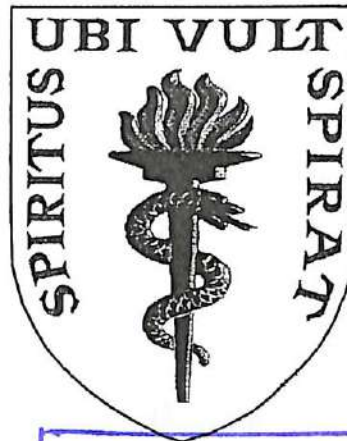


NO SE PRESTA

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA



UPCH-BIBLIOTECA

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A LA ALTURA
SOBRE LA ESPERMATOGÉNESIS Y EL RECuento DE
ESPERMATOZOIDES EN RATAS MACHO EN EDAD
REPRODUCTIVA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Manuel Enrique Gasco Tantachuco

LIMA-PERU

2002

Asesor:

Dr Gustavo Gonzales Rengifo

Jurado:

PRESIDENTE: Mg. Wilfredo Mormontoy
VOCAL : MSc. León Villegas Vilches
SECRETARIO: MSc. Luis Rossi Mayo

Dedicatoria:

Este trabajo se lo dedico a la memoria de mi hermano Antonio, seguiré por siempre su ejemplo de fuerza y superación, esté donde esté.

Agradecimientos

A mis padres, Luis y Raquel por haberme apoyado durante toda mi carrera.
Al Dr. Gustavo Gonzales Rengifo, por las enseñanzas brindadas.
A mis compañeros del laboratorio: Julio, Arturo, Katiuska, Karla, Amanda y Sharon, por haber colaborado con la realización de este trabajo.
A Dieguito, fuente de mi inspiración.
A Roxana, por su infinita paciencia.

INDICE

I -	Resumen.....	1
II -	Introducción.....	3
III-	Hipótesis.....	8
IV-	Objetivo General.....	9
V-	Material y Métodos.....	10
VI-	Resultados.....	16
VII-	Discusión.....	28
VIII-	Conclusiones.....	33
IX-	Referencias.....	34

I- RESUMEN

El presente trabajo de investigación evalúa de manera cuantitativa el efecto de la altura sobre el sistema reproductivo en ratas macho en edad reproductiva, y corrobora los trabajos anteriores hechos de manera cualitativa. Para ello se utilizó la técnica de transiluminación para observar el ciclo espermatogénico de la rata, esta técnica es ampliamente estudiada en el laboratorio del Instituto de Investigaciones de la Altura de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, además se realizó el recuento de espermatozoides en el epidídimo para corroborar los resultados del ciclo espermatogénico. Entre los resultados obtenidos se observó que los estadios **IX-XI** y **VIII**, que son los estadios que dan lugar al inicio y al final del ciclo respectivamente, disminuyen significativamente en la altura luego de sendos períodos de **7** y **14** días de exposición, mientras que después de **21** días existe una nivelación con los valores del nivel del mar, es más, después de **42** días de exposición a la altura, los estadios **IX-XI** y **VIII** se incrementan por encima del nivel del mar. Todos estos datos acerca del ciclo espermatogénico se corroboran con los resultados del recuento de espermatozoides en el epidídimo encontrados luego de **7** y **14** días de exposición a la altura. Se concluye que la exposición aguda a la altura afecta inicialmente los estadios del inicio de la espermatogénesis así como también el de la espermiación, lo que podría conllevar a algún tipo de infertilidad, pero que el efecto se revierte después de **21** días de exposición a la altura, mejorando considerablemente después de **42** de permanencia en la altura a 4340 msnm.

SUMMARY

The present research work evaluates quantitatively the effect of high altitude on the rat male reproductive system and confirms previous qualitatively research. Transillumination techniques was used to test the spermatogenesis in rats. This technique has been broadly applied in the "Instituto de Investigaciones de la Altura" of the Universidad Peruana Cayetano Heredia, in addition, epididym sperm counting was performed to confirm the results obtained in the spermatogenesis cycle. The results show that stages IX-XI and VIII, which the stages at the beginning and end of the cycle respectively, decrease at altitude significantly after 7 and 14 days, however after a 21 days stages IX-XI and VIII are similar as those at sea level. After being 42 days at altitude, stages IX-XI and VIII increase over sea level. All these results about the spermatogenesis cycle are confirmed with the results of the sperm count in the epididym found after 7 and 14 days of altitude exposition. We can conclude that acute altitude exposition affects the first stages of spermatogenesis, and spermatation, which could take to infertility, this effect is, however, reverted after 21 days of being exposed at an altitude of 4340 mosl.

II- INTRODUCCIÓN

Nuestro país se caracteriza porque el 32 % de la población reside en la altura a más de 2000 msnm. Las condiciones ambientales a las alturas constituyen un factor estresante para el organismo no sólo por la menor presión parcial de oxígeno inspirado, sino también por la mayor sequedad del aire, menor temperatura ambiental, menor gravedad, e incluso mayor radiación solar y ultravioleta (Monge C, 1990). Como también una alta frecuencia de precipitaciones pluviales.

Por lo tanto, el hecho de que un sujeto habite o de alguna forma esté expuesto a la altura constituye un factor que puede estar produciendo cambios significativos en la fisiología del individuo en general.

Un individuo puede estar expuesto a la altura de manera aguda, crónica, intermitente, y permanente como el que nace y vive en la altura (nativo); determinando el grado de interferencia que provocaría en su organismo. Por lo tanto; se puede definir a la exposición aguda a aquella en la cual los sujetos están expuestos algunos días o semanas y la exposición crónica como aquella en la que los individuos están expuestos a la altura por más de tres meses.

Carlos Monge sugiere que la adaptación de la raza andina se deba al aspecto reproductivo y no en el respiratorio, es la ventaja de la fertilidad del poblador andino que lo hace real mente distinto.

Los estudios acerca del efecto de la altura sobre la fisiología reproductiva en el humano han dado muchas luces al conocimiento de distintas características propias del poblador andino. Así pues el efecto de la menor presión parcial de oxígeno sobre la fisiología sexual femenina ha sido ampliamente estudiada (Gonzales y col. 1998). Determinando algunas características de la mujer de altura como la menarquia tardía, la menopausia temprana, el período intergenésico disminuido y cambios hormonales característicos que las hace diferentes a la mujer del nivel del mar.

Trabajos realizados en varones en los cuales se evaluaron el número de espermatozoides y la bioquímica seminal en habitantes de grandes alturas y pacientes de mal de montaña crónico (García-Hjarles MA., 1989). Este investigador determinó que los espermatozoides se encontraban dentro del rango normal, y aquellos con mal de montaña crónico tenían el número de espermatozoides por mililitro mayor que aquellos del grupo control a nivel del mar, como consecuencia de una disminución en el volumen seminal.

Ya por los años 50, en estudios sobre el efecto de la exposición aguda a la altura, San Martín advierte que la causa de infertilidad por la exposición aguda a la altura residía en el macho, que esta podía ser revertida y que su causa principal podría ser una disminución en las gonadotropinas.

Guerra-García observó, en 1959, que cuando cobayos de nivel del mar eran trasladados a grandes alturas (Morococha 4500 msnm), estos presentaban alteraciones en los túbulos seminíferos. Los animales fueron expuestos durante dos semanas a la altura (exposición aguda) y evidenció, a la vez, un aumento en las células basófilas hipofisarias, esta observación podría indicar una mayor producción de gonadotropinas durante la exposición aguda a la altura.

Trabajos realizados por Saxena, en 1995, indican que luego de estudiar las características seminales y morfología testicular en monos Rhesus expuestos a una altura simulada de 4411 msnm por 21 días, estos evidenciaban una disminución reversible del volumen seminal, conteo de espermatozoides y motilidad espermática. A su vez observó incremento del pH seminal y en la concentración de fructuosa, lo que puede evidenciar una mayor actividad androgénica por exposición aguda a la altura.

Diversos estudios realizados en humanos demostraron que la exposición aguda a la altura ocasionaba alteraciones en el recuento de espermatozoides disminuyendo su número, además se observó un aumento en los niveles de fructuosa seminal (Donayre y col., 1968), que indicarían un aumento en la actividad androgénica.

Además, Mujica en 1994, determina que los niveles de prolactina y testosterona sérica se incrementan durante una exposición aguda a la altura en ratas machos expuestos de manera aguda a la altura (Morococha, 4540 msnm)

Gonzales y col en 1990, determinan la alteración histológica en los testículos de ratas que fueron expuestas por 4 días a una altura de 4340 msnm donde encontró espermatozoides primarios y espermátides picnóticas, necrosis de numerosas células y de espermatozoides primarios. Estos daños fueron prevenidos con un agente antiserotoninérgico.

Los datos presentados anteriormente evidencian el efecto dañino de la altura sobre el aparato reproductor masculino y la fertilidad. Como es el caso de la *disminución en el número de espermatozoides y el incremento en la concentración de fructuosa seminal* que representan un claro reflejo del aumento de los niveles de testosterona presentados en la altura.

También se ha determinado que la excreción urinaria de testosterona en varones se encuentra disminuida (Guerra-García., 1971) durante la exposición aguda a la altura, en tanto que la *producción de testosterona no se modifica*. Gonzales (1993) ha demostrado que los niveles de testosterona sérica se incrementan durante la exposición aguda a la altura. Lo que evidencia la *mayor biodisponibilidad de la testosterona en el individuo por su normal producción y su reducción en la excreción durante la exposición aguda a la altura*. Así pues, estudios posteriores (Gonzales, 1983) demuestran que las *concentraciones elevadas de testosterona expuestos a condiciones de altura* retornan a sus niveles normales cuando son retornados a su lugar de origen (nivel del mar).

Es necesario tomar en cuenta que la infertilidad durante la exposición aguda a la altura es temporal y que puede ser revertida al exponer a los individuos a nivel del mar.

La espermatogénesis se estudia a través de tinciones histológicas, las cuales son largas y requieren de una gran experiencia de microscopía óptica, además, sus resultados la mayoría de veces son expresadas de manera cualitativa lo que dificulta su comparación cuando se evalúa el efecto de diversos fármacos. *Una mala fijación del tejido (por ejemplo si se usa formol en vez de solución Bouin) puede dañar la arquitectura del túbulo seminífero e impresionar como daño testicular y ser atribuido esta diferencia al efecto del fármaco evaluado, con la consiguiente distorsión y mala interpretación de los resultados.*

El estudio histológico igualmente no permite observar la evolución de la espermatogénesis a través del tiempo. *Importante cuando se quiere evaluar efecto de fármacos o de exposiciones a cambios ambientales.*

Las células germinales en la rata se distribuyen en asociaciones que determinan 14 estadios de manera longitudinal (LeBlond y Clermont, 1952). *La espermiación o liberación de las espermátides elongadas más desarrolladas ocurren en el estadio VIII, en tanto que la iniciación de la espermatogénesis es decir donde ocurre la mitosis de las espermatogonias ocurre en los estadios IX-XI.*

El método de transiluminación demuestra ser una técnica de gran valor porque mantiene la integridad de los túbulos seminíferos por ser procesados en fresco y sin el uso de algún agente químico que nos ayude a la separación de los mismos. *La técnica de transiluminación permite aislar los túbulos seminíferos y visualizar las diferentes estadios espermatogénicos por la manera característica que tienen para absorber la luz, permitiendo así su observación a través del microscopio de luz invertida (Soderstrom y col. 1978).*

Gonzales y Del Valle (1995) incorporaron el método de transiluminación descrito por el Parvinen en 1982 para evaluar los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero ante el tratamiento con sustancias exógenas con posible efecto sobre la espermatogénesis y desarrollaron un método para evaluar la frecuencia relativa de los diferentes estadios cuando se emplea un tratamiento que modifica la espermatogénesis.

Se ha probado este método con sustancias que inhiben la espermatogénesis (Almenara y col. 2001), evaluándose grandes cantidades de túbulos seminíferos en fresco y sin necesidad de tinción, y además permite evaluar las frecuencias de los 14 estadios de los túbulos seminíferos de la rata, y así poder seguir su evolución a través del tiempo. Comparando la frecuencia del ciclo espermatogénico del animal tratado con otro grupo control.

Queda demostrado entonces que el método de transiluminación, otorga muy buenos resultados que nos permite evaluar si una sustancia actúa primordialmente sobre algún estadio del ciclo espermatogénico, ya sea al inicio (mitosis) o si su acción se circunscribe a alguno de los otros procesos (meiosis, espermiogénesis o espermiación), así como el efecto de *Lepidium meyenii* (maca) que ha sido demostrado por esta técnica que aumenta la espermiación en la rata (Gonzales, 2001) como también el trabajo realizado por Almenara y colaboradores (2001) donde determinan que el enantato de testosterona disminuye la el comienzo de la espermatogénesis en ratas.

El presente estudio evalúa de una manera cuantitativa el efecto de la exposición a la altura sobre la espermatogénesis y el recuento de espermatozoides en epidídimo de ratas macho en edad reproductiva, utilizando la técnica de transiluminación y del conteo de espermatozoides.

III- HIPOTESIS

- 1- La exposición aguda a la altura inhibe la espermatogénesis en ratas en edad reproductiva de la cepa Holtzman.

- 2- La exposición aguda a la altura disminuye el peso de los testículos y de las glándulas accesorias en ratas adultas de la cepa Holtzman.

- 3- La exposición aguda a la altura disminuye el recuento de espermatozoides en el epidídimo.

- 4- La exposición aguda a la altura afecta los estadios IX-XI y VIII del ciclo espermatogénico.

IV- OBJETIVO GENERAL

Determinar de manera experimental el efecto de la exposición aguda a la altura sobre la espermatogénesis en ratas macho en edad reproductiva de la cepa Holtzman, comparadas con ratas a nivel del mar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la exposición aguda a la altura sobre el ciclo espermatogénico luego de 7, 14, 21 y 42 días de exposición.
2. Determinar el efecto de la exposición a la altura sobre el peso de los órganos reproductivos luego de 7, 14, 21 y 42 días de exposición.
3. Determinar el efecto de la exposición a la altura sobre el recuento de espermatozoides en el epidídimo luego de 7, 14, 21 y 42 días de exposición.
4. Determinar qué estadíos de la espermatogénesis se afectan durante 42 días de exposición a la altura.

V- MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones de la Altura (IIA) sede Cerro de Pasco y en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. Perú.

El protocolo de Investigación ha sido aprobado por la dirección de Investigación Científica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y financiado por el Fondo Concursable del Vicerrectorado de Investigación.

Material Biológico:

Ratas macho en edad reproductiva (90 días de edad) de la cepa Holtzman.

Material de Laboratorio:

- Balanza analítica calibrada
- Microscopio de luz invertida
- Microscopio Optico Compuesto
- Refrigerador a 4°C
- Cámara de Neubauer
- Micropipeta 20-40 μ l
- Solución salina 0.9%
- Agua destilada
- Placas Petri
- Tubo Homogenizador de tejidos
- Eosina 0.2 %
- Pipetas de 5 ml
- Vasos Beaker de 50 ml
- Material de disección
- Tubos de vidrio de 12 ml
- Jaulas de polipropileno
- Sonda nasogástrica N° 18
- Viruta
- Alimento nutritivo
- Guillotina para animales menores

Selección de animales

Se seleccionaron de manera aleatoria 48 ratas *Rattus norvegicus*, en edad reproductiva (90 días de edad) de la cepa Holtzman obtenidos del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Los animales se mantuvieron en los bioterios del laboratorio del Instituto de Investigaciones de la Altura (IIA) y del Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Cerro de Pasco y Lima respectivamente, a condiciones asépticas, recibiendo agua y comida balanceada ad libitum. Controlándose diariamente y evitando cualquier tipo de enfermedad.

Los animales en este trabajo fueron mantenidos en número de seis en cada jaula, y con un período de luz/oscuridad de 12 horas/12horas con la suficiente aireación para mantener sus necesidades vitales. La temperatura promedio en Lima fue de 20° C, mientras que en Cerro de Pasco fue de 8°C.

Definición del grupo de Estudio

Los animales fueron distribuidos al azar en 4 grupos diferentes de acuerdo al período de exposición a la altura.

Grupo A

Este grupo estuvo constituido por 12 ratas de 90 días de edad, seis de ellas fueron inoculadas durante 7 días vía oral con 2 ml de agua destilada una vez al día en Cerro de Pasco (4340 msnm) y las otras seis con el mismo tratamiento en Lima (150 msnm). La inoculación con agua es para mantener a los animales con el mismo estrés durante todo los períodos, tanto en Lima como en Cerro de Pasco.

Grupo B

Este grupo también constituido por 12 animales de 90 días de edad, de los cuales 6 fueron inoculados durante 14 días vía oral con 2 ml de agua destilada en Cerro de Pasco a 4340 m de altura y como grupo control las seis restantes en Lima con el mismo tratamiento.

Grupo C

Un tercer grupo constituido también por 12 ratas macho en edad reproductiva, recibieron el mismo tratamiento que el primero y segundo grupo tanto en la altura como a nivel del mar, pero por un período de 21 días.

Grupo D

Este grupo constituido por 12 ratas, 6 estuvieron en Cerro de Pasco y su control en Lima, durante un período de 42 días.

Sacrificio de los animales en estudio

Se sacrificó a los animales luego del período establecido (7,14, 21y 42 días) de exposición a la altura y a nivel del mar. Los animales fueron sacrificados por el método de decapitación.

Control de los pesos corporales

Se tomaron los pesos de los órganos reproductivos durante los distintos períodos de exposición. Tales como los testículos, epidídimos y vesícula seminal, fueron anotados y analizados en el programa estadístico SPSS.

Tratamiento de los animales

El agua destilada fue administrada vía oral a través de una sonda nasogástrica, en una dosis de 2 ml por día. De acuerdo al período de exposición en la altura con sus respectivos controles a nivel del mar.

Evaluación de la espermatogénesis

La evaluación de la espermatogénesis se ha realizado por el método de transiluminación descrita por Parvinen y colaboradores (1982) y validada por Gonzales y Del Valle (1995) con respecto al método histológico en el Instituto de Investigaciones de la Altura. Para corroborar la evaluación del ciclo seminífero, se empleó el método del recuento de espermatozoides en el epidídimo, este método fue descrito por Verma y colaboradores (1966) y validado por Ruiz de Castilla (1975).

Para la observación de los estadios del ciclo seminífero se utilizó el testículo derecho, esto para seguir una sola línea de estudio además porque hay ligeras diferencias entre ambos testículos. Lo mismo se hizo para el recuento de espermatozoides, es decir se trabajó también con el epidídimo derecho del mismo testículo empleado en la transiluminación.

Para la observación de los túbulos a través del microscopio, se procedió primeramente a separar la túnica albugínea que envuelve a los túbulos seminíferos y con ayuda de pinzas finas se procede a separar cada uno de ellos y se llevan a una placa Petri para la observación directa.

Los túbulos seminíferos se mantienen en todo momento en una placa Petri en solución fisiológica (NaCl 0.9 %), a partir de aquí son manipulados y luego observados en el microscopio de luz invertida.

Para el recuento de espermatozoides se utilizó el procedimiento según Robb (1978) con algunas modificaciones: una vez extraído y pesado el epidídimo, este se secciona en pedazos uniformes en un vaso beaker de 50 ml, conteniendo 2 ml de solución salina (NaCl 0.9%), luego se vierte esta mezcla a un tubo manual homogenizador de tejidos y se homogeniza por 5 minutos. Posteriormente se vierte el sobrenadante a un tubo de ensayo de 12 ml, el resto de tejidos que quedó en el homogenizador es nuevamente homogenizado con 3 ml de solución salina y luego vertido, tanto el sobrenadante como restos de tejido en el tubo de ensayo, la muestra que contiene 5 ml es refrigerada a 4 °C por un período de 24 horas.

Luego del tiempo de refrigeración, la muestra se mezcló con 5 ml de eosina al 0.2 %, de aquí se extrajo 10 μ l y se diluyó con 20 μ l de eosina, una gota de esta solución se vertió a la cámara de Neubauer y se observó en el microscopio compuesto a 400 X , se contaron las cabezas de los espermatozoides que hubieron en el área mostrada en el Gráfico 1, el total es multiplicado por el factor de 7.5×10^7 . Expresándose el resultado en espermatozoides/ ml de liquido epididimal.

La fórmula para hallar el factor es:

$$\frac{\text{Espermatozoides contados}}{\text{Superficie contada x Profundidad de cámara x Dilución}}$$

Cálculo de la dilución:

$$0.1/5+0.1 = 1/51$$

$$5.1/5+5.1 = 51/101$$

$$10/20+10 = 1/3$$

$$\Rightarrow 1/51 \times 51/101 \times 1/3 = 1/303$$

Cálculo del Factor, según la fórmula:

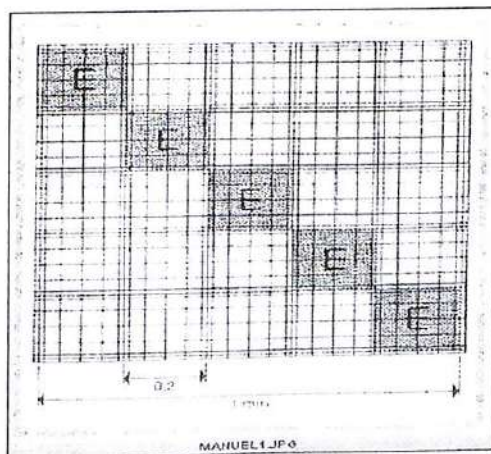
$$= \text{espermatozoides contados} / (0.2 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times 1/301)$$

$$= \text{espermatozoides contados} \times 1.5 \times 10^4 / \mu\text{l} \text{ liquido epididimal}$$

$$= \text{espermatozoides} \times 1.5 \times 10^7 \text{ ml} \times 5 \text{ ml (volumen total)}$$

$$= \text{espermatozoides} \times 7.5 \times 10^7 / \text{epididimo}$$

GRAFICO 1: Se muestra la superficie contada, dentro de los 5 cuadrados medianos señalados con una "E", utilizados para el recuento de eritrocitos y trombocitos.



Recolección de Datos Estadísticos

En este estudio se observó una longitud de 1000 mm de túbulo seminífero de cada testículo derecho empleado, tomándose en cuenta la frecuencia de los 14 estadios que tiene la espermatogénesis de la rata. Para el análisis de los datos fue necesario llevar a porcentajes las longitudes de los estadios (frecuencias absolutas).

Las longitudes relativas se calculó llevando a 1 las longitudes absolutas del grupo control (nivel del mar).

Acerca de las mediciones del recuento de espermatozoides en el epidídimo, estas se realizaron 10 veces para cada muestra y de esta manera obtener el mínimo error y un menor coeficiente de variación.

Los datos obtenidos fueron ingresados a una base en el programa estadístico SPSS (versión 9.0). Para el análisis de los datos se utilizó el Análisis de Varianza Univariado para observar y determinar cuales son los estadios significativos, se utilizó el test t de Student para comparar diferencias de medias y el coeficiente de correlación de Pearson para correlacionar la frecuencia de los estadios VIII con la concentración de espermatozoides en el epidídimo, se consideraron resultados significativos valores de Sig (p) menores de 0.05 ($p < 0.05$).

VI- RESULTADOS

Pesos de Testículos, Epididimos y Vesículas seminales

Luego de 42 días de exposición a la altura observamos que los pesos de los órganos reproductivos tanto de nivel del mar como los de altura son similares, a excepción de la vesícula seminal que mantuvo su peso disminuido.

TABLA 1: Pesos de testículos, epididimos y vesículas seminales luego de 42 días de exposición a la altura.

	Nivel del Mar (n=6)	Altura (n=6)	p
Vesícula Seminal	1.05±0.12	0.52±0.06	p<0.05
Testículo Derecho	1.59±0.01	1.31±0.14	NS
Testículo Izquierdo	1.80±0.15	1.45±0.12	NS
Epidídimo Derecho	0.43±0.12	0.53±0.12	NS
Epidídimo Izquierdo	0.48±0.01	0.52±0.05	NS

Valor expresado en gramos (g). Datos son medias±DS.

Pesos de Testículos, Epidídimos y Vesícula seminal

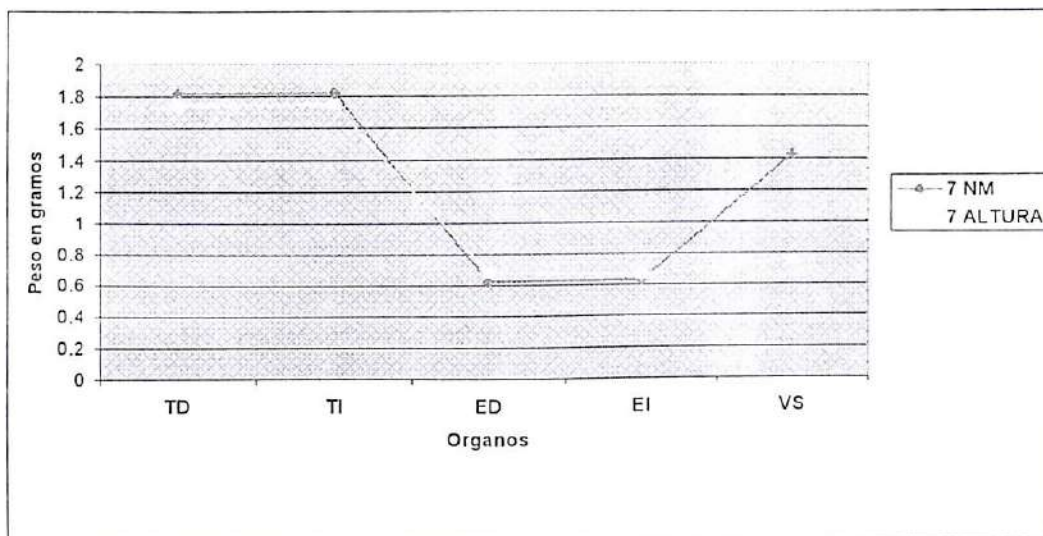
Se observa que los pesos de los distintos órganos disminuyen durante la exposición a la altura. Se puede observar claramente la alteración luego de 14 días de exposición.

TABLA 2: Pesos de los distintos órganos reproductivos, durante los distintos períodos de exposición a la altura.

	7 DIAS		14 DIAS		21 DIAS		42 DIAS	
	(n= 6)		(n= 6)		(n= 6)		(n= 6)	
	NM	Altura	NM	Altura	NM	Altura	NM	Altura
Testículo Derecho	1.82±0.06	1.74±0.02	1.94±0.12	1.39±0.15*	2.27±0.05	1.48±0.19*	1.59±0.01	1.31±0.14
Testículo Izquierdo	1.82±0.06	1.75±0.03	1.94±0.11	1.29±0.17*	2.29±0.04	1.44±0.21*	1.80±0.15	1.45±0.12
Epidídimo Derecho	0.62±0.05	0.68±0.05	0.76±0.01	0.52±0.23*	0.89±0.11	0.58±0.14*	0.43±0.12	0.53±0.12
Epidídimo Izquierdo	0.63±0.03	0.66±0.03	0.67±0.04	0.45±0.09*	0.89±0.04	0.56±0.06*	0.48±0.01	0.52±0.05
Vesícula Seminal	1.43±0.04	0.75±0.05*	1.53±0.13	0.77±0.28*	1.70±0.12	1.07±0.11*	1.05±0.12	0.52±0.06*

Valor expresado en gramos (g). Datos son medias±DS. *p<0.05 respecto al grupo control a nivel del mar.

FIG 1: Efecto de la exposición a la altura sobre los órganos reproductivos luego de 7 días



TD: Testículo Derecho, TI: Testículo Izquierdo, ED: Epidídimo Derecho, EI: Epidídimo Izquierdo, VS: Vesícula Seminal.

FIG 2: Efecto de la exposición a la altura sobre los órganos reproductivos luego de 14 días

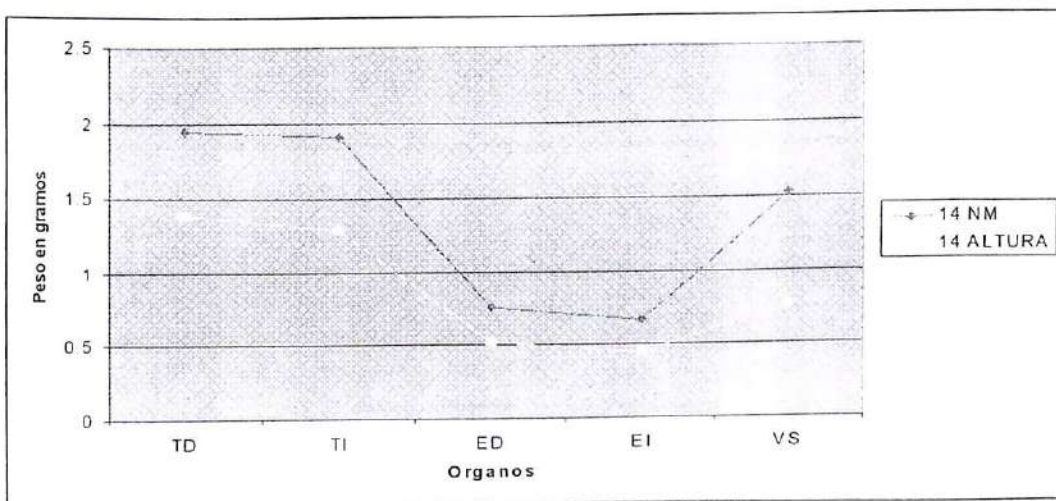


FIG 3: Pesos de los órganos reproductivos luego de 21 días de exposición a la altura.

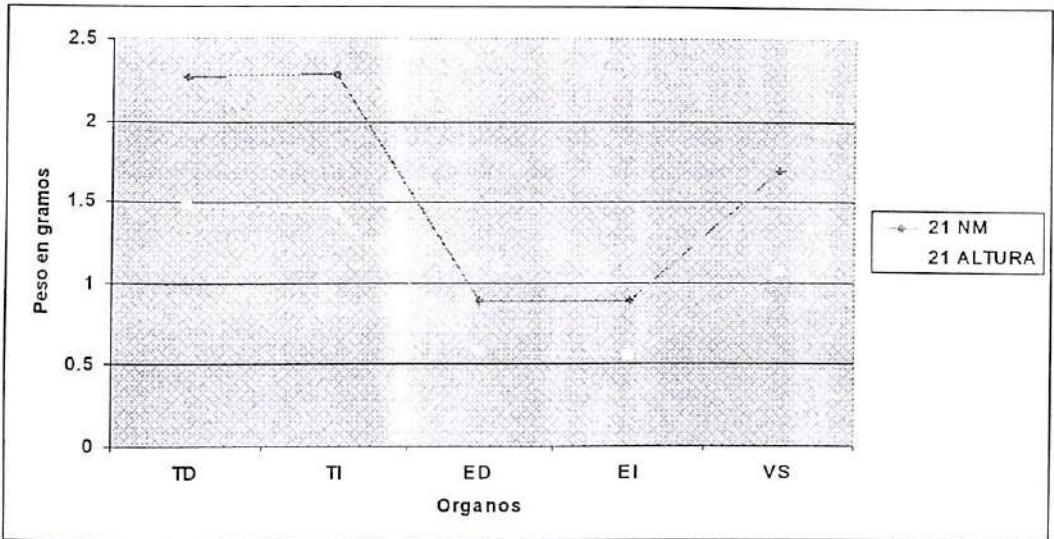
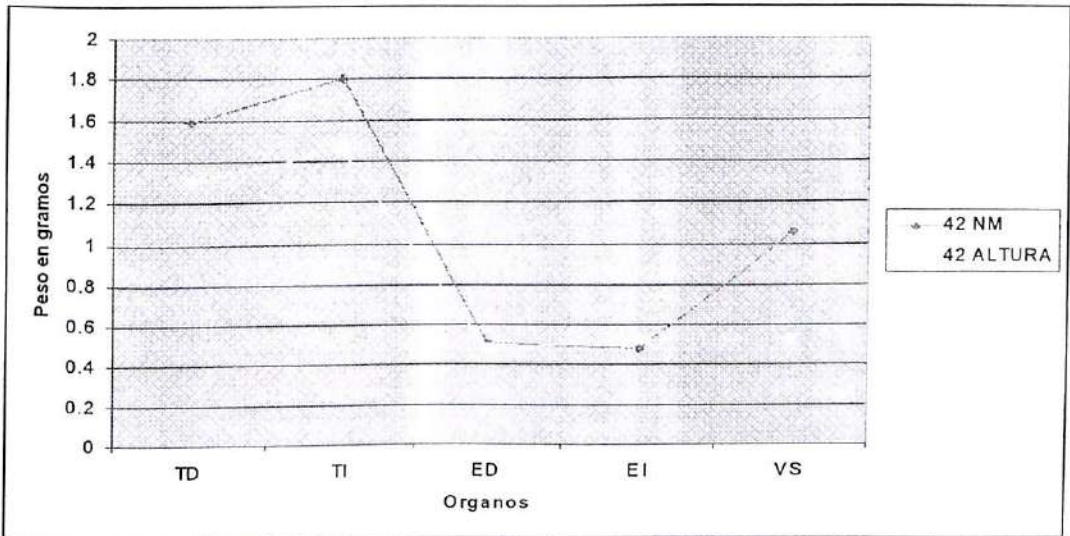


FIG 4: Pesos de los órganos reproductivos luego de 42 días de exposición a la altura.



Longitudes absolutas de los estadios del ciclo espermatogénico

De acuerdo a las longitudes absolutas encontradas en los distintos periodos de exposición establecidos, se observó lo siguiente:

A los 7 días de exposición a más de 4340 msnm disminuye marcadamente el estadio IX-XI (Tabla 3).

TABLA 3: Longitudes Absolutas de los estadios del ciclo espermatogénico encontradas después de 7 días de exposición a la altura.

Estadios	Nivel del Mar (n=6)	Altura (n=6)
I	21.69±6.96	19.5±1.26
II-III	7.04±3.57	29.34±1.46*
IV-V	4.73±2.49	11.05±0.78*
VI	2.74±1.28	8.5±0.63*
VII	5.56±2.68	5.75±0.34
VIII	2.15±0.88	1.16±0.33*
IX-XI	31.46±1.42	6.77±0.44*
XII	9.75±6.12	4.84±0.34
XIII-XIV	14.88±7.51	13.1±0.61

Datos son medias±DS. *p<0.05 respecto al grupo control a nivel del mar.

TABLA 4: Longitudes Absolutas de los estadios del ciclo espermatogénico observadas luego de 14 días de exposición a la altura.

Estadios	Nivel del Mar (n=6)	Altura (n=6)
I	23.20±3.94	16.07±1.95*
II-III	8.81±1.3	21.02±1.48*
IV-V	6.01±2.73	11.15±1.13*
VI	3.66±1.4	8.91±2.0*
VII	12.68±2.9	11.38±1.19
VIII	2.07±0.31	1.28±0.09*
IX-XI	26.68±2.39	12.81±2.68*
XII	7.76±2.8	5.64±1.63*
XIII-XIV	8.63±3.99	11.81±1.85

Datos son medias±DS. *p<0.05 respecto al grupo control a nivel del mar.

A los 14 días de exposición a la altura se observa que el estadio IX-XI sigue disminuido pero con una leve recuperación, también el estadio XII sigue su recuperación.

TABLA 5: Longitudes Absolutas de los estadios de la espermatogénesis observadas después de 21 días de exposición a la altura.

Estadios	Nivel del Mar (n=6)	Altura (n=6)
I	24.06±2.64	12.27±1.41*
II-III	10.53±0.96	12.13±0.91*
IV-V	8.29±1.64	10.95±0.70
VI	4.40±0.96	9.19±1.59*
VII	18.90±1.64	17.01±1.13
VIII	0.51±0.11	3.14±0.98*
IX-XI	22.85±1.44	18.78±2.04
XII	6.17±0.64	6.26±1.18
XIII-XIV	3.29±0.55	10.24±1.55*

Datos son medias±DS. *p<0.05 respecto al grupo control a nivel del mar.

A los 21 días de exposición a más de 4000 msnm, se observa la recuperación casi total del inicio de la espermatogénesis evidenciada en el estadio IX-XI.

TABLA 6: Longitudes Absolutas de los estadios del ciclo espermatogénico observadas luego de 42 días de exposición a la altura.

Estadios	Nivel del Mar (n=6)	Altura (n=6)
I	18.14±4.75	16.65±0.57
II-III	11.99±2.73	17.88±0.49*
IV-V	11.33±1.63	8.29±0.53*
VI	8.61±0.83	5.46±0.48*
VII	16.90±2.42	15.53±0.44*
VIII	2.11±0.19	1.03±0.25*
IX-XI	20.19±2.37	25.56±0.73*
XII	3.17±0.46	3.86±0.33*
XIII-XIV	7.57±2.19	5.75±0.48*

Datos son medias±DS. *p<0.05 respecto al grupo control a nivel del mar.

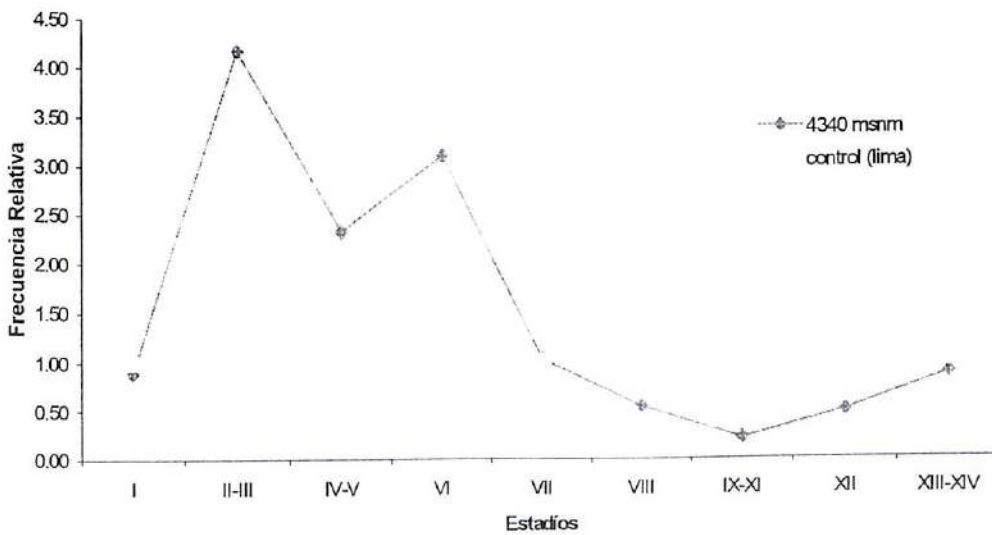
Longitudes Relativas de los estadios del epitelio seminifero

Se calcularon las frecuencias relativas de acuerdo a las frecuencias absolutas obtenidas en los distintos periodos de exposición.

TABLA 7: Longitudes Relativas obtenidas entre el grupo expuesto a la altura durante 7 días y el grupo control a nivel del mar.

Estadios	control (Lima)	4340 msnm
I	1	0.90
II-III	1	4.17
IV-V	1	2.33
VI	1	3.10
VII	1	1.03
VIII	1	0.54
IX-XI	1	0.22
XII	1	0.50
XIII-XIV	1	0.88

FIG 5: Frecuencias Relativas obtenida entre el grupo expuesto y el control después de 7 días.

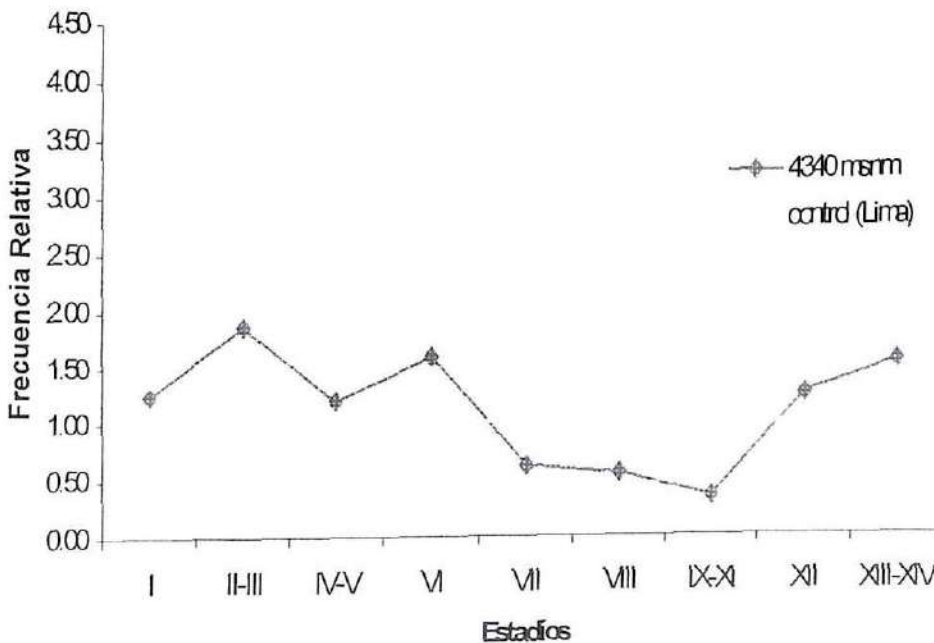


Se observa que el estadio donde se produce la espermiación (VIII) está disminuído así como el estadio IX-XI donde se inicia la espermatogénesis, a los 7 días de exposición a la altura. (Tabla 7, Figura 5).

TABLA 8: Longitudes Relativas de los estadios del ciclo espermatogénico obtenidas luego de 14 días de exposición a la altura.

Estadios	Control (Lima) (n=6)	4340 msnm (n=6)
I	1	1.25
II-III	1	1.87
IV-V	1	1.20
VI	1	1.60
VII	1	0.62
VIII	1	0.56
IX-XI	1	0.34
XII	1	1.26
XIII-XIV	1	1.55

FIG 6: Longitudes Relativas obtenida entre el grupo expuesto y el control después de 14 días.

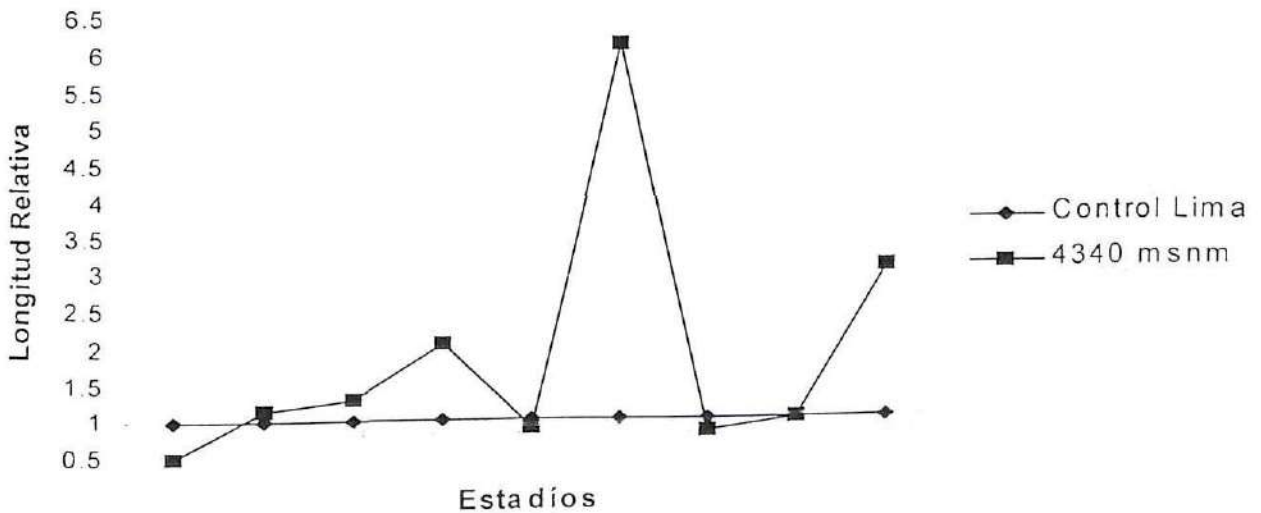


Se observa que los estadios VIII y IX-XI están disminuidos, pero con una leve mejoría con respecto al período de 7 días. Así mismo se observa que el estadio XII se nivela con el control. (Tabla 8, Figura 6).

TABLA 9: Longitud Relativa de los estadios del ciclo espermatogénico obtenida luego de 21 días de exposición a la altura.

Estadios	control (Lima) (n=6)	4340 msnm (n=6)
I	1	0.51
II-III	1	1.15
IV-V	1	1.32
VI	1	2.09
VII	1	0.90
VIII	1	6.16
IX-XI	1	0.82
XII	1	1.01
XIII-XIV	1	3.11

FIG 7: Gráfico que muestra la longitudes relativas obtenidas entre el grupo expuesto y el control después de 21 días.

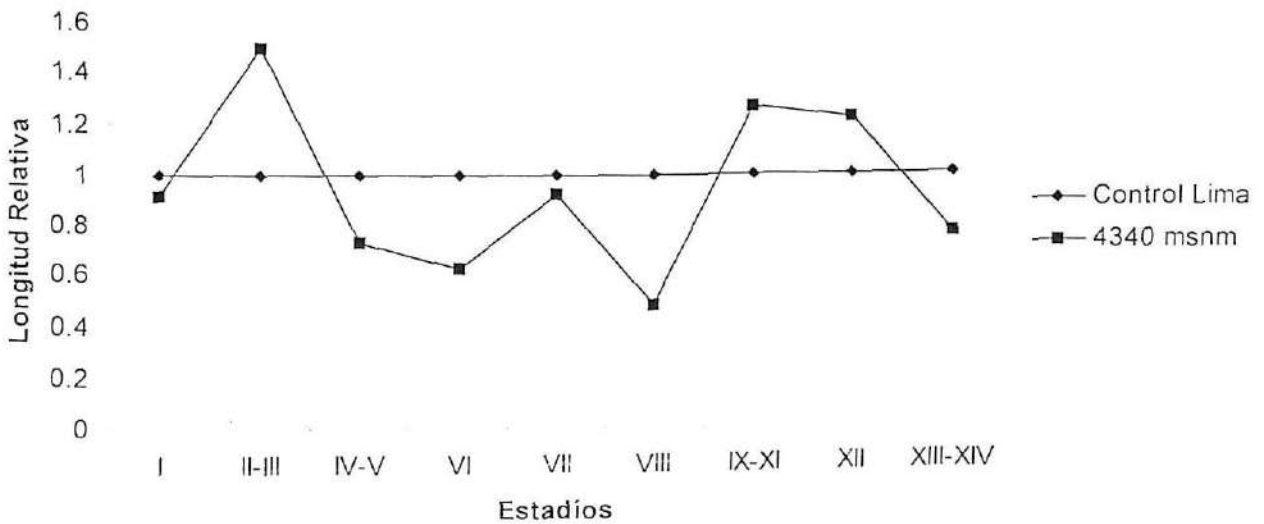


Se observa que a los 21 días de exposición a la altura, la nivelación de los estadios IX-XI y XII de la altura con respecto al control, estos son estadios que dan el inicio a la espermatogénesis. Los estadios VII y VIII muestran también mejoría después de este período. (Tabla 9, Figura 7).

TABLA 10: Longitud Relativa de los estadios del ciclo espermatogénico obtenida luego de 42 días de exposición a la altura.

Estadios	control (Lima) (n=6)	4340 msnm (n=6)
I	1	0.68
II-III	1	1.26
IV-V	1	0.83
VI	1	0.62
VII	1	0.77
VIII	1	1.59
IX-XI	1	1.88
XII	1	1.02
XIII-XIV	1	1.36

FIG 8: Gráfico que muestra la frecuencia relativa obtenida entre el grupo expuesto y el control después de 42 días.



Se observa el aumento de los estadíos VIII y IX-XI, mientras que el resto de estadíos continúan con la regularidad del ciclo espermatogénico, después de un período de exposición a la altura de 42 días, esto con respecto al control a nivel del mar. (Tabla 10, Figura 8).

Recuento de espermatozoides en el epidídimo

TABLA 11: Se muestra la concentración de espermatozoides en el epidídimo durante los diferentes períodos de exposición a la altura, comparado con el control a nivel del mar.

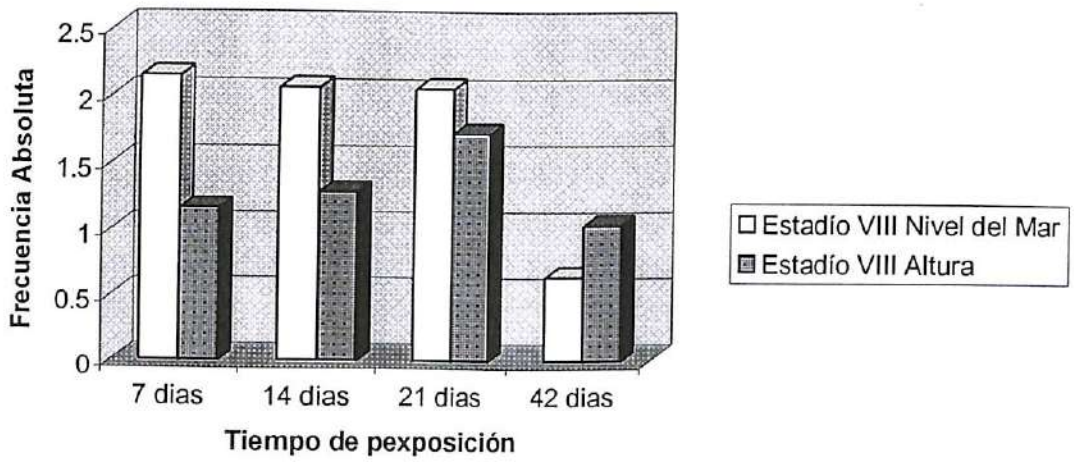
PERIODO	Nivel del mar	Altura
7 DIAS	898.75±27.57	379.71±56.02*
14 DIAS	701.85±31.08	432.06±54.43*
21 DIAS	617.05±32.54	361.19±60.41*
42 DIAS	749.01±62.11	448.97±38.58*

Valores expresados en número de espermatozoides x 10⁷/epidídimo. Los datos son medias±DS. *p<0.05 respecto al grupo control a nivel del mar.

Se observa que la concentración de espermatozoides en el epidídimo disminuye significativamente durante los distintos períodos de exposición a la altura.

FIG 9: Estadío de la espermiación (VIII), Altura vs Nivel del mar luego de 7, 14, 21 y 42 días de exposición aguda.

El estadío VIII disminuye significativamente después de 7 y 14 días de exposición a la altura.



VII- DISCUSIÓN

Se ha demostrado por una variedad de investigaciones que la exposición aguda a la altura produce daño sobre el sistema reproductivo masculino de distintas especies de mamíferos, incluyendo al hombre.

En 1959, Guerra-García, observó que cobayos de nivel del mar trasladados a 4500 m.s.n.m, presentaban alteraciones en los túbulos seminíferos, después de 14 días de estadía en la altura (exposición aguda).

Saxena (1995) demuestra en monos *Rhesus*, una disminución reversible en el volumen seminal, conteo de espermatozoides y motilidad espermática, luego de un período de 21 días de exposición simulada a mas de 4000 msnm.

En 1968, Donayre en un estudio realizado en humanos determinó que la exposición aguda a la altura a 4340 msnm ocasionaba alteraciones en el número de espermatozoides disminuyendo su número. Demostrando el daño en el sistema reproductor masculino producido por la altura.

En un estudio donde se demuestra por métodos cualitativos el daño sobre el sistema reproductor masculino en ratas producido por la exposición aguda a la altura es el realizado por Gonzales y colaboradores en 1990, donde determinan la alteración histológica en los testículos de ratas que fueron expuestas por 4 días a una altura de 4340 msnm, aquí encontraron espermatozoides primarios y espermátides picnóticas, necrosis de numerosas células y espermatozoides primarios.

En el presente trabajo realizado se ha demostrado cuantitativamente el daño producido por la exposición aguda sobre le espermatogénesis en ratas macho en edad reproductiva, siguiendo el ciclo completo espermatogénico, el mismo que en la rata es de tipo longitudinal y tarda 42 días. A su vez se ha monitoreado el ciclo espermatogénico en distintos períodos, como es de 7, 14, 21, hasta llegar a 42 días que es el tiempo en que dura el ciclo completo.

Se ha demostrado también que se ve afectado el recuento de espermatozoides en el epidídimo debido a la exposición aguda a la altura y que esto es producto del daño sobre el ciclo espermatogénico, demostrado también en este estudio de investigación.

El método de las frecuencias relativas descrita por Gonzales y Del Valle (1995) y Almenara y col (2001) para comparar como varía el ciclo espermatogénico de un animal tratado con respecto a su control es muy ventajoso ya que nos permite identificar cual de los 14 estadios del ciclo espermatogénico es el que más se diferencia de los controles y a la vez comprobar el efecto de cualquier sustancia o droga inoculada en el individuo.

Se ha determinado en este estudio que el efecto de la exposición aguda a la altura es más notorio después de 7 y 14 días de exposición y que este efecto se revierte a medida que transcurre el tiempo de exposición, se puede asemejar este fenómeno con los cambios producidos tanto en el sistema cardiorespiratorio como en el sistema renal y que son muy notorios durante los primeros días de permanencia en la altura, y que desaparecen paulatinamente mientras el individuo prolongue su estancia en la altura.

Los cambios que acontecen en el sistema reproductor masculino son causados por cambios hormonales como el aumento de la testosterona, Gonzales (1993) ha demostrado que los niveles de testosterona sérica se incrementan a los 4 días de una exposición aguda a la altura. Lo que causaría una mayor biodisponibilidad y una menor excreción urinaria de la misma (Guerra-García, 1971). Nuestros resultados a los 7, 14, 21 y 42 días no muestran evidencia de esa mayor secreción de testosterona. En efecto los estadios VIII que son andrógenos dependientes más bien disminuyen en la altura a los 7 y 14 días de exposición, igualmente las vesículas seminales, otro órgano andrógeno dependiente no incrementa su peso.

Se determinó en este trabajo que el peso de los órganos reproductivos se ven afectados, a partir de los 14 días de exposición. El peso de todos los órganos disminuyen con respecto al control, lo que nos hace suponer un daño a nivel de los tejidos que conforman la pared de los órganos, pero que el efecto se revierte luego de 42 días de exposición a la altura a excepción de las vesículas seminales. Estas glándulas parecen ser más sensibles a la exposición a la altura, sin embargo otros autores han encontrado un aumento del peso de estas glándulas debido a un mayor efecto androgénico. Proponemos que deberían determinarse los niveles de testosterona y observar como varían de acuerdo al peso de esta glándula.

Se determinó en este trabajo que tanto el inicio de la espermatogénesis (estadío IX-XI) como el de la espermiación (estadío VIII) disminuyen en la altura, después de 7 y 14 días de exposición aguda a la altura. Esto es razonable ya que si un ciclo lo interferimos al inicio de este, es difícil que pueda llegar sin alteraciones al final del mismo.

Estos resultados de 7 y 14 días de exposición a la altura concuerdan con los resultados encontrados en la concentración de espermatozoides en el epidídimo, donde existió una disminución significativa del recuento de espermatozoides. Sin embargo, después del periodo establecido para este estudio, la concentración espermática sigue disminuída, indicando que tanto la recuperación del estadío VIII como el tránsito del espermatozoide desde el túbulo seminífero hacia el epidídimo, son procesos lentos y progresivos.

A los 42 días de exposición se comprueba el efecto reversible del daño espermatogénico que produce la altura. Aquí el estadío VIII y IX-XI están aumentados notoriamente con respecto al del nivel del mar, pero no se incrementa el número de espermatozoides, por las causas arriba mencionadas.

A nivel del mar, se aprecia que el estadio VIII disminuye después de 42 días, esto se debería a dos razones: la primera es que el túbulo seminífero ha liberado una magnitud considerable de espermatozoides al final del ciclo espermatogénico, la segunda razón sería un posible error técnico, lo que nos daría a saber que al final de este período, los animales de la altura no se recuperan del estadio de la espermiación. Esta última aseveración concuerda con el cálculo de la concentración de espermatozoides, para lo cual se recomienda realizar estudios mayores de 42 días y evaluar el ciclo espermatogénico, tanto a nivel del mar como en la altura.

En cuanto a los resultados encontrados por García-Harles(1970) donde determinó la edad fértil de la rata albina, difieren de los valores encontrados en este estudio, sin embargo los resultados de los recuentos en la altura son similares, se sugiere que estas diferencias se deban a la metodología empleada en este estudio. Es necesario entonces validar nuestro protocolo con otras investigaciones y llegar a corregir los datos por una cifra más exacta. Lo que si corrobora es que la edad fértil de la rata determinada por García-Hjarles en la cual esta presenta un pico de concentración de espermatozoides a las 12 semanas de edad es similar a la encontrada en este estudio, luego la concentración disminuye a medida que el animal envejece.

Si bien es cierto se ha demostrado cuantitativamente en este trabajo de investigación que la exposición aguda a la altura afecta el sistema reproductivo masculino en ratas, lo que le conllevaría al animal a la disminución de su fertilidad, revirtiéndose este efecto a partir de los 21 días de exposición, se hace necesario realizar estudios de largo plazo en varones para determinar el tiempo en que se prolonga el daño sobre el sistema reproductor, debido a que nuestro país presenta una gran actividad minera en la sierra central y que por lo tanto muchos profesionales y empleados tienen que trasladarse hasta estos lugares y permanecer ahí por tiempos prolongados. Como también los sujetos que por razones de deporte, de aventura o turismo escalan las grandes montañas de nuestro territorio y a los que se les debería determinar la magnitud del daño producido por la altura sobre el sistema reproductor.

De alguna manera el poblador andino no sufre estos efectos de la altura sobre el sistema reproductor masculino, lo que indicaría la adaptación genética al ambiente estresante de la altura como también podrían tener alguna sustancia natural protectora dentro de su dieta. De acuerdo a lo demostrado en este estudio acerca del daño espermatogénico que produce la altura debemos investigar si algún producto natural revierte estos cambios, como es el caso de la maca cuyo efecto favorable sobre la espermatogénesis ha sido demostrada no solo en ratas sino también en humanos (Gonzales y col. 2001; 2001 a).

VIII- CONCLUSIONES

Los pesos de los órganos reproductivos masculinos en la rata, se ven afectados después de 14 días de exposición a la altura.

El inicio del ciclo espermatogénico, especificado en el estadio IX-XI, en la rata macho en edad reproductiva disminuye considerablemente después de un período de 7 y 14 días de exposición a la altura.

La espermiación, estipulada en el estadio VIII en la rata macho en edad reproductiva disminuye significativamente respecto al control a nivel del mar, luego de un tiempo de exposición a la altura de 7 y 14 días.

Luego de un período de 21 días, el ciclo espermatogénico de la rata macho en edad reproductiva se acomoda a los valores normales del nivel del mar, nivelándose los estadios IX-XI, XII, VII y VIII que son los estadios tanto del inicio del ciclo como del final del mismo que van a dar lugar a la espermátide elongada.

El recuento de espermatozoides en el epidídimo de la rata se mantiene disminuido a partir de los 7 días de exposición a la altura hasta el periodo final del estudio (42 días).

IX- REFERENCIAS

- 1 Almenara, A; Escalante, G; Gazzo, E; Gonzales, GF (2001). Transillumination to evaluate spermatogenesis: effect of testosterone enanthate in adult male rats. Arch Androl 46 (1):21-7.
- 2 Córdova,A. (2001). Efecto del extracto acuoso de *Lepidium meyenii* Chacon sobre la espermatogenesis en ratas macho en edad reproductiva. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Tesis para optar el grado de Licenciado en Ciencias.
- 3 Cicero, AF; Bandieri, E; Arletti, R. (2001). *Lepidium meyenii* Walp. Improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. J Ethnopharmacol 75(2-3):225-9
- 4 Donayre, J; Guerra-García, R; Moncloa, F; Sobrevilla, LA. (1968). Endocrine studies at high altitude. IV. Changes in the semen of men. J Reprod Fertil 16(1):55-8.
- 5 Fahim, MS; Messlha,FS, Giris,SM. (1980). Effect of acute chronic simulated high altitude on male reproduction and testosterone level. Arch Androl 4(3):217-9
- 6 Ferrán, M. SPSS para Windows Análisis Estadístico. (2001). Osborne McGraw-Hill. Madrid. 421pp.
- 7 García-Hjarles, MA. (1989). Sperm count and seminal biochemistry of high altitude inhabitants and patients with chronic altitude sickness. Arch Biol Med Exp (Santiago)1989 .Apr 22(1):61-7.

- 8 García-Hjarles, M A. (1971). Determinación de la edad fértil en la rata albina. Universidad Nacional Agraria La Molina, Tesis para optar el grado de Licenciado en Biología.
- 9 Gonzales GF, Salirrosas A. (1998). Pulse saturation and neurologic assesment in human neonates after vaginal and cesarean delivery. *Gyneacol Obstet* 63(1):63-6
- 10 Gonzales, GF; Villena, A; Gómez, C; Zevallos, M. (1994). Relationship between body mass index, age, and, serum adrenal androgen levels in Peruvian children living at high altitude and at sea level. *Hum Biol* 66(1):145-53
- 11 Gonzales, GF; Rodríguez, I; Valera, J; Sandoval, E; García-Hjarles, MA.(1990). Prevention of high altitude-induced testicular disturbances by previous treatment with cyproheptadine in males rats. *Archives of Andrology*. 24, 201-205.
- 12 Gonzales, GF; Del Valle, L. (1995). Adult rat seminiferous tubules secrete a fraction greater than 30 kDa to regulate spermatogenesis. *Human reproduction*; 10(6)1435-43.
- 13 Gonzales , GF. (1998). El Fútbol y la aclimatación a la altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia . Lima. 237 pp.
- 14 Gonzales, GF. (1992). Andrología, fertilidad e infertilidad. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima. 317 pp.

- 15 Gonzales, GF; Ruiz, A; Gonzales, C; Villegas, L; Córdova A. (2001). Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian journal of Andrology* 3(3):161-240.
- 16 Gonzales, GF; Córdova, A; Gonzales, C; Chung A; Vega, K; Villena, A. (2001 a). *Lepidium meyenii* (maca) improved semen parameters in adult men. *Asian Journal of Andrology* 3 (4):241-320.
- 17 Grasso, P; Rozhavskaya, M; Reichert, L. (1997). A Synthetic Peptide Corresponding to Amino Acid Residues 34 to 37 Human Follicle-Stimulating Hormone β -Subunit Accelerates the Onset of Puberty in Male and Female Mice. *Endocrinology* 138(10):4215-4219.
- 18 Guerra-García, R; Velasquez, A; Whitembury, J. (1965). Urinary testosterone in high altitude natives. *Steroids* 6(3):351-5.
- 19 Hochachka, PW; Rupery, JL; Monge, C. (1999). Adaptation and conservation of physiological system in the evolution of human hypoxia tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 124:1-17
- 20 Le blond, CP; Clermonottt, Y. (1952). Definition of stages of the cycle of the seminiferous epithelium the rat. *Am NY Acad Sci* 55 (548-73).
- 21 Parvinen, M. (1982). Regulation of the Seminiferous Epithelium. *Endoc Rev* 3(4):404-17.
- 22 Robb, GW; Amann, RP and Killian, GJ. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adults rats. *J Reprod Fert* 54:103-107.

- 23 Ruiz de Castilla M. (1975). Reservas Seminales de epidídimo en cobayo. *Anales Científicos UNA*. Vol XIII (1-2).
- 24 Saxena, DK. (1995). Effect of hypoxia by intermittent altitude exposure on semen characteristics and testicular morphology of male rhesus monkeys. *Int J Biometeorol* 38(3):137-40.
- 25 Soderstrom, KO; Parvinen, M (1978). Observations on living rat spermatogenic cells in different developmental stages. *Acta Anat (Basel)*100(4):557-72.
- 26 Taylor, GT; Weiss, J and Komitowski D. (1983). Reproductive Physiology and penile papillae morphology of rats after sexual experience. *J Endocr* 98(2):155-163.
- 27 Taylor, GT; Weiss,J; Frechmann, T and Haller, J. (1985). Copulation induces an acute increase in epididymal sperm numbers in rats. *J Reprod Fert* 73:323-327.
- 28 Tortora, G. (2001). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Biological Science Textbook. México. 1175 pp.
- 29 Zheng, BL; He, K; Kim, CH; Rogers, L; Shao, Y; Huang, ZY; Lu, Y; Yan, SJ; Qlen, LC; Zheng, QY. (2000). Effect of lipidic extract from *lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 55(4):598-602.