

Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica

Analysis of the parameters of the ejaculate in the laboratory Wistar rat: technical description

Rosa Angélica Lucio* José Luis Tlachi** Aurora Adriana López**
René Zempoalteca* Javier Velázquez-Moctezuma***

Abstract

The number of spermatozoa, weight and size of the seminal plug has been quantified in the ejaculate of the laboratory rat and sperm viability, sperm mobility and sperm concentration in samples obtained from the epididymis. The reference values for the rat ejaculate have not been determined maybe due to the difficulty to obtain it directly from the male. Nevertheless, an approach can be obtained analyzing the ejaculate collected from the inseminated female. The objective of this study was to evaluate and propose the values of the macroscopic and microscopic parameters of the semen and seminal plug obtained from the female. The seminal analysis of the Wistar rats was performed adapting the methods used for other species. After one ejaculatory series, semen contained in the uterine horns was obtained, as well as the seminal plug from the vagina. In more than one hundred ejaculates, 94.54% were off-white with 2.35 ± 0.06 mm of viscosity and 8.13 ± 0.02 of pH. The sperm concentration was 16.3 ± 0.59 millions of spermatozoa per mL, 0.72 ± 0.01 mobility index, $64.4 \pm 0.7\%$ viability and $99.11 \pm 0.20\%$ normal morphology. From 99% of seminal plugs, 92.7% were hardened, they weighed 115.63 ± 1.54 mg, measured 12.41 ± 0.13 and 5.31 ± 0.05 mm of length and width respectively, and volume 87.70 ± 1.74 mm³. In conclusion, the used method to obtain and to evaluate the parameters of the ejaculate is reliable, for that reason, it is suggested that the results obtained could be considered as indicative values for semen and seminal plug for the Wistar rat.

Key words: SEMEN, SPERM MOBILITY, SPERM VIABILITY, SPERM MORPHOLOGY, NUMBER OF SPERMATOZOA, SEMINAL PLUG.

Resumen

Se ha cuantificado en el eyaculado de la rata de laboratorio, el número de espermatozoides, peso y tamaño del tapón seminal, y en muestras obtenidas de epidídimo, la viabilidad, movilidad y concentración espermáticas. Los valores de referencia para el eyaculado de la rata no se han determinado quizá por la dificultad para obtenerlo directamente del macho. No obstante, puede obtenerse una aproximación al analizar el eyaculado recolectado de una hembra recién inseminada. El objetivo de este estudio fue evaluar y proponer los valores de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen y tapón seminal obtenidos de la hembra. El análisis del semen de ratas Wistar se realizó adecuando los métodos usados para otras especies. Después de una serie eyaculatoria, se obtuvo el semen contenido en los cuernos uterinos y el tapón seminal de la vagina. En más de 100 eyaculados, 94.54% fueron blanquecinos, con 2.35 ± 0.06 mm de viscosidad y 8.13 ± 0.02 de pH. La concentración espermática fue de 16.3 ± 0.59 millones de espermatozoides por mL, 0.72 ± 0.01 de índice de movilidad, $64.4 \pm 0.7\%$ de viabilidad y $99.11 \pm 0.20\%$ de morfología normal. Del 99% de los tapones seminales, 92.7% fueron endurecidos, pesaron 115.63 ± 1.54 mg, midieron 12.41 ± 0.13 y 5.31 ± 0.05 mm de largo y ancho, respectivamente, y de volumen 87.70 ± 1.74 mm³. En conclusión, el método utilizado para obtener y evaluar los parámetros del eyaculado es confiable, por ello se sugiere que los resultados obtenidos podrían considerarse como valores indicativos para el semen y tapón seminal de la rata Wistar.

Palabras clave: SEMEN, MOVILIDAD ESPERMÁTICA, VIABILIDAD ESPERMÁTICA, MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA, NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES, TAPÓN SEMINAL.

Recibido el 19 de noviembre de 2008 y aceptado el 18 de septiembre de 2009.

*Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla, km 1.5 s/n, Tlaxcala, 90062, Tlaxcala, México, Apartado Postal 264, telefax: (246) 462-1557; correo electrónico: lucioral@yahoo.com.mx,

**Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla, km 1.5 s/n, Tlaxcala, 90062, Tlaxcala, México.

***Área de Neurociencias, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida Michoacán y La Purísima, Iztapalapa, 38340, México, D. F.

Introduction

Semen expelled during ejaculation is constituted by spermatozoa originated in the epididymis and by secretions synthesized by several accessory sexual glands. Semen from species of domestic importance and man has been macroscopically and microscopically analyzed, unlike the laboratory rat, which is the most widely used animal for reproductive studies. Few studies have focused on analyzing some of the parameters, particularly the microscopic ones; from those, the sperm concentration has called the attention. In pioneer studies, 83 millions¹ and 58 millions² of spermatozoa per milliliter of semen obtained after normal copulation, and 79 millions in monandric conditions were estimated,³ in contrast to 18 millions of spermatozoa per milliliter after only one ejaculation.⁴ It must be said that in the referred works, the analyzed seminal fluid was obtained from the inseminated female ducts. With electroejaculation technique, ten millions⁵ and 63 millions of spermatozoa,⁶ and two to three millions of spermatozoa in spontaneous ejaculations were quantified.^{7,8}

In recent studies, besides sperm concentration, mobility and morphology have been evaluated, but not from semen from one or several ejaculations, but in spermatozoa obtained from the epididymis. In regard to the sperm concentration, 152 to 230 millions,⁹ 440 millions,¹⁰ 180 millions¹¹ and 95 millions of spermatozoa have been quantified.⁵ Other studies have limited to their morphology, it has been found that 8%¹² and 16% of spermatozoa from old rats presented cytoplasmic droplets.¹¹ In regard to sperm mobility, 23% of spermatozoa showed mobility.⁵ By means of the computer-assisted semen analysis (CASA), it was found that 75%,¹² 79%¹³ and 100%¹¹ of the spermatozoa present progressive mobility.

The parameters evaluated in the seminal plug have been limited to the macroscopic ones: presence, weight and size. In regard to presence, there was no seminal plug in 32%⁴ and 20% of the ejaculations.¹⁴ In relation to weight, quantities vary from 100 mg,⁴ 130 mg¹⁴ to 170 mg.¹⁵ In relation to size, 12 mm until 5 mm are estimated for width and length of the seminal plug, respectively.⁴ Then, it is clear that not all parameters are considered in only one study, that the analyzed samples have been obtained from inseminated females or by electroejaculation, or are spermatozoa from the epididymal cauda. Therefore, there is no systematic method that can allow analyzing the higher number of rat ejaculate characteristics, or correspondent reference values.

The aim of this study was to adequate the technique to macroscopic and microscopically evaluate semen and seminal plug, obtained from the female

Introducción

Durante la eyaculación se expelen semen que está constituido de espermatozoides provenientes del epidídimo y de secreciones sintetizadas por las distintas glándulas sexuales accesorias. Tanto el semen de las especies de importancia doméstica como el del hombre han sido analizados en forma macroscópica y microscópica, no así el de la rata de laboratorio que es el modelo animal más ampliamente utilizado en los estudios reproductivos. Pocos estudios se han enfocado en analizar algunos de los parámetros, particularmente los microscópicos, de ellos la concentración espermática ha llamado la atención. En estudios pioneros se estimaron 83 millones¹ y 58 millones² de espermatozoides por mililitro en el semen obtenido después de la cópula normal, y 79 millones en condiciones monándricas,³ contrastado con 18 millones de espermatozoides por mililitro después de sólo una eyaculación.⁴ Debe mencionarse que en los trabajos referidos, el fluido seminal analizado se obtuvo de los conductos de las hembras inseminadas. Con la técnica de electroeyaculación se cuantificaron diez millones⁵ y 63 millones de espermatozoides⁶ y de dos a seis millones en eyaculaciones espontáneas.^{7,8}

En estudios más recientes, además de la concentración espermática, se ha evaluado la movilidad y la morfología, pero no del semen de una o varias eyaculaciones, sino de los espermatozoides obtenidos del epidídimo. En relación con la concentración espermática, se han cuantificado de 152 a 230 millones,⁹ 440 millones,¹⁰ 180 millones¹¹ y 95 millones de espermatozoides.⁵ Otros estudios se han limitado a la morfología en ellos, se ha encontrado que 8%¹² y 16% de los espermatozoides de ratas viejas tenían gota citoplásmica.¹¹ Respecto a la movilidad espermática, 23% de los espermatozoides mostraron movilidad.⁵ Mediante el programa de análisis asistido por computadora para analizar el semen (CASA, por sus siglas en inglés) se encontró que 75%,¹² 79%¹³ y 100%¹¹ de los espermatozoides presentan movilidad progresiva.

Los parámetros evaluados en el tapón seminal se han limitado a los macroscópicos: presencia, peso y tamaño. Respecto a la presencia, no se encontró tapón seminal en 32%⁴ y 20% de las eyaculaciones.¹⁴ En cuanto al peso, las cantidades varían desde 100 mg,⁴ 130 mg¹⁴ hasta 170 mg.¹⁵ En cuanto al tamaño, se estiman 12 mm y 5 mm para el largo y ancho del tapón seminal, respectivamente.⁴ Entonces, es claro que no todos los parámetros están considerados en un mismo estudio, que las muestras analizadas se han obtenido de las hembras inseminadas o por electroeyaculación, o son espermatozoides de la cauda epididimaria. Por lo tanto, no hay un método sistemático que permita analizar el mayor número de las características del

after an ejaculate series, as well as to determine the respective indicative values.

Animals

Adult male Wistar rats (body weight of 300-450 g) were used, housed in standard biotery conditions with controlled temperature and humidity, and with an inverted light cycle 12:12 hours (light was turned on at 22:00 h). Commercial feed* was daily administered and they had continuous access to water. All parameters were accepted by the Comité de Ética del Centro de Investigación, of the Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Copulatory behavior

Copulatory tests were carried out during the second third of the dark period, placing the male rat on a cylindrical sand (50 × 50 cm of height and diameter), of transparent acrylic, during five minutes to become used to it. Then, a female rat was placed on the sand, always of the same body weight (250-280 g), virgin, ovariectomized and with induced estrus. Estrus was induced by the sequential treatment of estradiol benzoate (10 µg) followed by progesterone (2 mg), for 48 and four hours, respectively, before the test. Macroscopic and microscopic parameters of the semen were evaluated in 111 ejaculates from sexually intact and expert males.

Ejaculate analysis

Approximately, ten minutes after the male had ejaculated, the female was anesthetized with sodium pentobarbital** (26 mg/kg body weight, intraperitoneal via), in order to perform an abdominal incision and expose the uterine horns, which after being proximally and distally ligated, were removed from the cavity. Later, the ligated uterine horns were submerged in a Petri dish containing saline solution (0.9%) at 37°C to easily eliminate the fat tissue and the external uterine vessels. The seminal content of both uterine horns was poured in a micro-centrifuge tube (transparent and with a capacity of 1.5 mL), kept in a thermo bath* at 37°C for immediate analysis of macroscopic and microscopic parameters.¹⁶

Macroscopic parameter evaluation of semen

The color of semen (seminal fluid aspect, considered as a qualitative parameter) was determined by direct observation. In order to determine the viscosity (seminal fluid consistency, expressed in milliliters), the tip of the transference pipette with 0.125 mL of

eyaculado de la rata, ni tampoco existen los valores de referencia correspondientes.

El propósito de este estudio fue adecuar la técnica para evaluar macroscópica y microscópicamente el semen y el tapón seminal, obtenidos de la hembra después de una serie eyaculatoria, así como determinar los valores indicativos respectivos.

Animales

Se utilizaron ratas macho, adultas, de la cepa Wistar (peso corporal de 300-450 g), mantenidas en condiciones estándar de bioterio con temperatura y humedad controladas y con ciclo de luz invertido 12:12 horas (la luz se encendía a las 22:00 h). Se les proporcionó diariamente alimento comercial* y tenían acceso continuo al agua. Todos los procedimientos fueron aceptados por el Comité de Ética del Centro de Investigación, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Conducta copulatoria

Las pruebas copulatorias fueron realizadas durante el segundo tercio del periodo de oscuridad, consistieron en colocar a la rata macho en una arena cilíndrica (50 × 50 cm de alto y diámetro), de acrílico transparente, durante cinco minutos de habituación. Después se colocó en la arena una rata hembra, siempre del mismo peso corporal (250-280 g), virgen, ovariectomizada y con estro inducido. El estro fue inducido mediante el tratamiento secuencial de benzoato de estradiol (10 µg) seguido de progesterona (2 mg), 48 y cuatro horas, respectivamente, antes de la prueba. Los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen fueron evaluados en 111 eyaculados de machos intactos y expertos sexualmente.

Análisis del eyaculado

Aproximadamente diez minutos después de que el macho había desplegado el patrón eyaculatorio, la hembra fue anestesiada con pentobarbital sódico** (26 mg/kg de peso corporal, vía intraperitoneal), para realizar una incisión abdominal y exponer a los cuernos uterinos, que ligados proximal y distalmente, fueron extraídos de la cavidad. Luego los cuernos uterinos ligados fueron sumergidos en una caja de Petri que contenía solución salina (0.9%) a 37°C, para eliminar con facilidad el tejido graso y la red de vasos uterinos externos. El contenido seminal de ambos cuernos uterinos fue vertido en un tubo de microcentrifuga (transparente y con capacidad de 1.5 mL), mantenido en un termobañ* a 37°C para el inmediato análisis

*Purina Chow, México.

**Pfizer, S. A. de C. V., México.

fresh semen was placed on the border of the micro-centrifuge tube, and 0.60 mL were set free in a precise way. The tip was slowly removed from the border of the micro-centrifuge tube, in order to observe the semen filament formation. The length of the filament was measured with a digital Vernier.** To measure pH (semen acidity or alkalinity), 10 μ L of fresh semen were placed on a pH indicator paper. The acquired color was immediately compared to the printed standard colors.

Microscopic parameter evaluation of semen

In order to measure the sperm concentration (number of spermatozoa, expressed in millions per milliliter), the sample dilution was first determined, for this, 10 μ L of fresh semen were poured on a slide (25 $\times$ 75 mm) and a coverglass was placed on it (22 $\times$ 22 mm) then, it was observed with a 20X objective. The number of spermatozoa was quantified in three random fields to determine the sperm density, which, in mean, was 93.33 spermatozoa (and the range of 60-120 spermatozoa). Therefore, the semen dilution used was 1:200; a hosepipe was used in order to prepare it (30-40 cm in length and 3 mm in lumen diameter), connected to the superior extreme of the dilution pipette (for erythrocytes) Shali.

Fresh semen was suctioned using the hose up to the 0.5 mark of the Shali pipette; afterwards, the diluted liquid was absorbed (2% formaldehyde) up to the 101 mark. The hosepipe was disconnected and the pipette was horizontally placed, covering its open extremes with the thumb and medium finger. The pipette was manually shaken until the mixture was homogenized. The semen, thus diluted, was placed in a micro-centrifuge tube. Ten μ L of the diluted semen were placed in each one of the two Neubauer hemocytometer grids and were observed with a 20X objective. The evaluation was carried out in the central grid (known as E), considering the spermatozoa of five specific squares (four on the corner and one on the middle). The spermatozoa which heads were in these five small squares were counted, as established by the World Health Organization.¹⁷

The number of spermatozoa counted in each grid was added and was divided to obtain the mean, the result was multiplied by 1 000 000. For determining the sperm mobility (individual mobility of the spermatozoa), classified in four categories: fast progressive, slow progressive, *in situ* and immobile), 10 μ L of fresh semen were placed on a slide with a coverglass and 100 spermatozoa that crossed the horizontal line drawn on the half observation field were analyzed.

The lecture was done from left to right and the 20X objective was used. The spermatozoa that dela-

de los parámetros macroscópicos y microscópicos.¹⁶

Evaluación de los parámetros macroscópicos del semen

El color del semen (aspecto del fluido seminal, considerado un parámetro cualitativo) fue determinado mediante observación directa. Para determinar la viscosidad (consistencia del fluido seminal, expresada en milímetros) se colocó sobre el borde del tubo de microcentrífuga, la punta de una pipeta de transferencia con 0.125 mL de semen fresco, se liberaron 0.60 mL de manera precisa. La punta se retiró lentamente del borde del tubo de microcentrífuga para observar la formación del filamento de semen. La longitud del filamento se midió con un Vernier digital. Para medir el pH (acidez o alcalinidad del semen) se colocaron 10 μ L de semen fresco sobre un papel de indicador de pH. El color adquirido se comparó inmediatamente con los colores estándar impresos.

Evaluación de los parámetros microscópicos del semen

Para medir la concentración espermática (número de espermatozoides, expresado en millones por mililitro), primero se determinó la dilución de la muestra, para ello se vertieron 10 μ L de semen fresco sobre un portaobjetos (25 $\times$ 75 mm) y sobre la muestra se colocó un cubreobjetos (22 $\times$ 22 mm) y se observó con el objetivo 20X. El número de espermatozoides se cuantificó en tres campos al azar para determinar la densidad espermática, que, en promedio, fue de 93.33 espermatozoides (y el rango de 60-120 espermatozoides). Por lo tanto, la dilución de semen que se utilizó fue 1:200; para prepararla se utilizó una manguera de succión (30-40 cm de largo y 3 mm de diámetro del lumen), conectada al extremo superior de la pipeta de dilución (para eritrocitos) Shali.

Se succionó semen fresco usando la manguera hasta la marca 0.5 de la pipeta Shali, después se absorbió el líquido de dilución (formaldehído a 2%) hasta la marca 101. La manguera fue desconectada y la pipeta se colocó horizontalmente, cubriendo sus extremos abiertos con el dedo pulgar y el dedo medio. La pipeta se sacudió en forma manual hasta homogeneizar la mezcla. El semen así diluido fue colocado en un tubo de microcentrífuga. Se colocaron 10 μ L del semen diluido en cada una de las dos cuadrículas del hemocitómetro Neubauer y se observaron con el objetivo 20X. La evaluación se realizó en la cuadrícula central (conocida como E), considerando los espermatozoides de cinco cuadros específicos (los cuatro de las esquinas y el de en medio). Se contaron

*Felisa®, FE-371, México.

yed three seconds to cross the line were identified as fast progressive mobility; those that delayed more than four seconds, were identified as slow progressive mobility. The spermatozoa with *in situ* mobility were considered as no progressive, and those without mobility were identified as immobile.

The sperm mobility index was determined by adding the number of fast plus the slow spermatozoa, the result was divided between 100. The mobility of the spermatozoa was filmed in order to corroborate data. The sperm viability (number of live spermatozoa, expressed in percentage) was determined using a colorant constituted by nigrosin, eosin and sodium citrate, all soluble in distilled water. Ten μL of semen were placed on a slide, and then 10 μL of the colorant were added, both samples were mixed with a tooth pick. The stained spermatozoa were considered as dead and those not stained, alive. The sperm morphology determination (number of normal spermatozoa, expressed in percentage) was carried out in the stained preparation used to evaluate the sperm viability. Normal spermatozoa with a sickle-shape head and large flagella *versus* the abnormal ones, with double head and fragmented or zigzag flagella were distinguished. In both cases, a hundred spermatozoa were randomly evaluated with the objective 100X.

All semen microscopic parameters were evaluated twice in order to decrease error; also, they were analyzed using an equipped microscope* with colored video-camera** and a video-tape recording,*** everything connected to a computer. The digital counter allows sperm count according to their mobility, viability or morphology.

After semen was evaluated, the seminal plug of the vagina was obtained by separating the pubic symphysis and longitudinally cutting the vaginal wall. This procedure is useful for obtaining semen and seminal plug from a recently inseminated female.^{3,4}

Macroscopic parameter evaluation of the seminal plug

The consistency of the seminal plug (seminal plug solidity, qualitative parameter) was determined by direct tactile inspection, the weight of the seminal plug (seminal plug mass, expressed in milligrams) was determined with an analytical scale,* the size of the seminal plug (longitude and width of the seminal plug, expressed in millimeters), was assessed using a digital Vernier and the seminal plug volume (mass occupied by the seminal plug, expressed in cubic millimeters), using the formula:

$$(\text{longitude})(\Pi)(r^2)/3$$

los espermatozoides cuyas cabezas estaban dentro de estos cinco cuadrados pequeños, como lo establece la Organización Mundial de la Salud.¹⁷

Se sumó el número de espermatozoides contados en cada cuadrícula y se dividió para obtener el promedio, el resultado se multiplicó por 1 000 000. Para determinar la movilidad espermática (movimiento individual de los espermatozoides, clasificada en cuatro categorías: progresiva rápida, progresiva lenta, *in situ* e inmóvil) se colocaron 10 μL de semen fresco sobre un portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos y se analizaron 100 espermatozoides que cruzaron la línea horizontal dibujada sobre la mitad del campo de observación.

La lectura se hizo de izquierda a derecha y se utilizó el objetivo 20X. Los espermatozoides que tardaron tres segundos en cruzar la línea se identificaron como de movilidad progresiva rápida; los que tardaron más de cuatro segundos, de movilidad progresiva lenta. Los espermatozoides con movimiento *in situ* fueron considerados no progresivos, y aquellos sin movimiento se identificaron como inmóviles.

El índice de movilidad se determinó sumando el número de espermatozoides rápidos con el número de espermatozoides lentos, el resultado se dividió entre 100. La movilidad de los espermatozoides se filmó para corroborar los datos. La viabilidad espermática (número de espermatozoides vivos, expresado en porcentaje) se determinó usando un colorante constituido de nigrosina, eosina y citrato de sodio, todos solubles en agua destilada. Se colocaron 10 μL de semen sobre un portaobjetos, luego se añadieron 10 μL del colorante, ambas muestras se mezclaron con un palillo de madera. Los espermatozoides teñidos se consideraron muertos y los no teñidos, vivos. La determinación de la morfología espermática (número de espermatozoides normales, expresado en porcentaje), se realizó en la preparación teñida utilizada para evaluar la viabilidad espermática. Se distinguieron los espermatozoides normales, con cabeza en forma de hoz y flagelo largo *versus* los anormales, con doble cabeza, flagelo fragmentado o en zig-zag. En ambos casos se evaluaron 100 espermatozoides al azar con el objetivo 100X.

Todos los parámetros microscópicos del semen fueron evaluados dos veces para reducir errores; además se analizaron usando un microscopio* equipado con videocámara a color,** y una videogradora,*** todo ello conectado a una computadora. El contador digital permite el conteo de espermatozoides considerados según su movilidad, viabilidad o morfología.

Después de evaluar el semen, se obtuvo el tapón

*Optiphot-2 Nikon, Estados Unidos de América.

**TK-C1380; JVC, Estados Unidos de América.

***LG (EC47M), México.

where:

r = seminal plug radius.

Microscopic parameter evaluation of the seminal plug

Cytological elements of the seminal plug (number of single heads, single flagella and complete spermatozoa, expressed in percentage).

First, the seminal plug, in its equatorial axis, was cut transversally with a scalpel, obtaining a seminal plug divided in two halves. Then, the half face of the plug was horizontally slid from left to right over a slide (25 × 75 mm), drawing four lines, it took caution not to overlap them. The observed elements were counted and added, and then the percentage of each one was obtained.

Data from each macroscopic and microscopic parameter of semen and seminal plug were analyzed by descriptive statistics, graphics were done with the 7.1 Statistic software.

One hundred and eleven ejaculates from the reproductive ducts of recently inseminated females were analyzed. Semen was obtained from the uterine horns and seminal plug of the vagina. The macroscopic and microscopic parameter values of 104 out of 111 semen samples are expressed in Table 1 as mean ± standard error. The sperm concentration showed great variability, the minimal was four millions of spermatozoa per milliliter of semen, found in three semen samples and, in two of them, the maximum was 39 millions of spermatozoa per milliliter of semen. Approximately, 30 semen samples showed from ten to 15 millions of spermatozoa per milliliter, and about 40 had from 15 to 20 millions of spermatozoa per milliliter (Figure 1a).

The sperm mobility index was 0.72 ± 0.01 , the lowest was 0.42 in one semen sample, and the highest was 0.90 in 13 samples. The majority of the semen samples showed a mobility index of 0.6 to 0.8 (Figure 1b). Finally, the sperm viability was not so variable; in fact, the majority of the semen samples showed 60% to 70% of live spermatozoa. The lowest value of live spermatozoa was 32% and the highest 86%, corresponding to two and five samples, respectively. The mean of the sperm viability was 64.45 ± 0.73 (Figure 1c).

The macroscopic parameter values of 102 out of 111 seminal plugs, such as: weight, size and volume were expressed as mean ± standard error (Table 2). The seminal plug had some single heads and very few single flagella, as well as scarce complete spermatozoa (Figure 2).

The seminal plug weight was 115.6 ± 1.5 mg, varying from 104.6 mg to 126 mg. The volume also showed variance, from 40 to 140 mm³, the mean value

seminal de la vagina separando la sínfisis púbica y cortando longitudinalmente la pared vaginal. Este procedimiento es útil para obtener el semen y tapón seminal de la hembra recién inseminada.^{4,3}

Evaluación de los parámetros macroscópicos del tapón seminal

La consistencia del tapón seminal (solidez del tapón seminal, parámetro cualitativo) se determinó mediante inspección táctil directa, el peso del tapón seminal (masa del tapón seminal, expresada en miligramos) se determinó con una balanza analítica,* el tamaño del tapón seminal (largo y ancho del tapón seminal, expresados en milímetros), se determinó usando un Vernier digital y el volumen del tapón seminal (masa ocupada por el tapón seminal, expresado en milímetros cúbicos), aplicando la fórmula:

$$(\text{longitud})(\Pi)(r^2)/3$$

donde:

r = radio del tapón seminal.

Evaluación de los parámetros microscópicos del tapón seminal

Elementos citológicos del tapón seminal (número de cabezas solas, flagelos solos y espermatozoides completos, expresados en porcentaje). Primero se cortó transversalmente con un bisturí el tapón seminal en su eje ecuatorial, obteniendo dos mitades. Después, la mitad rostral del tapón se deslizó en forma horizontal de izquierda a derecha sobre un portaobjetos (25 × 75 mm), dibujando cuatro líneas, se tuvo cuidado de no traslaparlas. Se contaron los elementos observados y se sumaron, después se obtuvo el porcentaje de cada uno.

Los datos de cada parámetro macroscópico y microscópico del semen y tapón seminal fueron analizados mediante estadística descriptiva, las gráficas se hicieron con el software Statistica 7.1. Se analizaron 111 eyaculados de los conductos reproductivos de las hembras recién inseminadas. El semen se obtuvo de los cuernos uterinos y el tapón seminal de la vagina. Los valores de los parámetros macroscópicos y microscópicos de 104 de 111 muestras de semen se expresan en promedio ± error estándar en el Cuadro 1. La concentración espermática mostró gran variabilidad, la mínima fue de cuatro millones de espermatozoides por mililitro de semen, encontrada en tres muestras de semen, y la máxima de 39 millones de espermatozoides por mililitro de semen en dos de ellas. Aproximadamente 30 muestras de semen presentaron de

*Mettler AE50, Estados Unidos de América.

was $87.7 \pm 1.74 \text{ mm}^3$. In regard to the size, the mean was $12.4 \pm 0.1 \text{ mm}$ of longitude and $5.3 \pm 0.05 \text{ mm}$ of width. The seminal plug longitude was more variable than the width, the shortest was 9.70 mm and the longest was 18.45 mm; the thinner was 3.60 mm and the widest was 6.83 mm.

Finally, the seminal plug cytological analysis showed more single heads than complete spermatozoa, their values vary between different seminal plug smears (Figure 3a). In one smear there were 23 single heads, while in another one there were 96. The range of single flagella was one to 76, although there were commonly 11 to 20 flagella (Figure 3b). Also, 31 out of 102 smears did not show complete spermatozoa and in 65 smears the range was from one to ten complete spermatozoa (Figure 3c).

The macroscopic and microscopic parameters of semen have been analyzed in species of economic importance and in man. The evaluation of such parameters is called direct when the analyzed semen is directly obtained from the male and placed in special containers after mechanical stimulation (for instance, rooster,²¹ man¹⁷) or electric (for example, horse²²). When semen is obtained from recently inseminated females (for instance, female rat,^{3,4} woman¹⁷) after sexual contact and is analyzed, such procedure is known as indirect evaluation. The semen direct or indirect evaluation (constituted by spermatozoa and secretion of accessory sexual glands) consists in the analysis of the ejaculate macro and microscopic characteristics, while in the samples obtained from the

diez a 15 millones de espermatozoides por mililitro, y alrededor de 40 tuvieron de 15 a 20 millones de espermatozoides por mililitro (Figura 1a).

El índice de la movilidad espermática fue de 0.72 ± 0.01 , el más bajo fue 0.42 en una muestra de semen, y el más alto de 0.90 en 13 muestras. La mayor parte de las muestras de semen presentaron un índice de movilidad de 0.6 a 0.8 (Figura 1b). Finalmente, la viabilidad espermática no fue tan variable; de hecho, la mayor parte de las muestras del semen presentó entre 60% a 70% de espermatozoides vivos. El valor más bajo de espermatozoides vivos fue 32% y el más alto fue de 86%, correspondiendo a dos y cinco muestras, respectivamente. El promedio de la viabilidad espermática fue 64.45 ± 0.73 (Figura 1c).

Los valores de los parámetros macroscópicos de 102 de 111 tapones seminales, como peso, tamaño y volumen fueron expresados en promedio $\pm$ error estándar (Cuadro 2). El tapón seminal contenía algunas cabezas solas y muy pocos flagelos solos, así como escasos espermatozoides completos (Figura 2).

El peso del tapón seminal fue de $115.6 \pm 1.5 \text{ mg}$, variando desde 104.6 mg hasta 126 mg. El volumen también mostró variación, de 40 a 140 mm^3 , el valor promedio fue $87.7 \pm 1.74 \text{ mm}^3$. En relación con el tamaño, el promedio fue $12.4 \pm 0.1 \text{ mm}$ de longitud y $5.3 \pm 0.05 \text{ mm}$ de ancho. La longitud del tapón seminal fue más variable que el ancho, el más corto fue de 9.70 mm y el más largo de 18.45 mm; el más delgado fue de 3.60 mm y el más ancho de 6.83 mm.

Finalmente, el análisis citológico del tapón seminal

Cuadro 1
VALORES DE LOS PARÁMETROS SEMINALES DE RATAS
SEMINAL PARAMETER VALUES OF RATS

<i>Parameters</i> (104 of 111 semen samples)	<i>Values</i> (mean $\pm$ se)	<i>Value range of (iq-sq)</i>
<i>Macroscopic</i>		
Viscosity	2.35 ± 0.06	2.00 to 3.00
pH	8.13 ± 0.02	8.00 to 8.33
<i>Microscopic</i>		
Sperm concentration (10 ⁶ /mL)	16.30 ± 0.59	12.50 to 19.50
Sperm mobility index (0-1)	0.72 ± 0.01	0.70 to 0.80
Fast progressive mobility (% spz)	46.02 ± 0.74	42.16 to 51.00
Slow progressive mobility (% spz)	31.69 ± 0.62	28.16 to 36.33
<i>in situ</i> mobility (% spz)	15.25 ± 0.63	12.16 to 16.16
Immobility (% spz)	9.01 ± 0.36	6.83 to 10.50
Sperm viability (% live spz)	64.45 ± 0.73	61.16 to 67.33
Sperm morphplogy (% normal spz)	99.11 ± 0.20	99.00 to 100.0

Inferior quartile (iq) and superior quartile (sq) corresponding ranges.

Spz = spermatozoid

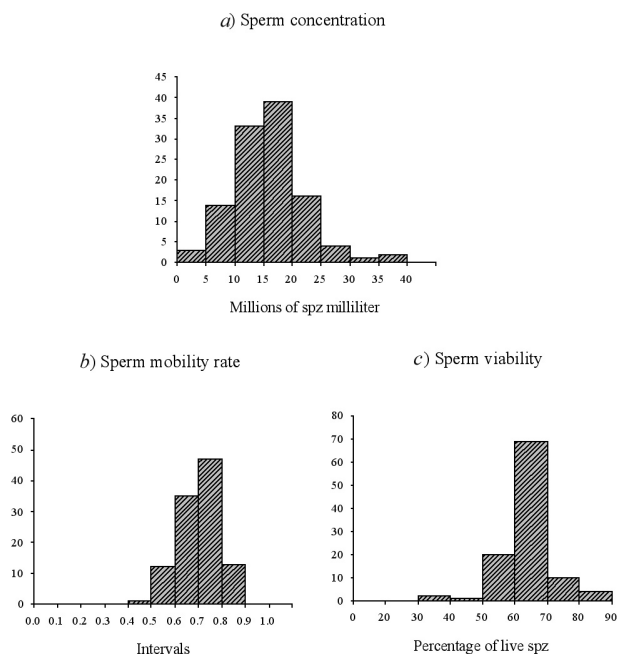


Figura 1. Parámetros microscópicos del semen. *a)* Concentración espermática. *b)* Índice de movilidad espermática. *c)* Viabilidad espermática. Los parámetros fueron analizados en 104 muestras de semen obtenidas de los cuernos uterinos de hembras recién inseminadas.

Figure 1. Semen microscopic parameters. *a)* Sperm concentration. *b)* Sperm mobility index. *c)* Sperm viability. Parameters were analyzed in 104 semen samples obtained from the uterine horns of recently inseminated females.

epididymis (constituted only by spermatozoa) the analysis limits to evaluate some spermatozoa microscopic characteristics, as concentration and morphology.

It has been difficult to obtain semen directly from the male rat because of the retraction of the prepuce, in spite of inducing different erection intensities it does not causes ejaculation,²³ besides, electroejaculation produces very small volumes of semen.²⁴ Likewise, there are no artificial vaginas to collect ejaculate.²⁴ This could explain why the majority of rat semen parameters have not been evaluated and their reference values are also unknown.

Because the rat constitutes one of the most utilized species in reproductive biology laboratories, in the present study it was considered that evaluating the majority of the macro and microscopic parameters of its ejaculate would result in a more complete work. Therefore, the importance of describing in detail the technique used, as well as the copulatory context conditions (sexually expert males, virgin females but ovariectomized with induced estrus and only one ejaculation) to obtain values that serve as comparison with other studies whose objective is to perform some sort of manipulation that has an influence on semen characteristics. Although it is known that the results

mostró más cabezas solas que espermatozoides completos, sus valores variaron entre los diferentes frotis de los tapones seminales (Figura 3a). En un frotis se encontraron 23 cabezas solas, mientras que en otro se observaron 96. El rango de flagelos solos fue de uno hasta 76, aunque comúnmente se encontraron de 11 a 20 flagelos (Figura 3b). Además, 31 de 102 frotis no mostraron espermatozoides completos y en 65 frotis el rango fue de uno a diez espermatozoides completos (Figura 3c).

Los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen se han analizado en especies de importancia económica y en el hombre. La evaluación de tales parámetros se denomina directa cuando el semen analizado es obtenido directamente del macho y depositado en contenedores especiales después de la estimulación mecánica (por ejemplo, gallo,²¹ hombre¹⁷) o eléctrica (por ejemplo, caballo²²). Cuando el semen es obtenido de hembras recién inseminadas (por ejemplo, rata hembra,^{3,4} mujer¹⁷) luego de un encuentro sexual y es analizado, dicho procedimiento se conoce como evaluación indirecta. La evaluación directa o indirecta de semen (constituida por espermatozoides y secreciones de glándulas sexuales accesorias) consiste en el análisis de las características macro y microscópicas del eyaculado, mientras que en las muestras obtenidas de epidídimo (constituidas sólo por espermatozoides) el análisis se restringe a evaluar algunas de las características microscópicas de los espermatozoides, como concentración y morfología.

Para la rata ha resultado difícil obtener semen directamente del macho porque la retracción del prepucio, a pesar de inducir distintas intensidades de erección no provoca la eyaculación,²³ además de que la electroeyaculación produce volúmenes muy pequeños de semen.²⁴ Asimismo, no existen vaginas artificiales para recolectar el eyaculado.²⁴ Esto podría explicar por qué no se han evaluado la mayoría de los parámetros del semen de la rata y tampoco se conocen sus valores de referencia.

Como consecuencia de que la rata constituye una de las especies más utilizadas en los laboratorios de biología reproductiva, en el presente trabajo se consideró que evaluar la mayoría de los parámetros tanto macroscópicos como microscópicos de su eyaculado resultaría en un estudio más completo. Por ello, el hincapié en describir detalladamente la técnica empleada, así como las condiciones del contexto copulatorio (machos expertos sexualmente, hembras vírgenes pero ovariectomizadas con estró inducido y una sola eyaculación) para obtener valores que sirvan de comparativo con otros estudios cuyo objetivo sea realizar alguna manipulación que incida sobre las características del semen. Aunque se sabe que los resultados de una espermatobioscopia pueden variar entre indi-

Cuadro 2
VALORES DE LOS PARÁMETROS DE LOS TAPONES
SEMINALES DE RATA

PARAMETER VALUES OF RAT SEMINAL PLUGS

<i>Parameters</i> (102 of 111 seminal plugs)	<i>Values</i> (mean $\pm$ se)	<i>Value range of</i> (iq-sq)
<i>Macroscopic</i>		
Weight (mg)	115.63 $\pm$ 1.54	104.66 to 126.00
Size-length (mm)	12.41 $\pm$ 0.13	11.40 to 13.26
Size-width (mm)	5.31 $\pm$ 0.05	4.96 to 5.70
Volume (mm ³)	87.70 $\pm$ 1.74	75.77 to 96.30
<i>Microscopic</i>		
Cytological content		
Single heads (%)	75.49 $\pm$ 1.40	64.25 to 85.95
Single flagella (%)	20.71 $\pm$ 1.12	11.70 to 25.82
Complete spermatozoa (%)	3.80 $\pm$ 0.68	0.00 to 3.391

Inferior quartile (iq) and superior quartile (sq) corresponding ranges.

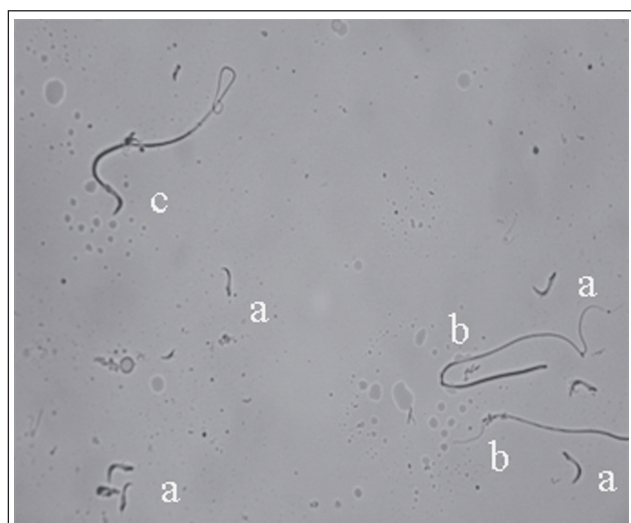


Figura 2. Frotis de tapón seminal que muestra cabezas solas de espermatozoides *a*), flagelos solos de espermatozoides, *b*) y espermatozoides completos, *c*). Obsérvese la presencia de algunos leucocitos del líquido uterino.

Figure 2. Seminal plug smear that shows sperm single head *a*), sperm single flagella, *b*) complete sperm, *c*). Observe the presence of some leukocytes in uterine fluid.

of a spermatobioscopy can vary between individuals, including between ejaculations of a same individual, the results of the present study could be considered as indicative values, since they correspond to the semen and seminal plug analysis of more than 100 individuals. In order to obtain greater useful results, not only the mean was expressed but also the minimal and maximum ranges of each parameter of semen or

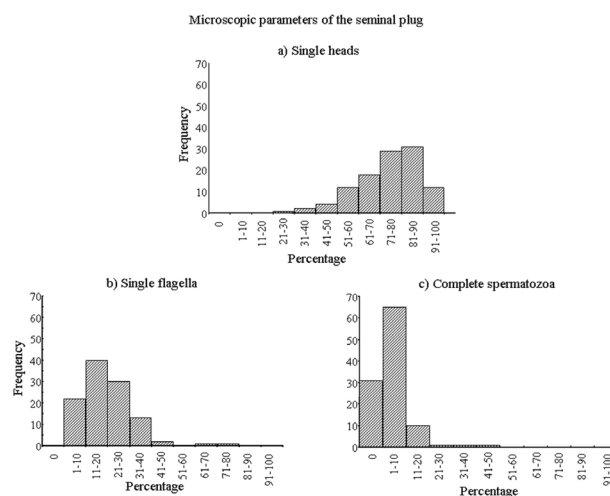


Figura 3. Frecuencia de los parámetros microscópicos del tapón seminal. *a*) Cabezas solas. *b*) Flagelos solos. *c*) Espermatozoides completos. Los parámetros corresponden a 102 tapones seminales obtenidos de ratas macho sexualmente expertas.

Figure 3. Frequency of seminal plug microscopic parameters. *a*) Single heads. *b*) Single flagella. *c*) Complete spermatozoa. Parameters correspond to 102 seminal plugs obtained from sexually expert male rats.

viduos, incluso entre las eyaculaciones de un mismo individuo, los resultados del presente estudio podrían ser considerados como valores indicativos, ya que corresponden al análisis de semen y de tapones seminales de más de 100 individuos. Para que los resultados obtenidos fueran de mayor utilidad, no sólo se expresó el promedio sino también los rangos, mínimos y máximos de cada parámetro tanto de semen

seminal plug (Tables 1 and 2). Even more, the variability of the microscopic parameters of semen (sperm concentration, sperm mobility index and sperm viability) and of the seminal plug (single heads, single flagella or complete spermatozoa) is represented in histograms of frequency (Figures 1 and 3).

There are advantages and disadvantages in obtaining semen from inseminated rats. Although the analyzed values do not correspond exclusively to the seminal fluid because it mixes with the uterine fluid, it allows the most approximate evaluation of the majority of the ejaculate parameters (semen and seminal plug) and it does not limit to evaluate one or two parameters, as it happens when samples are obtained from the epididymis. One of the macroscopic parameters that cannot be evaluated is the seminal volume, because it is difficult to differentiate between the semen volume and the intrauterine fluid volume.¹⁸ Also, an approximate volume cannot be estimated because the observations done at the laboratory, detected that the feminine fluid volume varies from 0.1 to 1 mL. Another parameter is the semen color, which cannot be quantitatively analyzed, but certainly in a qualitative way. Something similar happens with one of the seminal plug parameter, the consistency that is qualitatively analyzed is distinguished as hardened or not. The rest of the macroscopic and all of the microscopic parameters of semen and seminal plug can be determined in a quantitative way.

If the objective of a study is only focused on the effects that a surgical, chemical or pharmacological intervention could have on the seminal plug, this could be obtained from a recently inseminated female (from five minutes after ejaculation) without the necessity to sacrifice her; for that, it could be enough to mate her with another allowing him to display him three or four intromissions to observe on the sand the dislodged seminal plug from the vagina.¹⁴ The floor must be dark and have no shaving, in order to easily visualize the seminal plug.¹⁴ After this, the seminal plug must be immediately removed to avoid being eaten by the male or female.

Based on the after mentioned, it is concluded that this method constitutes a simple, reliable and economic tool, since there is no need for sophisticated equipment. Besides, by considering that the ejaculate samples are the product of mating and that it is obtained from the female anatomical structures, the final results show the natural physiological conditions in regard to the samples obtained by electroejaculation or the epididymis.

Acknowledgements

The authors thank the technical comments of Maria

como de tapón seminal (Cuadros 1 y 2). Aún más, la variabilidad de los parámetros microscópicos del semen (concentración espermática, índice de movilidad y viabilidad espermática) y del tapón seminal (cabezas solas, flagelos solos o espermatozoides completos) se representa en histogramas de frecuencia (Figuras 1 y 3).

Obtener el semen de las ratas inseminadas para evaluarlo ofrece ventajas y desventajas. Aunque los valores analizados no corresponden al fluido seminal exclusivamente porque se mezcla con el fluido uterino, permite la evaluación más aproximada de la mayoría de los parámetros del eyaculado (semen y tapón seminal) y no se limita a evaluar uno o dos parámetros, como ocurre cuando las muestras se obtienen del epidídimo. Uno de los parámetros macroscópicos que no puede evaluarse es el volumen seminal, porque es difícil diferenciar entre el volumen de semen y el volumen del fluido intrauterino.¹⁸ Además no puede estimarse un volumen aproximado porque en las observaciones hechas en el laboratorio, se detectó que el volumen de los fluidos femeninos varía desde 0.1 hasta 1 mL. Otro parámetro es el color del semen al que no se le puede analizar cuantitativamente, pero sí en forma cualitativa. Algo similar ocurre con uno de los parámetros del tapón seminal, la consistencia que se analiza cualitativamente se distingue como endurecida o no endurecida. El resto de los parámetros macroscópicos y todos los microscópicos del semen y del tapón seminal sí pueden determinarse de manera cuantitativa.

Si el interés de un trabajo se enfoca solamente en los efectos que pudiera tener una intervención quirúrgica, química o farmacológica sobre el tapón seminal, éste pudiera obtenerse de una hembra recién inseminada (a partir de los cinco minutos después de la eyaculación) sin necesidad de sacrificarla; para ello, bastaría con colocarla con otro macho y esperar a que realice entre tres y cuatro intromisiones para observar sobre el piso de la arena de observación el tapón seminal desprendido de la vagina.¹⁴ Es importante que el piso sea oscuro y no tenga viruta encima con la finalidad de visualizarlo fácilmente a aquél.¹⁴ Luego de esto último, el tapón seminal debe ser retirado de inmediato para evitar que lo ingieran la hembra o el macho.

Con base en lo anterior, se concluye que este método constituye una herramienta sencilla, confiable y económica, ya que no se requiere de equipo sofisticado. Además, al considerar que las muestras del eyaculado son producto de la cópula y que se obtiene de las estructuras anatómicas femeninas, los resultados finales reflejan las condiciones fisiológicas naturales *versus* los resultados de las muestras obtenidas por electroeyaculación o de epidídimo.

de los Angeles and Beatriz Mendoza. The partial financial support was from PROMEP 10.3/04/28/49-AUT-LAX-CA26; UATLX-CA-191 and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, of Mexico (Project 67530 a RAL). The scholarships 188574 for Jose Luis Tlachi and 198782 for Aurora Adriana Lopez were granted by Conacyt.

Referencias

1. FARRIS EJ. Spermatozoa counts in albino rats. *Anat Rec* 1946; 94:360-361.
2. BLANDAU RJ, ODOR DL. The total number of spermatozoa reaching various segments of the reproductive tract in the female albino rat at intervals after insemination. *Anat Rec* 1949; 103:93-109.
3. POUND N, GAGE MJG. Prudent sperm allocation in Norway rats, *Rattus norvegicus*: a mammalian model of adaptive ejaculate adjustment. *Anim Behav* 2004; 68:819-823.
4. AUSTIN D, DEWSBURY DA. Reproductive capacity of male laboratory rats. *Physiol Behav* 1985; 37:627-632.
5. MOTRICH RD, PONCE AA, RIVERO VE. Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat. *Fertil Steril* 2007; 2:452-461.
6. SCOTT JW, DZIUK PJ. Evaluation of the electroejaculation technique and the spermatozoa thus obtained from rats, mice and guinea pigs. *Anat Rec* 1959; 133:655-664.
7. AGMO A. The number of spermatozoa in spontaneous ejaculates in rats. *J Reprod Fertil* 1976; 48:405-407.
8. AGMO A, ANDERSSON R, JOHANSSON C. Effect of oxytocin on sperm numbers in spontaneous rat ejaculation. *Biol Reprod* 1978; 18:346-349.
9. LAMANO-CARVALHO TL, KEMPINAS WG. Determination of spermatozoa concentration in the rat cauda epididymis. *Braz J Med Biol Res* 1987; 20:429-431.
10. ROBB GW, AMANN RP, KILLIAN GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978; 54:103-107.
11. GOYAL HO, BRADEN TD, MANSOUR M, WILLIAMS CS, KAMALELDIN A, SRIVASTAVA KK. Diethylbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm mobility parameters but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biol Reprod* 2001; 64:927-934.
12. SYNTIN P, ROBAIRE B. Sperm structural and mobility changes during aging in the brown Norway rat. *J Androl* 2001; 22:235-244.
13. DOSTAL LA, FABER CK, ZANDEE J. Sperm motion parameters in vas deferens and cauda epididymal rat sperm. *Reprod Toxicol* 1996; 3:231-235.

Agradecimientos

Los autores agradecen a María de los Ángeles Díaz y Beatriz Mendoza sus comentarios técnicos. El apoyo financiero parcial fue de PROMEP 10.3/04/2849-AUT-LAX-CA26; UATLX-CA-191 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México (Proyecto 67530 a RAL). Las becas 188574 a José Luis Tlachi y 198782 a Aurora Adriana López fueron otorgadas por el Conacyt.

14. LUCIO RA, MANZO J, MARTINEZ-GOMEZ M, SACHS BD, PACHECO P. Participation of pelvic nerve branches in male rat copulatory behavior. *Physiol Behav* 1994; 55:241-246.
15. MANZO J, VAZQUEZ MI, CRUZ MR, HERNANDEZ ME, CARRILLO P, PACHECO P. Fertility ratio in male rats: effects after denervation of two pelvic floor muscles. *Physiol Behav* 2000; 5:611-618.
16. TLACHI-LÓPEZ JL, ZEMPOALTECA R, LUCIO RA. Determinación de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen y las características del tapón seminal de rata. *Memorias de Décimo Curso Internacional: Bases Biológicas de la Conducta. Resumen*; junio, 10; Tlaxcala (Tlaxcala) México. Universidad Autónoma de Tlaxcala, 2005:1-23.
17. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
18. BLANDAU RJ. On the factors involved in sperm transport through the cervix uteri of the albino rat. *Am J Anat* 1945; 77:253-272.
19. MCCLINTOCK MK, ANISKO JJ, ADLER NT. Group mating among Norway rats II. The social dynamics of copulation: competition, cooperation and mate choice. *Anim Behav* 1982; 30:410-425.
20. CANCEL AM, LOBDELL D, MENDOLA P, PERREAULT SD. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Human Reprod* 2000; 15:1322-1328.
21. HOWARTH B JR. Oxidation of [U-14C] palmitic acid by cock spermatozoa. *Poult Sci* 1978; 57:1751-1754.
22. ALLEN WE. *Fertilidad y Obstetricia Equina*. México DF: Ed. ACRIBIA, 2001.
23. SACHS BJ. Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation and induction of pregnancy in the rat. *J Reprod Fertil* 1982; 66:433-443.
24. QUINLAN DM, NELSON R, PARTIN AW, MOSTWIN JL, WALSH PC. The rat as a model for the study of penile erection. *J Urol* 1989; 141:656-661.