Estructura Testicular y Calidad Seminal en Ratones Seleccionados por Peso

Testicular Structure and Semen Quality in Mice Lines Selected for Weight

*Sandra Bernardi; **Guillermo Brogliatti & ***María Inés Oyarzabal

BERNARDI, S.; BROGLIATTI, G. & OYARZABAL, M. I. Estructura testicular y calidad seminal en ratones seleccionados por peso. *Int. J. Morphol.*, 28(3):673-680, 2010.

RESUMEN: La capacidad reproductiva femenina se modificó como consecuencia de la selección de peso realizada en un par de líneas de selección divergente durante 50 generaciones (s: bajo peso; s': alto peso), originadas a partir de una población testigo (t) de ratones CF1 y criadas en la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNR). Se probó la existencia de diferencias reproductivas atribuibles al genotipo paterno observadas en el tamaño de camada al nacimiento y en los días transcurridos desde el ingreso a servicio hasta la parición. Con el propósito de explicar las diferencias se comparó la estructura testicular - peso testicular (PTEST), diámetro del túbulo seminífero (DTS), altura de su epitelio (AES) - y la calidad seminal - número de espermatozoides (NE), porcentaje de células anormales (AN), motilidad y desplazamiento de las células espermáticas (Parámetros CASA) -, en machos adultos de 10 a 14 semanas de edad. Se estimó el promedio del DTS y AES en 100 túbulos seminíferos por individuo. El semen se obtuvo de la porción caudal de los epidídimos y de los conductos deferentes. El recuento de espermatozoides se realizó en cámara de Neubauer hemocitométrica y el porcentaje de células anormales se calculó sobre 100 espermatozoides por extendido. Los parámetros de motilidad se determinaron con analizador computarizado de semen Ceros 12.1. La selección por peso diferenció significativamente a las líneas en el mismo sentido de la selección practicada para PTEST, AES y NE. Los machos de la línea más pesada (s') presentaron PTEST y AES mayores y tuvieron un mayor número de espermatozoides al compararlos con los de las líneas s y t ($p < 0,05$). La calidad del semen, bajo las condiciones del *setup* utilizado, fue similar para los machos de las tres líneas. Por lo tanto, la calidad del semen no aportó a la explicación de las diferencias de fertilidad masculina entre las líneas.

PALABRAS CLAVE: Peso testicular; Túbulo seminífero; Calidad seminal; Parámetros CASA; Fertilidad masculina; Selección de peso; Ratones.

INTRODUCCIÓN

En la producción pecuaria, el macho es responsable de múltiples preñeces en servicio natural y de cientos de millares en inseminación artificial, motivo por el cual, el conocimiento de su capacidad reproductiva - condicionada por el proceso de espermatogénesis - adquiere relevancia en la selección de los reproductores. El tamaño de los testículos, la producción de esperma y el porcentaje de espermatozoides de morfología y motilidad normal son importantes indicadores de fertilidad (Foote, 2002). La concentración espermática está relacionada directamente con la tasa de dilución y el número de dosis por eyaculado, y la morfología de los espermatozoides

permite identificar reproductores de baja calidad que se descartan como donantes en programas de inseminación artificial, técnica ampliamente utilizada en algunas especies de interés económico (Rodríguez-Martínez & Ericsson, 2000). Más recientemente, la aparición de sistemas de análisis computarizado permitió conocer características del desplazamiento de los espermatozoides como tipo de movimiento, velocidad y trayectoria de los mismos (Brogliatti, 2005). Se han encontrado, en distintas especies, relaciones significativas entre aspectos del movimiento de los espermatozoides y la penetración en el moco cervical y la fertilización tanto *in vitro* como *in vivo* (Mortimer, 1997;

* Cátedra de Histología I y Embriología Básica. Fac. Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

** Actividad Privada. Venado Tuerto, Argentina.

*** Cátedra de Producción de Carne Bovina. Fac. Cs. Veterinarias y Consejo de Investigaciones, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Tardiff *et al.*, 1999). Pero también, otros autores señalan que los parámetros seminales como la motilidad, morfología y la concentración espermática son insuficientes, no solamente para predecir la fertilidad sino también para identificar individuos subfértiles (Petrunkina *et al.*, 2007; Holt & Van Look, 2004).

La capacidad reproductiva puede alterarse por factores ambientales. En ratones, la exposición a ambientes hipóxicos, ciertos trastornos nutricionales como la anorexia nerviosa, el consumo crónico de alcohol, la administración de agroquímicos, ocasionaron la destrucción del epitelio germinal, modificaron la estructura tubular, alteraron el transporte de los espermatozoides y la maduración de los gametos, etc. (Bustos Obregón *et al.*, 2005; Martini *et al.*, 2004; van Thiel *et al.*, 1979; Adams *et al.*, 1997; Calleja *et al.*, 1997; Bustos Obregón *et al.*, 2007).

La relación entre la capacidad reproductiva y la respuesta a la selección genética de caracteres productivos, ha sido menos estudiada en machos que en hembras (Fowler & Edwards, 1960; Roberts, 1961; Bradford, 1971; Brien, 1986; Bünger *et al.*, 1992, 2005). Los machos de una línea de ratones seleccionados para alto peso demostraron tener una menor libido, que podía conducir a una demora del nacimiento de la primera camada o a la esterilidad, cuando se los comparó con machos de una línea no seleccionada, mediante cruzamientos con hembras de la línea de alto peso (Fowler & Edwards). Otras líneas de ratones con alto potencial genético para crecimiento postdestete, mostraron una reducción del tamaño de los testículos, de la producción de espermatozoides por gramo de testículo y de la motilidad, comparadas con una línea control (Berger *et al.*, 1989).

En la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNR), se desarrolló un modelo experimental consistente en una línea no seleccionada de ratones CF1 (t) y en un par de líneas de selección divergente de peso, a los 49 días de edad, derivada de la primera. Se demostró que la selección continua e intensa realizada durante 50 generaciones provocó un deterioro de la aptitud general de estos animales (Oyarzabal & Rabasa, 1995) y modificó la fertilidad femenina en variables tales como: rendimiento reproductivo, edad a la apertura vaginal, porcentaje de pariciones (Bernardi *et al.*, 1999), número y tamaño de folículos ováricos y número de cuerpos lúteos (Bernardi *et al.*, 2009).

En el presente trabajo, se analizó si la selección de peso a largo plazo deterioró la fertilidad de los machos de las líneas mencionadas. Se evaluó el efecto fertilidad del macho mediante cruzamientos de machos de las tres líneas con hembras t. Se comparó la estructura testicular -peso testicular, diámetro del túbulo seminífero y altura de su

epitelio- y la calidad seminal -número de espermatozoides, porcentaje de células anormales, motilidad y desplazamiento de las células espermáticas- con el propósito de explicar las diferencias de fertilidad atribuibles al genotipo del macho.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales experimentales. En 1986, a partir de una población de ratones de la cepa CF1 existente en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR, se formó una población testigo (t) no seleccionada con apareamientos al azar. Posteriormente, con animales de la generación 3 de t, se fundó un par de líneas de selección divergente para peso corporal a los 49 días de edad (P), s': línea de selección positiva y s: línea de selección negativa (Oyarzabal & Rabasa, 1995; 1999). La selección por peso se realizó eligiendo como reproductores los animales de pesos más extremos (los más pesados en s' y los más livianos en s) y de buen aspecto general.

En el presente trabajo se utilizaron machos adultos (75 a 90 días de edad) pertenecientes a las generaciones 47 a 50 de t y 44 a 48 del par s. El manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo con las normas éticas pautadas en Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical (AVMA, 2007). Se les suministró agua *ad-libitum* y un alimento comercial para ratón con 25% de proteínas, el ambiente se mantuvo a una temperatura media de 21 ± 2°C.

Cruzamientos. Con el objetivo de estimar la fertilidad masculina atribuible a cada uno de los genotipos, se cruzaron machos s, s' y t con hembras t. En todos los casos los planteles fueron monogámicos (1_1_) y se siguieron seis parejas por cruzamiento (t x s, t x s', t x t) desde el ingreso a servicio hasta la primera parición. Se registraron el número de crías nacidas por pareja (TC), los días transcurridos desde el ingreso a servicio hasta la parición (D) y el coeficiente de fertilidad ($CF = (7 \times TC) / (D + 21)$) (Rabasa & Font, 1963).

Peso y estructura testicular. Se comparó el peso y la estructura testicular básica de los machos de las tres líneas, en 15 animales adultos por línea, elegidos al azar. Después del sacrificio, se extirparon ambos testículos, se despojaron de la grasa circundante y se calculó el peso promedio de los mismos por animal expresado en gramos (PTEST). Los testículos se fijaron por inmersión en una solución al 10% de formaldehído tamponado con fosfato bisódico anhidro y fosfato monosódico monohidratado, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes histológicos seriados a 4µm y se

colorearon con hematoxilina-eosina. En 100 túbulos por animal se calculó el promedio del diámetro mayor (DTS) y el promedio de la altura del epitelio que recubre la luz de los mismos (AES), ambas variables se expresaron en micrómetros.

Calidad seminal. La concentración, morfología y motilidad de los espermatozoides fue analizada en muestras de semen provenientes de los vasos deferentes y de la cola de los epidídimos, dado que en los primeros, se observa una baja concentración pero una alta motilidad, mientras que en los últimos se encuentra una buena concentración espermática y también una buena motilidad (Sztein *et al.*, 2000).

El recuento de espermatozoides por mililitro de semen y el porcentaje de células espermáticas anormales se realizó sobre el semen obtenido de 15 machos adultos por línea. Para tales efectos la región más caudal de los epidídimos y los conductos deferentes se colocaron en una placa de Petri con 2ml de solución de NaCl al 0.9% durante 24 horas a 4°C. Con una aguja 30G se realizaron diversas incisiones a fin de facilitar la dispersión del esperma y el recuento de espermatozoides se realizó en cámara hemocitométrica de Neubauer siguiendo el procedimiento utilizado para el conteo de glóbulos rojos. La cantidad de espermatozoides por macho se expresó en millones/mililitro de suspensión (NE). La morfología se evaluó en alícuotas de suspensión fijadas en formol y extendidas en un portaobjetos, las que se colorearon con eosina y se examinaron bajo microscopio óptico a 1000 aumentos. Por cada macho se analizaron 100 espermatozoides identificando normales y no normales (AN) (Bustos-Obregón *et al.*, 2005; De la Cruz Ramírez *et al.*, 2004; Sobarzo & Bustos-Obregón, 2000). Las células consideradas morfológicamente anormales fueron aquellas que presentaron cabeza triangular, colapsada o en martillo, presencia de curvatura a nivel de la pieza intermedia, cola rectilínea o con curvatura (en distintos grados) tanto en la porción media como distal de la misma (Kawai *et al.*, 2006).

Fig. 1. Razones entre las velocidades de los espermatozoides

Los parámetros de motilidad de los espermatozoides se valoraron a partir del semen obtenido de 30 animales adultos de la línea t, 27 de s y 23 de s'. Los epidídimos caudales y conductos deferentes se colocaron en una placa de Petri conteniendo 1ml de medio HOLDING Plus (BIONICHE, Pullman, WA, USA) y la dispersión del esperma se facilitó practicando varias incisiones con una aguja 30G. Las placas con el material detallado se mantuvieron a 37° C en baño María por 10 minutos. Se cargó una alícuota de cada muestra en una cámara de Makler de 20 ml y se analizaron 6 campos microscópicos. Sólo se tuvieron en cuenta para el estudio las muestras que contaron al menos con 1000 espermatozoides totales. Los parámetros de motilidad (Parámetros CASA: Computer Assisted Semen Analysis) se estimaron utilizando un analizador Ceros 12.1 (Hamilton Thorne, Biosciences, Inc., Beverly, MA, USA). La población de espermatozoides analizados se limitó sólo a aquellos que reunieron los valores estipulados por el *setup* Mouse 2 (Hamilton Thorne Biosciences, 2002).

Las variables estudiadas fueron:

- Porcentaje de espermatozoides motiles (%MOT): porcentaje de células que tienen movimiento.
- Porcentaje de espermatozoides progresivos (%PRO): porcentaje de células que siendo mótils, describen un desplazamiento hacia adelante.
- Velocidad curvilineal (VCL): velocidad calculada sobre el camino real del espermatozoide entre dos puntos, expresada en micrones por segundo. Describe la motilidad real de los espermatozoides (Fig. 1).
- Amplitud lateral de la cabeza (ALH): distancia promedio del desplazamiento de la cabeza desde la posición media del camino, expresada en micrones.
- Frecuencia de batido (BCF): frecuencia de los movimientos laterales de la cabeza del espermatozoide, expresada en Hertz (Hz).
- Velocidad lineal (VSL): velocidad del espermatozoide sobre una línea recta entre dos puntos medida en micrones por segundo (Fig. 1).
- Velocidad promedio en su trayectoria (VAP): velocidad promedio del espermatozoide sobre el camino real entre dos puntos de su trayectoria, expresada en micrones por segundo (Fig. 1).

$$STR = \frac{VSL}{VAP} \times 100$$

$$LIN = \frac{VSL}{VCL} \times 100$$

— VCL - - VAP VSL

P₁ y P₂ puntos de la trayectoria

-Rectitud (STR= (VSL/VAP)*100): desviación de la velocidad promedio a la velocidad en línea recta expresada en porcentaje.

-Linearidad (LIN= (VSL/VCL)*100): desviación de la velocidad del camino real a la velocidad en línea recta expresada en porcentaje.

Los parámetros VCL, ALH y BCF se consideraron medidas que reflejan el vigor de los espermatozoides, y los parámetros VSL, STR y LIN la progresividad, según la categorización realizada por Cancel *et al.* (2000).

Análisis realizados. Debido a la asimetría de las distribuciones de las variables se debió transformar a raíz cuadrada para realizar las pruebas de hipótesis correspondientes (Sokal & Rohlf, 1979). Se estimaron los promedios y errores estándar de las variables PTEST, DTS, AES, NE, AN, %MOT, %PRO, VCL, ALH, BCF, VSL, VAP, STR, LIN. Se calculó el coeficiente de regresión de Ptest en P (variable independiente), de DTS y AES en PTEST (variable independiente) y de NE en PTEST (variable independiente).

Se probó si existían diferencias significativas entre las líneas mediante la aplicación de análisis de la variancia a un criterio de clasificación y pruebas de comparaciones múltiples HSD de Turkey-Kramer. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa JMP en su versión 5.0 para Windows (JMP®, SAS Institute, 2003).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los cruzamientos realizados para probar si existían diferencias de la fertilidad masculina atribuibles al genotipo del macho se muestran en la Tabla I. La prueba de comparaciones múltiples evidenció diferencias significativas entre los promedios de las líneas para las tres variables estudiadas. Cuando las hembras se cruzaron con machos t produjeron un mayor TC en menor tiempo y por lo tanto obtuvieron un mayor CF, aunque no significativamente diferentes de los de los cruzamientos t x s'. Teniendo en cuenta que la duración del ciclo estral en el ratón es, en promedio, de 4 días y la gestación de 21, el servicio de machos t provoca la concepción prácticamente en el primer celo de la hembra (D=23), mientras que con servicio

s', las hembras se preñan en el segundo o tercer celo (D=29). Los machos s duplican el tiempo de permanencia en servicio hasta que se logra la concepción con respecto a los machos t.

Al comparar los pesos de los testículos de los machos de las tres líneas se observó que los de la línea s' tuvieron testículos significativamente más pesados ($p<0,05$) que los de las otras dos (Tabla II). En relación a la estructura histológica de los testículos, no se evidenciaron diferencias significativas entre las líneas al comparar el diámetro de los túbulos, pero sí al evaluar la altura de su epitelio. Los machos s' tuvieron la mayor altura del epitelio seminífero, los de la línea s la menor y los de la línea t una intermedia entre la de los machos de las líneas seleccionadas (Tabla II).

Las estimaciones de los coeficientes de regresión entre el peso de los testículos y el peso corporal del animal, entre el diámetro de los túbulos seminíferos y el peso testicular, y entre la altura de los túbulos y el peso de los testículos, evidenció que el peso testicular está significativa y positivamente relacionado con el peso corporal, y el diámetro de los túbulos seminíferos con el peso testicular en las tres líneas (Tabla III).

El recuento de espermatozoides por mililitro de semen para cada línea se muestra en la Tabla IV. Los animales de la línea no seleccionada tuvieron un número intermedio entre los de las líneas seleccionadas, el número de espermatozoides fue significativamente mayor ($p<0,05$) en los animales seleccionados para alto peso corporal. Mientras que el número de espermatozoides con anomalías morfológicas por cada 100 no difirió significativamente entre las líneas (Tabla IV).

Se encontró una relación significativa ($p<0,05$) entre el número de espermatozoides por mililitro de semen y el peso de los testículos para los individuos de las tres líneas: bt=396,99, bs=1501,48 y bs'=661,07.

El análisis de la variancia efectuado sobre los parámetros CASA no arrojó diferencias significativas indicando que la calidad seminal fue similar en los machos de las tres líneas para el grupo de espermatozoides analizados según las condiciones del *setup* utilizado (Tabla V).

Tabla I. Promedios y errores estándar de tamaño de camada, días desde el ingreso a servicio hasta la parición y coeficiente de fertilidad.

Cruzamiento	TC $\pm$ ES	D $\pm$ ES	CF $\pm$ ES
t x s	8,67 $\pm$ 0,71 b	50,67 $\pm$ 11,08 a	0,97 $\pm$ 0,19 b
t x s'	10,80 $\pm$ 0,66 ab	29,00 $\pm$ 3,00 ab	1,54 $\pm$ 0,12 ab
t x t	12,17 $\pm$ 0,91 a	23,00 $\pm$ 0,44 b	1,94 $\pm$ 0,15 a

TC: tamaño de camada. D: días desde el ingreso a servicio hasta la parición, CF: coeficiente de fertilidad

Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas, $p<0,05$

Tabla II. Promedios y errores estándar de peso corporal, peso testicular, diámetro del túbulo y alto del epitelio seminífero en tres líneas de ratones.

LINEA	P ± ES	PTEST ± ES	DTS ± ES	AES ± ES
<i>t</i>	30.69 ± 0.56 b	0.21 ± 0.01 b	190.86 ± 0.77 a	59.67 ± 0.74 ab
<i>s</i>	26.13 ± 0.35 c	0.18 ± 0.01 b	183.83 ± 3.49 a	58.21 ± 0.20 b
<i>s'</i>	37.46 ± 0.81 a	0.25 ± 0.01 a	186.14 ± 3.53 a	60.35 ± 0.12 a

P: peso. PTEST: peso de los testículos. DTS: diámetro del tubo seminífero. AES: espesor del epitelio seminífero.

Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas, $p < 0,05$

Tabla III. Coeficientes de regresión del peso testicular en el peso corporal y del diámetro de los túbulos seminíferos y del espesor de su epitelio en el peso de los testículos en tres líneas de ratones.

b	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>s'</i>
PTEST-P	0.010 ***	0.004 ***	0.004 **
DTS- PTEST	69.30 ***	709.68 ***	276.62 ***
AES- PTEST	-16.96 <i>n.s.</i>	-7.89 <i>n.s.</i>	-3.36 <i>n.s.</i>
	*** $p < 0,001$	** $p < 0,005$	<i>n.s.</i> no significativo

Tabla IV. Promedios y errores estándar del número de espermatozoides y del número de células anormales en tres líneas de ratones.

LINEA	P ± ES	NE ± ES	AN ± ES
<i>t</i>	30.69 ± 0.56 b	603.16 ± 5.73 ab	1.91 ± 0.15 a
<i>s</i>	26.13 ± 0.35 c	584.23 ± 8.58 b	2.15 ± 0.21 a
<i>s'</i>	37.46 ± 0.81 a	616.94 ± 10.24 a	2.42 ± 0.26 a

P: peso. NE: número de espermatozoides (millones/mlilitro). AN: número de espermatozoides

Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas, $p < 0,05$

Tabla V. Promedios y errores estándar de los parámetros de motilidad, progresión y vigor de los espermatozoides (Parámetros CASA) en tres líneas de ratones.

	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>s'</i>
P	29.65 ± 1.00 b	25.58 ± 0.31 c	38.71 ± 1.00 a
%MOT	56.87 ± 3.26 a	55.70 ± 3.87 a	51.96 ± 2.89 a
%PRO	18.35 ± 2.11 a	17.22 ± 1.61 a	18.78 ± 1.77 a
Parámetros de vigor			
VCL	126.15 ± 9.43 a	120.48 ± 7.28 a	133.98 ± 6.70 a
ALH	9.29 ± 0.29 a	12.13 ± 2.86 a	9.69 ± 0.23 a
BCF	28.73 ± 0.78 a	28.85 ± 1.07 a	28.62 ± 0.88 a
Parámetros de progresividad			
VAP	68.29 ± 3.81 a	65.68 ± 3.54 a	72.33 ± 3.74 a
VSL	45.54 ± 3.42 a	44.02 ± 2.23 a	47.71 ± 2.77 a
STR	66.39 ± 1.61 a	64.93 ± 1.85 a	65.04 ± 1.13 a
LIN	44.22 ± 1.60 a	39.13 ± 1.29 a	38.48 ± 1.11 a

P: peso. %MOT: móviles. %PRO: progresivos. VCL: velocidad en camino real. ALH: distancia promedio del desplazamiento de la cabeza. BCF: frecuencia de los movimientos de la cabeza. VAP: velocidad en camino suavizado. VSL: velocidad en línea recta. STR: desviación de la velocidad promedio a la línea recta. LIN: desviación de la velocidad del camino real a la línea recta.

Dentro de una fila, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas, $p < 0,05$

DISCUSIÓN

Los animales seleccionados para alto peso tuvieron gónadas más pesadas y el epitelio seminífero fue significativamente más alto, característica histológica que probablemente se relacione con un mayor índice de división de las espermatogonias, células generatrices del linaje espermático, lo que redundó en un mayor número de espermatozoides. Los machos s', tendrían un mejor potencial reproductivo basado fundamentalmente en una mayor concentración de espermatozoides en semen que los machos s y t. Sin embargo, el mejor rendimiento reproductivo (mayor CF y TC) se observó en los machos no seleccionados (t), aún cuando estos animales partieron de un potencial intermedio entre las líneas seleccionadas (valores medios para NE). Los machos s y s' presentarían problemas de subfertilidad evidenciados en un menor tamaño de camada y en una demora en la preñez de las hembras.

Resultados similares fueron expuestos por Tardiff *et al.*, quienes al estudiar la importancia de diversos parámetros seminales sobre la fertilidad *in vivo* en el cerdo concluyeron que la concentración de los espermatozoides en un eyaculado es un buen indicador de la capacidad productora de gametos en los túbulos seminíferos, pero generalmente no puede relacionarse con la fertilidad del macho.

El análisis de la estructura de los espermatozoides no dio cuenta de diferencias significativas entre los machos de las tres líneas. Si bien el número de espermatozoides con morfología anormal, por cada 100, fue similar tanto para los machos seleccionados como para los no seleccionados, en promedio, este porcentaje fue más bajo que los comunicados para animales de otras cepas de ratones (De la Cruz Ramírez *et al.*; Kawai *et al.*).

En cuanto a la motilidad de los espermatozoides, los resultados mostraron que bajo las condiciones del *setup* utilizado, la cantidad de células móviles y progresivas, y la velocidad y trayectoria de las mismas, fueron similares para los machos de alto y bajo peso y los controles no seleccionados. Por lo tanto, la calidad del semen no aporta a la explicación de las diferencias de fertilidad encontradas entre los machos t, s y s', pero sí permite conocer la trayectoria descrita por los espermatozoides de los animales de estas líneas.

Katebi *et al.* (2005) analizaron la trayectoria espermática en semen de ratones de la cepa ICR (10 a 12 semanas de edad) y encontraron que el promedio de velocidad curvilineal (VCL) fue de 180 μm y la linealidad (LIN) del 28% aproximadamente. Nuestros resultados determinaron una VCL menor (125 μm) y una LIN mayor (39,61%), si

se toma el promedio de las tres líneas. Mortimer, en una revisión sobre la importancia fisiológica y el análisis del movimiento espermático en mamíferos describió que una trayectoria circular tiene generalmente una baja linealidad. En cambio, se da una trayectoria con alta linealidad cuando el camino curvilíneo es más corto porque tiene relativamente baja amplitud lateral de la cabeza y la dirección del movimiento es similar a la del camino en línea recta. Teniendo en cuenta los datos obtenidos por Katebi *et al.*, nuestros resultados y la descripción de la trayectoria realizada por Mortimer, podemos inferir que los espermatozoides de los ratones de estas líneas describen una trayectoria menos circular (más lineal) con respecto a la descrita por los espermatozoides de los machos ICR, y entre ellos los s' aparentan ser más veloces, pero los t más lineales en sus trayectorias, sin alcanzar significado estadístico. Esta característica es importante a los efectos de estimar fertilidad, ya que la linealidad en el desplazamiento de los espermatozoides es un parámetro que según lo publicado por otros autores en la especie bovina (Farrell *et al.*, 1998; Januskauskas *et al.*, 2001; Rodríguez-Martínez, 2000) está significativamente relacionado con la fertilidad.

Finalmente, debe considerarse que se han analizado muestras de espermatozoides que cumplieron con determinadas condiciones propias al *setup* utilizado (por ejemplo, más de 25 mm para VAP, 50% como mínimo para STR) y que pueden considerarse como un conjunto de espermatozoides con una calidad seminal superior, es decir, que para estos conjuntos de espermatozoides especiales no hay diferencias entre las líneas. Cabe preguntarse si modificando los umbrales para cada uno de los parámetros, se encontrarían diferencias en la calidad seminal del resto de los espermatozoides que no cumplen con las especificaciones utilizadas o si existen diferencias en el porcentaje de espermatozoides anormales tomando la totalidad de las células espermáticas.

Sintetizando, los resultados demuestran que la selección de peso modificó parámetros reproductivos estructurales (altura del epitelio seminífero, número de espermatozoides por mililitro de semen) en el mismo sentido de la selección practicada durante aproximadamente 50 generaciones. Sin embargo, estos cambios no redundaron en una mejor fertilidad (TC, D, CF), es decir, no estuvieron acompañados por modificaciones funcionales. De otra manera, los indicadores de estructura testicular y de calidad seminal no alcanzaron a explicar las diferencias de fertilidad atribuibles a los machos encontradas en los cruzamientos.

Algunos autores sostienen que el éxito de los espermatozoides se basa en la heterogeneidad de las poblaciones celulares, sólo un reducido número supera favorablemente los procesos bioquímicos, biofísicos y metabólicos necesarios para estar en condiciones de fecundar al oocito ma-

duro. Entonces, además de conocer el número total, la motilidad y la trayectoria, sería fundamental analizar el equilibrio osmótico, la capacitación y la integridad de los péptidos de membrana, de los receptores termo y quimiotácticos, de los canales de calcio entre otras características para conocer en forma más cierta a ese selecto grupo de espermatozoides aptos para fecundar (Holt *et al.*, 2004). En una revisión, Petrunkina *et al.* propusieron que al elegir los parámetros relevantes para evaluar la fertilización debería cuestionarse qué mide cada uno de ellos, si son relevantes para la fertilización, si el tracto femenino realiza la selección de acuerdo a ellos y si describen la heterogeneidad fisiológica del esperma. A pe-

sar de los muchos años de investigación, los métodos de control de calidad del esperma continúan dando datos imprecisos sobre la fertilidad (Holt & Van Look).

El presente trabajo muestra que la selección a largo plazo de un carácter productivo (peso) modificó la fertilidad de los machos y que los indicadores de estructura testicular y calidad seminal no explican la subfertilidad de las líneas seleccionadas. Esto último hace que sea importante generar trabajos que contemplen el estudio de características bioquímicas, biofísicas y metabólicas de los espermatozoides comprometidas en el proceso de fecundación, en ratones de las tres líneas.

BERNARDI, S.; BROGLIATTI, G. & OYARZABAL, M. I. Testicular structure and semen quality in mice lines selected for weight. *Int. J. Morphol.*, 28(3):673-680, 2010.

SUMMARY: Reproductive female capacity was affected by the genetic selection performed in a pair of lines of two-way selection of body weight for 50 generations (s: downward selection; s': upward selection). These lines were originated from a control CFI mice population (t) at the Faculty of Veterinary Sciences (UNR). The existence of reproductive differences attributed to the male genotype in the litter size and in the interval from the service beginning to first parturition was proven. With the aim of explaining them, the testicular structure - testicular weight (PTEST), vas deferens diameter (DTS), epithelium height (AES) - and the semen quality - spermatozoa number (NE), abnormal cell percentage (AN), motility and movement of spermatic cells (CASA parameters) were compared, in adult males between 10 and 14 weeks of age. The means of the DTS and AES were estimated for 100 seminiferous tubules per individual. Semen was obtained from the caudal portion of the epididymides and vasa deferentia. Sperm count was performed in Neubauer hemocytometer and abnormal cell percentage was estimated over 100 spermatozoa per sample. Motility parameters were determined with a Ceros 12.1 semen computerized analyzer. Body weight selection occasioned significant differences between lines in the same way of the selection performed for PTEST, AES and NE. Males of the heaviest line (s') show heavier testicles, higher seminiferous epithelium and, consequently, a higher number of spermatozoa when compared with s and t males ($p < 0.05$). Semen quality under the employed *setup* conditions was similar for males of the three lines. Therefore, semen quality does not contribute to the explanation of the fertility differences between lines.

KEY WORDS: Testis weight; Vas deferens; Semen quality; CASA parameters; Male fertility; Body weight selection; Mice.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. L.; Meyer, E. R. & Cicero, T. J. Interactions between alcohol-and opioid-induced suppression of rat testicular steroidogenesis in vivo. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21(4):684-90, 1997.
- AVMA, American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines on Euthanasia Formerly Report of the AVMA. Panel on Euthanasia, 2007. Disponible en: <http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>
- Berger, T.; Calvert, C. & Bradford, G. Reduced male reproductive capacity in mice with high genetic potential for post-weaning growth. *J. Reprod. Fertil.*, 87(1):33-8, 1989.
- Bernardi, S.; Brogliatti, G. & Oyarzabal, M. I. Diferencias de fertilidad en ratones seleccionados por peso. *Analecta Veterinaria*, 19(1-2):11-7, 1999.
- Bernardi, S. F.; Brogliatti, G. & Oyarzabal, M. I. Ovarian structure in mice lines selected for weight. *Anat. Histol. Embryol.*, 38(3):200-3, 2009.
- Bradford, G. E. Growth and reproduction in mice selected for rapid body weight gain. *Genetics*, 69(4):499-512, 1971.
- Brien, F. D. A Review of the Genetic and Physiological Relationships Between Growth and Reproduction in Mammals. *Anim. Breed.*, 54(12):975-97, 1986.
- Brogliatti, G. *Aplicaciones del análisis computarizado de semen (CASA) en la evaluación de la calidad seminal y la fertilidad*. Conferencia. Córdoba, VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2005.
- Bünger, L.; Lewis, R.; Rothschild, M.; Blasco, A.; Renne, U. & Simm, G. Relationships between quantitative and reproductive fitness traits in animals. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360:1489-1502, 2005.
- Bünger, L.; Renne, U. & Dietl, G. Selection for body weight at 42 days in laboratory mice with and without litter size standardization. Direct response and correlated effects on litter size. *Arch. Tierz. Dummerstorf*, 35:305-19, 1992.
- Bustos-Obregón, E.; Costa del Río, F. & Sarabia, L. El análisis morfológico de los túbulos testiculares de ratones después de la administración de Malatión y Maca. *Int. J. Morphol.*, 25(2):245-8, 2007.
- Bustos-Obregón, E.; Riveros, J. L. & Maurer, I. Función Espermática Post-Hipoxia Simulada en Ratón. *Cienc. Trab.*, 7(16):56-60, 2005.

- Calleja, J. Alteraciones testiculares producidas por el alcohol. *Actas Urol. Esp.*, 21(4):337-42, 1997.
- Cancel, A. M.; Lobdell, D.; Mendola, P. & Perreault, D. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum. Reprod.*, 15(6):1322-8, 2000.
- De la Cruz Ramirez, W. F.; Luján Mavila, K. M. & Miranda Soberón, U. E. *Efectos del malathion sobre la espermatogénesis de ratones machos jóvenes de la cepa BALB-C53*. Ciudad de Ica, Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional San Luis Gonzaga, 2004.
- Farrell, P. B.; Presicce, G. A.; Brockett, C. C. & Foote, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49(4):871-9, 1998.
- Foote, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim. Reprod. Sci.*, 75(1-2):119-39, 2002.
- Fowler, R. E. & Edwards, R. G. The fertility of mice selected for large or small body size. *Genet. Res.*, 1:393-407, 1960.
- Hamilton Thorne Biosciences. *HTM-IVOS Software Guide*. Version 12.1, 2002.
- Holt, M.; Vangen, O. & Farstad, W. Components of litter size in mice after 110 generations of selection. *Reproduction*, 127(5):587-92, 2004.
- Holt, W. V. & Van Look, K. J. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, 127(5):527-35, 2004.
- Januskauskas, A.; Johannisson, A. & Rodríguez-Martínez, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. *Theriogenology*, 55(4):947-61, 2001.
- Katebi, M.; Movahedin, M.; Abdolvahabi, M. A.; Akbari, M.; Abolhassani, F.; Sobhani, A. & Aoki, F. Changes in motility parameters of mouse spermatozoa in response to different doses of progesterone during course of hyperactivation. *Iran. Biomed. J.*, 9(2):73-9, 2005.
- Kawai, Y.; Hata, T.; Suzuki, O. & Matsuda, J. The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. *J. Reprod. Dev.*, 52(4):561-8, 2006.
- Martini, A. C.; Stuz, G.; Vincenti, L. M.; Santillán, M. E.; Carlini, V.; Rubiales de Barioglio, S. & Fiol de Cuneo, M. Evaluación de Parámetros Morfométricos, Reproductivos y Conductuales en Ratones Macho Hiponutridos. *Rev. Argent. Endocrinol. Metab.*, 41:66, 2004.
- Mortimer, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, 3(5):403-39, 1997.
- Oyarzabal, M. I. & Rabasa, S. L. Selección divergente de peso en ratones con alta endocría seguida de 90 generaciones de cría libre. *Mendeliana*, 10:119-32, 1995.
- Oyarzabal, M. I. & Rabasa, S. A. Riqueza genética y estabilidad en ratones de la cepa CF1. *Mendeliana*, 13(2):74-84, 1999.
- Petrunkina, A. M.; Waberski, D.; Günzel-Apel, A. R. & Töpfer-Petersen, E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*, 134(1):3-17, 2007.
- Rabasa, S. L. & Font, M. T. Cría y selección de la rata blanca. *Ciencia e investigación*, 19:133-7, 1963.
- Roberts, R. C. The lifetime growth and reproduction of selected strains of mice. *Heredity*, 16:369-81, 1961.
- Rodríguez-Martínez, H. & Ericsson, B. *Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad en inseminación artificial en cerdos*. Flores da Cunha –RS- Brasil, III Simposio Internacional MINITUB, 1:11-33, 2000.
- Rodríguez-Martínez, H. *Evaluación del semen congelado: métodos tradicionales y de actualidad*. Ithaca, New York, International Veterinary Information Service, 2000.
- Sobarzo, C. & Bustos-Obregón, E. Sperm quality in mice acutely treated with parathion. *Asian J. Androl.*, 2(2):147-50, 2000.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. *Biometría*. Madrid, H. Blume Ed., 1979.
- Sztejn, J. M.; Farley, J. S. & Mobraaten, L. E. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol. Reprod.*, 63(6):1774-80, 2000.
- Tardiff, S.; Laforest, J. P.; Cormier, N. & Bailey, J. L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, 52(3):447-59, 1999.
- van Thiel, D. H.; Gavalier, J. S.; Cobb, C. F.; Sherins, R. J. & Lester, R. Alcohol-induced testicular atrophy in the adult male rat. *Endocrinology*, 105(4):888-95, 1979.

Dirección para correspondencia:

Sandra Bernardi

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de Rosario.

Ov. Lagos y Ruta 33, 2170 Casilda

ARGENTINA

Email: sbernard@unr.edu.ar

Recibido : 30-03-2010

Aceptado: 01-07-2010