

Microaspiración del espermatozoide para estudio seminal en ratas

Drs. E. Santos Lima, A.L. Weber, A.L.B. Bordin, A.J. D'Acampora, V. Ortiz, J.A. Sousa, M.I. Perina, P. Goldberg, E.R. Quaresma, M.C. Capella, E.K. Araújo

Laboratorio de Técnica Operativa y Cirugía Experimental de la Universidad Federal de Santa Catarina y Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, Brasil.

Resumen

Los intentos de medir la función exócrina testicular en modelos animales de experimentación resultaron en una diversificación de métodos de muy difícil comparación y reproducibilidad.

La presente investigación tiene como objetivo verificar el valor de la técnica de microaspiración del espermatozoide en la cola del epidídimo de la rata, evaluando sus parámetros seminales. Fueron utilizadas 35 ratas albinas, de la variedad Wistar de 150 días de edad. Se desarrolló una técnica para la microaspiración del espermatozoide en la cola del epidídimo. La motilidad y concentración de los espermatozoides de ambos testículos de cada animal fueron analizados con el test T de Student para las muestras dependientes ($p < 0.05$), según la concentración y motilidad espermática. La técnica de microaspiración de la cola del epidídimo permite un adecuado acceso, confiable y de fácil ejecución.

Palabras clave: Rata-Semen-Testículo

Summary

Trials to measure testicular exocrine function in experimental animals models have results in a diversification of methods creating difficulty to compare and reproduce results. The aim of our work consisted in verifying the value of the technique of microaspiration of sperm

from the rat tail. Thirty-five color-blinded Wistar rats with 150 days of age were used. We developed a technique to aspirate sperm from the rat tail. Motility and sperm concentration of both testes was analyzed using student-t-test ($p < 0.05$). Our technique of microaspiration permits adequate access, is dependable and of easy reproduction.

Index words: rats - sperm - testicles

Resumo

Em nível experimental, tentativas de medir a função exócrina testicular, principalmente em ratos, tem resultado em uma diversificação de métodos. A função exócrina do testículo caracteriza-se pela espermatogênese, principal fator responsável pela reprodução. Essa função pode ser avaliada por métodos diretos e indiretos. Como no homem o parâmetro mais comum de avaliação desta função, é

através do espermograma, necessita-se obter um método animal semelhante, possibilitando alguma correlação clínico-experimental. O presente estudo busca verificar o valor da técnica de microaspiração do espermatozoide para o estudo dos valores seminais do rato. Foram utilizadas 35 ratos albinos machos, da linhagem Wistar com idade de 150 dias. Utilizou-se a técnica de la microaspiração de espermatozoides da cauda do epidídimo do rato. Os dados referentes aos testículos direito e esquerdo de cada animal foram analisados segundo concentração e motilidade espermática, pelo test T de Student para amostras dependentes, com um ($p < 0.05$) segundo concentração e motilidade espermática. Conclui-se que a técnica de microaspiração da cauda do epidídimo permite acesso ao espermatozoide adequada, confiável, rápida e de fácil execução.

Palavras Chaves: Rato-Semen-Testículo

Introducción

La exacta evaluación de las funciones de un órgano es de vital importancia, tanto en el aspecto clínico como en los estudios experimentales. El testículo desempeña dos importantes funciones fisiológicas: endócrina y exócrina^{2,3}. La función exócrina se caracteriza por la espermatogénesis, principal factor responsable de la reproducción. La evaluación de la función exócrina del testículo implica el estudio de la fertilidad en el hombre a través de los parámetros seminales^{1,2,3}. En la rata esta función puede ser evaluada por un método directo, a través del análisis de los parámetros seminales y por métodos indirectos como los estudios histológicos, el peso testicular, la fertilidad por apareamiento, el dosaje de anticuerpos, hormonas, y ADN de las células testiculares mediante técnicas morfométricas. Varios estudios asociaron más de un método experimental para esta evaluación^{4,5,6}. En dichos experimentos hubo una gran variación metodológica en el análisis de la función exócrina testicular y en los resultados obtenidos. Sería interesante desarrollar en el animal un estudio semejante al espermograma, posibilitando una correlación clínico-experimental. La mejor forma de evaluar la espermatogénesis es la evaluación directa del semen de la rata. Para permitir un acceso práctico y confiable al semen de la rata fue desarrollada una técnica de aspiración del esperma del conducto seminífero utilizando micropipetas de laboratorio, una variante de la micropunción. El objetivo de este estudio es evaluar la técnica de microaspiración del esperma para el estudio de los valores seminales de la rata y determinar la confiabilidad del método.

Material y método

Fueron utilizadas 35 ratas albinas del linaje Wistar de 15 días de edad y peso medio de 366 g. Los animales fueron anestesiados y sometidos a una vía de acceso longitudinal en el hemiescrotro izquierdo. Se realizó apertura de todos los planos hasta exponer el testículo, seguido de sección del gubernáculo. Fue identificada la cola del epidídimo y utilizando un microscopio quirúrgico (De Vasconcelos®) con 16 aumentos 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, completando la sección

transversal completa del mismo. Con una micropipeta con capacidad de 5 microlitros, se efectuó la aspiración del esperma. El material aspirado fue colocado en un tubo de Ependorf conteniendo 200 µL de cloruro de sodio al 0,9%, mantenido a una temperatura de 37°C para el análisis de la motilidad y concentración de los espermatozoides. La motilidad de los espermatozoides fue evaluada colocando 5 microlitros de esperma en una lámina de vidrio, para ser analizada en un microscopio de luz, con un aumento de 200 veces. Los campos fueron rastreados en número de dos, para acumular una centena de espermatozoides sucesivos, clasificados en móviles e inmóviles, con auxilio de un contador de laboratorio. La medida de la concentración de espermatozoides 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 agitador de laboratorio durante 3 minutos, para homogeneizar la muestra. Se tomaron cinco microlitros que fueron colocados en una cámara de Makler (Counting chamber Makler-Seftl-Medical Instruments). Fueron realizados 3 conteos obteniéndose una media simple de los mismos este valor fue multiplicado por 20, como factor de corrección para la dilución hecha en la micropipeta del esperma del 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 exanguinación, inmediatamente luego de la recolección de semen. Para análisis de los resultados se utilizó la prueba T de Student para muestras dependientes ($p < 0,05$).

Resultados

La motilidad media de los espermatozoides fue de 60,57% en el testículo derecho y 62,17% en el izquierdo, con un desvío estándar de 13,24 y 11,62 respectivamente (Fig. 1). La concentración espermática de la muestra tuvo un media de 10.551.428 espermatozoides /mL en el testículo derecho y 9.920.000 espermatozoides /mL en el testículo izquierdo con un desvío de 7.952.680 y 5.661.580 respectivamente (Fig.2). Los resultados para la motilidad y la concentración se mantuvieron dentro de la curva de normalidad aceptable para el sistema estadístico utilizado.

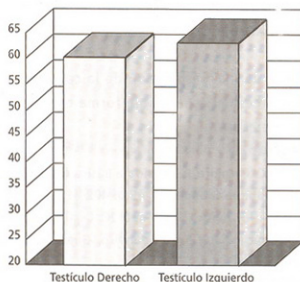


Fig. 1: motilidad de los espermatozoides, comparando ambos testículos.

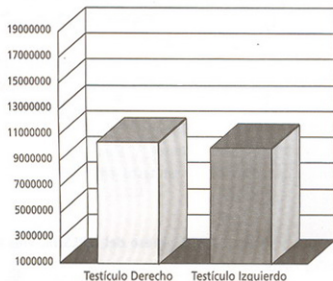


Fig. 2: concentración de los espermatozoides, comparando ambos testículos.

Discusión

Este estudio se diferencia de otros precedentes^{6,7} por el sistema de recolección del semen en la rata. Fueron utilizadas ratas del linaje Wistar basándose en otros trabajos que utilizaron este linaje para el estudio de la función exócrina testicular, o la edad de 150 días para asegurar la maduración sexual. Los estudios histológicos por microscopía óptica o electrónica

no son específicos para prever la capacidad fértil en virtud de la heterogeneidad del tejido testicular. Las evaluaciones histológicas traducen como máximo un aspecto de la maduración espermática y no una medida de la producción de espermatozoides. Otros tests como dosaje de hormonas y medida de producción diaria de espermatozoides y dosaje de ADN de las células testiculares con índice de espermatogénesis, necesitan de técnicas o equipamiento sofisticado, elevando el costo y es mayor el tiempo necesario para cada experimento, además de las dificultades de reunir técnicas y equipos apropiados.

Es conocido que los parámetros seminales no traducen completamente la capacidad reproductora del animal, porque ella depende principalmente de la capacidad fértil del espermatozoide, que se evalúa de otra forma. Entretanto, métodos de evaluación semejantes podrían permitir en el futuro posibles correlaciones, en tanto los estudios experimentales buscarían un método de evaluación más práctico y como consecuencia, la agilitación de las pesquisas sobre fertilidad.

La obtención del semen a través de la electroeyacuación no resultó efectiva por las dificultades para la obtención del mismo, a pesar de la estimulación repetida, por otra parte la relación conteo versus volumen no es confiable. Además no permite ninguna información respecto de la función exócrina de un testículo en forma individual.

Las pruebas de fertilidad por impregnación vaginal sólo detectan la presencia de espermatozoides, pero no permiten análisis cuantitativo. El apareamiento permite evaluar la función final del testículo exócrino, pero no permite un estudio de los testículos por separado y no permite una correlación con los estudios clínicos.

La obtención del semen de la rata, a través del lavado y recolección del deferente, sería la mejor forma de evaluación individual de la función exócrina de cada testículo, midiendo la cantidad y calidad de los espermatozoides producidos, pero no es un método práctico o de fácil reproducción. La técnica de micropunción y cateterización de los túbulos seminíferos se realizó con micropipetas con puntas de 10-40 micrones de diámetro que, con el auxilio del microscopio, se introducían en la luz de los túbulos para tomar las muestras. Howards⁸ observó que el "espermatozoides" de la cola del epidídimo es superior al de los túbulos seminíferos, proponiendo la utilización de esta técnica para el estudio de los túbulos seminíferos y del epidídimo porque facilitan y

aceleran las investigaciones respecto a fisiología de la reproducción masculina.

Turner⁵ observó que el inicio de la motilidad espermática dependía de la adición de soluciones iónicas situadas entre la hiper y la hiposmolaridad, observando además que luego de exponer los conductos de la cola del epidídimo y seccionándolos en forma incompleta y transversal, se producía la inmediata exteriorización de semen de la rata. Entonces con el auxilio de un microscopio quirúrgico y de una micropipeta de laboratorio de análisis, el material fue aspirado y analizado. En lugar de una micropunción, se realiza una microaspiración. La obtención del semen con maniobras suaves, y su colocación en 200 microlitros de una solución salina mantenida a 37°C y su análisis entre lámina y laminula dentro de un cierto tiempo, hizo posible evaluar la motilidad de los espermatozoides. Analizándose 100 células y separándolas en móviles e inmóviles, se obtiene el porcentual de motilidad de los espermatozoides. Posteriormente el material se coloca en la cámara de Makler, y se realiza un conteo como el de un espermograma, obteniéndose la concentración de los espermatozoides de la rata, bastando apenas corregir los factores de dilución de la muestra. Se obtuvo con relativa facilidad y practicidad la recolección de los espermatozoides directamente, a través de la sección del epidídimo y la aspiración con micropipetas, consiguiendo espermatozoides en número y motilidad adecuadas. La muestra se comportó uniformemente, quedando los resultados tanto de la motilidad como de la concentración espermática dentro del espectro normal esperado por la prueba estadística.

La mediana de la diferencia de los resultados del testículo derecho e izquierdo, tanto para la motilidad como para la concentración se mantuvieron próximas al cero, mostrando pequeñas diferencias entre los resultados. Con el análisis estadístico de motilidad y concentración espermática, se obtuvo un $t = 0,555$; $p = 0,581$ y $t = 0,434$; $p = 0,666$ respectivamente. Mostrando que las diferencias de los resultados no son estadísticamente significativas. Resta ahora superar más de una etapa den-

tro de la misma línea, verificar si los parámetros seminales pueden ser correlacionadas con otras formas de evaluación del testículo exócrino, como el test de apareamiento.

La técnica de microaspiración de la cola del epidídimo permite acceso al espermatozoide de forma confiable, rápida y de fácil ejecución.

Bibliografía:

1. Junqueira LC, Carneiro J: Histología Básica (ed.3). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1974, pp 402-417.
2. Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC: Cecil Tratado de Medicina Interna. (ed.19) Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993, vol. 2 pp 1360-1365.
3. Ryan PC, Whelan CA, Fiszpatrick JM: The vas deferens count: a new accurate method for experimental measurement of testicular exocrine function Eur Urol 14:156-159, 1988.
4. Ryan P.C, Gorey TF, Fiszpatrick JM: Experimental testicular torsion: fixation without parenchymal trauma. Eur Urol 14: 141-144, 1988.
5. Turner TT, Howards SS: Factors involved in the initiation of sperm motility. Biol Reprod 18:571-578, 1978.
6. Robb GW, Amann RP, Killian GJ: Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. J Reprod Fert 54: 103-107, 1978.
7. 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.
8. Howards S.S, Johnson A, Jessee S: Micropuncture and microanalytic studies of the rat testis and epididymis. Fert Steril 26: 13-19, 1975

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

Dr. E. Santos Lima
Hospital Infantil Joana de Guzmão
Rua Rui Barbosa 152
99025301-CP3081
Florianópolis ASC
Brasil