

Comparación entre los parámetros seminales de la rata y la fertilidad.

Dres. A.L. Weber, E.A. Santos Lima, A.L.B. Bordin, A.J. D'Acampora, V. Ortiz, J.A. Souza, M.L. Pereira, P. Goldberg, E.R. Quaresma, M.C. Capella, E.J. Capella, E.J. de Araujo

Laboratorio de Técnica operatorio y cirugía experimental de la Universidad Federal de Santa Catarina y Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Infantil Joana de Gusmão -Florianópolis-Brasil

Resumen

La fertilidad en el hombre es evaluada por las características seminales. Experimentalmente el test de fertilidad se acepta como el más confiable pero imposible de reproducir en humanos porque implica la capacidad de gestación. La técnica simplificada de microaspiración del esperma, resultó muy práctica pero había que verificar si los parámetros seminales así obtenidos tenían correlación con el test de apareamiento. El objetivo del trabajo fue evaluar la correlación entre los parámetros seminales de la rata, y el test de apareamiento. Se utilizaron 20 ratas y 20 ratas albinas del linaje Wistar, con edades durante el test de apareamiento de 70 días y peso medio de 260 g. Para el procedimiento de microaspiración del esperma del epidídimo, fueron utilizados las 40 ratas Wistar (20+20), con edad de 70 días y un peso medio de 200 g. para el test de apareamiento. Para la microaspiración, las mismas ratas tenían 160 días, con un peso medio de 368,4 g. En el test de apareamiento se utilizó el método de Poiley, se observaron el número de embarazos y de crías. Se utilizó la técnica de microaspiración de esperma de la cola del epidídimo para evaluar la motilidad y concentración espermática. El test T de Student fue utilizado en la evaluación de los parámetros seminales. Se correlacionó el número de crías con la motilidad y la concentración espermática obteniéndose un nivel de significancia de 0,5 ($p < 0,05$). No hubo diferencias estadísticas en el número de embarazos, número de hijos, motilidad y concentración espermática. Pudiendo concluirse que además de ser racional, la técnica de microaspiración del esperma es también específica en esta evaluación.

Palabras clave: Rata-Semen-Fertilidad

Summary

Man's fertility is assessed by seminal features. Experimental, fertility test is accepted as the most reliable, being achieved through marriage which is impossible to reproduce clinically. Simplified microaspiration technique of sperm became very practical, however it's important to know if the seminal parameter obtained through this procedure has any correlation with mating test. The main purpose of this paper was assessing the correlation between seminal parameter of rat and the mating test. Wistar rats were used (20 male and 20 female), aging 70 days and medium weight of 260g at the time of mating test. During microaspiration technique, animals were 160 days old and weighted 369,4g. In mating tests, Poiley method was used in order to establish the number of pregnancies and litter. Microaspiration technique of sperm from the epididymis tail was done to study sperm mobility and concentration. Students's T test was used to assess seminal parameters correlation of the number of litters of rat with spermatoc motility and concentration ($p < 0.05$). There was no statistic difference in spermatoc motility and concentration. There was no association between the number of litter with the spermatoc motility and concentration. It was possible to conclude that there was no association between seminal parameters in rats with fertility.

Index words: Rats - Semen - Fertility.

Resumo

Fertilidade no homem é avaliada pelas características seminais. Experimentalmente, o teste de fertilidade consagrou-se ser mais confiável. Dentre estes testes, o acasalamento é o mais utilizado, porém inexecúvel clinicamente. O ideal seria, conseguir aproximar a avaliação feita em humanos aos trabalhos experimentais. A técnica de microaspiração de esperma simplificada, tornou-se mais prática. Porém necessita-se verificar se os parâmetros seminais obtidos por esta técnica, mantém correlação com o teste do acasalamento. Objetivou-se avaliar a correlação entre os parâmetros seminais do rato e o teste do acasalamento. Utilizou-se 20 ratos e 20 ratas da linhagem Wistar, com idade de 70 dias e peso médio de 260 gramas durante o teste do acasalamento. Durante a técnica de microaspiração, os mesmos tinham 160 dias, com peso médio de 368,4 gramas. No teste de acasalamento utilizou-se o método de Poiley, observando-se os números de gestações e os de filhotes. Utilizou-se a técnica de microaspiração de esperma da cauda do epidídimo na obtenção do esperma, observando-se a motilidade e concentração espermática. O teste T de Student foi utilizado na avaliação dos parâmetros seminais. Realizou-se a correlação entre o número de filhotes com a motilidade e a concentração espermática com nível de significância de 0,5 ($p < 0,05$). Não houve diferenças estatísticas no número de gestações, número de filhotes, motilidade e concentração espermática. Houve correlação significativa entre o número de filhotes com a concentração espermática. Podendo concluir-se que, além de ser racional, a técnica de microaspiração de esperma é também específica nesta avaliação.

Palavras chaves: Ratos - Sêmen - Fertilidade.

Introducción

La fertilidad se analiza en el varón evaluando las características del semen, que se obtiene recolectando muestras de masturbación recogidas en condiciones estándar. El análisis comprende: medida del volumen del semen, concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides, PH, cantidad de fructosa, presencia de leucocitos y análisis de penetración del espermatozoide¹.

A nivel experimental, el test de fertilidad ha sido consagrado como el más fiable al evaluar la función exócrina testicular^{2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16}. Esto se debe al hecho de analizar, los parámetros seminales en términos de cantidad, y calidad de los espermatozoides que representa el producto final de todo proceso de reproducción. El test de fertilidad es inviable de aplicar en seres humanos, pero es el más utilizado en los trabajos experimentales que evalúan la fertilidad con el test de apareamiento^{2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16}. Otros métodos, como la inseminación artificial, son menos usados¹⁶. El ideal sería conseguir en los trabajos experimentales intentar una evaluación metodológica semejante a la realizada en humanos, con un análisis fiable. La técnica de micropunción y microanálisis se desarrolló para evaluar glándulas su-

doríparas, salivales, pancreáticas y tiroideas, fue adoptada para evaluar los fluidos seminales¹⁷. Esta exige materiales y métodos específicos, tornándose difícil su reproductibilidad; por esta razón se desarrolló una variante de la técnica, simplificándola, haciéndola práctica, de fácil ejecución y de gran confiabilidad¹⁸. Resta confrontar esta técnica de obtención de esperma y análisis de la motilidad y concentración espermática a la técnica de fertilidad. Este estudio tiene por objetivo evaluar si hay correlación entre los parámetros seminales de la rata, obtenido por microaspiración del epidídimo y el test del apareamiento.

Material y método

Fueron utilizadas 20 ratas más 20 ratas albinas del linaje Wistar, con edades durante el test de apareamiento de 70 días y peso medio de 260 g. Para el procedimiento de microaspiración del esperma del epidídimo, fueron utilizadas las 20 ratas, con edad de 160 días y peso medio de 368,4 g. Para el test de apareamiento fue utilizado el método de Poiley para 7 grupos, con apareamiento monogámico permanente, con duración de 14 semanas, compatible a la obtención de 4 gestaciones. La capacidad fértil de las hembras no eran conocidas, en ca-

so de no obtener ninguna gestación la pareja era eliminada de la muestra. Para la evaluación de la fertilidad se observó el número de gestaciones y el número de crías resultantes. En el procedimiento de microaspiración de esperma de la cola del epidídimo, los animales fueron sometidos a una vía de acceso longitudinal en el hemiescrotro izquierdo, con anestesia general. Se realizó la apertura de todos los planos hasta la exposición del testículo, seguido de sección del gubernáculo. Fue identificada la cola del epidídimo y utilizando un microscopio quirúrgico De Vasconcelos con aumento de 16 veces se realizó la presión de la cola del epidídimo con una pinza de microcirugía tipo iris, seguida de una incisión de la túnica epididimaria con exposición del conducto epididimario, seguida de una sección transversal completa del mismo. Se utilizó una micropipeta con capacidad de 5 microlitros, para la aspiración del esperma. Para el análisis de la motilidad y concentración de espermatozoides, el material aspirado fue colocado en un tubo de Ependorf conteniendo 200 ml de cloruro de sodio al 0,9%. La motilidad fue evaluada colocando 5 microlitros de Ependorf en una lámina de vidrio, para ser analizada en un microscopio de luz, con aumento de 200 veces. Los campos fueron rastreados en número de dos, para acumular cien espermatozoides sucesivos, clasificados en móviles e inmóviles, con auxilio de un contador de laboratorio. La medida de la concentración fue realizada con la colocación de 10 microlitros de ovoalbumina bovina en el tubo de Ependorf conteniendo la solución de cloruro de sodio y esperma, para eliminar los grumos de espermatozoides. El tubo fue colocado en una centrifuga durante 3 minutos, para homogeneizar la muestra. Cinco microlitros de muestra fueron colocados en la cámara de Makler (Counting chamber Makler-Seftl-Medical Instruments). Fueron hechos 3 conteos que se sumaron y dividieron por 3, obteniéndose una media simple. Este valor fue multiplicado por 20, como factor de corrección para la dilución hecha con el micropipetaje del esperma en el conducto epididimario. El valor obtenido correspondía a la concentración de espermatozoides por mililitro. Ambos testículos fueron sometidos a idénticos procedimientos. Los animales fueron sacrificados por exsanguinación, después de la recolección del semen. Para el análisis de la motilidad y concentración

espermática fue utilizado el test T de Student para muestras dependientes ($p < 0,05$). La correlación entre el número de crías con la motilidad y la concentración espermática fue realizada con $p < 0,05$. La correlación entre la motilidad y la concentración fue realizada con $p < 0,05$.

Resultados

El número total de gestaciones fue de 60 y como resultado hubo 636 crías, con una media de 3 gestaciones y 31,8 crías por animal. La motilidad de los espermatozoides tuvo una media de 59,6% en el testículo izquierdo (Fig. 1). La concentra-

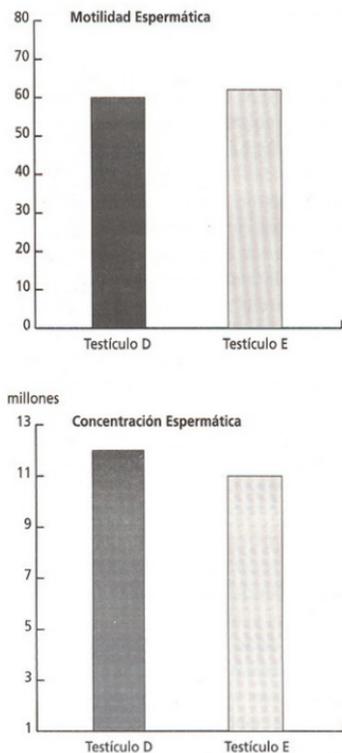


Fig. 1: porcentaje de espermatozoides móviles y concentración espermática ($10^6/ml$) en los testículos derechos e izquierdos.

ción espermática de la muestra tuvo un media de 12.260.000 espermatozoides /ml en el testículo izquierdo (Fig.1). Los resultados de la motilidad y concentración espermática se mantuvieron dentro de una curva de normalidad aceptable para el test T de Student. La correlación entre el número de crías con la motilidad y la concentración espermática obtuvieron niveles de significancia de 0,9606 y 0,4443 respectivamente. Para la correlación entre la motilidad y la concentración espermática se obtuvo un nivel de significancia de 0,9629.

Discusión

Este trabajo buscó comparar una técnica consagrada de evaluación de la fertilidad, el test de apareamiento, con una nueva técnica de obtención del esperma para el análisis de la motilidad y concentración espermática, evaluando sus relaciones. No existen en la literatura trabajos con este objetivo. El tipo de animal utilizado fue criteriosamente escogido, basado en numerosas publicaciones sobre la fertilidad utilizando el linaje Wistar^{3,4,14,18,19}. Los machos fueron sometidos al apareamiento en el período de edad con capacidad fértil, que es completa después de los 125 días, según la descripción de Robb¹⁹. Las hembras fueron igualmente escogidas en edad, apta para la reproducción, según el protocolo del Bioterio Central de la Universidad Federal de Santa Catarina 20. El test de fertilidad escogido fue el test de apareamiento, por ser el más utilizado en la literatura^{2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15} siendo práctico, confiable y de fácil reproductibilidad. La inseminación artificial exige una técnica depurada y material especializado, siendo cara y difícil de reproducir en la práctica¹⁶.

El test de apareamiento o método de Pooley²⁰, fue utilizado por razones económicas y porque neutraliza las consecuencias perjudiciales del aislamiento de los animales en el espacio, cuando se realiza su tratamiento en las cajas. Los apareamientos son realizados de manera sistemática, de forma que, con una colonia menor, mayor es el número de grupos, tratando de mantener el índice de consanguinidad por debajo del 1% por generación. Algunos autores que utilizaron el test de apareamiento, al variar la metodología, no obtuvieron correlación entre los distintos resultados. Esta diversidad se debe al número de hem-

bras utilizadas, al tiempo de apareamiento y al método de evaluación del producto final del test: embriones o crías.

Ryan¹⁴ y Merimsky², utilizaron una hembra para cada macho. Las hembras tenían capacidad fértil conocida, que implica un mayor gasto en tiempo, para seleccionar las hembras. Banik y col.⁵, Magdar y col.⁶ por otro lado, utilizaron una hembra para cada macho, pero sin capacidad fértil comprobada. Se sabe que, el factor masculino y el femenino son necesarios para la gestación. La posibilidad de una hembra infértil podría cuestionar la confiabilidad del trabajo. Debido a tal agravante este estudio eliminó la pareja al momento en que no obtenía gestación. Otros autores^{3,7,8,11,12,13,14,15} utilizaron dos o tres hembras por macho durante el test de apareamiento. Esto disminuyó mucho la probabilidad de una hembra infértil, pero aumentó el gasto en animales y el número de crías. Consecuentemente hay un aumento en los costos de la investigación, mayor dificultad en el manejo y gran cantidad de sacrificio de animales.

Respecto al tiempo de apareamiento, se observó una variación entre los trabajos de 7, 14, y 23 días⁸. En los estudios de evaluación por apareamiento hubo también divergencias entre la metodología. Los más realizados son sacrificio y posterior laparotomía para conteo de embriones^{9,10,11,12,14} y parto normal con conteo de crías³. Este estudio optó por el conteo de las crías, para eliminar el procedimiento quirúrgico y poder utilizar hembras y crías en otros experimentos.

Debido a los nuevos conceptos de bioética que preconizan el uso racional de los animales de experimentación, bajando los gastos y economizando del número de animales, el test de apareamiento es un método desde el punto de vista biótico sobrepasado ya que el número de animales sacrificados es extremadamente alto. Hay necesidad por lo tanto, de utilizar un método más racional, pero que mantenga la especificidad del test de apareamiento. Como la técnica de microaspiración del esperma de la cola del epidídimo corresponde a un método racional y práctico, se necesitaba evaluar la especificidad de este método. Como es sabido que el número y la concentración espermática no corresponde completamente a la capacidad fértil del animal, debido a que pueden interferir otros factores.

Los resultados referentes a motilidad y concentración espermática fueron semejantes con la técnica de micorraspiración de esperma descripta¹⁸, sin diferencias significativas, mostrando que es reproducible.

Al analizar la correlación entre el número de crías con la motilidad y la concentración espermática, no se observó ninguna asociación. Tampoco fue observada asociación alguna al correlacionar la motilidad y la concentración espermática, demostrando que la microaspiración del esperma de la cola del epidídimo es una técnica práctica, pero no se presta para la obtención de una relación entre la motilidad y concentración espermática con la capacidad fértil del animal. Por lo tanto, no hay correlación entre los parámetros seminales de la rata, obtenidos por la técnica de microaspiración del epidídimo con el test de apareamiento.

Bibliografía

1. Jequier AM, Ukombe EB: Error inherent in performance of a routine semen analysis. *Br J Urol* 55(4):434-436, 1983.
2. Merimsky E, Rock M, Katz S: Assessment of fertility after testicular torsion: an experimental study. *Urol Res* 10:51-54, 1982.
3. Sofikitis N, Takahashi C, Nakamura I et al: Surgical repair of secondary right varicocele in rats with primary left varicocele: effects on fertility, testicular temperature, spermatogenesis and sperm maturation. *Arch Androl* 28(1):43-51, 1992.
4. Ryan PC, Whelan CA, Gaffney EF et al: The effect of unilateral experimental testicular torsion on spermatogenesis and fertility. *B J Urol* 62:359-366, 1988.
5. Banik UK, Givner ML: Effects of a luteinizing hormone-releasing hormone analog on mating and fertility in rats. *Fertil Steril* 27(9):1078-1084, 1976.
6. Madgar I, Lunenfeld B, Mashiach S et al: Effect of testicular torsion on contralateral testis and fertility in mature rats. *Arch Androl* 19:237-241, 1987.
7. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M et al: Spermatic cord torsion: effects of cyclosporina and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. *J Androl* 11(5):401-408, 1990.
8. Kogan BA, Gupta R, Juenemann KP: Fertility in cryptorchidism: improved timing of fixation and treatment in an experimental model. *J Urol* 138:1046-1047, 1987.
9. Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN et al: The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. *J Urol* 144:366-369, 1990.
10. Kamada K, Takihara H, Shirataki S et al: Flow cytometric DNA analysis demonstrates contralateral testicular deterioration in experimental unilateral testicular torsion of prepubertal rats. *Androl* 25:239-244, 1993.
11. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R et al: Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *J Androl* 7:23-31, 1986.
12. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R et al: Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol* 133:....
13. Heindel RM, Pakyz RE, Cosentino MJ: Spermatic cord torsion. Contralateral testicular degeneration at various ages in the rat. *J Androl* 11 (6):506-13, 1990.
14. Stewart RJ, Brown S: Fertility in experimental unilateral cryptorchidism. *J Pediatr Surg* 25(6):672-674, 1990.
15. Cosentino MJ, Rabinowitz R, Valvo JR et al: The effect of prepubertal spermatic cord torsion on subsequent fertility in rats. *J Androl* 5:93-98, 1984.
16. Young JA, Kwok-Sing C, Lang DJ: Infection and fertilization of mice after artificial insemination with a mixture of sperm and murine cytomegalovirus. *The Journal of Infectious Diseases* 135(5):837-840, 1997.
17. Howards SS, Johnson A, Jessee S: Micropuncture and micro-analytic studies of the rat testis and epididymis. *Fert Steril* 26:13-19, 1975.
18. Araújo EJ: Efeitos da torção do cordão espermático sobre os parâmetros seminais do testículo contralateral em ratos pré-puberis. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para a obtenção do título de doutor em medicina. São Paulo, 1998.
19. Robb GW, Amann RP, Killian GJ: Dailt sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats.. *J Reprod Fert* 54:103-107, 1978.
20. Manual para técnicos em animais de laboratório. Fundação Fio Cruz. Rio de Janeiro, 1994.

Trabajo presentado en el 3º Congreso del CIPESUR, Viña del Mar, Chile, 1998.

Dr. Edevar J. de Araujo
Hospital Infantil Joana de Guzmão
Rua Rui Barbosa 152
99025301-CP3081
Florianópolis ASC
Brasil