniment de la composició diferencial del fluid epididimari.....	19
c) Molècules orgàniques de baix pes molecular.....	20
- Carnitina	
- Glutamat	
- <i>myo</i> -Inositol	
d) Hipertonicitat del fluid epididimari.....	21
2.4. Funcions de l'epidídim.....	23
a) Sosteniment i protecció.....	23
b) Transport.....	23
c) Maduració epididimària.....	23
d) Emmagatzemament.....	25
2.5. Fonts d'energia presents a l'epidídim.....	26
3. Factors que influeixen en la qualitat espermàtica dels mascles porcins .....	27
<b>MATERIAL I MÈTODES.....</b>	<b>29</b>
1. Característiques dels exemplars i obtenció de les mostres d'epidídim.....	31
2. Estudi de l'efecte d'una elevada freqüència d'ejaculacions sobre l'esperma epididimària i ejaculada .....	32
2.1. Obtenció i anàlisi de l'esperma ejaculada.....	32
a) Anàlisi de la concentració espermàtica.....	32
b) Anàlisi de la motilitat espermàtica.....	32
c) Anàlisi de la vitalitat i la morfologia espermàtiques.....	33

2.2. Obtenció i anàlisi de l'esperma epididimària.....	33
a) Anàlisi del percentatge de variació de la concentració espermàtica i de fluid reabsorvit al conducte epididimari.....	34
2.3. Anàlisi estadística de les dades.....	35
3. Anàlisi de la concentració de carnitina, glutamat i inositol al fluid i als espermatozoides epididimaris.....	35
3.1. Obtenció de les mostres de fluid i espermatozoides epididimaris.....	35
3.2. Extracció d'osmolits dels espermatozoides epididimaris.....	36
3.3. Anàlisi de la concentració espermàtica del fluid luminal.....	36
3.4. Anàlisi de la concentració de proteïna, carnitina, glutamat i inositol.....	37
a) Anàlisi de la concentració de proteïna.....	37
b) Anàlisi de la concentració d'osmolits orgànics.....	37
- Carnitina	
- Glutamat	
- Inositol	
3.5. Anàlisi estadística de les dades.....	40
4. Anàlisi de la concentració de glucosa, sorbitol i fructosa i de la presència d'aldosa reductasa i sorbitol deshidrogenasa al conducte epididimari.....	40
4.1. Obtenció de les mostres de fluid i espermatozoides epididimaris.....	40
4.2. Anàlisi de la concentració de glucosa, sorbitol i fructosa.....	41
- Glucosa	
- Sorbitol	
- Fructosa	
4.3. Detecció immunohistoquímica dels enzims Aldosa Reductasa i Sorbitol Deshidrogenasa a l'epiteli epididimari.....	44
4.4. Anàlisi estadística de les dades.....	46
<b>RESULTATS.....</b>	<b>47</b>
1. Article 1: Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. <i>Theriogenology 2005; 63:2219-2232</i> .....	49
2. Article 2: Concentration of carnitine, glutamate and <i>myo</i> -inositol in epididymal fluid and spermatozoa from boars. <i>Animal Reproduction Science (in press)</i> .....	65
3. Article 3: Study of the polyol pathway in the porcine epididymis. <i>Molecular Reproduction and Development (in press)</i> .....	79
<b>DISCUSSIÓ GENERAL.....</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>105</b>

# Abreviatures

AcCoA	Acetil coenzim A
ADP	Adenosina 5'-difosfat
ANOVA	Anàlisi de variàncies
APT	L-alanina-piruvat transaminasa
AR	Aldosa reductasa
ATP	Adenosina 5'-trifosfat
BIPM	N-(4-(2-benzimidazolil)-fenil)-maleimida
BSA	Albúmina de sèrum boví
BTS	Beltsville-Thawing-Solution
CAT	Carnitina acetiltransferasa
CoA	Coenzim A
EDTA	Àcid etilendiamina-tetraacètic
FAD <sup>+</sup>	Flavin adenin nucleòtid
G6PDH	Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa
Glut Ox	Glutamat Oxidasa
GO	Glucosa oxidasa
GPT	L-glutamat-piruvat transaminasa
HK	Hexoquinasa
HRP	Horse radish peroxidase
IDH	Inositol deshidrogenasa
NAD <sup>+</sup>	Nicotina adenina dinucleòtid
NADH Ox	NADH oxidasa
NADP <sup>+</sup>	Nicotina adenina dinucleòtid fosfat
PBS	Tampó salí fosfat
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
SD	Desviació estàndard
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
SEM	Error estàndard de la mitjana



# Resum

Els espermatozoides procedents dels testicles de mamífers són funcionalment immadurs, i requereixen d'una posterior diferenciació a l'epidídim per adquirir la motilitat progressiva i l'aptitud fecundant. L'epidídim proporciona als espermatozoides un fluid luminal que va canviant qualitativament de forma progressiva al llarg del conducte epididimari com a resultat de l'activitat secretora i absorptiva de l'epiteli epididimari. En augmentar el ritme d'extraccions de semen es produeixen alteracions en el patró d'absorció i secreció del fluid epididimari, en el desenvolupament de la motilitat espermàtica i en el desplaçament de la gota citoplasmàtica al llarg del conducte epididimari; en algunes regions epididimàries també es produeix un augment de la freqüència d'algunes anomalies espermàtiques.

El fluid epididimari conté un nombre elevat de molècules orgàniques; es creu que algunes molècules orgàniques de baix pes molecular com l'L-carnitina, el glutamat i el *myo*-inositol estan implicades en la maduració espermàtica. En aquest estudi s'ha determinat que al llarg del conducte epididimari la concentració de glutamat i carnitina al fluid epididimari lliure d'espermatozoides augmenten, alhora que la concentració de *myo*-inositol disminueix. Al llarg de l'epidídim les variacions en la concentració d'aquests soluts no segueixen el mateix patró que les variacions en la concentració espermàtica; aquestes diferències s'atribueixen a processos de secreció o d'absorció d'aquests osmolits. El contingut de *myo*-inositol a l'interior dels espermatozoides disminueix des del caput distal, mentre que el contingut de glutamat augmenta a partir del caput distal; el contingut de carnitina dels espermatozoides epididimaris no varia al llarg del conducte. Aquests resultats donen suport a la hipòtesi de que l'epidídim proporciona glutamat als espermatozoides, el qual pot ser utilitzat pels espermatozoides per regular el seu volum en entrar en contacte amb els fluids hipotònics del tracte reproductor femení.

Recentment, s'ha proposat que la ruta del poliòl pot estar involucrada en la conservació energètica dels espermatozoides al llarg del conducte epididimari. En aquesta ruta metabòlica la glucosa és reduïda a sorbitol per l'aldosa reductasa (AR) i el sorbitol resultant és oxidat a fructosa per la sorbitol deshidrogenasa (SDH). Un dels objectius d'aquest estudi ha estat determinar la presència de la ruta del poliòl a l'epidídim de porcí, a partir de la localització al llarg del conducte epididimari dels enzims que hi participen i de l'anàlisi de la concentració dels substrats i els productes d'aquesta ruta. Els resultats obtinguts suggereixen una difusió de glucosa de la sang cap al fluid epididimari, la seva conversió a sorbitol via AR, l'acumulació d'aquest sorbitol al fluid luminal i la seva conversió a fructosa per l'acció de l'SDH. El metabolisme espermàtic de la glucosa i la fructosa podria explicar les seves baixes concentracions al cauda epididimari. L'elevada concentració de sorbitol al llarg de tot el conducte epididimari indica que el sorbitol podria ser, a més d'un substrat metabòlic, un osmolit requerit per a la regulació del volum dels espermatozoides.

# Resumen

Los espermatozoides procedentes de los testículos de mamíferos son funcionalmente inmaduros, y requieren de una diferenciación en el epidídimo para adquirir la motilidad progresiva y la aptitud fecundante. El epidídimo proporciona a los espermatozoides un fluido luminal que va cambiando cualitativamente a lo largo del conducto epididimario debido a la actividad secretora y absorbiva de su epitelio. Al aumentar el ritmo de extracciones de semen se producen alteraciones en el patrón de absorción y secreción del fluido epididimario, en el desarrollo de la motilidad espermática y en el desplazamiento de la gota citoplasmática a lo largo del conducto epididimario; en algunas regiones epididimarias también se produce un incremento de la frecuencia de algunas anomalías espermáticas.

El fluido epididimario contiene muchas moléculas orgánicas; algunas moléculas de bajo peso molecular como la L-carnitina, el glutamato y el *myo*-inositol están implicadas en la maduración espermática. En este estudio se ha determinado que a lo largo del conducto epididimario la concentración de glutamato y carnitina en el fluido libre de espermatozoides aumentan, a la vez que la concentración de inositol disminuye. Las variaciones en la concentración de estos osmolitos no siguen el mismo patrón que la variación de la concentración espermática; estas diferencias se han atribuido a procesos de secreción o absorción de los osmolitos. El contenido de *myo*-inositol del interior de los espermatozoides disminuye desde el caput distal, mientras que el contenido de glutamato aumenta a partir del caput distal; el contenido de carnitina de los espermatozoides epididimarios no varía a lo largo del conducto. Así pues, parece que el epidídimo proporciona glutamato a los espermatozoides, los cuales utilizan este sustrato para regular su volumen al entrar en contacto con los fluidos hipotónicos del trato reproductor femenino.

Recientemente, se ha propuesto que la ruta del poliol puede estar implicada en la conservación energética de los espermatozoides en el epidídimo. En esta ruta metabólica la glucosa es reducida a sorbitol por la aldosa reductasa (AR) y el sorbitol resultante es oxidado a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa (SDH). Uno de los objetivos de este estudio ha sido el de determinar la presencia de la ruta del poliol en el epidídimo de porcino, a partir de la localización de los enzimas y del análisis de la concentración de los sustratos y los productos que forman parte de esta ruta. Los resultados obtenidos sugieren una difusión de glucosa desde la sangre hacia el fluido epididimario, su conversión a sorbitol vía AR, la acumulación de este sorbitol en el fluido luminal y su conversión a fructosa por acción de la SDH. El metabolismo espermático de la glucosa y la fructosa podría explicar sus bajas concentraciones en el cauda epididimario. La elevada concentración de sorbitol determinada en el fluido epididimario indica que el sorbitol podría ser, además de un sustrato metabólico, un osmolito requerido para la regulación del volumen de los espermatozoides.

# Summary

Mammalian spermatozoa from the testis are incapable of fertilising eggs and their functional competence is acquired during transit through the epididymis. This provides a unique milieu for sperm maturation and storage by the absorptive and secretory activities of its epithelium. A high semen collection frequency brought about an altered resorption and secretion pattern of the epididymal fluid, and affected the development along the epididymal duct of sperm motility and distal displacement of the sperm cytoplasmic droplet. The incidence of some sperm abnormalities was also found to be higher in some epididymal regions of these boars.

In epididymal plasma, high-molecular-weight proteins and smaller molecules such as L-carnitine, glutamate and *myo*-inositol are thought to aid in the conversion of gametes into competent, functional cells. In this study, it has been determined that in epididymal fluid, free of spermatozoa, the concentration of *myo*-inositol decreased in a proximo-distal direction, whereas intraluminal concentrations of L-carnitine and L-glutamate increased distally. As changes in the concentration of these solutes did not parallel changes in sperm concentration, indicative of fluid resorption, this may reflect active secretion or absorption of these solutes. The content of inositol in spermatozoa fell as they moved from the distal caput whereas sperm glutamate increased from the distal caput to more distal regions and carnitine content remained unchanged during epididymal transit. These data are consistent with the hypothesis that epididymal provision of glutamate prepares porcine spermatozoa for the hypotonic challenge of fluids in the sow.

It has recently been proposed that the polyol pathway is involved in sperm energy conservation along the epididymal duct. In this pathway glucose is first reduced to sorbitol by aldose reductase (AR) and the resulting sorbitol is subsequently oxidised to fructose by sorbitol dehydrogenase (SDH). In this study, evidence for an operative polyol pathway was demonstrated in the porcine epididymis by localising enzymes in the epithelium and measuring substrates and products in epididymal fluid. The results found are consistent with diffusion of circulating glucose into the lumen, its conversion via AR to sorbitol which accumulates in the lumen and the action of SDH on sorbitol to produce fructose. Sperm metabolism of glucose and fructose may explain their lower concentrations found in the caudal fluid and sorbitol could be a metabolic substrate or osmolyte required for volume regulation.





# Introducció

---



## 1. OBJECTIUS

Aquest treball pretén aprofundir en l'estructura i funcionament del conducte epididimari. L'epidídim és l'òrgan responsable del manteniment, protecció, transport, maduració i emmagatzemament dels espermatozoides. Així doncs, els espermatozoides procedents dels testicles són funcionalment immadurs, i requereixen d'una posterior diferenciació a l'epidídim per adquirir la motilitat progressiva i l'aptitud fecundant. En aquest procés de maduració, la interacció dels espermatozoides amb el fluid luminal pren un paper essencial. La composició d'aquest fluid luminal va canviant progressivament al llarg del conducte epididimari; aquests canvis estan regulats per les activitats secretores i absortives de l'epiteli que són específiques per a cada regió epididimària (Hinton i Palladino, 1995; Hinton i col. 1996). El procés de maduració epididimària dels espermatozoides de mamífers implica canvis morfològics i funcionals importants, com ara el desplaçament de la gota citoplasmàtica des de la peça de connexió a l'anell de Jensen (Crabo i Hunter, 1975), la condensació i estabilització de la cromatina nuclear i de les fibres denses mitjançant ponts disulfur (Cooper, 1986; Moore, 1990, 1996; Hingst i col., 1995) i la maduració de l'acrosoma (Bedford, 1963). Durant la maduració epididimària també es produeix una remodelació de la membrana plasmàtica dels espermatozoides (Kumar i col., 1991; Orgebin-Crist, 1998; Stoffel i col., 2002); a més, els espermatozoides adquireixen la capacitat de moure's progressivament (Yanagimachi, 1994) i l'habilitat de reconèixer i unir-se als oòcits (Moore i col., 1983; Cooper, 1986; Kumar i col., 1991).

Així doncs, el primer objectiu d'aquest estudi és determinar quin és el patró d'absorció i secreció a l'epidídim i quins són els canvis maduratius que es donen en els espermatozoides al llarg del conducte epididimari dels mascles porcíns.

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 (Sprando i col., 1999; Veeramachaeni, 2000; Dobson i Smith, 2000; Pinart i col., 2001, 2002; Goeritz i col., 2003; Sancho i col., 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 dels mascles a una elevada freqüència d'ejaculacions es manifesta en un descens de la motilitat espermàtica i un augment

de la freqüència d'espermatozoides amb gota citoplasmàtica i aberrants a l'ejaculat (Meding, 1975; Swierstra i Dyck, 1976; Cameron, 1985; Schilling i Vengust, 1987; Bonet i col., 1991; Strzezek i col., 1995a; Tanaka i col., 2000; Pruneda i col., 2005). Aquesta disminució de la qualitat espermàtica dels ejaculats 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 i col., 1991; Briz i col., 1995, 1996; Tanaka i col., 2000; Pruneda i col., 2005).

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

El fluid epididimari conté un elevat nombre de molècules orgàniques de baix pes molecular i solubles en aigua presents a elevades concentracions (mM) (Cooper, 1998); algunes d'aquestes molècules són l'L-carnitina, el glutamat i el *myo*-inositol. Es creu que l'L-carnitina està implicada en la producció d'energia per a la motilitat espermàtica (Ng i col., 2004), i que el glutamat pot ser utilitzat com a substrat oxidatiu per al metabolisme aeròbic dels espermatozoides (Mann, 1964) o pot millorar la supervivència espermàtica (Tyler i Rothschild, 1951). D'altra banda, el *myo*-inositol un cop transformat a fosfatidilinositol és metabolitzat activament pels espermatozoides (Scott i Dawson, 1968) i es creu que té un efecte estimulador de la motilitat, la respiració i la glicòlisi dels espermatozoides (Voglmayr, 1973). A més, es coneix que aquestes molècules són utilitzades per les cèl·lules somàtiques com a osmolits reguladors de volum (Strange i col., 1996; Lang i col., 1998; Fürst i col., 2002). Recentment s'ha proposat que els espermatozoides en procés de maduració podrien adquirir aquests osmolits, els quals participarien en la regulació del volum espermàtic als fluids hipoosmòtics del tracte reproductor femení (Cooper i Yeung, 2003).

El tercer objectiu d'aquest estudi és determinar com varia la concentració de carnitina, *myo*-inositol i glutamat al fluid i als espermatozoides de les diferents regions epididimàries, i si aquestes substàncies actuen com a osmolits pels espermatozoides en procés de maduració a l'epidídim de porcí.

Es coneix que la fructosa i la glucosa poden servir com a font d'energia pels espermatozoides de diverses espècies, entre elles l'espècie porcina (Mann, 1964; Leese i col., 1981; Jones i Montague, 1991); a més, s'ha demostrat *in vitro* que els espermatozoides de marrà oxiden el sorbitol (King i

Mann, 1959). La glucosa és un sucre majoritari a la sang, mentre que les concentracions de sorbitol i de fructosa són relativament baixes a molts teixits. Un tipus específic de metabolisme, conegut com la ruta del poliòl és present en alguns teixits, i converteix la glucosa a fructosa via sorbitol (King i Mann, 1959). En aquesta ruta metabòlica la glucosa és reduïda a sorbitol per l'aldosa reductasa (AR) i el sorbitol resultant és oxidat a fructosa per la sorbitol deshidrogenasa (SDH) (Kinoshita i Nishimura, 1988).

Així doncs, el quart objectiu d'aquest estudi és determinar la presència de la ruta del poliòl a l'epidídim de porcí, a partir de la localització al llarg del conducte epididimari dels seus enzims i de l'anàlisi de la concentració dels substrats i els productes d'aquesta ruta.



## 2. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE L'EPIDÍDIM

### 2.1. Estructura macroscòpica

El terme epidídim prové del grec (*epi*=sobre, *didymoi*=testicles) i designa l'òrgan situat sobre la superfície dels testicles dels mamífers, rèptils i peixos cartilaginosa que va des del pol anterior al pol posterior testicular, i condueix els espermatozoides des dels conductes eferents al vas deferent (Cooper, 1998). L'epidídim està format pel conducte epididimari, altament recargolat i immers en una matriu de teixit conjuntiu, i externament envoltat per una càpsula fibrosa que emet septes cap a l'interior, i el divideixen en lòbuls. El conducte epididimari completament estirat mesura aproximadament 3 m en rates, 6 m en humans, 36 m en toros i 54 m en porcs (von Lanz i Neuhäuser, 1964; Hoskins i col., 1978; Turner i Howards, 1978; Jiang i col., 1994; Cooper, 1998).

A la majoria de les espècies l'epidídim ha estat tradicionalment dividit en tres regions anatòmiques principals: el caput, format pels conductes eferents que hi desemboquen i per la porció proximal del conducte epididimari, el corpus generalment més estret, i el cauda molt prominent (Vendrely, 1981; Goyal i Williams, 1991). De tota manera, segons criteris funcionals, altres autors han dividit l'epidídim en els segments inicial, mig i terminal, on tenen lloc respectivament una reabsorció de fluid, una maduració espermàtica i un emmagatzemament de l'esperma (Glover i Nicander, 1971; Cooper, 1998).

### 2.2. Estructura microscòpica

A totes les espècies de mamífers l'epiteli que revesteix el conducte epididimari és de tipus pseudoestratificat, i conté tres tipologies cel·lulars: les cèl·lules principals, les cèl·lules basals i les cèl·lules halo (Robaire i Hermo, 1988; Briz i col., 1993; Stoffel i Friess, 1994; Calvo i col., 2000). En algunes espècies com ratolins (Schleicher i col., 1984), rates (Reid i Cleland, 1957; Morales i Cavicchia, 1991), marsupials (Rodger, 1982), toros (Goyal i col., 1980), bocs (Goyal i Williams, 1991), porcs (Stoffel i Friess, 1994) i humans (Palacios i col., 1991) s'han distingit, a més d'aquestes tipologies cel·lulars, les cèl·lules apicals. Les característiques i abundància relativa dels diferents tipus cel·lulars varia segons la regió epididimària i l'espècie (Reid i Cleland, 1957; Ramos i Dym, 1977; Goyal i Williams, 1991; Briz i col., 1993; Stoffel i Friess, 1994).



Les cèl·lules principals són cèl·lules columnars amb abundants estereocilis a la seva superfície apical (Hamilton, 1975; Briz i col., 1993; Stoffel i Friess, 1994), que intervien en l'activitat secretora i absortiva de l'epiteli (Robaire i Hermo, 1988; Cooper, 1998). Generalment aquestes cèl·lules presenten un nucli en posició medio-basal i un o dos nuclèols desenvolupats (Briz i col., 1993; Stoffel i Friess, 1994). Les cèl·lules principals es mantenen unides entre si per unions estretes que es localitzen a la porció apical de l'epiteli, i que constitueixen la barrera hematoepididimària (Hinton, 1980).

A la majoria de mamífers s'han observat diferències morfològiques i funcionals en les cèl·lules principals al llarg del conducte epididimari (Nicander i Glover, 1973; Jones i col., 1979). Aquestes diferències es reflecteixen en l'aparença i organització del seu aparell secretor (reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i grànuls secretors) i del seu aparell endocític (vesícules envoltades de membrana, endosomes, cossos multivesiculars i lisosomes) (Hamilton, 1975; Hermo i col., 1994), i en l'abundància de gotes lipídiques. Aquestes diferències regionals han estat relacionades amb canvis en la motilitat i la capacitat fecundant dels espermatozoides durant el seu pas a través de l'epidídim (Flickinger i col., 1988; Cooper, 1990; Mathieu i col., 1992).

Les cèl·lules basals es distribueixen homogèniament al llarg del conducte epididimari; es tracta de cèl·lules de perfil piramidal en contacte amb la membrana basal, però que no arriben a la superfície lliure (Briz i col., 1993; Stoffel i col., 1994). El seu citoplasma és escàs i el nucli mostra un perfil arrodonit i una cromatina laxa (Briz i col., 1993). Tot i que s'havia proposat que aquestes cèl·lules constituïen una font de reserva de cèl·lules principals (Robaire i Hermo, 1988), la presència d'abundants cèl·lules principals en mitosi a l'epiteli epididimari (Sun i Flickinger, 1979) va fer descartar aquesta hipòtesi. Actualment, l'hipòtesi més plausible és la proposada per Yeung i col. (1994) en humans, que van determinar que les cèl·lules basals es diferencien a partir de macròfags i que participen en la defensa immunològica.

Les cèl·lules apicals, també anomenades cèl·lules holocrines, cèl·lules riques en mitocondris i cèl·lules estretes (Sun i Flickinger, 1982; Regadera i col., 1993), han estat descrites a les regions proximals del conducte epididimari de la majoria dels mamífers estudiats, entre altres el gat (Morales i Cavicchia, 1991), el toro (Goyal, 1985), el boc (Goyal i Williams, 1991), el porc (Stoffel i Friess, 1994) i l'home (Palacios i col., 1991); generalment presenten un àpex a la part apical i de vegades formen un perllongament que s'estén fins a la membrana basal (Hamilton, 1975; Goyal i Williams, 1991; Arenas i col., 1996). En rates (Cohen i col., 1976), conills (Ekstedt i

Ridderstrale, 1992) i porcins (Ekstedt i col., 1991) s'ha demostrat que les cèl·lules apicals tenen activitat anhidrasa carbònica, i per tant, podrien estar implicades en l'acidificació del fluid luminal (Stoffel i Friess, 1994).

En rates, bovins, bocs i humans s'ha determinat que les cèl·lules halo descrites per Reid i Cleland (1957) són limfòcits i macròfags intraepitelials (Goyal i Williams, 1991) que probablement estan implicats en la defensa immunològica del tracte reproductor masculí, i eviten la resposta antigènica contra els espermatozoides (Goyal i Williams, 1991).

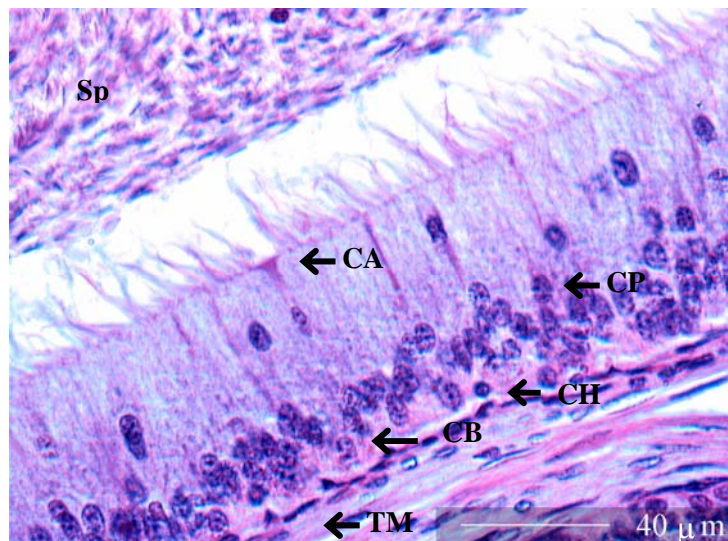


Figura 1. Detall de l'epiteli epididimari a la regió del caput proximal. L'epiteli està format per cèl·lules principals (CP), cèl·lules basals (CB), cèl·lules halo (CH) i cèl·lules apicals (CA); envoltant el conducte epididimari es pot observar la túnica muscular (TM) i a la llum del conducte s'observen espermatozoides (Sp).

El conducte epididimari està envoltat per una túnica muscular que mostra un grau de desenvolupament variable al llarg de les diferents regions (Briz i col., 1993; Stoffel i Fries, 1994). El teixit connectiu peritubular és de tipus lax i irrigat per abundants vasos limfàtics i sanguinis, especialment al caput epididimari que és la regió metabòlicament més activa (Briz i col., 1993). Pròxims als vasos sanguinis s'observen plexos de fibres nervioses amielíniques que emeten ramificacions cap al conducte epididimari, i també alguns ganglis vegetatius (Paniagua, 1997). La musculatura del cauda està molt innervada pel sistema nerviós simpàtic, el qual provoca intenses contraccions de la porció inferior de l'epidídim durant l'ejaculació (Wheather, 1980; Setchell i col., 1993).

### 2.3. El fluid epididimari

#### a) Formació del fluid epididimari

Les cèl·lules de Sertoli secreten el fluid testicular (Setchell, 1969; Cheung i col., 1977) que transporta els espermatozoides des dels tubs seminífers fins als conductes eferents, on la major part d'aquest fluid és reabsorbit (Tuck i col., 1970). Les cèl·lules epitelials del segment inicial de l'epidídim també estan involucrades en la reabsorció de fluid (Wong i Yeung, 1978). Al llarg dels conductes eferents i epididimari la major part dels productes testiculars seran retornats a la sang (Levine i Marsh, 1971). Tot i que la reabsorció des de la llum del conducte cap a la sang és un element constitutiu del flux del fluid a l'epidídim, el moviment de fluid en una direcció secretora, de la sang cap a la llum del conducte, també pren un paper important. Així doncs, la formació del medi epididimari és el resultat de la reabsorció i secreció al llarg del conducte de l'epidídim. Per tant, el fluid epididimari va canviant de forma contínua mentre els espermatozoides es van movent al llarg del conducte (Turner, 1991), i a qualsevol punt del conducte epididimari el fluid luminal és el resultat de les activitats secretores i absortives de l'epiteli, totes dues en aquest punt determinat i en els punts pròxims. Aquesta secreció és mediada per transportadors situats a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials (Wong, 1989).

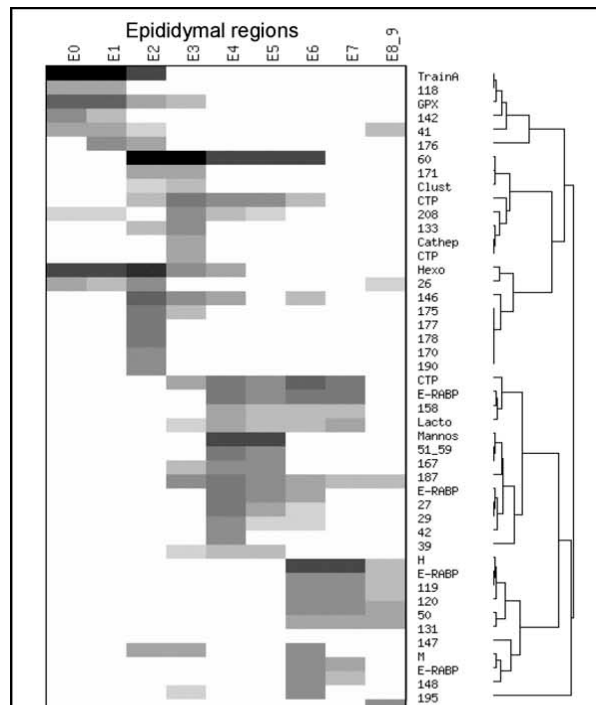


Figura 2. Diagrama de les proteïnes secretades a les diferents regions epididimàries de porcí, segons la intensitat de la seva secreció. E0-E4 caput, E5-E7 corpus, E8-E9 cauda (extret de Dacheux i col., 2005).

El fluid epididimari està format per aigua, ions inorgànics, molècules orgàniques petites i macromolècules orgàniques, principalment proteïnes. Mitjançant els processos de secreció i d'absorció es produeix una entrada i sortida d'aigua a través de l'epiteli; aquest flux és possible perquè l'epiteli que revesteix els conductes eferents i epididimari té una elevada permeabilitat a l'aigua (Wong i col., 2002). Aquest transport d'electrolits i d'aigua a través de l'epiteli afecta la concentració de tots els constituents essencials del fluid epididimari. Alhora, la fluïdesa del medi afecta la concentració espermàtica i el transport dels espermatozoides al llarg del conducte epididimari, i determina el temps que els espermatozoides passaran a l'epidídim (Wong, 1986).

b) Manteniment de la composició diferencial del fluid epididimari

El fluid epididimari té una composició molt diferent a la composició de la sang, i aquestes diferències composicionals es mantenen gràcies a la barrera hematoepididimària (Orgebin-Crist i col., 1975; Flickinger, 1983; Kirchhoff i col., 1998). Les unions estretes entre cèl·lules epitelials epididimàries regulen aquestes diferències entre el fluid luminal i la sang; les unions adherents també són essencials, ja que tenen propietats estructurals i de senyalització entre cèl·lules (Cyr i col., 2002). Les unions de tipus gap també formen part del complex d'unions de l'epidídim, i concretament, són les responsables de la comunicació entre cèl·lules epididimàries i facilitar així la coordinació dels canvis luminals que són necessaris per a la maduració i emmagatzemament espermàtics (Pelletier, 1995).

Alguns autors han investigat el transport de molècules a través de l'epiteli epididimari i com aquestes molècules contribueixen a la formació del fluid luminal (veure Hinton i Palladino, 1995). Els estudis de micropunció han demostrat que les molècules de baix pes molecular, com l'aigua i l'urea, poden travessar la barrera hematoepididimària, mentre que molècules d'alt pes molecular com la glucosa, l'inulina i l'albumina sèrica bovina no la travessen (Hinton i Howards, 1982; Turner i Howards, 1985). Així doncs, sembla que la selectivitat de la barrera resideix en la presència de proteïnes de transport específiques a la membrana basolateral de les cèl·lules principals que transporten productes des de la sang cap al fluid luminal (Turner i Howards, 1985). Diversos soluts, com l'L-carnitina, són transportats activament cap al lumen (James i col., 1981); tot i que no es coneix quin és el mecanisme pel qual l'L-carnitina és transportada a través de l'epiteli, se sap que és un procés actiu que pot ser regulat per andrògens (James i col., 1981). La glucosa també és transportada a través de l'epiteli epididimari, però a diferència de l'L-carnitina, és un transport per difusió facilitada (Hinton i Howards, 1982).

c) Molècules orgàniques de baix pes molecular

➤ Carnitina

La carnitina és un compost orgànic de baix pes molecular que es troba en elevades concentracions a l'epidídim (Marquis i Fritz, 1964); concretament, la seva concentració al cauda epididimari de rates i porcs és 2.000 vegades més gran que la concentració sanguínia (Brooks, 1979; Hinton i col., 1979). L-carnitina és l'isòmer actiu de la carnitina i es coneix que en altres teixits intervé en la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos (Atar i col., 1997). S'ha determinat que l'L-carnitina del fluid epididimari no és un producte de síntesi local, sinó que es transporta des de la sang mitjançant un transport dependent d'andrògens (Brooks i col., 1974) i és secretada al lumen per un transport actiu (Brooks, 1980; Cooper i col., 2003). En moltes espècies s'ha demostrat que la concentració de carnitina augmenta al llarg del conducte epididimari (Casillas, 1973; Hinton i col., 1979; Jeulin i col., 1994), cosa que ha fet pensar que aquesta molècula és essencial per als espermatozoides madurs, però no per als espermatozoides immadurs. Posteriorment, es va proposar que la carnitina podria proporcionar un substrat energètic als espermatozoides epididimaris a través de la transferència d'àcids grassos lliures al mitocondri, tal i com s'ha vist en cèl·lules musculars (Atar i col., 1997). Així doncs, la carnitina del fluid epididimari podria estar relacionada amb el desenvolupament de la capacitat de moviment dels espermatozoides (Hinton i Hernandez, 1985). A favor d'aquesta hipòtesi, s'ha demostrat que tant la carnitina com l'acetilcarnitina augmenten la motilitat dels espermatozoides provinents del caput epididimari (Hinton i Hernandez, 1985). D'altra banda, en porcí i en boc, però no en rata ni en hámster (Jeulin i Lewin, 1996), la concentració de carnitina i acetilcarnitina en els espermatozoides epididimaris es correlaciona amb el percentatge d'espermatozoides amb un moviment progressiu. Jeulin i Lewin (1996) van proposar que l'acetilcarnitina podria ser utilitzada com a reserva d'energia, ja que seria una molècula donadora de grups acetil, mentre que la carnitina actuaria com un agent protector dels espermatozoides.

➤ Glutamat

El glutamat és el principal aminoàcid lliure dels testicles, el fluid epididimari i el semen de la majoria dels mamífers (Mann, 1964). Al caput epididimari de rates la concentració de glutamat és 350 vegades la concentració en sang (Hinton, 1990); diversos transportadors de glutamat s'han identificat a l'epidídim de rates, i es creu que estan implicats en el transport de glutamat cap al lumen epididimari (Wagenfeld i col., 2002; Cooper i Yeung, 2003). D'altra banda, Krvavica i col.

(1964) van demostrar que en porcí l'àcid glutàmic s'originava a l'epidídim. Al semen, el glutamat es localitza al plasma seminal però no als espermatozoides (Mann, 1964). Els aminoàcids lliures podrien servir com a substrats oxidables per al metabolisme aeròbic dels espermatozoides (Mann, 1964) o millorar la supervivència dels espermatozoides (Tyler i Rothschild, 1951).

➤ *myo*-Inositol

L'inositol és un sucre alcohol que a la majoria de teixits de mamífers es troba en forma del seu estereoisòmer, el *myo*-inositol. Existeix una gran variabilitat en la concentració d'inositol al fluid epididimari de diferents espècies; així en conills, monos, bocs i toros la concentració d'inositol disminueix al llarg del conducte epididimari (Voglmayr i Amann, 1973; Hinton i col., 1980), mentre que en rates augmenta (Voglmayr, 1974; Pholpramool i col., 1982). D'altra banda, s'ha determinat que el testicle, a diferència de l'epidídim, té la capacitat de sintetitzar inositol a partir de la glucosa (Voglmayr i Amann, 1973; Hinton i col., 1980; Sujarit i col., 1985). Així doncs, l'inositol del fluid epididimari prové, en part, del testicle. A més, s'ha demostrat que l'inositol és transportat des de la sang cap a la llum del conducte epididimari en contra del seu gradient de concentració, suggerint així un transport actiu (Cooper, 1982; Hinton i Howards, 1982). Al fluid epididimari l'inositol és utilitzat per sintetitzar fosfatidilinositol (Voglmayr i Amann, 1973), que és un fosfolípid abundant en els espermatozoides i que té un efecte estimulador de la motilitat, la respiració i la glicòlisi (Voglmayr, 1973), i que és metabolitzat activament pels espermatozoides (Scott i Dawson, 1968). Voglmayr i Amann (1973) van proposar que la disminució de la concentració d'inositol al llarg de l'epidídim de conills, simis, bocs i toros es produeix a causa d'un augment de la síntesi de fosfatidilinositol a partir de l'inositol present al fluid.

d) Hipertonicitat del fluid epididimari

El fluid epididimari dels mamífers és hipertònic en relació a la sang; els ions inorgànics i les molècules orgàniques petites, entre elles l'inositol, el glutamat, la carnitina i el sorbitol, contribueixen a crear aquest ambient hiperosmòtic (Cooper, 1998). L'any 1977, Johnson i Howards van suggerir que la hiperosmolaritat del fluid luminal podria jugar un paper en la maduració espermàtica; així doncs, s'hipotetitzava que alguns osmolits actius podien alterar processos de plegament de proteïnes importants per a la maduració espermàtica. D'altra banda, es coneix que les condicions hipertòniques poden causar la pèrdua de volum cel·lular i la deshidratació dels espermatozoides (Hammerstedt i col., 1978), de manera que es va pensar

que aquesta deshidratació podria estar implicada en el manteniment de la viabilitat espermàtica durant l'emmagatzemament al cauda epididimari (Crichton i col., 1994).

D'altra banda, diversos estudis han demostrat que la disminució de l'osmolaritat del fluid epididimari provoca un inflament hipotònic dels espermatozoides dins el lumen (Cooper i Yeung, 2003). La infertilitat dels ratolins c-ros knockout es relaciona amb la incapacitat dels espermatozoides per regular el seu volum quan entren en contacte amb les solucions hipotòniques del tracte femení, de manera que les cues es deformen per inflament. Així doncs, aquests espermatozoides no poden travessar la unió uterotubàrica i, per tant, són incapaços d'arribar fins a les trompes de Fal·lopi (Yeung i col., 2000).

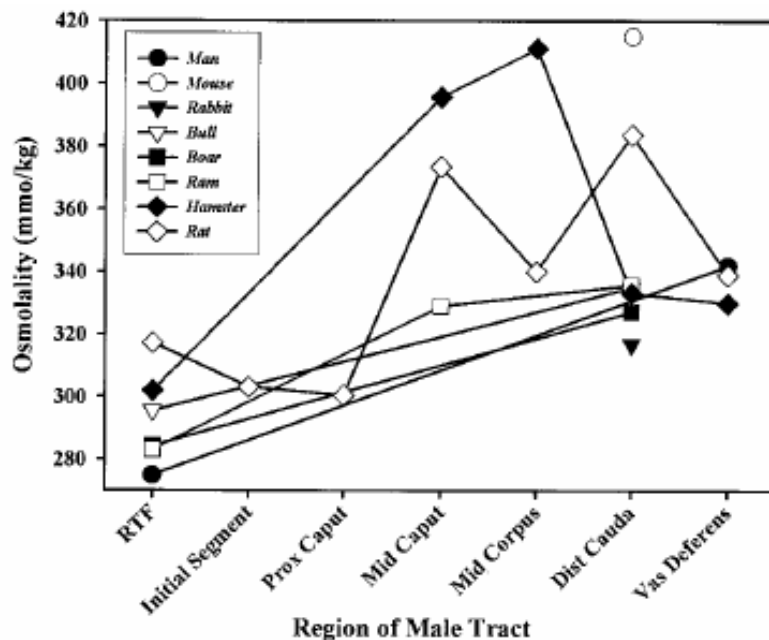


Figura 3. Pressió osmòtica al llarg del tracte reproductor masculí de diverses espècies de mamífers (extret de Cooper i Yeung, 2003).

Recentment s'ha proposat que l'augment de l'osmolaritat al llarg del conducte epididimari, juntament amb el llarg temps (dies) que els espermatozoides viatgen a través d'aquest conducte, podria afavorir l'adquisició d'osmolits del fluid per part dels espermatozoides; aquests osmolits podrien ser utilitzats pels espermatozoides per regular el seu volum durant el seu trànsit a través dels fluids hipoosmòtics del tracte femení (Cooper i Yeung, 2003).

## 2.4. Funcions de l'epidídim

### a) Sosteniment i protecció

Durant el seu desenvolupament i maduració, els espermatozoides adquireixen diferents antígens de membrana que no són reconeguts com a propis pel sistema immunitari de l'organisme, i per tant, podrien desencadenar una resposta antigènica (Pollanen i Cooper, 1994). Existeixen diferents factors que protegeixen els espermatozoides contra la resposta immune del propi organisme com són la barrera hematoepididimària, que evita el pas de macròfags cap al fluid luminal (Turner, 1991; Hinton i Palladino, 1995), i les cèl·lules basals de l'epiteli epididimari, que estan implicades en l'eliminació d'alguns autoantígens dels espermatozoides (Yeung i col., 1994). D'altra banda, algunes proteïnes secretades per les cèl·lules epididimàries a la llum del conducte participen en la protecció dels espermatozoides enfront els efectes perjudicials d'agents xenobiòtics tòxics i químics i de l'estrès oxidatiu (Alvarez i col., 1987; Kirchhoff, 1999).

### b) Transport

A moltes espècies el temps mig de trànsit dels espermatozoides a través de l'epidídim varia d'1 a 2 setmanes, i el recorregut diari és de 0,5 i 5 m en rates i en porcs, respectivament. El transport dels espermatozoides a través del caput i el corpus epididimaris està afavorit per la contracció peristàltica de la seva musculatura llisa (Amann, 1989; Cooper, 1998); al cauda epididimari les ones peristàltiques es tornen progressivament menys intenses fins a anul·lar-se completament, i això facilita l'emmagatzemament dels espermatozoides. En el moment de l'ejaculació, la contracció de la musculatura llisa del cauda és estimulada per fibres adrenèrgiques i afavoreix l'emissió dels espermatozoides emmagatzemats (Amann, 1989; Cooper, 1995).

### c) Maduració epididimària

Tot i que en vertebrats inferiors, com ciclostomes, peixos i amfibis, els espermatozoides que s'alliberen dels testicles són totalment mòbils i capaços de fertilitzar l'òocit, en vertebrats superiors com rèptils, ocells i mamífers els espermatozoides procedents dels testicles no presenten motilitat progressiva ni capacitat fecundant (Nirmal i Rai, 1997), sinó que aquestes propietats s'adquireixen durant la seva maduració al llarg de l'epidídim (Robaire i Hermo, 1988; Hinton i Palladino, 1995; Cooper, 1998; Dacheux i col., 1998; Jones, 1998).

El procés de maduració epididimària dels espermatozoides implica canvis morfològics i funcionals importants, com són el desplaçament de la gota citoplasmàtica des de la peça de connexió a l'anell de Jensen (Crabo i Hunter, 1975), la condensació i estabilització de la



cromatina nuclear i de les fibres denses mitjançant ponts disulfur (Cooper, 1986; Moore, 1990, 1996; Hingst i col., 1995) i la maduració de l'acrosoma (Bedford, 1963). El cocultiu d'espermatozoides procedents del caput epididimari de porcí amb fragments de conducte del corpus epididimari provoca la migració distal de la gota citoplasmàtica (Bassols i col., 2005). Durant la maduració epididimària també es produeixen canvis en les propietats fisicoquímiques de la membrana dels espermatozoides (Kumar i col., 1991; Orgebin-Crist, 1998; Stoffel i col., 2002), que són conseqüència tan de la incorporació de proteïnes secretades al conducte epididimari, com de la modificació per part d'enzims presents al fluid luminal de proteïnes ja existents (Moore, 1981; Dacheux i col., 1990; Okamura i col., 1992).

Al llarg del conducte epididimari els espermatozoides també adquireixen la capacitat de moure's progressivament (Yanagimachi, 1994); d'aquesta manera, la motilitat vibrant del caput proximal i distal canvia gradualment a una motilitat circular però no progressiva al corpus, i posteriorment, a una motilitat lineal i progressiva al cauda epididimari (Dacheux i Paquignon, 1980; Goyal i Williams, 1991; Yeung i col., 1993).

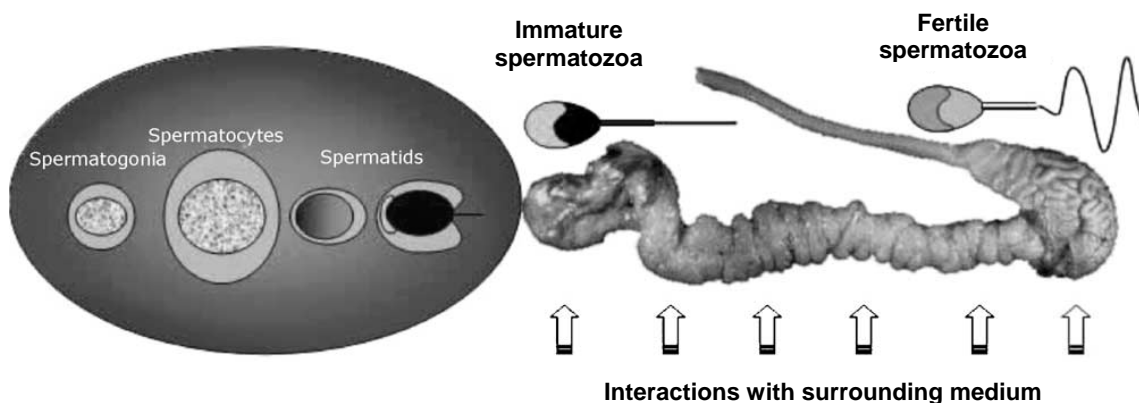


Figura 4. Representació esquemàtica del procés de formació i maduració de l'espermatozoide de porcí a través del testicle i l'epidídim (segons Dacheux i col., 2005).

D'altra banda, durant el trànsit al llarg del conducte epididimari els espermatozoides adquireixen l'habilitat de reconèixer i unir-se als oòcits (Moore i col., 1983; Cooper, 1986; Kumar i col., 1991). En humans només els espermatozoides del cauda tenen capacitat fecundant (Moore i col., 1983; Cooper, 1990), mentre que en porcs s'ha observat que alguns espermatozoides del caput distal manifesten ja aquesta capacitat (Dacheux i Paquignon, 1980). Cal remarcar, però, que en rates,

hàsters, conills, marrans i porcins la major freqüència d'espermatozoides amb capacitat fecundant es localitza al cauda (Dacheux i Paquignon, 1980).

Així doncs, alguns dels canvis que experimenten els espermatozoides al llarg del conducte epididimari són conseqüència de l'activitat de les cèl·lules epididimàries, mentre que altres són canvis que depenen del temps (Cooper 1995, 1998).

d) Emmagatzemament

El cauda epididimari està especialitzat en emmagatzemar espermatozoides fins al moment de l'ejaculació (Jones, 1989; Jones i Clulow, 1994). A la majoria d'espècies s'ha determinat que aproximadament el 55-65% de l'esperma epididimària es localitza al cauda (Amann, 1981), i que el temps de residència dels espermatozoides en aquesta regió pot variar entre 3 i 13 dies (Amann, 1981; Robaire i Hermo, 1988), tot i que, excepcionalment en algunes espècies es pot mantenir en estat fèrtil durant dues o tres setmanes (Setchell i col., 1993; Moore, 1996). Aquesta funció d'emmagatzemament de l'epidídim també és dependent d'andrògens (Orgebin-Crist i col., 1975; Bedford i Hoskins, 1990).

Estudis *in vitro* en humans i porcins han demostrat que la viabilitat espermàtica es manté quan els espermatozoides són cocultivats amb cèl·lules epididimàries; sembla que aquest efecte beneficiós és conseqüència del contacte directe entre els espermatozoides i la superfície apical de les cèl·lules epitelials en cultiu (Akhondi i col., 1997; Bassols i col., 2005).

Els espermatozoides són emmagatzemats al cauda epididimari en un estat quiescent de mínima energia fins al moment de l'ejaculació (Cooper, 1986, 1998; De Paw i col., 2003). Aquest estat de quiescència està induït per l'elevat contingut de proteïnes viscoses, les baixes concentracions de ió sodi del fluid caudal, el baix pH intracel·lular dels espermatozoides, l'elevada concentració espermàtica, la baixa tensió d'oxigen, l'elevada osmolaritat i les baixes concentracions de substrats energètics com la glucosa i la fructosa (Cascieri i col., 1976; Turner i Reich, 1985; Crichton i col., 1994; Verma i Chinoi, 2001; De Paw i col., 2003). De tota manera, els espermatozoides emmagatzemats al cauda manifesten ràpidament la seva capacitat de moure's en ser diluïts en un medi de cultiu o en els fluids procedents de les glàndules accessòries (Elzanaty i col., 2002).

## 2.5. Fonts d'energia presents a l'epidídim

Es coneix que la fructosa i la glucosa poden servir de font d'energia pels espermatozoides de diverses espècies (entre elles, el porcí) (Mann, 1964; Leese i col., 1981; Jones i Montague, 1991); a més a més, s'ha demostrat *in vitro* que els espermatozoides de marrà oxiden el sorbitol (King i Mann, 1959). Mentre que la glucosa és un sucre majoritari a la sang, els nivells de sorbitol i fructosa són relativament baixos a la majoria dels teixits. Un tipus específic de metabolisme conegut com la ruta del poliòl és present a alguns teixits, i converteix la glucosa a fructosa via sorbitol (King i Mann, 1959). En aquesta ruta metabòlica, la glucosa és reduïda a sorbitol per l'aldosa reductasa (AR) utilitzant el nicotina adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) com a donador d'electrons. El sorbitol resultant és oxidat a fructosa per la sorbitol deshidrogenasa (SDH), utilitzant el nicotina adenina dinucleòtid (NAD<sup>+</sup>) com a acceptor d'electrons.

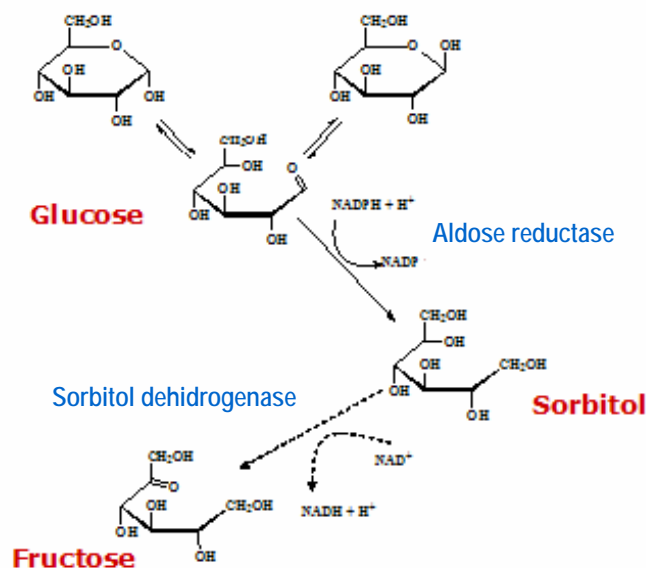


Figura 5. Esquema de la ruta del poliòl.

Als testicles de rata s'ha demostrat la presència de l'AR al citoplasma de les cèl·lules de Sertoli i de les espermàtides allargades; en ambdós tipus cel·lulars s'ha proposat que l'AR intervé en la destoxicació dels compostos carbonil citoplasmàtics (Kobayashi i col., 2002). Tot i que la presència d'AR no s'ha demostrat en els espermatozoides testiculars ni epididimaris de rata (Kobayashi i col., 2002), en toro s'ha descrit la seva presència tan als espermatozoides com al fluid luminal de l'epidídim (Frenette i col. 2004). La presència d'SDH s'ha demostrat al fluid i als espermatozoides epididimaris de rates i toros (Kobayashi i col., 2002; Frenette i col., 2004). Frenette i col. (2004) proposaren que la ruta del poliòl podia estar implicada en el control del metabolisme espermàtic durant el seu trànsit a través del conducte epididimari.

### 3. FACTORS QUE INFLUEIXEN EN LA QUALITAT ESPERMÀTICA DELS MASCLES PORCINS

Existeixen diversos factors que afecten la funció reproductora de l'espècie porcina. Quan un factor altera la funció reproductora d'una truja, aquesta entra en anestre i s'inhibeix l'ovulació (Flowers, 1998). En els mascles porcins, en canvi, les disfuncions reproductives s'associen, freqüentment, a alteracions de la qualitat espermàtica dels ejaculats (Martín, 1990; Tucker i Chan, 1993).

Entre els factors que més influeixen en la qualitat espermàtica dels mascles porcins cal destacar l'edat (Berndtson i Thompson, 1990), el pes i la mida testicular (Cameron, 1982; Berndtson i Thompson, 1990), el ritme d'extraccions (Bonet i col., 1991; Cooper i col., 1993; Strzezek i col., 1995a, 1995b; Tanaka i col., 2000; Pruneda i col., 2005), el fotoperíode (Sancho i col., 2004), la temperatura (Colenbrander i Kemp, 1990; Ciereszko i col., 2000), l'estació (Prunier i col., 1994; Ciereszko i col., 2000), les condicions d'allotjament (Martín, 1990; Le Dividich, 1996), el règim alimentari (Martín, 1990; Le Dividich, 1996) i els trastorns orgànics de l'aparell reproductor (Colenbrander i Kemp, 1990; Pinart i col., 1999).

La freqüència de recollida del semen és un factor clau que incideix de forma directa sobre la capacitat reproductiva dels mascles porcins; estudis previs han demostrat que quan els mascles sans i sexualment madurs se sotmeten a un elevat ritme d'extraccions de semen, la qualitat espermàtica dels seus ejaculats, i per tant, la seva fertilitat disminueixen notablement (Meding, 1975; Swierstra i Dyck, 1976; Cameron, 1985; Schilling i Vengust, 1987; Bonet i col., 1991; Strzezek i col., 1995a; Tanaka i col., 2000; Pruneda i col., 2005). Les principals alteracions observades a l'esperma ejaculada dels mascles estressats pel ritme d'ejaculacions són la disminució de la concentració espermàtica, l'augment de la freqüència d'espermatozoides amb gota proximal o distal, la disminució de la motilitat espermàtica i l'augment de la freqüència d'algunes malformacions espermàtiques. A més, Strzezek i col. (1995b) van observar que una elevada freqüència d'ejaculació provoca alteracions bioquímiques als espermatozoides, similars a l'apoptosi de les cèl·lules somàtiques.

En una sola ejaculació es buida un 60% dels espermatozoides emmagatzemats al cauda epididimari (Hughes i Varley, 1984; Strzezek i col., 1995a). Així doncs, un nombre d'extraccions superior a 2 per setmana i sense períodes d'abstinència sexual resulta en l'esgotament de les

reserves de l'epidídim i força el pas dels espermatozoides a través del conducte; aquestes alteracions es manifesten en un descens de la concentració espermàtica i un increment de la freqüència d'espermatozoides amb gota citoplasmàtica a l'ejaculat (Meding, 1975; Swierstra i Dyck, 1976; Cameron, 1985; Schilling i Vengust, 1987; Bonet i col., 1991; Strzezek i col., 1995a; Tanaka i col., 2000). Hughes i Varley (1984) aconsellen un nombre d'extraccions de semen de 4 a la setmana, mentre que Bonet i col. (1991) afirmen que l'interval òptim de recollida de semen és de 3-4 dies.

En un mascle reproductor sa la màxima freqüència de recollida de semen sense que es produeixin canvis en la qualitat espermàtica depèn, sobretot, de la seva producció diària d'espermatozoides i del temps de trànsit dels espermatozoides a través del conducte epididimari (Bonet i col., 1991). La producció espermàtica diària dels mascles porcins de raça Landrace és d'uns  $25,89 \times 10^9$  spz/dia/gr de testicle (Egbunike i col, 1975; Okwun, 1996). D'altra banda, a partir de tècniques autoradiogràfiques, Swierstra (1968) va determinar que l'esperma epididimària de porcí roman 3 dies al caput, 2 dies al corpus i de 4 a 9 dies al cauda per tal que la maduració es doni de forma correcta.

# **Material i Mètodes**

---



## 1. CARACTERÍSTIQUES DELS EXEMPLARS I OBTENCIÓ DE LES MOSTRES D'EPIDÍDIM

Per a l'estudi citològic i bioquímic del fluid epididimari es van utilitzar mascles reproductors porcins sans postpuberals i de la raça Piétrain, procedents d'un centre de Selecció i Multiplicació Porcina. Aquests mascles es van confinar en una nau climatitzada a  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  sota un estricte control sanitari i alimentats amb una dieta equilibrada i controlada. Des dels set mesos d'edat, tots els mascles es van sotmetre a un ritme d'extraccions de semen de dues vegades per setmana.

Els animals es van sacrificar a l'escorxador més proper a les instal·lacions de la Universitat de Girona. Immediatament després del sacrifici es va procedir a l'extracció dels testicles i els epidídims, que es van transportar a  $15^{\circ}\text{C}$  al laboratori de la UdG. Un cop al laboratori es van separar els epidídims i es van netejar abans de fer-ne la dissecció. En tots els mascles l'epidídim va ser dividit en sis regions: caput proximal i distal, corpus proximal i distal, i cauda proximal i distal, tal i com es mostra a la Figura 1.

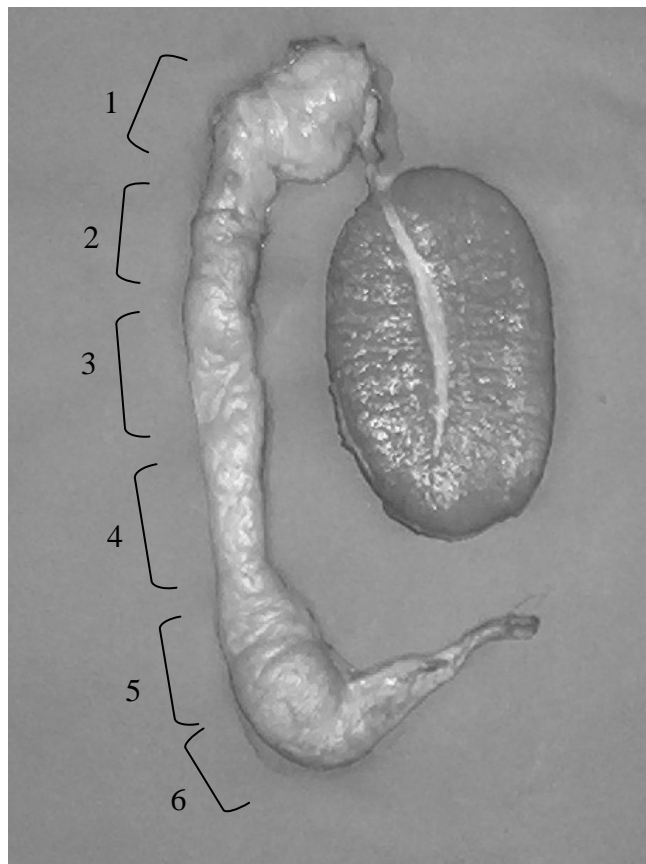


Figura 1. Aspecte macroscòpic de l'epidídim dels mascles reproductors porcins. 1: caput proximal, 2: caput distal, 3: corpus proximal, 4: corpus distal, 5: cauda proximal, 6: cauda distal.



## 2. ESTUDI DE L'EFECTE D'UNA ELEVADA FREQUÈNCIA D'EJACULACIONS SOBRE L'ESPERMA EPIDIDIMÀRIA I EJACULADA

Per a l'estudi dels efectes d'una elevada freqüència d'ejaculacions sobre la qualitat de l'esperma epididimària i del semen ejaculat es van utilitzar dos grups de 3 mascles cadascun. Quan els mascles tenien un any, es va modificar el ritme d'extraccions dels tres mascles d'un grup (mascles estressats), mentre que l'altre grup de mascles es va mantenir al mateix ritme d'ejaculacions (dos per setmana, mascles control); els mascles estressats es van sotmetre a un ritme de dues extraccions diàries de semen durant 4 dies consecutius. Passats aquests quatre dies es va procedir al sacrifici tan dels mascles estressats com dels mascles sans.

### 2.1. Obtenció i anàlisi de l'esperma ejaculada

Tres hores abans del sacrifici dels animals es va obtenir l'ejaculat dels mascles estressats i dels mascles control. Del total de semen ejaculat només es va recollir la fracció rica en espermatozoides que es va filtrar amb una gasa estèril (Buxadé, 1984) i se'n va mesurar el volum; la fracció rica de cada ejaculat es va diluir en BTS (Magapor, Zaragoza, Espanya) a la proporció 1:5, i posteriorment, es va transportar a 15°C des de la granja al laboratori de la Universitat de Girona (UdG).

L'anàlisi microscòpica de l'esperma ejaculada s'ha realitzat en un microscopi òptic Zeiss (Jenalumar) equipat amb un dispositiu de contrast de fases. Les imatges es van capturar amb una càmera digital Polaroid, model PDMC-2.

#### a) Anàlisi de la concentració espermàtica

L'anàlisi de la concentració espermàtica s'ha realitzat amb la cambra de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) (Ludwig i Frick, 1990) i amb una il·luminació de contrast de fases, a 125 X. Els resultats s'expressen en nombre d'espermatozoides  $\times 10^6/\text{ml}$ .

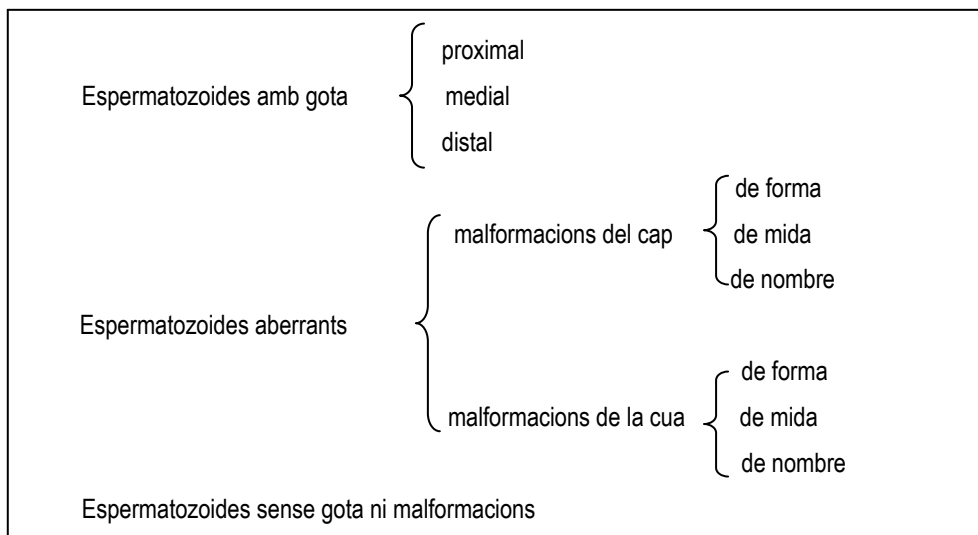
#### b) Anàlisi de la motilitat espermàtica

Per a l'anàlisi de la motilitat espermàtica 5 ml de la fracció diluïda es van mantenir a 37°C durant 15 minuts. La motilitat espermàtica s'ha avaluat al microscopi òptic a 125 X, utilitzant la cambra de Makler (Keel, 1990) i la il·luminació per contrast de fases. Per a cada mascle s'han fet 3 recomptes de 100 espermatozoides que han estat classificats com a immòbils o mòbils; els resultats s'expressen com a percentatge d'espermatozoides mòbils.

c) Anàlisi de la vitalitat i la morfologia espermàtiques

La vitalitat espermàtica es va determinar al microscopi òptic de camp clar a 500 X, mitjançant la tinció supravital d'eosina-nigrosina d'acord amb el protocol de WHO (1999) i de Kvist i Björndahl (2002). Per a cada mascle s'han realitzat 3 recomptes de 100 espermatozoides que han estat classificats com a vius o morts; els resultats s'expressen com a percentatge d'espermatozoides vius.

L'anàlisi de la morfologia espermàtica es va realitzar al microscopi òptic de camp clar a 500 X a partir d'extensions tenyides amb el mètode Panòptic ràpid de QCA (Química Clínica Aplicada S.A., Tarragona, Espanya), d'acord amb el protocol descrit per Bonet i col. (1995, 2000), WHO (1999) i Kvist i Björndahl (2002). Per a cada mascle s'ha fet el recompte de 1.000 espermatozoides que s'han classificat de la forma següent (Sancho i col., 2004):



La morfologia espermàtica s'expressa com el % dels diferents tipus d'espermatozoides.

## 2.2. Obtenció i anàlisi de l'esperma epididimària

De cada una de les 6 regions epididimàries es van obtenir diversos fragments que es van submergir en solucions diferents en funció de l'anàlisi a realitzar:

- fragments de 4-5 mm de costat que es van submergir en medi RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen S.A., Barcelona, Espanya) complementat amb un 10% de sèrum fetal (Foetal Calf Serum Gold) (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) i que es van mantenir 15 min a 37°C per analitzar la motilitat espermàtica, seguint el mateix procediment que per a l'esperma ejaculada.

- fragments de 4-5 mm de costat que es van submergir en medi RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen S.A., Barcelona, Espanya) complementat amb un 10% de sèrum fetal (Foetal Calf Serum Gold) (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) per avaluar la vitalitat i la morfologia espermàtiques, tal i com s'ha explicat per a l'esperma ejaculada.
- fragments d'aproximadament 30 mg que es van submergir en 1 ml de PBS (Gibco, Invitrogen S.A., Barcelona, Espanya) i que van ser utilitzats per a l'avaluació de la concentració espermàtica i del percentatge de fluid reabsorbit tal i com es detalla a continuació.

a) Anàlisi del percentatge de variació de la concentració espermàtica i de fluid reabsorbit al conducte epididimari

Per tal de determinar el percentatge de variació de la concentració espermàtica i de fluid reabsorbit a les diferents regions del conducte epididimari es van processar aquests fragments de 30 mg disposats en plaques de Petri amb 1 ml de PBS i es va procedir seguint el protocol de Goyal i Williams (1991):

1. Seccionament de les mostres en fragments d'1 mm i agitació suau de les plaques durant 1 h.
2. Transferència del sobrenedant a un tub i posterior rentat dels fragments amb 1 ml de PBS net, que també és transferit al tub.
3. Centrifugació dels 2 ml de sobrenedant a 1.000 g durant 10 min i resuspensió dels espermatozoides sedimentats amb 2 ml de PBS net.
4. Determinació de la concentració espermàtica per triplicat per a cada mascle en cadascuna de les regions epididimàries utilitzant la cambra de Makler (vegeu Apartat 2.1).

Els valors de concentració obtinguts van ser corregits per les diferències en el volum luminal entre regions i després utilitzats per determinar el percentatge de variació de la concentració espermàtica i el percentatge de fluid reabsorbit entre regions, tal i com s'explica a continuació (Goyal i Williams, 1991):

1) 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

2) 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

### 2.3. Anàlisi estadística de les dades

Per a cada grup de mascles i per a cada paràmetre espermàtic els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  SD ( $n=3$ ). L'anàlisi estadística de les dades es va realitzar amb el programa SPSS per a Windows versió 12.0. L'anàlisi comparativa de la concentració espermàtica, el volum i el nombre total d'espermatozoides a l'ejaculat entre els mascles control i els mascles estressats es va fer utilitzant el test *t* d'Student, amb un nivell de significació de  $P<0,05$ .

Per a l'esperma epididimària, les dades percentuals es van transformar amb l'arcsinus de l'arrel quadrada del percentatge/100; per al percentatge de variació de la concentració espermàtica, prèviament els valors es van transformar amb el  $\lg_{10}$  conc + 200. Tots els paràmetres de l'esperma epididimària es van analitzar amb el test de l'ANOVA de dos factors, considerant el tractament i la regió epididimària més ejaculat, amb un nivell de significació de  $P<0,05$ .

## 3. ANÀLISI DE LA CONCENTRACIÓ DE CARNITINA, GLUTAMAT I INOSITOL AL FLUID I ALS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIS

### 3.1. Obtenció de les mostres de fluid i espermatozoides epididimaris

Per a aquest estudi es van utilitzar sis mascles Pietrain de deu mesos d'edat. En cadascun d'ells es van canular sis regions epididimàries (caput proximal i distal, corpus proximal i distal, i cauda proximal i distal) utilitzant una cànula de clorur de polivinil amb un extrem allargat i prim; la solució de perfusió utilitzada va ser Tris-HCl 10 mM a pH 7 (Merck, Darmstadt, Alemanya), ajustada a 350 mmol/kg amb NaCl (Panreac Química, Barcelona, Espanya) i amb Blau Tripà (0,1% pes/volum) (Merck, Darmstadt, Alemanya) per tal de visualitzar el perfusat. Així doncs, per

obtenir el fluid luminal sense diluir, primer de tot s'introdueix a una regió del conducte luminal una mica d'aire i tot seguit s'injecta la solució de perfusió de color blau. Els continguts luminals sense diluir es recullen fent un tall al túbul en una zona més distal de la mateixa regió i s'aspiren amb una pipeta Pasteur. Aquests continguts luminals es van dividir en 2 tubs eppendorfs i es va procedir de la següent manera:

- d'un dels tubs es va agafar 1  $\mu$ l que es va diluir en 1 ml de medi RPMI (Gibco, Invitrogen S.A., Barcelona, Espanya) complementat amb 10% (pes/volum) de sèrum fetal boví (PAA Laboratories, LabClinics, Barcelona, Espanya) per dur a terme l'anàlisi de la concentració espermàtica tal i com s'ha explicat a l'Apartat 2.1. El contingut restant es va centrifugar a 13.000 *g* durant 30 minuts a 4°C, i el sobrenedant es va tornar a centrifugar a 13.000 *g* durant 5 minuts abans de guardar el fluid lliure d'espermatozoides a -20°C.
- el contingut de l'altre tub es va rentar dues vegades amb 10 mM Tris-HCl pH 7,0 ajustat a 350 mmol/kg amb NaCl, a fi de simular l'osmolaritat del fluid epididimari de porc (345 mmol/kg: Einarsson i Gustafsson, 1973; Jones, 1978) i minimitzar així els canvis osmòtics dels espermatozoides, que podrien provocar una pèrdua d'osmolits. Els espermatozoides es van centrifugar a 600 *g* durant 10 minuts a 4°C, i a continuació es va calcular la concentració espermàtica amb la cambra de Makler (vegeu Apartat 2.1) abans de guardar els espermatozoides obtinguts a -20°C.

### 3.2. Extracció d'osmolits dels espermatozoides epididimaris

Per a l'extracció d'osmolits, els espermatozoides descongelats es van resuspendre amb Tris-HCl hiposmòtic de pH 7,0 a una concentració final de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/ml; la mostra es va barrejar amb el vòrtex i posteriorment s'hi van aplicar 3 polsos d'ultrasons de 3 segons amb el sonicador (25 Watts; punta d'1,5 mm; Vibra-Cell-Sonicator, Sonics & Materials Inc. Danbury, Conn, USA), tot mantenint la mostra en gel. Després de centrifugar a 20.000 *g* durant 10 minuts a 4°C, els extractes d'espermatozoides es van congelar a -20°C fins al moment de l'assaig.

### 3.3. Anàlisi de la concentració espermàtica del fluid luminal

Per a cada regió epididimària es va determinar la concentració espermàtica a partir de fluid epididimari diluït en medi RPMI (vegeu Apartat 3.1). La concentració espermàtica es va avaluar amb la cambra de Makler i la il·luminació de contrast de fases.

### 3.4. Anàlisi de la concentració de proteïna, carnitina, glutamat i inositol

#### a) Anàlisi de la concentració de proteïna

L'anàlisi de la concentració de proteïna es va realitzar amb l'assaig de *DC Protein Assay* (BioRad, Munich, Alemanya), el qual es basa en el mètode de Lowry. Aquest assaig consta de dues reaccions que donen lloc a un producte colorimètric: primer de tot, la reacció entre la proteïna i el coure en un medi alcalí, i la subseqüent reducció del reactiu de Folin amb la proteïna tractada amb coure. El producte colorimètric es llegeix amb un espectrofotòmetre (SpectraMax 250, Molecular Devices GmbH, Munich, Alemanya).

#### b) Anàlisi de la concentració d'osmolits orgànics

Totes les anàlisis dels osmolits orgànics es van realitzar amb assajos fluorimètrics modificats per plaques de 96 pouets i es van llegir amb un espectrofluorímetre (SpectraMax GeminiXS Molecular Devices GmbH, Munich, Alemanya). Per a tots els assajos les mostres es van diluir amb el solvent de l'assaig per tal que, al llegir-ho a l'espectrofluorímetre, el valor obtingut es trobés dins la recta patró.

La sensibilitat dels assajos es va calcular a partir de la mitjana + 2 SD de diferents anàlisis de mostres sense l'analit, és a dir, sense l'osmolit orgànic; d'altra banda, la variabilitat interassajos (coeficient de variació) es va determinar a partir de diferents mesures dels estàndards.

#### 1. Carnitina

L'anàlisi de la concentració de carnitina es va fer seguint el mètode modificat pel Dr. TG Cooper a partir del protocol descrit per Maehara i col. (1988). En aquest mètode, l'L-carnitina és convertida a acetilcarnitina per la carnitina acetiltransferasa (CAT), alhora que l'acetil coenzim A (AcCoA) és convertit a coenzim A (CoA). El coenzim A reacciona amb el N-(4-(2-benzimidazolil)-fenil)-maleimida (BIPM) per donar lloc a un producte fluorescent (CoA-BIPM) que pot ser quantificat amb excitació a 315 nm i emissió a 370 nm.

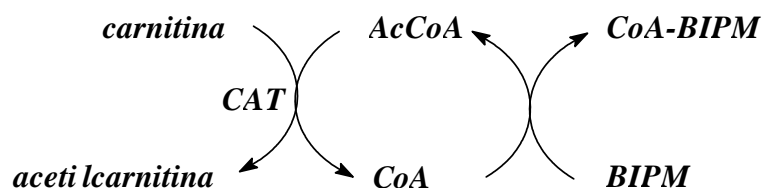


Figura 2. Seqüència de reaccions de l'assaig de la concentració de carnitina.

Per dur a terme aquesta anàlisi els passos a seguir són:

- es pipetegen 50 µl de blancs (aigua), d'estàndards (0-50 µM de carnitina en aigua) o de mostra (fluid o extracte d'espermatozoides epididimaris diluïts en aigua) a cada pouet,
- s'afegeixen 50 µl de la Barreja per a la Reacció a cada pouet. Per a 100 assajos, la Barreja per a la Reacció consta de: 2.180 µl d'aigua destil·lada, 2.500 µl de tampó fosfat 0,4 M pH 6,85, 200 µl d'EDTA 50 mM, 120 µl d'AcCoA 15 mM i 42 µl de CAT 500 U/ml,
- s'incuba 15 minuts a temperatura ambient i en agitació,
- s'afegeixen 100 µl de 0,1 mM BIPM,
- s'incuba 15 minuts més a temperatura ambient, en fosc i agitació, i
- es llegeix la reacció amb l'espectrofluorímetre.

Tots els reactius utilitzats en aquest assaig eren de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya). La sensibilitat de l'assaig és de 2,64 µM i la variació interassajos del 6,43% (recuperació del 103% de l'estàndard de 25 µM).

## 2. Glutamat

L-glutamat és convertit a α-oxoglutarat, NH<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per la glutamat oxidasa (Glut Ox). El glutamat és regenerat per l'acció de l'L-alanina- i l'L-glutamat-piruvat transaminasa (APT i GPT, respectivament) que incrementen la producció d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aquest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presència de la Horse Radish Peroxidasa (HRP) converteix l'Amplex Red a resorufin que podrà ser quantificada per excitació a 560 nm i emissió a 587 nm.

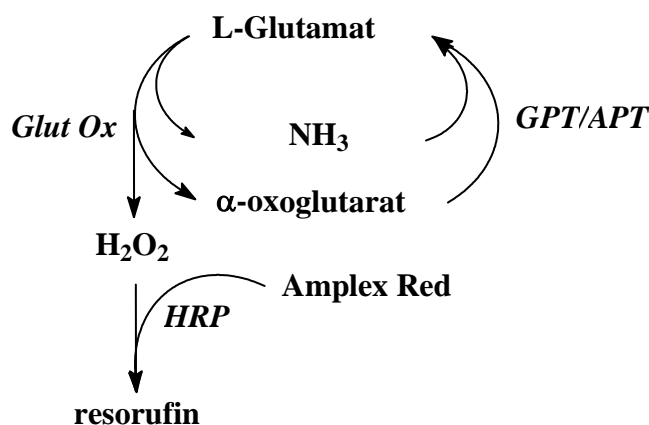


Figura 3. Seqüència de reaccions de l'assaig de la concentració de glutamat.

El protocol seguit fou:

- es pipetegen 50  $\mu$ l de blancs (tampó), d'estàndards (0-2.000 nM de glutamat en tampó) o de mostra (fluid o extracte d'espermatozoides epididimaris diluïts en tampó) a cada pouet,
- s'afegeixen 50  $\mu$ l de la Barreja per a la Reacció a cada pouet. Per a 100 assajos, la Barreja per a la Reacció consta de: 50  $\mu$ l d'Amplex Red 10 mM, 12,5  $\mu$ l de HRP 100 U/ml, 80  $\mu$ l de Glut Ox 5 U/ml, 25  $\mu$ l de GPT 100 U/ml, 5  $\mu$ l d'Alanina 200 mM i 4,83 ml de tampó,
- s'incuba 30 minuts a 37°C, en foscor i agitació, i
- es llegeix la reacció amb l'espectrofluorímetre.

Per a l'assaig del glutamat es va utilitzar l'*Amplex® Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit* (Molecular Probes, Leiden, Holanda). La sensibilitat de l'assaig és de 0,08  $\mu$ M i la variació interassajos del 6,74% (recuperació del 91% de l'estàndard de 0,5  $\mu$ M).

### 3. Inositol

Per a l'anàlisi de la concentració d'inositol es va utilitzar el mètode modificat pel Dr. T.G. Cooper a partir del protocol descrit per O'Neill i col. (1998). En aquest mètode, el *myo*-inositol és convertit a *scyllo*-inososa per la inositol deshidrogenasa (IDH), mentre que el nicotina adenina dinucleòtid ( $\text{NAD}^+$ ) és reduït ( $\text{NADH}$ ). La  $\text{NADH}$  oxidasa ( $\text{NADH Ox}$ ), juntament amb el flavin adenin nucleòtid ( $\text{FAD}^+$ ), oxida el  $\text{NADH}$  i converteix l'oxigen a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalment, l'Amplex Red en presència de l'HRP reacciona amb l' $\text{H}_2\text{O}_2$  per produir resorufin, que serà quantificada amb excitació a 530 nm i emissió a 590 nm.

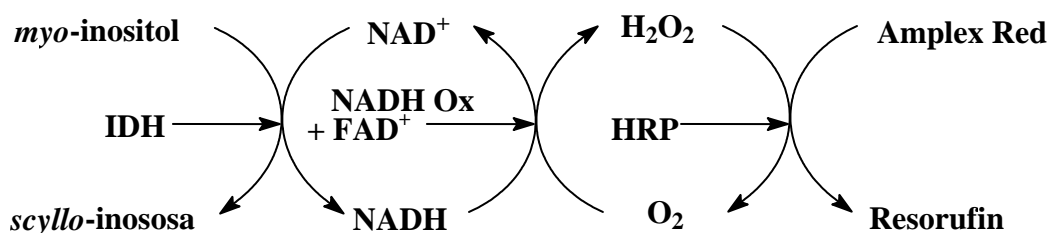


Figura 4. Seqüència de reaccions de l'assaig de la concentració de *myo*-inositol.

El procediment és:

- es pipetegen 50  $\mu$ l de blancs (tampó potàssic fosfat 10 mM pH 6,8), d'estàndards (0-400  $\mu$ M d'inositol en el mateix tampó) o de mostra (fluid o extracte d'espermatozoides epididimaris diluïts en el tampó) a cada pouet,



- s'afegeixen 140 µl de la Barreja per a la Reacció a cada pouet. Per a 100 assajos, la Barreja per a la Reacció consta de: 500 µl de NAD<sup>+</sup> 0,1 M, 500 µl d'IDH 5 U/ml, 6.000 µl de tampó potàssic fosfat 30 mM pH 7,5 amb 0,1 % BSA (pes/volum), 3.000 µl de FAD<sup>+</sup> 1 mM, 1.000 µl de NADH Ox 0,2 U/ml, 1.500 µl d'Amplex Red 100 µM i 1.500 µl de HRP 0,2 U/ml,
- s'incuba 30 minuts a 30°C, en fosc i agitació, i
- es llegeix la reacció amb l'espectrofluorímetre.

Tots els reactius utilitzats per a aquesta anàlisi eren de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya), excepte l'Amplex Red i l'HRP que procedien de l'*Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit* (Molecular Probes, Leiden, Holanda). La sensibilitat de l'assaig és de 5,97 µM i la variació interassajos del 5,05% (recuperació del 103% de l'estàndard de 100 µM).

### 3.5. Anàlisi estadística de les dades

Els resultats obtinguts de l'anàlisi de la concentració de proteïna i d'osmolits orgànics s'expressen com la mitjana ± SEM ( $n=6$ ). L'anàlisi estadística de les dades es va dur a terme amb el programa SigmaStat (versió 3.1; SPSS Inc, Erkrath, Alemanya). Les diferències entre regions epididimàries es van analitzar amb el test de l'ANOVA d'un factor; les dades que no complien la normalitat o la homoscedasticitat es van analitzar amb una ANOVA d'un factor en rangs. Per fer les comparacions *post-hoc* es va utilitzar el mètode de Holm-Sidak, i les diferències es van considerar estadísticament significatives quan  $P<0,05$ .

## 4. ANÀLISI DE LA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA, SORBITOL I FRUCTOSA I DE LA PRESENCIA D'ALDOSA REDUCTASA I SORBITOL DESHIDROGENASA AL CONDUCTE EPIDIDIMARI

### 4.1. Obtenció de les mostres del fluid i espermatozoides epididimaris

En aquest estudi es van utilitzar mostres de fluid obtingudes de les 6 regions epididimàries de 6 mascles Piétrain que es van obtenir per canulació (vegeu Apartat 3.1). Els continguts luminals sense diluir es van centrifugar a 13.000 *g* durant 30 minuts a 4°C, i el sobrenedant es va tornar a centrifugar a 13.000 *g* durant 5 minuts; el fluid lliure d'espermatozoides es va guardar a -20°C fins al moment de l'anàlisi.

#### 4.2. Anàlisi de la concentració de glucosa, sorbitol i fructosa

Les anàlisis de la concentració d'aquests sucres es van realitzar mitjançant assajos fluorimètrics modificats per a plaques de 96 pouets que es van llegir amb un espectrofluorímetre (SpectraMax GeminiXS Molecular Devices GmbH, Munich, Alemanya). Per a tots els assajos les mostres es van diluir amb el tampó de l'assaig per tal que, al llegir-ho a l'espectrofluorímetre, el valor obtingut caigués dins la recta patró.

La sensibilitat dels assajos es va calcular a partir de la mitjana + 2 SD de diferents anàlisis de mostres sense l'analit; d'altra banda, les variabilitats intra i interassajos (coeficients de variació) es van determinar a partir de diferents mesures dels estàndards.

Com que la concentració d'aquests sucres al conducte epididimari és baixa, va ser necessari treballar amb mostres molt poc diluïdes. A fi de minimitzar els errors de mesura es va realitzar un control negatiu per a cada mostra, que consistia en repetir el mateix assaig per a cada reacció però sense l'enzim específic, és a dir, sense la glucosa oxidasa per a l'assaig de glucosa, sense la sorbitol deshidrogenasa per a l'assaig de sorbitol, i sense la fosfogliceroisomerasa per a l'assaig de fructosa; si s'observava alguna absorbància en el control negatiu, aquesta es restava al valor obtingut de l'anàlisi de la mostra en presència de l'enzim.

##### 1. Glucosa

La glucosa és convertida a gluconolactona i  $H_2O_2$  per la glucosa oxidasa (GO). L' $H_2O_2$  en presència de l'HRP converteix l'Amplex Red a resorufin que pot ser quantificada per excitació a 560 nm i emissió a 587 nm.

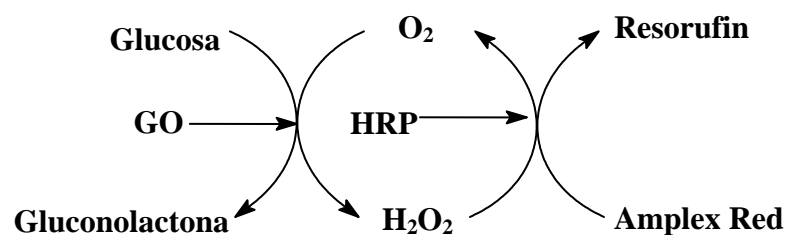


Figura 5. Seqüència de reaccions de l'assaig de la concentració de glucosa.

El protocol és:

- es pipetegen 50  $\mu$ l de blancs (tampó), d'estàndards (0-200  $\mu$ M de glucosa en tampó) o de mostra (fluid epididimari diluït en tampó) a cada pouet,

- s'afegeixen 50 µl de la Barreja per a la Reacció a cada pouet. Per a 100 assajos, la Barreja per a la Reacció consta de: 50 µl d'Amplex Red 10 mM, 100 µl de HRP 10 U/ml, 100 µl de GO 100 U/ml i 4,75 ml de tampó,
- s'incuba 30 minuts a 30°C, en foscor i agitació, i
- es llegeix la reacció amb l'espectrofluorímetre.

Per dur a terme aquest assaig es va utilitzar l'Amplex® Red Glucose Acid/Glucose Oxidase Assay Kit (Molecular Probes, Leiden, Holanda). La sensibilitat de l'assaig és de 0,73 µM, la variació intraassajos del 3,34% (recuperació del 97% de l'estàndard de 25 µM) i la variació interassajos del 2,23% (recuperació del 101% de l'estàndard de 25 µM).

## 2. Sorbitol

L'assaig per a l'anàlisi de la concentració de sorbitol es va desenvolupar a partir del mètode utilitzat en l'anàlisi de la concentració d'inositol; en aquest cas, el sorbitol és convertit a sorbosa per la sorbitol deshidrogenasa (SDH) i la presència de sorbitol es podrà quantificar a partir de la resorufin produïda amb excitació a 530 nm i emissió a 590 nm.

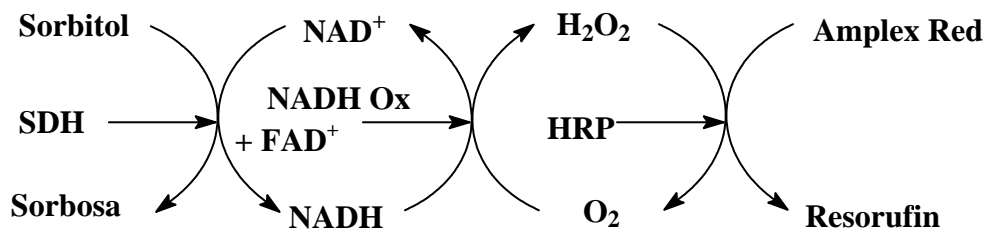


Figura 6. Seqüència de reaccions de l'assaig de la concentració de sorbitol.

El protocol és:

- es pipetegen 50 µl de blancs (tampó potàssic fosfat 30 mM pH 7,5), d'estàndards (0- 400 µM de sorbitol en el mateix tampó) o de mostra (fluid epididimari diluït en el tampó) a cada pouet,
- s'afegeixen 140 µl de la Barreja per a la Reacció a cada pouet. Per a 100 assajos, la Barreja per a la Reacció consta de: 500 µl de NAD<sup>+</sup> 0,1 M, 500 µl de SDH 5 U/ml, 6.000 µl de tampó potàssic fosfat 30 mM pH 7,5 amb 0,1 % BSA (pes/volum), 3.000 µl de FAD<sup>+</sup> 1 mM, 1.000 µl de NADH Ox 0,2 U/ml, 1.500 µl d'Amplex Red 100 µM i 1.500 µl d'HRP 0,2 U/ml,
- s'incuba 30 minuts a 30°C, en foscor i agitació, i
- es llegeix la reacció amb l'espectrofluorímetre.

En aquest assaig tots els reactius utilitzats eren també de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya) menys l'Amplex Red i l'HRP que procedien de l'Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular Probes, Leiden, Holanda). La sensibilitat de l'assaig és de 4,2  $\mu\text{M}$ , la variació intraassajos del 2,95% (recuperació del 99% de l'estàndard de 100  $\mu\text{M}$ ) i la variació interassajos del 6,44% (recuperació del 105% de l'estàndard de 100  $\mu\text{M}$ ).

### 3. Fructosa

L'anàlisi de la concentració de fructosa es va desenvolupar a partir del kit comercial *Fructose Assay Kit* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya), la sensibilitat del qual, en principi, no permetria detectar els baixos nivells de fructosa que se suposa conté el fluid epididimari. Així doncs, per tal d'augmentar la sensibilitat del mètode, el NADH produït amb el kit comercial es va amplificar amb NADH Ox i  $\text{FAD}^+$ , seguint el mateix procediment que en l'anàlisi de la concentració d'inositol i de sorbitol. Per tant, en aquest assaig la fructosa és convertida a fructosa 6-fosfat per l'hexoquinasa (HK) amb consum d'ATP. D'altra banda, la fructosa 6-fosfat és convertida a glucosa 6-fosfat per la fosfoglucosa isomerasa (PGI), i aquesta glucosa 6-fosfat és oxidada a 6-fosfogluconat per la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH) mentre que el  $\text{NAD}^+$  és reduït a NADH. La NADH Ox, juntament amb el  $\text{FAD}^+$ , oxida el NADH i transforma l'oxigen a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalment, l'Amplex Red en presència de l'HRP utilitza l' $\text{H}_2\text{O}_2$  per produir resorufin, que serà quantificada amb excitació a 530 nm i emissió a 590 nm.

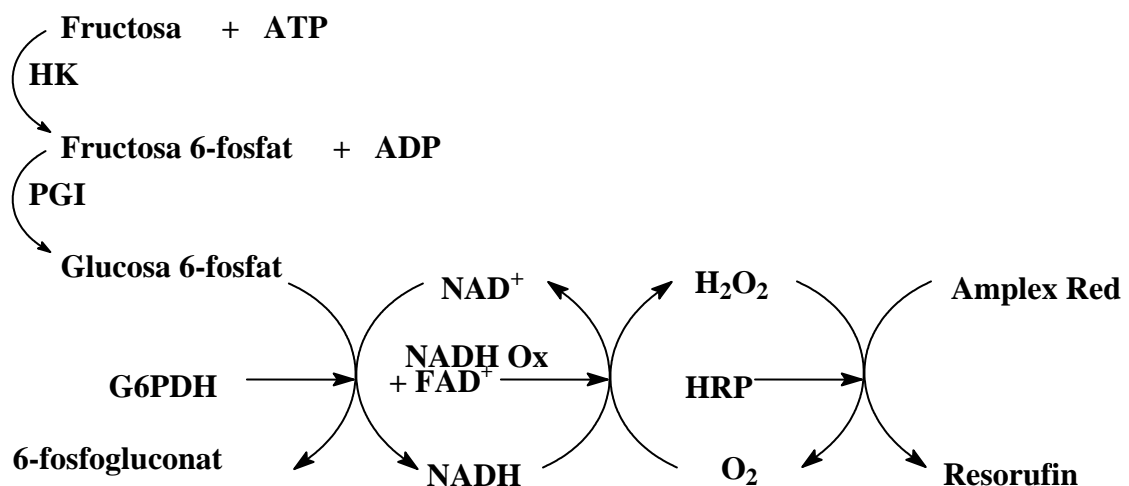


Figura 7. Seqüència de reaccions de l'assaig de la concentració de fructosa.

Per a aquesta anàlisi, el procediment que es va seguir es descriu a continuació:

- es pipetegen 50 µl de blancs (tampó potàssic fosfat 10 mM pH 6,8), d'estàndards (0- 400 µM de fructosa en el mateix tampó) o mostra (fluid epididimari diluït en el tampó) a cada pouet,
- s'afegeixen 140 µl de la Barreja per a la Reacció a cada pouet. Per a 100 assajos, la Barreja per a la Reacció consta de: 500 µl de NAD<sup>+</sup> 0,1 M; 500 µl d'una solució que conté 5 U/ml HK, 5 U/ml G6PDH, 5 mM ATP i 7,5 mM NAD<sup>+</sup>; 25 µl de PGI 600 U/ml; 6.000 µl de tampó potàssic fosfat 30 mM pH 7,5 amb 0,1 % BSA (pes/volum); 3.000 µl de FAD<sup>+</sup> 1 mM; 1.000 µl de NADH Ox 0,2 U/ml; 1.500 µl d'Amplex Red 100 µM i 1.500 µl de HRP 0,2 U/ml,
- s'incuba 30 minuts a 30°C, en foscor i agitació, i
- es llegeix la reacció amb l'espectrofluorímetre.

En aquest cas, la HK, la PGI, la G6PDH, l'ATP i la fructosa procedien del *Fructose Assay Kit* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya). La resta de reactius també eren de Sigma-Aldrich, a excepció de l'Amplex Red i l'HRP que procedien de l'*Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit* (Molecular Probes, Leiden, Holanda). La sensibilitat de l'assaig és d'1,90 µM, la variació intraassajos del 9,54% (recuperació del 96% de l'estàndard de 50 µM) i la variació interassajos del 7,58% (recuperació del 103% de l'estàndard de 50 µM). Com que la HK no és específica per a la fructosa, en aquest assaig, es llegeixen tant la fructosa com la glucosa, així doncs, la glucosa determinada amb el control negatiu (sense PGI) es restava del valor obtingut en presència de PGI.

#### 4.3. Detecció immunohistoquímica dels enzims Aldosa Reductasa (AR) i Sorbitol Deshidrogenasa (SDH) a l'epiteli epididimari

L'estudi immunohistoquímic es va realitzar sobre seccions histològiques obtingudes de les 6 regions epididimàries procedents de 3 mascles Piétrain. El processament dels fragments de teixit epididimari es detalla a continuació:

1. Fixació: 1 hora a 4° C amb paraformaldehid 4% en tampó fosfat 0,1 M i pH 7,4.
2. Deshidratació de les mostres en sèrie etanòlica creixent: 3 canvis de 30 minuts en alcohol 70%, 2 canvis de 30 minuts en alcohol 90%, 3 canvis de 20 minuts en alcohol absolut.
3. Imbibició de les mostres en xilol: 3 canvis de 20 minuts.
4. Inclusió de les mostres en parafina de 56-58 pF a 58°C: 2 canvis d'1 hora.
5. Realització dels blocs.

6. Piramidat dels blocs i posterior microtomia per a l'obtenció de talls de 5 µm de gruix amb un micròtom de rotació Medin; els talls es recullen en portes sialinitzats (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya).

Per a l'estudi immunohistoquímic es van utilitzar anticossos anti-AR i anti-SDH produïts en conill i cedits gentilmente pel Dr. E. Madore (Canadà) i el Dr. S. K. Chung (Hong Kong), respectivament. Com a control negatiu es va utilitzar sèrum control de conill, cedit pel Grup de Biologia Cel·lular de la UdG. L'anticòs secundari biotinitat anti-conill (produït en boc), el sèrum normal de boc i el conjugat avidina-peroxidasa procedien del kit *Vectastain Elite ABC* (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Es va seguir el següent protocol:

1. Desparafinat i rehidratació de les seccions: 3 canvis de 5 minuts de xilol, 2 canvis de 5 minuts d'alcohol absolut, 2 canvis de 5 minuts d'alcohol 95%, 1 canvi de 5 minuts d'alcohol 70%, 2 canvis de 5 minuts d'aigua destil·lada.
2. Bloqueig de la peroxidasa endògena: peròxid d'hidrogen 3% en metanol durant 10 minuts.
3. Rentat amb aigua destil·lada: 3 canvis de 5 minuts.
4. Desemmascament dels antigens: es col·loquen els portes en un vas de precipitats de Pyrex, es cobreixen amb 10 mM citrat sòdic (pH 6,0), es posen al microones i es deixa que la solució bulli durant 2 minuts.
5. Rentat amb PBS: 3 canvis de 5 minuts.
6. Bloqueig antigènic per tal d'evitar la unió inespecífica dels anticossos: 5% de sèrum normal de boc en PBS, durant 1 hora a temperatura ambient i en cambra humida. Decantat.
7. Incubació amb l'anticòs primari diluït en PBS (1:1000 per l'AR i 1:750 per la SDH) amb un 2% de sèrum normal de boc durant 2 hores a temperatura ambient i en cambra humida. Per al control negatiu s'incuba amb el sèrum control de conill.
8. Rentat amb PBS: 3 canvis de 5 minuts.
9. Incubació amb l'anticòs secundari biotinitat diluït en PBS (1:200) amb un 2% de sèrum normal de boc durant una hora a temperatura ambient i en cambra humida.
10. Rentat amb PBS: 3 canvis de 5 minuts.
11. Incubació amb el conjugat avidina-peroxidasa durant 45 minuts a temperatura ambient.
12. Rentat amb PBS: 3 canvis de 5 minuts.

13. Revelat de les seccions amb diaminobenzidina estable (Invitrogen S.A., Barcelona, Espanya) durant 3 minuts.
14. Rentat amb aigua destil·lada: 1 canvi de 5 minuts.
15. Contrastat amb hematoxilina de Delafield durant 2 minuts.
16. Rentat amb aigua carbonatada: 1 canvi de 5 minuts.
17. Rentat amb aigua destil·lada: 1 canvi de 2 minuts.
18. Muntatge amb Aquatex (Merck, Darmstadt, Alemanya).

Per a cada mascle es van processar tres seccions de cada regió; les seccions de les sis regions epididimàries de cada mascle es van processar en paral·lel. Com que el marcatge obtingut va ser similar entre mascles, es van capturar imatges representatives amb una càmera digital AxioCam HRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) adaptada a un microscopi òptic de camp clar Imager.Z1 AX10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### 4.4. Anàlisi estadística de les dades

Els resultats obtinguts de l'anàlisi de la concentració de glucosa, sorbitol i fructosa s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). L'anàlisi estadística de les dades es va dur a terme amb el programa SigmaStat (versió 3.1; SPSS Inc, Erkrath, Alemanya). Les diferències entre regions epididimàries es van analitzar amb el test de l'ANOVA d'un factor; les dades que no complien la normalitat o la homoscedasticitat es van analitzar amb una ANOVA d'un factor en rangs. Per fer les comparacions *post-hoc* es va utilitzar el mètode de Holm-Sidak, i les diferències es van considerar estadísticament significatives quan  $P < 0,05$ .

# Resultats

---





# Article 1



ELSEVIER

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

SCIENCE @ DIRECT®

---

---

Theriogenology

---

---

Theriogenology 63 (2005) 2219–2232

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

## Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars

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

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

Received 24 May 2004; received in revised form 24 September 2004; accepted 7 October 2004

---

### Abstract

This study examines the effect of semen-collection rhythm on the sperm maturation process in boar epididymis. Three post-pubertal boars were submitted to a high semen-collection frequency (stressed boars) during 4 days, and three males were kept as a control group (control boars). Semen samples coming from six epididymal regions and from the ejaculate of each male were evaluated for sperm concentration, sperm vitality, sperm motility and sperm morphology. In each epididymal region, either fluid resorption or fluid secretion was determined from the variation in sperm concentration. The pattern of fluid resorption–secretion along the epididymal duct differed significantly between the stressed and control boars. A high semen-collection frequency also affected the development of sperm motility and the sperm cytoplasmic droplet displacement along the epididymal duct. The incidence of some sperm abnormalities was also found to be higher in some epididymal regions and ejaculates of 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.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Boar; Epididymis; Collection frequency; Sperm motility; Sperm viability

---

\* Corresponding author. Tel.: +34 972 41 83 66; fax: +34 972 41 81 50.  
E-mail address: [anna.pruneda@udg.es](mailto:anna.pruneda@udg.es) (A. Pruneda).

## **Article 2**



ELSEVIER

Animal Reproduction Science xxx (2006) xxx–xxx

---

---

**ANIMAL  
REPRODUCTION  
SCIENCE**

---

---

www.elsevier.com/locate/anireprosci

## Concentrations of carnitine, glutamate and *myo*-inositol in epididymal fluid and spermatozoa from boars

Anna Pruneda<sup>a,\*</sup>, Ching-Hei Yeung<sup>b</sup>, Sergi Bonet<sup>a</sup>,  
Elisabet Pinart<sup>a</sup>, Trevor G. Cooper<sup>b</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> *Institute of Reproductive Medicine of the University, Domagkstrasse 11,  
D-48129 Münster, Germany*

Received 16 November 2005; received in revised form 11 January 2006; accepted 19 January 2006

---

### Abstract

This study examines the concentrations of carnitine, glutamate and *myo*-inositol in fluid and spermatozoa from six epididymal regions. Samples were taken from six post-pubertal boars, and the sperm concentration, the protein concentration in epididymal fluid and the concentrations of carnitine, *myo*-inositol and glutamate in the epididymal fluid and spermatozoa were analysed. In epididymal fluid the concentration of *myo*-inositol decreased in a proximo-distal direction, whereas intraluminal concentrations of L-carnitine and L-glutamate increased distally. As changes in the concentration of these solutes did not parallel changes in sperm concentration, this may reflect secretion or absorption of these solutes. The sperm content of inositol fell as they moved from the distal caput whereas glutamate content increased from the distal caput to more distal regions and carnitine content remained unchanged during epididymal transit. This is the first attempt to elucidate the changes in the content of glutamate and inositol in epididymal spermatozoa of mammals and in the fluid from different epididymal regions of boars.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Boar; Epididymis; Carnitine; Glutamate; *myo*-Inositol

---

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

E-mail address: anna.pruneda@udg.es (A. Pruneda).

## **Article 3**

# Study of the Polyol Pathway in the Porcine Epididymis

ANNA PRUNEDA,<sup>1\*</sup> ELISABET PINART,<sup>1</sup> SERGI BONET,<sup>1</sup> CHING-HEI YEUNG,<sup>2</sup> AND TREVOR G. COOPER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Biotechnology of Porcine Reproduction, Department of Biology-INTEA, Faculty of Sciences, University of Girona, Girona, Spain*

<sup>2</sup>*Institute of Reproductive Medicine of the University, Domagkstrasse 11, Münster, Germany*

**ABSTRACT** Concentrations of D-glucose, D-fructose and D-sorbitol were quantified in porcine epididymal fluid by spectrofluorimetric assays and aldose reductase (AR) and sorbitol dehydrogenase (SDH) were located immunohistochemically in the epididymal epithelium. Glucose and fructose concentrations were low (<1 mM) and decreased in the cauda whereas sorbitol concentration (4–7 mM) was rather uniform along the duct. AR was lumenally located on microvilli in the caput and corpus with less presence distally and was present in the lumen. SDH was present apically and basally in epithelial cells throughout the epididymis and in the lumen. The observations are consistent with diffusion of circulating glucose into the lumen, its conversion via AR to sorbitol which accumulates in the lumen and the action of SDH on sorbitol to produce fructose. Sperm metabolism of glucose and fructose may explain their lower concentrations in the cauda and sorbitol could be a metabolic substrate or osmolyte required for volume regulation. *Mol. Reprod. Dev.*

© 2006 Wiley-Liss, Inc.

**Key Words:** boar; epididymal fluid; sorbitol; glucose; fructose

## INTRODUCTION

Epididymal transit is an obligatory event for mammalian spermatozoa to acquire their fertilising ability. In the boar this occurs in the corpus epididymidis (Holtz and Smidt, 1976; Hunter et al., 1976) and over a period of about 12 days (Orgebin-Crist and Olson, 1984). Mechanisms controlling sperm metabolism established during the transit through the excurrent duct include acidification of epididymal fluid by H<sup>+</sup>ATPase (Breton et al., 1996) and viscous proteins with sperm immobilisation properties (Usselman and Cone, 1983). Recently, a polyol pathway has been also proposed to be involved in this energy conservation (Frenette et al., 2004).

It is well known that fructose and glucose can be energy sources for spermatozoa from a wide range of species, including the boar (Mann, 1964; Leese et al., 1981; Jones and Montague, 1991) and sorbitol has been shown to be oxidised by ovine spermatozoa in vitro (King and Mann, 1959). Whereas glucose constitutes a major blood sugar, sorbitol and fructose levels are quite low in

most tissues. Both sorbitol and fructose are present in porcine semen, although little metabolism of sorbitol is thought to occur in the pig (King and Mann, 1959). In the porcine seminal vesicles, concentrations of 1.7 mM sorbitol and 2.5 mM fructose are found (Mann and Lutwak-Mann, 1981). In the guinea pig seminal vesicle, the polyol pathway is responsible for converting glucose to fructose via sorbitol (Prendergast and Venezia, 1975).

In this pathway glucose is first reduced to sorbitol by aldose reductase (AR) via nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) as electron donor. The resulting sorbitol is subsequently oxidised to fructose by sorbitol dehydrogenase (SDH), using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) as electron acceptor. The rate-determining step of the pathway is the first step of the pathway (Kinoshita and Nishimura, 1988).

Aldose reductase has been found in the rat testis, where it is detectable in Sertoli cells and elongated spermatids. In these cells, AR has been proposed to be involved in detoxification of cytoplasmic carbonyl compounds (Kobayashi et al., 2002). Although AR was not found in testicular and epididymal spermatozoa of rats (Kobayashi et al., 2002), Frenette et al. (2004) detected high quantities of AR associated with spermatozoa and membranous vesicles (epididymosomes) in all regions of the bovine epididymis. The presence of SDH has been demonstrated in the epididymis and epididymal spermatozoa of both rats and bulls (Brooks, 1978; Kobayashi et al., 2002; Frenette et al., 2004).

In vitro studies in which low molecular weight organic compounds cause murine sperm swelling in hypotonic medium have been interpreted as evidence that these compounds (including sorbitol) are involved in volume regulation (Yeung et al., 2005). Whether this occurs

Grant sponsor: Spanish Ministry of Science and Technology (MCYT); Grant number: AGL2002-01924 (GAN-ACU); Grant sponsor: Spanish Ministry of Science and Technology (MCYT); Grant number: RZ02-013.

\*Correspondence to: Anna Pruneda, BSc, Biotechnology of Porcine Reproduction, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Girona, Campus Montilivi s/n, 17071 Girona, Spain.

E-mail: anna.pruneda@udg.es

Received 17 October 2005; Accepted 11 January 2006

Published online in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/mrd.20481

# **Discussió General**

---





L'epidídim de mamífers és l'òrgan encarregat de transformar els espermatozoides procedents dels testicles, immòbils i sense capacitat de fecundar els oòcits, en cèl·lules madures i amb l'habilitat de moure's i de reconèixer i fecundar els oòcits (Orgebin-Crist i col., 1975; Turner, 1995; Jones, 1999). A més a més l'epidídim també és l'encarregat de transportar, concentrar, protegir i emmagatzemar els espermatozoides (Setchell i col., 1993; Hinton i Palladino, 1995; Cooper, 1998). En aquest conducte el medi que envolta els espermatozoides va canviant, a mesura que aquests es desplaçen des del caput cap al cauda epididimari. Les proteïnes, ions i altres molècules d'aquest medi són modificats per les activitats reabsortives i secretores de l'epiteli epididimari (Yanagimachi, 1994).

En aquest estudi s'ha analitzat la concentració espermàtica a les diferents regions epididimàries; els valors obtinguts s'han utilitzat per estimar el percentatge de fluid reabsorvit o secretat al llarg del conducte de l'epidídim de mascles porcins. Els resultats demostren que al caput epididimari es produeix 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. Al cauda epididimari s'observa un augment de la concentració espermàtica com a 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 mamífer. Així, en toros (Crabo, 1965) i en ratolins (Turner, 1984) s'ha determinat que més del 90% del fluid procedent de la rete testis és reabsorvit als conductes eferents i al caput de l'epidídim; d'altra banda, en bocs s'ha descrit que aquesta reabsorció es dona principalment a les regions proximals del caput epididimari (Goyal i Williams, 1991). Al corpus epididimari de bocs (Goyal i Williams, 1991), toros (Crabo, 1965; Pholpramool i col., 1985) i marrans (Amann i col., 1982) s'ha determinat que, malgrat que es produeix una reabsorció de fluid, l'activitat secretora de les cèl·lules epitelials és molt intensa i dona com a resultat un balanç net de secreció. Al cauda epididimari de la majoria dels mamífers l'augment de la concentració espermàtica és resultat de la seva funció d'emmagatzemament de l'esperma fins al moment de l'ejaculació (Glover i Nicander, 1971; Jones, 1989; Jones i Clulow, 1994).

La motilitat espermàtica és un dels paràmetres més importants per a la valoració de la capacitat fecundant dels espermatozoides (Flowers, 1997; Rigau i col., 2001). Al conducte epididimari de mascles porcins la motilitat espermàtica és d'un 40%, 55% i 80% al caput, corpus i cauda respectivament. Dacheux i Paquignon (1980) determinaren que la capacitat fecundant dels espermatozoides augmenta al llarg del conducte epididimari paral·lelament a la motilitat espermàtica.

La morfologia espermàtica varia al llarg del conducte epididimari; de tota manera els canvis morfològics més importants són la migració de la gota citoplasmàtica i la disminució de la mida del cap dels espermatozoides.

En els mascles porcins la gota citoplasmàtica migra des de la peça de connexió a l'anell de Jensen durant el seu trànsit a través del caput i el corpus epididimaris, i aproximadament un 75% dels espermatozoides alliberen la gota distal en el moment de l'ejaculació. Harayama i col. (1996) van determinar que l'alliberament de la gota residual durant l'ejaculació és induït per la fructosa del fluid de les vesícules seminals.

Al llarg del conducte epididimari dels mascles reproductors porcins no s'observen canvis en la forma del cap i de la cua, en la mida de la cua i en el nombre de caps i de cues dels espermatozoides, però sí una disminució de la mida del cap dels espermatozoides que es dona entre el caput proximal i el caput distal. Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts per Axnér i col. (1999) en gats, els quals també observen canvis en la mida i forma del cap dels espermatozoides que es donen de forma gradual al llarg de l'epidídim, però sobretot als segments inicials, i per Pérez-Sánchez i col. (1998) en conills que van determinar que la mida del cap dels espermatozoides disminueix al llarg del conducte epididimari. La disminució de la mida del cap dels espermatozoides s'atribueix a la condensació progressiva de la cromatina (Hingst i col., 1995) i de les proteïnes de l'acrosoma (Bedford, 1963; Briz i col., 1995) al llarg de la seva maduració epididimària.

En mamífers domèstics es coneix que un dels factors 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 dels mascles a una elevada freqüència d'ejaculacions es manifesta en un descens de la motilitat espermàtica i un augment

de la freqüència d'espermatozoides amb gota citoplasmàtica i d'espermatozoides aberrants a l'ejaculat (Meding, 1975; Swierstra i Dyck, 1976; Cameron, 1985; Schilling i Vengust, 1987; Bonet i col., 1991; Strzezek i col., 1995a; Tanaka i col., 2000; Pruneda i col., 2005). Aquesta disminució de la qualitat espermàtica dels ejaculats 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 i col., 1991; Tanaka i col., 2000; Pruneda i col., 2005).

Els resultats obtinguts en aquest treball demostren que en els mascles porcins sotmesos a una elevada freqüència d'ejaculació es produeixen canvis en el patró de reabsorció/secrèció de fluid al llarg del conducte epididimari. Al caput epididimari disminueix la taxa de reabsorció de fluid, al corpus no s'observa un balanç net de secreció, i al cauda no es produeix l'acumulació d'espermatozoides. Aquest és el primer estudi en el que es determina l'efecte del ritme d'extraccions sobre l'activitat secretora/absortiva de l'epidídim de mascles reproductors. Les anomalies en l'activitat secretora del conducte epididimari han estat també descrites en rates i conills criptorquídics (Bedford, 1991).

En els mascles sotmesos a una elevada freqüència d'extraccions de semen la vitalitat dels espermatozoides epididimaris i ejaculats no es veu afectada, per bé que al caput proximal s'observa una disminució de la freqüència d'espermatozoides vius. Existeixen poques dades sobre l'efecte de l'estrès pel ritme d'extraccions en la vitalitat espermàtica al llarg del conducte epididimari. Strzezek i col. (1995a) determinaren que el manteniment de mascles reproductors porcins a un ritme d'una ejaculació diària durant deu dies consecutius es manifestava en un increment del percentatge d'espermatozoides no viables a l'ejaculat. Aquestes diferències podrien estar relacionades amb la durada dels períodes estressants, per bé que altres factors com l'edat i la raça dels mascles poden inferir en els resultats (Bonet i col., 1991; Strzezek i col., 1995a).

Existeix una gran controvèrsia sobre els efectes del ritme d'extraccions en la motilitat espermàtica, a més la majoria dels estudis analitzen la motilitat espermàtica de l'ejaculat, però no del conducte epididimari. Així, en els mascles Pietrain sotmesos a dues ejaculacions diàries durant quatre dies consecutius la motilitat espermàtica és del 0% al caput, del 8% al corpus i del 13% al cauda epididimari, i de només un 20% a l'ejaculat. En mascles de la raça Large White

sotmesos a un ritme d'extraccions d'una cada dos dies durant 12 mesos i sense períodes de repòs la motilitat espermàtica de l'ejaculat és d'un 35% (Bonet i col., 1991), mentre que en mascles sotmesos a una extracció diària durant 10 dies la motilitat espermàtica de l'ejaculat és del 54-58% (Strzezek i col., 1995a). D'altra banda, mascles de la raça Landrace-Large White ejaculats diàriament durant tres setmanes presentaven una motilitat espermàtica d'un 72% (Huang i Johnson, 1996). Aquests resultats divergents indiquen que l'efecte de l'elevat ritme d'extraccions de semen sobre la motilitat espermàtica no només depèn del grau d'estrès, sinó també d'altres factors com la raça (Bonet i col., 1991; Strzezek i col., 1995a; Huang i Johnson, 1996). Els resultats obtinguts en aquest estudi semblen indicar que els mascles porcins de la raça Pietrain són més sensibles a una elevada freqüència d'ejaculacions que els mascles d'altres races, per bé que són necessaris més anàlisis per confirmar aquesta hipòtesi.

D'altra banda, en els mascles estressats la freqüència d'espermatozoides amb gota proximal és del 40% a l'ejaculat. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts per Bonet i col. (1991) i Strzezek i col. (1995) en porcí, i per Tanaka i col. (2000) en gats. Tradicionalment, l'estrès pel ritme d'extraccions s'ha relacionat amb anomalies en la migració de la gota citoplasmàtica que es produeixen com a conseqüència del menor temps de residència dels espermatozoides al conducte epididimari (Buxadé, 1984; Bonet i col., 1991).

En els mascles porcins sotmesos a un elevat ritme d'extraccions seminals s'observa una elevada freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap i de la cua al llarg de tot el conducte epididimari i a l'ejaculat. La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap i en el nombre de caps o cues augmenta al cauda epididimari i a l'ejaculat.

Les aberracions espermàtiques poden tenir un origen testicular o epididimari. Les anomalies testiculars o primàries es desenvolupen durant l'espermatogènesi, i les anomalies secundàries o epididimàries s'originen com a conseqüència d'alteracions en el procés de maduració dels espermatozoides (Briz i col., 1995, 1996). En aquest estudi els mascles estressats havien estat sotmesos a una elevada freqüència d'ejaculacions durant només quatre dies; si tenim en compte que l'espermatogènesi en mascles reproductors porcins dura uns 30 dies, totes les anomalies espermàtiques observades a l'epidídim i a l'ejaculat dels mascles sotmesos a una elevada freqüència d'ejaculacions es desenvolupen al conducte epididimari. A l'epidídim les anomalies en la forma i mida del cap es produeixen com a resultat d'alteracions en el patró de condensació del nucli i l'acrosoma (Barh i Oko, 1989; Briz i col., 1996), les anomalies en la forma de la cua són

conseqüència d'alteracions en la formació dels ponts disofre (Briz i col., 1996) i les anomalies en el nombre de caps o cues es correlacionen amb processos d'aglutinació espermàtica, que donen lloc a espermatozoides amb múltiples caps i cues, o amb una disminució de l'estabilitat cefàlica, que origina espermatozoides sense cap o sense cua (Briz i col., 1996).

Així doncs, el present estudi demostra que l'estrès per l'elevat ritme d'extraccions de semen no només força el pas d'espermatozoides a través del conducte epididimari, sinó que també altera el patró d'absorció i de secreció de fluid al caput i al corpus epididimaris. Probablement, els 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 maduració dels espermatozoides al llarg del conducte. Aquestes anomalies afecten sobretot el desenvolupament de la motilitat espermàtica, la migració i expulsió de la gota citoplasmàtica, la maduració del nucli i de l'acrosoma, i la formació dels ponts disofre a la peça de connexió.

En el procés de maduració epididimària la interacció dels espermatozoides amb el fluid luminal pren un paper essencial. La composició d'aquest fluid luminal va canviant progressivament al llarg del conducte epididimari; aquests canvis estan regulats per les activitats secretores i absorbives de l'epiteli que són específiques per a cada regió epididimària (Hinton i Palladino, 1995; Hinton i col., 1996). Es coneix que el fluid epididimari conté un elevat nombre de molècules orgàniques de baix pes molecular i solubles en aigua presents a elevades concentracions (mM) (Cooper, 1998); algunes d'aquestes molècules són l'L-carnitina, el glutamat i el *myo*-inositol. Es creu que l'L-carnitina està implicada en la producció d'energia per al moviment espermàtic (Ng i col., 2004), i que el glutamat pot ser utilitzat com a substrat oxidatiu per al metabolisme aeròbic dels espermatozoides (Mann, 1964) o pot estar implicat en millorar la supervivència espermàtica (Tyler i Rothschild, 1951). El *myo*-inositol un cop transformat a fosfatidilinositol és metabolitzat activament pels espermatozoides (Scott i Dawson, 1968) i probablement té un efecte estimulador de la motilitat, la respiració i la glicòlisi dels espermatozoides (Voglmayr, 1973). D'altra banda, es coneix que la carnitina, el glutamat i el *myo*-inositol serveixen com a osmolits reguladors del volum en les cèl·lules somàtiques (Strange i col., 1996; Lang i col., 1998; Fürst i col., 2002). Cooper i Yeung (2003) van proposar que el procés de maduració espermàtica inclou l'adquisició d'osmolits d'origen epididimari, que podrien ser essencials per als espermatozoides per regular el

seu volum en entrar en contacte amb els fluids hiposmòtics del tracte reproductor femení. En aquest sentit, s'ha demostrat que els espermatozoides dels ratolins infèrtils *c-ros* knockout presenten una menor concentració de glutamat i inositol al seu interior (Yeung i col., 2004), i que això determina la incapacitat d'aquestes cèl·lules per regular el seu volum quan entren en contacte amb les solucions hipotòniques del tracte femení (Yeung i col., 2002).

Les concentracions de carnitina i de glutamat del fluid luminal augmenten al llarg del conducte epididimari, i assoleixen el seu màxim al cauda proximal (10 mM i 23 mM, respectivament). La concentració espermàtica no segueix el mateix patró que la concentració de carnitina i glutamat, per tant, l'augment de la concentració d'aquests osmolits no és conseqüència d'una reabsorció d'aigua, sinó que s'atribueix a processos de secreció o de síntesi de carnitina i glutamat. L'augment de la concentració de carnitina al llarg del conducte epididimari ja havia estat descrit prèviament en porcí (Jeulin i col., 1987; Jeulin i Lewin, 1996). Jeulin i col. (1994) demostraren que la carnitina no se sintetitza a l'epidídim, sinó que és transportada des de la sang; posteriorment, s'ha descrit l'existència de transportadors de carnitina a l'epidídim de rates (OCTN2; Rodriguez i col., 2002; Kobayashi i col., 2005) i de ratolins (OCTN, OCT1, OCT2, OCT3; Cooper i col., 2003).

En els espermatozoides de raça Pietrain la concentració de carnitina no varia al llarg del conducte epididimari (0.28 nmol/106 spz), mentre que en els espermatozoides de la raça Large White augmenta de forma progressiva (Jeulin i col., 1987; Jeulin i Lewin, 1996). En altres espècies, com hámsters, conills, marrans i toros (Casillas, 1973; Casillas i Chaipayungpan, 1979; Inskeep i Hammerstedt, 1982; Casillas i col., 1984), també s'ha descrit un augment de la concentració de carnitina dels espermatozoides al llarg de l'epidídim.

La concentració de glutamat del fluid augmenta de forma progressiva al llarg del conducte epididimari fins a 23 mM al cauda distal. Johnson i col. (1972) també van trobar una concentració similar de glutamat al fluid del cauda distal de mascles porcíns, per bé que aquests autors no van mesurar la concentració d'aquest osmolit a la resta de regions epididimàries. Contràriament, en rata s'ha determinat que la concentració de glutamat disminueix al llarg del conducte epididimari (Hinton, 1990). En ratolí, s'ha descrit la presència de transportadors, que transporten glutamat de la sang cap a la llum del conducte epididimari (Wagenfeld i col, 2002; Cooper i Yeung, 2003).

Entre el caput proximal i el caput distal s'ha determinat una disminució de la concentració de glutamat en els espermatozoides, tot i que al corpus i al cauda epididimaris aquesta concentració augmenta fins a  $0.4 \text{ nmol}/10^6 \text{ spz}$ . Aquesta disminució inicial podria reflectir que els espermatozoides estan utilitzant el glutamat per al seu metabolisme, o que els espermatozoides són permeables al glutamat i que, per tant, es produeix un flux de glutamat cap al fluid epididimari. D'altra banda, l'augment de concentració que s'observa als espermatozoides del corpus i el cauda epididimaris podria ser conseqüència de l'adquisició de glutamat des del fluid epididimari.

A diferència de la carnitina i el glutamat, la concentració d'inositol al fluid luminal disminueix des del caput proximal (70 mM) fins al cauda distal (7.5 mM). Hinton i col. (1980) determinaren, també en porcí, que la concentració d'inositol al cauda distal era d'1 mM, per bé que en aquest cas tampoc no van mesurar la seva concentració a la resta de regions epididimàries. Existeixen diferències entre espècies en els nivells d'inositol del fluid epididimari; així, en conills, primats, marrans i toros (Voglmayr i Amann, 1973; Hinton i col., 1980) la concentració d'inositol disminueix al llarg del conducte, mentre que en rates augmenta (Voglmayr, 1974; Pholpramool i col., 1982). A l'epidídim de ratolí (Xu YX i Cooper TG, observacions no publicades), però no de gos (Kwon i col., 1992), s'ha determinat la presència d'un transportador d'inositol depenent de sodi, tot i que no es coneix en quina direcció transporta aquest substrat.

La concentració d'inositol als espermatozoides epididimaris disminueix des del caput distal fins al cauda distal ( $0.2 \text{ nmol}/10^6 \text{ espermatozoides}$ ), paral·lelament a la concentració d'inositol del fluid epididimari; això suggereix que els espermatozoides són permeables a l'inositol i/o que l'estan transformant a fosfatidilinositol. Voglmayr i Amann (1973) van demostrar que en conill el contingut d'inositol dels espermatozoides testiculars era quatre vegades superior al dels espermatozoides del cauda epididimari, d'acord amb els resultats obtinguts en el present treball.

Així doncs, al fluid epididimari la concentració de glutamat i carnitina augmenten, alhora que la concentració de *myo*-inositol decreix. El contingut de *myo*-inositol dels espermatozoides disminueix des del caput distal, mentre que el contingut de glutamat augmenta a partir del caput distal; el contingut de carnitina dels espermatozoides epididimaris no varia al llarg del conducte. Aquests resultats donen suport a la hipòtesi de què l'epidídim proporciona glutamat als



espermatozoides, i que aquest glutamat pot ser utilitzat pels espermatozoides per regular el seu volum en entrar en contacte amb els fluids hipotònics del tracte reproductor femení.

Un tipus específic de metabolisme, conegut com la ruta del polioliol, és present en alguns teixits i converteix la glucosa a fructosa via sorbitol (King i Mann, 1959). En aquesta ruta metabòlica la glucosa és reduïda a sorbitol per l'aldosa reductasa (AR) i el sorbitol resultant és oxidat a fructosa per la sorbitol deshidrogenasa (SDH) (Kinoshita i Nishimura, 1988). En diverses espècies, entre elles la porcina, s'ha demostrat que la fructosa i la glucosa poden servir com a font d'energia per als espermatozoides (Mann, 1964; Leese i col., 1981; Jones i Montague, 1991); a més a més, s'ha demostrat *in vitro* que els espermatozoides de marrà oxiden el sorbitol (King i Mann, 1959).

En condicions fisiològiques el fluid epididimari no conté glucosa. No obstant, s'ha determinat la presència de glucosa *in situ* al fluid epididimari lliure d'espermatozoides de conills (Jones, 1974) i en perfusats luminals lliures d'espermatozoides de rata (Cooper, 1982). Aquestes diferències en la concentració de glucosa del fluid epididimari amb i sense espermatozoides pot indicar que els espermatozoides catabolitzen la glucosa per via aeròbica o anaeròbica. En aquest estudi s'han utilitzat assajos específics per tal de mesurar concentracions de glucosa inferiors a 1  $\mu\text{M}$ ; i mitjançant aquests assajos s'ha pogut detectar glucosa al fluid luminal de totes les regions epididimàries excepte al cauda distal. La concentració de glucosa és més baixa al caput epididimari (0.2 mM), on la concentració espermàtica és màxima, i després augmenta fins a assolir el seu màxim al cauda proximal (0.7 mM). Al cauda distal, la concentració de glucosa és indetectable; Jones i Montague (1991) atribueixen aquests baixos nivells del cauda distal a que durant la recol·lecció i centrifugació del fluid epididimari els espermatozoides metabolitzen la glucosa.

La concentració de glucosa en sang de porcí és de 5 mM; aquesta gran diferència entre la concentració de glucosa del sèrum i el lumen epididimari probablement afavoreix la seva difusió facilitada a través de transportadors específics. Hinton i Howards (1982) van postular la presència d'aquests transportadors de glucosa a l'epidídim de rata, i posteriorment Cooper i col. (2003) van demostrar l'expressió dels gens transportadors de glucosa GLUT 1, 3 i 4 a l'epidídim de ratolí.

A diferència de la glucosa, la fructosa és indetectable al caput proximal, tot i que posteriorment la seva concentració augmenta de forma progressiva fins al cauda proximal (0.60 mM); al cauda distal la concentració de fructosa disminueix bruscament (0.20 mM). Igualment com la glucosa, la baixa concentració de fructosa al fluid luminal pot ser conseqüència de la seva utilització com a font d'energia pels espermatozoides epididimaris (Jones i Montague, 1991).

Si es compara amb la concentració de glucosa i fructosa, la concentració de sorbitol és més elevada a totes les regions epididimàries (entre 4 i 7 mM). L'elevada concentració de sorbitol determinada a la llum del conducte, indica que aquest sorbitol podria ser un substrat per el metabolisme energètic dels espermatozoides; a més a més, el sorbitol del fluid luminal podria tenir alguna altra funció. Es coneix que en cèl·lules somàtiques el sorbitol és un osmolit utilitzat per a l'osmoregulació (Burg, 1995). En porcí, l'osmolaritat del fluid epididimari (331 mmol/kg) és superior a la del fluid testicular (297 mmol/kg) (Einarsson i Gustafsson, 1973). S'ha proposat que el sorbitol juntament amb el glutamat contribueix a augmentar l'osmolaritat del fluid epididimari; alhora, aquests dos osmolits podrien ser adquirits pels espermatozoides en procés de maduració i els hi permetrien contrarestar l'inflament produït per diferències d'osmolaritat que pateixen en entrar en contacte amb el fluids hipotònics del tracte reproductor femení (Cooper i Yeung, 2003).

D'altra banda, l'enzim AR s'ha localitzat a la llum del conducte i a l'epiteli de totes les regions epididimàries, malgrat que existeixen petites diferències en el marcatge immunocitoquímic de l'epiteli al llarg del conducte. Al caput proximal, l'AR és present a la regió apical i als microvilli de les cèl·lules principals, és a dir, en contacte amb la llum del conducte. Això sembla indicar que en aquesta regió l'AR metabolitza la glucosa del fluid testicular que entra a l'epidídim. D'altra banda, al caput distal i al corpus epididimaris la presència d'AR disminueix al compartiment luminal però augmenta al compartiment basal de les cèl·lules principals; així doncs, en aquestes regions epididimàries l'enzim AR podria metabolitzar la glucosa que difon de la sang cap a la llum del conducte. Al cauda epididimari s'ha detectat la presència d'AR només en algunes cèl·lules basals; aquesta menor presència de l'enzim AR al cauda epididimari sembla indicar que existeixen altres factors, a més de l'enzim AR, que controlen els nivells de sorbitol i que fan que es mantinguin constants al llarg del conducte epididimari. La presència d'AR als microvillis apicals i al fluid luminal coincideix amb la secreció apocrina d'aquest enzim via epididimosomes descrita per Frenette i col. (2003).

L'enzim SDH s'ha localitzat als microvillis de les cèl·lules principals i a la llum del conducte de totes les regions epididimàries de porcí. Aquesta localització és similar a la descrita en rates i toros (Kobayashi i col., 2002; Frenette i col., 2003, 2004), i indica que l'enzim SDH podria sintetitzar fructosa a partir del sorbitol present al fluid epididimari. El marcatge observat al material de la llum del conducte epididimari, format per fluid i espermatozoides, s'atribueix a la presència de l'enzim SDH a l'interior dels espermatozoides. D'acord amb aquesta hipòtesi, en ovi s'ha demostrat que els espermatozoides oxiden sorbitol, i que tan els espermatozoides d'ovi com els de rata tenen l'enzim SDH (King i Mann, 1959; Brooks, 1978).

Així doncs, aquests resultats suggereixen que es produeix la difusió de glucosa de la sang cap al fluid epididimari, la seva conversió a sorbitol via AR, l'acumulació d'aquest sorbitol al fluid luminal i la seva conversió a fructosa per l'acció de l'SDH. El metabolisme espermàtic de la glucosa i la fructosa podria explicar les seves baixes concentracions al cauda epididimari. L'elevada concentració de sorbitol al llarg de tot el conducte epididimari indica que aquest podria ser utilitzat pels espermatozoides com a font d'energia però també com a osmolit requerit per a la regulació del volum dels espermatozoides en entrar en contacte amb els fluids hipotònics del tracte reproductor femení.

# Conclusions

---



- 1) Al caput epididimari dels mascles reproductors porcins es produeix una intensa activitat de reabsorció de fluid, mentre que al corpus té lloc un balanç net de secreció.
- 2) La motilitat espermàtica augmenta de forma progressiva al llarg del conducte epididimari i a l'ejaculat dels mascles porcins.
- 3) El desplaçament de la gota citoplasmàtica des de la peça de connexió a la peça intermèdia es dona a la regió del caput, i la migració des de la peça intermèdia a l'anell de Jensen té lloc al llarg del corpus epididimari; l'expulsió de la gota citoplasmàtica distal es dona en el moment de l'ejaculació.
- 4) Del caput proximal al caput distal es produeix una disminució de la mida del cap dels espermatozoides.
- 5) L'augment del ritme d'extraccions es manifesta en un canvi en el patró de reabsorció/secreció del fluid epididimari, com a conseqüència d'una disminució de la taxa de reabsorció de fluid al caput i d'un balanç net de reabsorció al corpus.
- 6) En els mascles reproductors porcins sotmesos durant quatre dies a una elevada freqüència d'ejaculacions es produeixen alteracions en el desenvolupament de la motilitat espermàtica, en la migració i expulsió de la gota citoplasmàtica, en la mida i la forma del cap dels espermatozoides, i en l'estabilitat de la seva peça de connexió. Aquestes alteracions són conseqüència del canvi en el patró de reabsorció/secreció del fluid epididimari en aquests mascles.
- 7) La concentració de carnitina del fluid luminal augmenta al llarg del conducte epididimari, i l'augment més important es produeix entre el corpus distal i el cauda proximal. El contingut de carnitina dels espermatozoides no varia al llarg del conducte epididimari.
- 8) La concentració de *myo*-inositol al fluid luminal disminueix al llarg del conducte epididimari, mentre que el contingut de *myo*-inositol dels espermatozoides disminueix a partir del caput distal.
- 9) La concentració de glutamat del fluid luminal augmenta al llarg del conducte epididimari, i l'augment més important es dona entre el corpus distal i el cauda proximal. El contingut de glutamat dels espermatozoides disminueix al caput epididimari, tot i que al corpus i al cauda torna a augmentar. L'augment de la concentració de glutamat al fluid i als espermatozoides

epididimaris dóna suport a la hipòtesi de què l'epidídim proporciona osmolits als espermatozoides en procés de maduració.

- 10) La concentració de glucosa al fluid epididimari augmenta des del caput distal fins al cauda proximal, on assoleix el seu màxim, mentre que al cauda distal la concentració de glucosa és indetectable.
- 11) La concentració de fructosa és indetectable al fluid luminal del caput proximal, tot i que a partir del caput distal augmenta fins a assolir el seu màxim al cauda proximal; al cauda distal la concentració de fructosa disminueix.
- 12) La concentració de sorbitol al fluid luminal és deu vegades més elevada que la de glucosa i fructosa a totes les regions del conducte epididimari. Així doncs, el sorbitol a més de ser un substrat metabòlic podria ser un osmolit requerit per a la regulació del volum dels espermatozoides.
- 13) La distribució de l'aldosa reductasa (AR) a l'epiteli varia lleugerament al llarg del conducte epididimari. Així doncs, al caput proximal només és present a la regió apical i als estereocilis de les cèl·lules principals, i al caput distal es distribueix per tot el citoplasma de les cèl·lules principals. Al corpus epididimari s'ha determinat la presència d'AR al citoplasma de les cèl·lules principals i a les cèl·lules basals, mentre que al cauda només és present en algunes cèl·lules basals.
- 14) A totes les regions epididimàries la sorbitol deshidrogenasa (SDH) es localitza als estereocilis de les cèl·lules principals; a més a més, al caput epididimari també és present al citoplasma de les cèl·lules principals.
- 15) Tant l'AR com l'SDH són presents a la llum del conducte de totes les regions epididimàries.
- 16) La ruta del poliòl és present al conducte epididimari de porcí; mitjançant aquesta ruta la glucosa que entra al lumen procedent dels testicles o de la sang és transformada a sorbitol per l'AR, el sorbitol s'acumula al fluid luminal i posteriorment és transformat a fructosa per l'SDH.

# **Bibliografia**

---





- Akhondi, M.A.; Chapple, C. i Moore, H.D. 1997. Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures. *Hum. Reprod.*, 12:514-522.
- Alvarez, J.G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L. i Storey, B.T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.*, 8(5):338-348.
- Amann, R.P. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.*, 2:37-58.
- Amann, R.P.; Hay, S.R. i Hammerstedt, R.H. 1982. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *Biol. Reprod.*, 27(3):723-733.
- Amann, R.P. 1989. Structure and function of the normal testis and epididymis. *J. Amer. Col. Toxicol.*, 8(3):457-471.
- Arenas, M.I.; de Miguel, M.P.; Bethencourt, F.R.; Fraile, B.; Royuela, M. i Paniagua, R. 1996. Lectin histochemistry in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, 106(2):313-320.
- Atar, D.; Spiess, M.; Mandinova, A.; Cierpka, H.; Noll, G. i Luscher, T.F. 1997. Carnitine--from cellular mechanisms to potential clinical applications in heart disease. *Eur. J. Clin. Invest.*, 27(12):973-976.
- Axnér, E.; Linde-Forsberg, C. i Einarsson, S. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, 52(5):767-778.
- Barth, A.D. i Oko, R.J. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press, Ames.
- Bassols, J.; Kadar, E.; Briz, M.; Pinart, E.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N.; Badia, E.; Pruneda, A.; Bussalleu, E.; Yeste, M.; Casas, I.; Dacheux, J.L. i Bonet, S. 2005. Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures Evaluation of boar sperm maturation in vitro. *Theriogenology*, 64(9):1995-2009.
- Bedford, J.M. 1963. Morphological changes in rabbit spermatozoa during passages through the epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, 5:169-177.
- Bedford, J.M. i Hoskins, D.D. 1990. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. A: *Marshall's Physiology of Reproduction*, Vol. 2. Ed: Lamming, G.E. 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.
- Berndtson, W.E. i Thompson, T.L. 1990. Age as a factor influencing the power and sensitivity of experiments for assessing body weight, testis size, and spermatogenesis in rats. *J. Androl.*, 11(4):325-335.
- Bonet, S.; Briz, M. i Fradera, A. 1991. The sperm quality and fertility of boars after two different ejaculation frequencies. *Scientia Gerund.*, 17:77-84.
- Bonet, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Camps, R.; Fradera, A. i Casadevall, M. 1995. Light microscopy characterization of sperm morphology. *Microsc. Anal.*, 9:29-31.
- Bonet, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N. i Badia, E. 2000. *Morfologia Espermatòica en Porcino*. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.
- Briz, M.; Bonet, S. i Fradera, A. 1993. A morphologic study of the ductus of the epididymis of *Sus domesticus*. *J. Morphol.*, 215:183-193.
- Briz, M.D.; Bonet, S.; Pinart, E.; Egozcue, J. i Camps, R. 1995. Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J. Androl.*, 16(2):175-188.
- Briz, M.D.; Bonet, S.; Pinart, E. i Camps, R. 1996. Sperm malformations through the boar epididymal duct. *Anim. Reprod. Sci.*, 43:221-239.
- Brooks, D.E.; Hamilton, D.W. i Mallek, A.H. 1974. Carnitine and glycerylphosphorylcholine in the reproductive tract of the male rat. *J. Reprod. Fertil.*, 36(1):141-160.
- Brooks, D.E. 1978. Activity and androgenic control of enzymes associated with the tricarboxylic acid cycle, lipid oxidation and mitochondrial shuttles in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. *Biochem. J.*, 174:741-752.
- Brooks, D.E. 1979. Carnitine, acetylcarnitine and the activity of carnitine acyltransferases in seminal plasma and spermatozoa of men, rams and rats. *J. Reprod. Fertil.*, 56(2):667-673.
- Brooks, D.E. 1980. Carnitine in the male reproductive tract and its relation to the metabolism of the epididymis and spermatozoa. A: *Carnitine Biosynthesis, Metabolism, and Functions*. Eds: Frankel, R.A. i McGarry, J.D. Academic Press, New York.

- Burg, M.B. 1995. Molecular basis of osmotic regulation. *Am. J. Physiol.*, 268:F983-F996.
- Buxadé, C.C. 1984. *Ganado Porcino: Sistemas de Explotación y Técnicas de Producción*. Mundi Prensa, Espanya.
- Calvo, A.; Pastor, L.M.; Bonet, S.; Pinart, E. i Ventura, M. 2000. Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *J. Reprod. Fert.*, 120:325-335.
- Cameron, R.D.A. 1982. Factors influencing semen production and quality in boars in subtropical environment. *Ph.D. Thesis*. University of Queensland, Brisbane.
- Cameron, R.D.A. 1985. Factors influencing semen characteristics in boars. *Aust. Vet. J.*, 62: 293-297.
- Cascieri, M.; Amann, R.P. i Hammerstedt, R.H. 1976. Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm motility. *J. Biol. Chem.*, 251(3):787-793.
- Casillas, E.R. 1973. Accumulation of carnitine by bovine spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Biol. Chem.*, 248:8227-8232.
- Casillas, E.R. i Chaipayungpan, S. 1979. The distribution of carnitine and acetylcarnitine in the rabbit epididymis and the carnitine content of rabbit spermatozoa during maturation. *J. Reprod. Fertil.*, 56:439-444.
- Casillas, E.R.; Villalobos, P. i Gonzales R. 1984. Distribution of carnitine and acetylcarnitine in the hamster epididymis and in epididymal spermatozoa during maturation. *J. Reprod. Fertil.*, 72:197-201.
- Ciereszko, A.; Ottobre, J.S. i Glogowski, J. 2000. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim. Reprod. Sci.*, 64:89-96.
- Cohen, J.P.; Hoffer, A.P. i Rosen, S. 1976. Carbonic anhydrase localization in the epididymis and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. *Biol. Reprod.*, 14(3):339-346.
- Colenbrander, B. i Kemp, B. 1990. Factors influencing semen quality in pigs. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 40:105-115.
- Cooper, T.G. 1982. Secretion of inositol and glucose by the perfused rat cauda epididymidis. *J. Reprod. Fertil.*, 64:373-379.
- Cooper, T.G. 1986. *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilisation*. Springer-Verlag, Berlin.
- Cooper, T.G. 1990. In defense of a function for the human epididymis. *Fertil. Steril.*, 54: 965-975.
- Cooper, T.G.; Keck, C.; Oberdieck, U. i Nieschlag, E. 1993. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Hum. Reprod.*, 8(8):1251-1258.
- Cooper, T.G. 1995. Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 377:87-101.
- Cooper, T.G. 1998. Epididymis. A: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds: Neill, J.D. i Knobil, E. Academic Press, San Diego.
- Cooper, T.G. i 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(1):28-38.
- Cooper, T.G.; Wagenfeld, A.; Cornwall, G.A.; Hsia, N.; Chu, S.T.; Orgebin-Crist, M.C.; Drevet, J.; Vernet, P.; Avram, C.; Nieschlag, E. i Yeung, C.H. 2003. Gene and protein expression in the epididymis of infertile *c-ros* receptor tyrosine kinase-deficient mice. *Biol. Reprod.*, 69:1750-1762.
- Crabo, B. 1965. Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars. *Acta Vet. Scand.*, 6(5):1-94.
- Crabo, B.G. i Hunter, A.G. 1975. Sperm maturation and epididymal function. A: *Control of Male Fertility*. Eds: Sciarra, J.J.; Markland, C. i Speidel, J.J. Harper & Row, Hagerstown.
- Crichton, E.G.; Hinton, B.T.; Pallone, T.L. i Hammerstedt, R.H. 1994. Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. *Am. J. Physiol.*, 267:R1363-1370.
- Cyr, D.G.; Finnson, K.; Dufresne, J. i Gregory, M. 2002. Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. A: *The Epididymis: From molecules to clinical practice*. Eds: Robaire, B. i Hinton, B.T. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Dacheux, J.L. i Paquignon, M. 1980. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.*, 20(4A):1085-1099.
- Dacheux, J.L.; Chevrier, C.; Dacheux, F.; Jeulin, C.; Gatti, J.L.; Pariset, C. i Paquignon, M. 1990. Sperm biochemical changes during epididymal maturation. A: *Gamete Interaction: Prospects for Immunocontraception*. Wiley-Liss, Nova York.

- Dacheux, J.L.; Druart, X.; Fouchecourt, S.; Syntin, P.; Gatti, J.L.; Okamura, N. i Dacheux, F. 1998. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 53:99-107.
- Dacheux, J.L.; Castella, S.; Gatti, J.L. i Dacheux, F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, 63(2):319-341.
- De Pauw, I.M.; Van Soom, A.; Maes, D.; Verberckmoes, S. i de Kruif, A. 2003. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of *in vitro* stored bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 59(5-6):1109-1122.
- Dobson, H. i Smith, R.F. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:743-752.
- Egbunike, G.N.; Holtz, W.; Endell, W. i Smidt, D. 1975. Reproductive capacity of German Landrace boars. I. Gonadal and extra-gonadal sperm reserves. *Zuchthygiene*, 10(4):184-187.
- Einarsson, S. i Gustafsson, B. 1973. A case of epididymal dysfunction in boar. *Andrology*, 5(4): 273-279.
- Ekstedt, E.; Ridderstrale, Y.; Ploen, L. i Rodriguez-Martinez, H. 1991. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the testis and epididymis of the boar. *Acta Anat.*, 141(3):257-261.
- Ekstedt, E. i Ridderstrale, Y. 1992. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the testis and epididymis of the rabbit. *Acta Anat.*, 143(3):258-264.
- Elzanaty, S.; Richthoff, J.; Malm, J. i Giwercman, A. 2002. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum. Reprod.*, 17(11):2904-2911.
- Flickinger, C.J. 1983. Synthesis and secretion of glycoprotein by the epididymal epithelium. *J. Androl.*, 4:157-161.
- Flickinger, C.J.; Herr, J.C. i Klotz, K.L. 1988. Immunocytochemical localization of the major glycoprotein of epididymal fluid from the cauda in the epithelium of the mouse epididymis. *Cell Tissue Res.*, 251(3):603-610.
- Flowers, W.L. 1997. Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 52:67-78.
- Flowers, W.L. 1998. Management of reproduction. A: *Progress in Pig Science*. Eds: Wiseman, J.; Varley, M.A. i Chadwick, J.P. Nottingham University Press, Nottingham.
- Frenette, G.; Lessard, C.; Madore, E.; Fortier, M.A. i Sullivan, R. 2003. Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. *Biol. Reprod.*, 69:1586-1592.
- Frenette, G.; Lessard, C. i Sullivan, R. 2004. Polyol pathway along the bovine epididymis. *Mol. Reprod. Dev.*, 69:448-456.
- Fürst, J.; Gschwentner, M.; Ritter, M.; Botta, G.; Jakab, M.; Mayer, M.; Garavaglia, L.; Bazzini, C.; Rodighiero, S.; Meyer, G.; Eichmüller, S.; Woll, E. i Paulmichl, M. 2002. Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. *Pflugers Archives*, 444:1-25.
- Glover, T.D. i Nicander, L. 1971. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 13:39-50.
- Goeritz, F.; Quest, M.; Wagener, A.; Fassbender, M.; Broich, A.; Hildebrandt, T.B.; Hofmann, R.R. i Blottner, S. 2003. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology*, 59:1487-1502.
- Goyal, H.O.; Ferguson, J.G. i Hrudka, F. 1980. Histochemical activity of carbonic anhydrase in testicular and excurrent ducts of immature, mature intact and androgen-deprived bulls. *Biol. Reprod.*, 22(4):991-997.
- Goyal, H.O. 1985. Morphology of the bovine epididymis. *Am. J. Anat.*, 172(2):155-172.
- Goyal, H.O. i 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.
- Hamilton, D.W. 1975. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymis, and ductus deferens in the rat. A: *Handbook of Physiology*, Vol. 5. Eds: Hamilton, D.W. i Greep, R.O. Williams and Wilkins, Berlin.
- Hammerstedt, R.H.; Keith, A.D.; Snipes, W.; Amann, R.P.; Arruda, D. i Griel, L.C. Jr. 1978. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolality on sperm. *Biol. Reprod.*, 18:686-696.

- Harayama, H.; Shibukawa, T.; Miyake, M.; Kannan, Y. i Kato, S. 1996. Fructose stimulates shedding of cytoplasmic droplets from epididymal boar spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, 8:1039-1043.
- Hermo, L.; Oko, R. i Morales, C.R. 1994. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int. Rev. Cytol.*, 154:106-189.
- Hingst, O.; Blottner, S. i Franz, C. 1995. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue staining and acridine orange staining. *Andrologia*, 27:275-279.
- Hinton, B.T.; Snoswell, A.M. i Setchell, B.P. 1979. The concentration of carnitine in the luminal fluid of the testis and epididymis of the rat and some other mammals. *J. Reprod. Fertil.*, 56(1):105-111.
- Hinton, B.T. 1980. The epididymal microenvironment: a site of attack for a male contraceptive? *Invest. Urol.*, 18(1):1-10.
- Hinton, B.T.; White, R.W. i Setchell, B.P. 1980. Concentrations of *myo*-inositol in the luminal fluid of the mammalian testis and epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, 58:395-399.
- Hinton, B.T. i Howards, S.S. 1982. Rat testis and epididymis can transport [3H] 3-O-methyl-D-glucose, [3H] inositol and [3H] alpha-aminoisobutyric acid across its epithelia in vivo. *Biol. Reprod.*, 27(5):1181-1189.
- Hinton, B.T. i Hernandez, H. 1985. Selective luminal absorption of L-carnitine from the proximal regions of the rat epididymis. Possible relationships to development of sperm motility. *J. Androl.*, 6(5):300-305.
- Hinton, B.T. 1990. The testicular and epididymal luminal amino acid microenvironment in the rat. *J. Androl.*, 11:498-505.
- Hinton, B.T. i Palladino, M.A. 1995. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.*, 30(1):67-81.
- Hinton, B.T.; Palladino, M.A.; Rudolph, D.; Lan, Z.J. i Labus, J.C. 1996. The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 33:61-102.
- Hoskins, D.D.; Brandt, H. i Acott, T.S. 1978. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Fed. Proc.*, 37:2534-2536.
- Huang, Y.T. i Johnson, R.K. 1996. Effect of selection for size of testes in boars on semen and testis traits. *J. Anim. Sci.*, 74(4):750-760.
- Hughes, P.E. i Varley, M.A. 1984. *Reproducción del Cerdo*. Acribia, Zaragoza.
- Inskeep, P.B. i Hammerstedt, R.H. 1982. Changes in metabolism of ram sperm associated with epididymal transit or induced by endogenous carnitine. *Biol. Reprod.*, 27:735-743.
- James, M.J.; Brooks, D.E. i Snoswell, A.M. 1981. Kinetics of carnitine uptake by rat epididymal cells. Androgen-dependence and lack of stereospecificity. *FEBS Lett.*, 126(1):53-56.
- Jeulin, C.; Soufir, J.C.; Marson, J.; Paquignon, M. i Dacheux, J.L. 1987. The distribution of carnitine and acetylcarnitine in the epididymis and epididymal spermatozoa of the boar. *J. Reprod. Fertil.*, 79:523-529.
- Jeulin, C.; Dacheux, J.L. i Soufir, J.C. 1994. Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate. *J. Reprod. Fertil.*, 100:263-271.
- Jeulin, C. i Lewin, L.M. 1996. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 2:87-102.
- Jiang, F.X.; Temple-Smith, P.D. i Wreford, N.G. 1994. Postnatal differentiation and development of the rat epididymis: a stereological study. *Anat. Rec.*, 238:191-198.
- Johnson, A.L. i Howards, S.S. 1977. Hyperosmolality in intraluminal fluids from hamster testis and epididymis: a micropuncture study. *Science*, 195(4277):492-493.
- Johnson, L.A.; Pursel, V.G.; Gerrits, R.J. i Thomas, C.H. 1972. Free amino acid composition of porcine seminal, epididymal and seminal vesicle fluids. *J. Anim. Sci.*, 34:430-434.
- Jones, A.R. i Montague, M.D. 1991. Metabolism of fructose-1,6-bisphosphate by mature boar spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, 3:609-613.
- Jones, R. 1978. Comparative biochemistry of mammalian epididymal plasma. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 61(3):365-370.
- Jones, R.; Hamilton, D.W. i Fawcett, D.W. 1979. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *Am. J. Anat.*, 156(3):373-400.
- Jones, R. 1989. Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. A: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Ed: Milligan, S.R. Oxford University Press, Oxford.

- Jones, R. 1998. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 53:73-84.
- Jones, R.C. i Clulow, J. 1994. Interactions of sperm and the reproductive tract of the male tammar wallaby, *Macropus eugenii* (Macropodidae: Marsupialia). *Reprod. Fertil. Dev.*, 6:437-444.
- Jones, R.C. 1999. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int. J. Androl.*, 22(2):57-67.
- Jones, T. 1974. Absorption and secretion in the cauda epididymidis of the rabbit and the effects of degenerating spermatozoa on epididymal plasma after castration. *J. Endocrinol.*, 63:157-165.
- Keel, B.A. 1990. The semen analysis. A: *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. Eds: Keel, B.A. i Webster, B.W. CRC Press, Boca Raton.
- King, T.F. i Mann, T. 1959. Sorbitol metabolism in spermatozoa. *Proc. Roy. Soc. B.*, 151:226-243.
- Kinoshita, J.H. i Nishimura, C. 1988. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metab. Rev.*, 4:323-337.
- Kirchhoff, C.; Osterhoff, C.; Pera, I. i Schroter, S. 1998. Function of human epididymal proteins in sperm maturation. *Andrologia*, 30(4-5):225-232.
- Kirchhoff, C. 1999. Gene expression in the epididymis. *Int. Rev. Cytol.*, 188:133-202.
- Kobayashi, T.; Kaneko, T.; Iuchi, Y.; Matsuki, S.; Takahashi, M.; Sasagawa, I.; Nakada, T. i Fujii, J. 2002. Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. *J. Androl.*, 23:674-683.
- Kobayashi, D.; Irokawa, M.; Maeda, T.; Tsuji, A. i Tamai, I. 2005. Carnitine/organic cation transporter OCTN2-mediated transport of carnitine in primary-cultured epididymal epithelial cells. *Reproduction*, 130:931-937.
- Krvavica, S.; Simunic, V.; Maloseja, Z. i Abram, K. 1964. The exchange of free amino acids in sperm of boars. *V International Cong. on Anim. Reprod. and Artificial Insemination* 4:446.
- Kumar, G.P.; Laloraya, M. i Laloraya, M.M. 1991. Superoxide radical level and superoxide dismutase activity changes in maturing mammalian spermatozoa. *Andrologia*, 23:171-175.
- Kvist, U. i Björndahl, L. 2002. *Manual on Basic Semen Analysis*. ESHRE Monographs. Oxford University Press, Oxford.
- Kwon, H.M.; Yamauchi, A.; Uchida, S.; Preston, A.S.; Garcia-Perez, A.; Burg, M.B. i Handler, J.S. 1992. Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J. Biol. Chem.*, 267:6297-6301.
- Lang, F.; Busch, G.L.; Ritter, M.; Völkl, H.; Waldegger, S.; Gubins, E. i Häussinger, D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, 78:247-306.
- Le Divich, J. 1996. Incidencia de las condiciones de alojamiento sobre las características de reproducción en porcino. *Rev. Asoc. Nac. Porcinocul. Cient.*, 154:73-81.
- Leese, H.J.; Astley, N.R. i Lambert, D. 1981. Glucose and fructose utilization by rat spermatozoa within the uterine lumen. *J. Reprod. Fertil.*, 61:435-437.
- Levine, N. i Marsh, D.J. 1971. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J. Physiol.*, 213(3):557-570.
- Ludwig, G. i Frick, J. 1990. *Spermatology: Atlas and Manual*. Ed. Springer-Verlag, New York.
- Maehara, M.; Kinoshita, S. i Watanabe, K. 1988. A simple fluorometric method for the determination of serum free carnitine. *Clin. Chim. Acta*, 171:311-316.
- Mann, T. 1964. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. John Wiley and Sons, New York.
- Marquis, N.R. i Fritz, I.B. 1964. Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues. *J. Lipid Res.*, 5:184-187.
- Martín, S. 1990. Problemas reproductivos asociados con anomalías del semen de verraco. *Rev. Asoc. Nac. Porcinocul. Cient.*, 95:35-46.
- Mathieu, C.; Guerin, J.F.; Cognat, M.; Lejeune, H.; Pinatel, M.C. i Lornage, J. 1992. Motility and fertilizing capacity of epididymal human spermatozoa in normal and pathological cases. *Fertil. Steril.*, 57(4):871-876.
- Meding, J.H. 1975. Influence of semen collection on breeding efficiency of A.I. boars. *Nord. Vet. Med.*, 27:153-160.

- Moore, H.D.M. 1981. Glycoprotein secretions of the epididymis in the rabbit and hamster localization on epididymal spermatozoa and the effect of specific antibodies on fertilization *in vivo*. *J. Exp. Zool.*, 215:77-85.
- Moore, H.D.M.; Hartman, T.D. i Pryor, J.P. 1983. Development of the oocyte penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. *Int. J. Androl.*, 6:310-318.
- Moore, H.D.M. 1990. The epididymis. A: *Scientific foundations of urology*. Eds: Chisholm, G.D. i Fair, W.D. Heimann Medical, Oxford.
- Moore, H.D.M. 1996. The influence of the epididymis on human and animal sperm maturation and storage. *Hum. Reprod.*, 11:103-110.
- Morales, A. i Cavicchia, J.C. 1991. Release of cytoplasm apical protrusions from principal cells of the cat epididymis. An electron microscopic study. *Tissue and Cell*, 23:505-513.
- Ng, C.M.; Blackman, M.R.; Wang, C. i Swerdloff, R.S. 2004. The role of carnitine in the male reproductive system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1033:177-188.
- Nicander, L. i Glover, T.D. 1973. Regional histology and fine structure of the epididymal duct in the golden hamster *Mesocricetus auratus*. *J. Anat.*, 114(3):347-364.
- Nirmal, B.K. i Rai, U. 1997. Epididymal influence on acquisition of sperm motility in the gekkond lizard *Hemidactylus flaviviridis*. *Arch. Androl.*, 39:105-110.
- O'Neill, R.B.; Dillon, S.A. i Morgan, P.M. 1998. A coupled enzyme assay for *myo*-inositol. *Biochem. Soc. Trans.*, 26:S84.
- Okamura, N.; Dacheux, F.; Venien, A.; Onoe, S.; Huet, J.C i Dacheux, J.L. 1992. Localization of a maturation dependent epididymal sperm surface antigen recognized by a monoclonal antibody raised against a 135-kilodalton protein in porcine epididymal fluid. *Biol. Reprod.*, 47:1040-1052.
- Okwun, O.E.; Igboeli, G.; Ford, J.J.; Lunstra, D.D. i Johnson, L. 1996. Number and function of sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *J. Reprod. Fertil.*, 107(1):137-149.
- Orgebin-Crist, M.C.; Danzo, B.J. i Davies, J. 1975. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. A: *Handbook of Physiology*, Vol. 5. Eds: Hamilton, D.W. i Greep, R.O. American Physiological Society, Washington.
- Orgebin-Crist, M.C. 1998. The epididymis across 24 centuries. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 53:285-292.
- Palacios, J.; Regadera, J.; Nistal, M. i Paniagua, R. 1991. Apical mitochondrial-rich cells in the human epididymis: an ultrastructural, enzymohistochemical, and immunohistochemical study. *Anat. Rec.*, 231:82-88.
- Paniagua, R. 1997. *Citología e Histología Vegetal y Animal*. Mc Graw-Hill Interamericana, Espanya.
- Pelletier, R.M. 1995. Freeze-fracture study of cell junctions in the epididymis and vas deferens of a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Microsc. Res. Tech.*, 30(1):37-53.
- Pérez-Sánchez, F.; Tablado, L. i Soler, C. 1998. Quantitative changes in sperm head morphology during passage through the male excurrent duct system of the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.*, 51(2):203-209.
- Pholpramool, C.; White, R.W. i Setchell, B.P. 1982. Influence of androgens on inositol secretion and sperm transport in the epididymis of rats. *J. Reprod. Fertil.*, 66:547-553.
- Pholpramool, C.; Zupp, J.L. i Setchell, B.P. 1985. Motility of undiluted bull epididymal spermatozoa collected by micropuncture. *J. Reprod. Fertil.*, 75(2):413-420.
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M.D.; Bonet, S. i García, N. 1999. Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Anim. Reprod. Sci.*, 55:269-278.
- Pinart, E.; Bonet, S.; Briz, M.; Pastor, L.M.; Sancho, S.; García, N.; Badia, E. i Bassols, J. 2001. Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid post-pubertal boars. *Int. J. Androl.*, 24:153-164.
- Pinart, E.; Bonet, S.; Briz, M.; Pastor, L.M.; Sancho, S.; García, N.; Badia, E. i Bassols, J. 2002. Histochemical study of the interstitial tissue in scrotal and abdominal boar testes. *Vet. J.*, 163:68-76.
- Pollanen, P. i Cooper, T.G. 1994. Immunology of the testicular excurrent ducts. *J. Reprod. Immunol.*, 26(3):167-216.
- Pruneda, A.; Pinart, E.; Briz, M.D.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N.; Badia, E.; Kádár, E.; Bassols, J.; Bussalleu, E.; Yeste, M. i Bonet, S. 2005. Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology*, 63:2219-2232.

- Prunier, A.; Dourmad, J.Y. i Etienne, M. 1994. Effect of light regimen under various ambient temperatures on sow and litter performance. *J. Anim. Sci.*, 72(6):1461-1466.
- Ramos, A.S. i Dym, M. 1977. Fine structure of the monkey epididymis. *Am. J. Anat.*, 149(4):501-531.
- Regadera, J.; Cobo, P.; Paniagua, R.; Martinez-Garcia, F.; Palacios, J. i Nistal, M. 1993. Immunohistochemical and semiquantitative study of the apical mitochondria-rich cells of the human prepubertal and adult epididymis. *J. Anat.*, 183:507-514.
- Reid, B.L. i Cleland, K.W. 1957. The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. *Aust. J. Zool.*, 5:223-246.
- Rigau, T.; Farre, M.; Ballester, J.; Mogas, T.; Pena, A. i Rodriguez-Gil, J.E. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56(5):801-815.
- Robaire, B. i Hermo, L. 1988. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, function and their regulation. A: *The Physiology of Reproduction*. Eds: Knobil, E. i Neill, J.D. Raven Press, New York.
- Rodger, J.C. 1982. The testis and its excurrent ducts in American caenolestid and didelphid marsupials. *Am. J. Anat.*, 163(3):269-282.
- Rodriguez, C.M.; Labus, J.C. i Hinton, B.T. 2002. Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, is differentially expressed in the adult rat epididymis. *Biol. Reprod.*, 67:314-319.
- Sancho, S.; Pinart, E.; Briz, M.; Garcia-Gil, N.; Badia, E.; Bassols, J.; Kadar, E.; Pruneda, A.; Bussalleu, E.; Yeste, M.; Coll, M.G. i Bonet, S. 2004. Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. *Theriogenology*, 62(7):1271-1282.
- Schilling, E. i 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.
- Schleicher, G.; Drews, U.; Stumpf, W.E. i Sar, M. 1984. Differential distribution of dihydrotestosterone and estradiol binding sites in the epididymis of the mouse. An autoradiographic study. *Histochem.*, 81(2):139-147.
- Scott, T.W. i Dawson, R.M.C. 1968. Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. *Biochem. J.*, 108:457-463.
- Setchell, B.P. 1969. Do Sertoli cells secrete fluid into the seminiferous tubules? *J. Reprod. Fertil.*, 19(2):391-392.
- Setchell, B.P.; Sanchez-Partida, L.G. i Chairussyuhur, A. 1993. Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: a review. *Reprod. Fertil.*, 5:601-612.
- Sprando, R.L.; Collins, T.F.X; Black, T.N.; Olejnik, N.; Rorie, J.I.; West, L.J.; Bowers, J.D; Sass, N. i Robl, M. 1999. Light microscopic observations on the reproductive tract of the male sand rat, *Psammodomys obesus*. *Tissue Cell*, 31(1):99-115.
- Stoffel, M.H. i Friess, A.E. 1994. Morphological characteristics of boar efferent ductules and epididymal duct. *Microsc. Res. Tech.*, 29(6):411-431.
- Stoffel, M.H.; Busato, A. i Friess, A.E. 2002. Density and distribution of anionic sites on boar ejaculated and epididymal spermatozoa. *Histochem. Cell Biol.*, 117:441-445.
- Strange, K.; Emma, F. i Jackson, P.S. 1996. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol.*, 270:C711-C730.
- Strzezek, J.; Kordan, W.; Glogowski, J.; Wysocki, P. i Borkowski, K. 1995a. Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. *Reprod. Dom. Anim.*, 30:85-94.
- Strzezek, J.; Torska, J.; Borkowski, K.; Glogowski, J.; Wysocki, P. i Holody, D. 1995b. The biochemical characteristics of boar seminal plasma during high ejaculation frequency. *Reprod. Dom. Anim.*, 30:77-84.
- Sujarit, S.; Chaturapanich, G. i Pholpramool, C. 1985. Evidence for blood myo-inositol as a source of the epididymal secretion in the perfused cauda epididymidis of the rat. *Andrologia*, 17(4):321-326.
- Sun, E.L. i Flickinger, C.J. 1979. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am. J. Anat.*, 154(1):27-55.
- Sun, E.L. i Flickinger, C.J. 1982. Proliferative activity in the rat epididymis during postnatal development. *Anat. Rec.*, 203:273-284.
- Swierstra, E.E. 1968. A comparison of spermatozoa production and spermatozoa output of Yorkshire and Lacombe boars. *J. Reprod. Fertil.*, 17(3):459-469.



- Swierstra, E.E. i Dyck, G.W. 1976. Influence of the boar and ejaculation frequency on pregnancy rate and embryonic survival in swine. *J. Anim. Sci.*, 42:455-460.
- Tanaka, A.; Kuwabara, S.; Takagi, Y.; Nakagawa, K.; Fujimoto, Y.; Murai, M. i Tsutsui, T. 2000. Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats. *J. Vet. Med. Sci.*, 62(11):1157-1161.
- Tuck, R.R.; Setchell, B.P.; Waites, G.M. i 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(3):225-243.
- Tucker, M.J. i Chan, S.Y. 1993. Origins and effects of variations in spermatozoal quality. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.*, 38(4):197-209.
- Turner, T.T. i Howards, S.S. 1978. Factors involved in the initiation of sperm motility. *Biol. Reprod.*, 18:571-578.
- Turner, T.T. 1984. Resorption versus secretion in the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, 72:509-514.
- Turner, T.T. i Howards, S.S. 1985. The tenacity of the blood-testis and blood-epididymal barriers. A: *Male Fertility and its Regulation*. Eds: Lobl, T.J. i Hafez, E.S.E. MTP Press Ltd, Lancaster.
- Turner, T.T. i Reich, G.W. 1985. Cauda epididymal sperm motility: a comparison among five species. *Biol. Reprod.*, 32(1):120-128.
- Turner, T.T. 1991. Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 637:364-383.
- Turner, T.T. 1995. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J. Androl.*, 16:292-298.
- Tyler, A. i Lord Rothschild. 1951. Metabolism of sea urchin spermatozoa and induced anaerobic motility in solution of amino acids. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 76:52.
- Veeramachaeni, D.R.N. 2000. Deteriorating trends in male reproduction: idiopathic or environmental? *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:121-130.
- Vendrely, E. 1981. Histology of the epididymis in the human adult. *Progr. Reprod. Biol.*, 8:21-23.
- Verma, R.J. i Chinoy, N.J. 2001. Effect of papaya seed extract on microenvironment of cauda epididymis. *Asian J. Androl.*, 3(2):143-146.
- Voglmayr, J.K. 1973. Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  concentration in genital tract secretions of dairy bulls. *Prostaglandins*, 4:673-678.
- Voglmayr, J.K. i Amann, R.P. 1973. The distribution of free *myo*-inositol in fluids, spermatozoa and tissues of the bull genital tract and observations on its uptake by the rabbit epididymis. *Biol. Reprod.*, 8:504-513.
- Voglmayr, J. 1974. Alpha-chlorohydrin-induced changes in the distribution of free *myo*-inositol and prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , and synthesis of phosphatidylinositol in the rat epididymis. *Biol. Reprod.*, 11:593-600.
- Von Lanz, T. i Neuhäuser, G. 1964. Morphometrische analyse des menschlichen nebenhodens. *Z. Anat. Entwickl.*, 124:126-152.
- Wagenfeld, A.; Yeung, C.H.; Lehnert, W.; Nieschlag, E. i Cooper, T.G. 2002. Lack of glutamate transporter EAAC1 in the epididymis of infertile *c-ros* receptor tyrosine-kinase deficient mice. *J. Androl.*, 23:772-782.
- Weather, P.R.; Burkitt, H.G. i Daniels, V.G. 1980. *Histología Funcional*. Ed. Jims, Barcelona.
- WHO, World Health Organization. 1999. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. (4<sup>a</sup> ed). Cambridge University Press, Cambridge.
- Wong, P.Y. i Yeung, C.H. 1978. Absorptive and secretory functions of the perfused rat cauda epididymidis. *J. Physiol.*, 275:13-26.
- Wong, P.Y.D. 1986. Fluid transport and sperm maturation in the epididymis. *Biomed. Res.*, 7(Suppl2):233.
- Wong, P.Y. 1989. Potassium channel blockers inhibit anion secretion in cultured rat epididymal epithelium. *Jpn. J. Physiol.*, 39(4):595-607.
- Wong, P.Y.D.; Gong, X.D.; Leung, G.P.H. i Cheuk, B.L.Y. 2002. Formation of the epididymal fluid microenvironment. A: *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Eds: Robaire, B. i Hinton, B.T. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. A: *The Physiology of Reproduction*. Eds: Knobil, E. i Neill J.K. Raven Press, New York.

- 
- Yeung, C.H.; Cooper, T.G.; Oberpenning, F.; Schulze, H. i Nieschlag, E. 1993. Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol. Reprod.*, 49:274-280.
- Yeung, C.H.; Nashan, D.; Sorg, C.; Oberpenning, F.; Schulze, H.; Nieschlag, E. i Cooper, T.G. 1994. Basal cells of the human epididymis-antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol. Reprod.*, 50:917-926.
- Yeung, C.H.; Wagenfeld, A.; Nieschlag, E. i Cooper, T.G. 2000. The cause of infertility of male c-ros tyrosine kinase receptor knockout mice. *Biol. Reprod.*, 63(2):612-618.
- Yeung, C.H.; Anapolski, M. i Cooper, T.G. 2002. Measurement of volume changes in mouse spermatozoa using an electronic sizing analyzer and a flow cytometer: validation and application to an infertile mouse model. *J. Androl.*, 23:522-528.
- Yeung, C.H.; Anapolski, M.; Setiawan, I.; Lang, F. i Cooper, T.G. 2004. Effects of putative epididymal osmolytes on sperm volume regulation of fertile and infertile c-ros transgenic mice. *J. Androl.*, 25:216-223.