

EFFECTO DE LA SEMILLA DE CALABAZA SOBRE EL NÚCLEO DE LAS ESPERMATOGONIAS, EN RATAS WISTAR

Autores:

Taylor Luis López Hernández¹

Melissa Maura Martínez Valle²

Dr. Isvel Zaldivar Garit³

Dra. Mileidys León García⁴

¹ Estudiante de Segundo Año de Medicina. Alumno Ayudante de Cirugía General. Facultad de Ciencias Médicas "Ernesto Guevara de la Serna", Universidad De Ciencias Médicas De Pinar Del Río, Cuba. E-mail: **vallemelissa95@gmail.com**

² Estudiante de Tercer Año de Medicina. Alumno Ayudante de Cardiología. Facultad de Ciencias Médicas "Ernesto Guevara de la Serna", Universidad De Ciencias Médicas De Pinar Del Río, Cuba.

³ Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral. y Embriología Clínica. Profesor Auxiliar. Investigador Aspirante. Facultad de Ciencias Médicas "Ernesto Guevara de la Serna", Universidad De Ciencias Médicas De Pinar Del Río, Cuba.

⁴ Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral. y Fisiología Normal y Patológica. Profesor Auxiliar. Investigador Aspirante. Facultad de

Ciencias Médicas "Ernesto Guevara de la Serna", Universidad De Ciencias Médicas De Pinar Del Río, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la infertilidad es una enfermedad del sistema reproductor y es definida como la incapacidad de parejas sexualmente activas sin ingerir anticonceptivos o usar protección, de lograr el embarazo dentro de un año.

Objetivo: describir el efecto que ejerce la semilla de calabaza sobre las espermatogonias en ratas Wistar.

Materiales y Métodos: para el estudio se utilizaron 6 machos que fueron seleccionadas aleatoriamente, 3 en grupo control y 3 en grupo experimental según el POT 05.01.03.002 empleando el programa LABTOOLS, utilizando como sustancia de ensayo la semilla de la calabaza natural administrada vía oral, y para ello se utiliza 600 mg/kg por cada ejemplar entre las 8:00 y 9:00 AM durante 30 días.

Resultados y discusión: en el presente estudio se observó un incremento significativo de los diferentes parámetros estudiados (diámetro mayor nuclear, diámetro menor nuclear, área nuclear, perímetro nuclear y volumen nuclear), en el núcleo de las espermatogonias en ratas Wistar macho que ingirieron semillas de calabaza

Conclusiones: se demostró que la administración de semilla de calabaza vía oral, produjo un incremento significativo de las dimensiones nucleares.

Palabras Clave: INFERTILIDAD; CUCURBITA PEPO; ESPERMATOGONIA; NÚCLEO CELULAR; TESTÍCULO

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la infertilidad es una enfermedad del sistema reproductor y es definida como la incapacidad de parejas sexualmente activas sin ingerir anticonceptivos o usar protección, de lograr el embarazo dentro de un año. El factor masculino de la infertilidad está presente en un 20-50% del 15% de las parejas infértiles, de forma

independiente o en conjunto con la infertilidad femenina. Aproximadamente 70 millones de parejas son infértiles en todo el mundo y las tecnologías de reproducción asistida son muy costosas para las parejas en los países desarrollados. (1)

El origen de los factores de la infertilidad masculina son complejos, incluyendo enfermedades orgánicas, factores ambientales, factores genéticos y sus interacciones. Dentro de las causas más frecuentes de la infertilidad masculina se encuentra el Varicocele, el mal descenso testicular o Criptorquidea no tratada y enfermedades infecciosas del tracto reproductor, como la epididimitis, orquitis, prostatitis y vesiculitis. Causas menos frecuentes incluyen disfunciones sexuales, efectos adversos a medicamentos, exposición a radiaciones o contaminantes, causas endocrinas y genéticas.(2,3)

Todas estas patologías se traducen en una disminución en la fertilidad del varón, que se evidencia a través de una disminución en la cantidad de espermatozoides, de su motilidad y de alteraciones en su morfología. Elementos básicos del análisis seminal, que en la actualidad puede complementarse con la evaluación de la presencia de autoanticuerpos, evaluar la fragmentación del ADN de los espermatozoides, detectar la presencia de especies oxígeno reactivas en el semen y medir la capacidad de unión del espermatozoide a la zona pellucida. Todos estos son exámenes complementarios al espermiograma tradicional, que son de gran utilidad en la evaluación y planificación del tratamiento de la infertilidad masculina. (3)

En Cuba los datos más recientes son los que reportan los resultados de un estudio realizado por el profesor Dr. Rubén Padrón en 1996, en el que se encuestaron 952 parejas de diversos municipios y diferentes provincias, y que arroja que existe entre un 12,0 a un 14,0 % de parejas infértiles, de las cuales entre el 42,0 y el 43,0 % desea el embarazo. (4)

En estudio realizado en Pinar del Río en el año 2013, sobre parejas infértiles en el periodo comprendido 2010-2012, se concluyó que la oligoastenozoospermia 21,6% como causa infertilidad masculina más atendida, seguida de la varicocele con un 9,1% y la criptorquidia con un 0.6%.(5)

El tratamiento a la infertilidad masculina es muy variado, todo en dependencia de la causa, hormonal o infecciosa, o de otro origen, hasta la reproducción asistida para aquellos que lo requieran como única alternativa. La medicina tradicional no se queda atrás y es en la Medicina Tradicional China donde la infertilidad masculina se relaciona estrechamente con los desórdenes del bazo, el hígado y sobre todo el riñón.(6)

Precisamente la investigación va encaminada a encontrar alternativas en la Medicina Natural y Tradicional para la mejoría de la función sexual masculina, probando la efectividad de la semilla de calabaza en ejemplares de ratas de la especie Wistar, a partir de sus ricas propiedades, como su elevado contenido de carbohidratos, fibra soluble, proteína, aceite de compuestos carotenoides, un 48,92% de aceite, ácidos grasos que están ampliamente reconocidos por sus beneficios a la salud, precursores de la vitamina A, el β caroteno, la criptoxantina y la luteína.(7)

Planteamiento del problema: La infertilidad humana ha sido reconocida como un problema social de salud a nivel mundial. La infertilidad masculina es considerada como uno de los factores que más contribuyen a la infertilidad de la pareja (35%), se estima que afecta uno de cada 20 hombres. Son varios los factores convencionales que originan la infertilidad masculina, estos pueden provocar daños o deformidades a las células precursoras de los espermatozoides.

El Problema científico: ¿Cuál es el efecto que puede tener el uso de la semilla de calabaza, sobre las espermatogonias?

OBJETIVO GENERAL

Describir el efecto que ejerce la semilla de calabaza sobre las espermatogonias en ratas Wistar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la distribución de frecuencia de los parámetros medidos en el núcleo de las espermatogonias según grupo de estudio.
- Determinar las variaciones en cuanto a área, perímetro y volumen del núcleo de las espermatogonias según grupo de estudio.

MATERIAL Y MÉTODO

Aspectos generales del estudio

Se realizó un estudio experimental en la Facultad de Ciencias Médicas Ernesto Guevara de la Serna de la Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río, en el período enero 2020- febrero 2020, en ratas Wistar.

Control de la Calidad

El estudio fue conducido y se rigió por lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el cuidado, uso y reproducción de los Animales para la Experimentación del Cenpalab⁽³⁹⁾.

Fundamentación de la especie seleccionada

Se escogió la rata pues es una especie aceptada para el estudio planteado por la factibilidad de su manejo, factibilidad económica de tenencia y manutención; además, estabilidad genética. Se utilizó la raza Wistar por su factibilidad al momento de la investigación.

Condiciones de mantenimiento

Una vez recibidos, todas las ratas Wistar macho fueron alojadas individualmente en jaulas T2) hasta el final del estudio. Todas las cajas son plásticas con tapa de rejilla y se ubicaran en estantes (Ver Anexo#1).

Se mantuvieron con encamado de bagazo de caña desmeollado, esterilizado en autoclave (POT 01.01.05.003) en la Dirección de Animales notobióticos.

Alimentación y suministro de agua

Dieta comercial granulada esterilizable EAO: 1004 (Cenpalab, AlyCo®) para roedores, con Certificado de Calidad, que se suministró a libertad durante el estudio. El agua se esterilizó (POT 05.01.06.021) y fue suministrada a libertad, en frascos de 250 y 500 mL.

Distribución de los ejemplares experimentales

Para el estudio se utilizaron 6 machos que fueron seleccionadas aleatoriamente, 3 en grupo control y 3 en grupo experimental según el POT 05.01.03.002 empleando el programa LABTOOLS¹⁰.

Identificación de los animales

Durante cada periodo del estudio fueron identificados mediante tarjetas donde se registró la identificación del animal, el código, tipo, especie, línea, sexo, edad, sustancia administrada, fecha de comienzo de la administración (día 0).

Sustancias de ensayo, vía de administración y dosificación.

La sustancia de ensayo fue la semilla de la calabaza natural que fue administrada vía oral, y para ello se utiliza 600 mg/kg por cada ejemplar entre las 8:00 y 9:00 AM durante 30 días.

Sacrificio de los animales, toma y procesamiento de muestras

De los ejemplares seleccionados para el estudio fueron intervenidos quirúrgicamente todos los ejemplares donde se estudiaron ambos testículos, se realizó el estudio morfométricos macroscópico observándose cualquier alteración presente (Ver Anexo#2). Se le realizaron además los cortes necesarios para luego realizar la técnica histológica. Realizamos la técnica histológica Orquiectomía para la cual seguimos el siguiente procedimiento:

- Abra la túnica vaginal: se pesa y mide el testículo.
- Se corta el testículo sagitalmente mientras está en estado fresco y se fija en formol.
- Se cortan lonjas seriadas de alrededor de 3mm de espesor de cada mitad testicular perpendicular a la sección original determinándose justo a nivel de la albugínea, se tiñe con hematoxilina y eosina y se examine cada superficie de corte.
- Se corta longitudinalmente el epidídimo a lo largo de toda su extensión.
- Se realizan varios cortes transversales del cordón espermático a diversos niveles.

Una vez que se obtengan las láminas histológicas estas fueron observadas en microscopio Motic y se les realizó el estudio morfométricos microscópico.

Variables y su operacionalización

VARIABLE	Tipo	ESCALA	MEDIDA DE RESUMEN
Diámetro nuclear menor de las espermatogonias	Cuantitativa continua	μm	Frecuencias absolutas, y relativas
Diámetro nuclear mayor de las espermatogonias	Cuantitativa continua	μm	Frecuencias absolutas, y relativas
Área nuclear de las espermatogonias	Cuantitativa continua	μm^2	Frecuencias absolutas, y relativas
Perímetro nuclear de las espermatogonias	Cuantitativa continua	μm	Frecuencias absolutas, y relativas
Volumen nuclear de la espermatogonias	Cuantitativa Continua	μm^3	Frecuencias absolutas, y relativas porcentuales

Métodos de procesamiento y análisis de la información:

Los datos obtenidos se procesaron utilizando técnicas estadísticas, una de ellas, la prueba U de Mann Whitney para realizar la comparación de medias y ver significancia estadística; estableciendo un nivel de confianza del 95% en la interpretación de los resultados.

Medios informáticos: Exportación a SPSS versión 22.0 para Windows para los cálculos de estadígrafos y realización de gráficos.

Aspectos éticos:

El ensayo fue conducido y se registró por lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso, y Reproducción de los Animales para la Experimentación según las normas CENPALAB.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó una serie de mediciones al núcleo de las espermatogonias en ratas Wistar macho que ingirieron semillas de calabaza y

a un grupo que no las ingirió. Los parámetros estudiados fueron, diámetro mayor nuclear, diámetro menor nuclear, área nuclear, perímetro nuclear y volumen nuclear. La descripción estadística de estos parámetros se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los parámetros nucleares de las espermatogonias de Ratas Wistar en los dos grupos de estudio.

			Grupo de estudio	Media	Máximo	Mínimo	Rango	Desviación estándar
Diámetro mayor nuclear (μm)		nuclear	Experimental	5,09	6,80	3,80	3,00	0,59
			Control	2,63	2,90	2,10	0,80	0,29
Diámetro menor nuclear (μm)		nuclear	Experimental	4,14	5,30	2,90	2,40	0,55
			Control	2,03	2,50	1,50	1,00	0,30
Área nuclear (μm^2)			Experimental	66,82	113,60	37,90	75,70	15,42
			Control	21,01	29,00	14,60	14,40	3,50
Perímetro nuclear (μm)			Experimental	29,18	38,40	22,00	16,40	3,28
			Control	17,07	23,00	13,00	10,00	2,05
Volumen nuclear (μm^3)			Experimental	47,41	99,96	19,37	80,60	16,90
			Control	5,83	9,49	2,94	6,54	2,01

En la tabla 1 se observa como en todas las mediciones realizadas los parámetros nucleares que se estudiaron resultaron ser mayores en el grupo experimental. Las mediciones del diámetro menor de los núcleos fueron los que menor variación experimentaron, cuando comparamos las mediciones en ambos grupos de estudios. Además, resultaron ser los valores menos dispersos aspecto que se puede deducir al observar la desviación estándar.

Según artículos de la Revista Chilena de Nutrición la semilla de calabaza cuenta con un amplio espectro de aminoácidos tales como alanina, arginina, ácido aspártico, serina, glicina, prolina, para una cantidad de proteínas totales de 33.92g, elementos esenciales para la síntesis de ADN. Además, en este se lleva a cabo la síntesis y el ensamblaje de las subunidades ribosomales, organelos que luego participarán en la síntesis de proteínas posteriormente. (8,9)

Para un mejor análisis de los resultados de las mediciones de los diámetros nucleares mayores y menores se representó la dispersión de ambas variables para cada caso estudiado en ambos grupos.

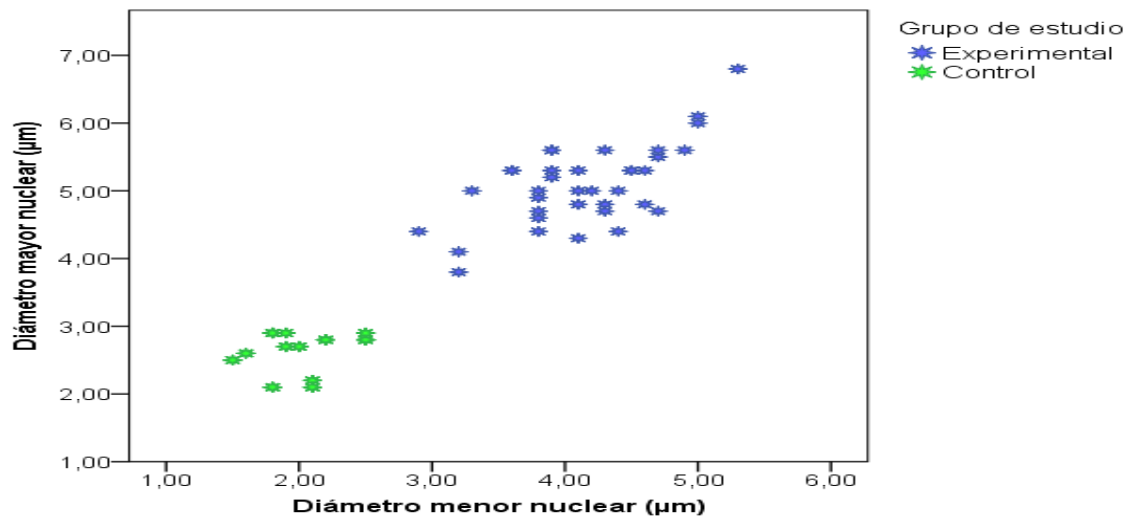


Figura 1. Diámetro nuclear mayor y menor de las espermatogonias de ratas Wistar machos teniendo en cuenta el grupo de estudio.

En la figura 1 se puede observar como los diámetros nucleares mayores y menores de las espermatogonias resultaron ser menores en el grupo control que en el experimental sugiriendo esto el hecho de que el consumo vía oral de semillas de calabaza en ratas Wistar machos ejerce un efecto positivo sobre las espermatogonias incrementando las dimensiones espaciales de sus núcleos.

Las mediciones realizadas en el grupo experimental se mostraron más dispersas, aspecto que puede estar vinculado a variaciones en la absorción de la sustancia de estudio entre las diferentes ratas utilizadas en el mismo.

En los últimos 20 años se ha constatado que estas células y las valiosas cargas que llevan son extremadamente vulnerables al estrés oxidativo. Además, el hecho de que la terapia antioxidante parece tener un impacto oficial en la calidad del semen sugiere que tal estrés no solo se correlaciona con la función defectuosa de los espermatozoides, sino que está causalmente involucrado en su génesis, y se conoce el efecto de del estrés oxidativo en la modificación del ADN nuclear. (10)

En estudio realizado en la Asociación Japonesa de Anatomistas, se demostró mediante el uso de ciclofosfamida, fármaco que afecta las células de división rápida, altera el ciclo celular, como consecuencia, modifica las respuestas humorales y celular, en un grupo de ratas Wistar el porcentaje de espermatozoides móviles disminuyó, mientras que el porcentaje de espermatozoides anormales y muertos aumentó significativamente. El tratamiento con el extracto mixto en otros grupos que se administró extracto de semilla de calabaza causó un aumento significativo en el recuento de espermatozoides, la viabilidad, la motilidad y la morfología normal de los espermatozoides en comparación con el grupo que consumía ciclofosfamida. (11,12)

Para la profundización del análisis de las mediciones realizadas se hizo necesario aplicar la prueba estadística U de Mann Whitney con un 95 % de certeza a las mediciones de área, perímetro y volumen nuclear. Esta prueba permitió comparar ambos grupos de estudio, en las tres comparaciones realizadas se observó una significación de 0,000 por lo que se puede afirmar que tanto el área nuclear, el perímetro nuclear como el volumen nuclear resultaron ser en el presente estudio significativamente mayores en las espermatogonias de las ratas Wistar que consumieron semilla de calabaza. Las diferencias observadas en las mediciones se representan en las figuras 2, 3 y

4.

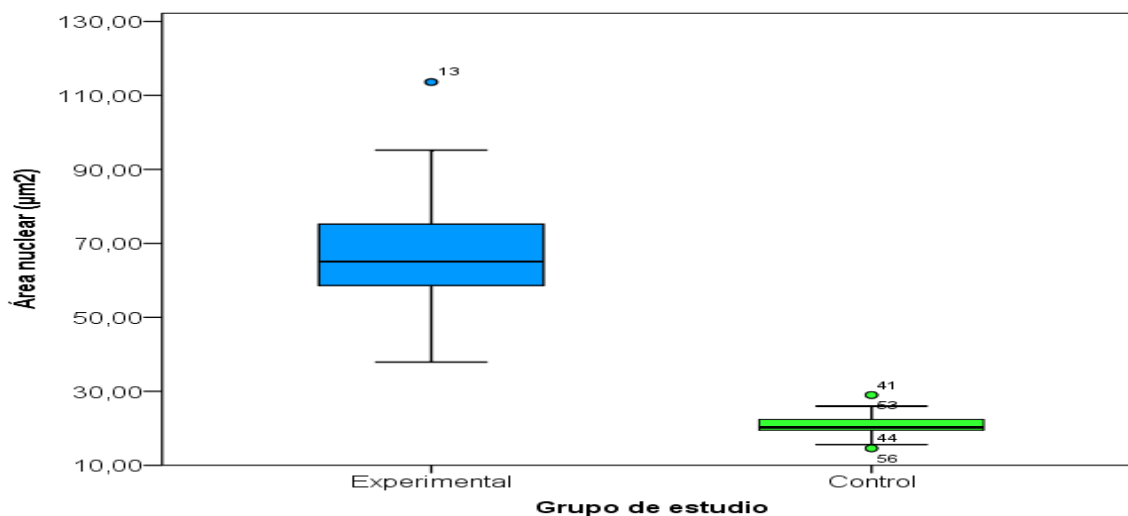


Figura 2. Área nuclear de las espermatogonias de ratas Wistar machos teniendo en cuenta el grupo de estudio.

La figura 2 muestra la diferencia existente entre las mediciones de área nuclear de las espermatogonias, entre los grupos de estudio. Todas las mediciones realizadas en el grupo control resultaron ser inferiores a las mediciones realizadas en el grupo experimental.

En investigación realizada en 2018 en Colombia se encontró es fuente de carotenoides, luteína, Vitamina A, Vitamina C, almidones, aceites polinsaturados de cadena larga, componentes que como en el caso específico de la vitamina A actúa como ligando específico de receptores nucleares, lo cual tiene como función principal potenciar la actividad del núcleo de la misma. (13,14)

El diagrama de la figura 3 muestra resultados similares en relación al perímetro nuclear.

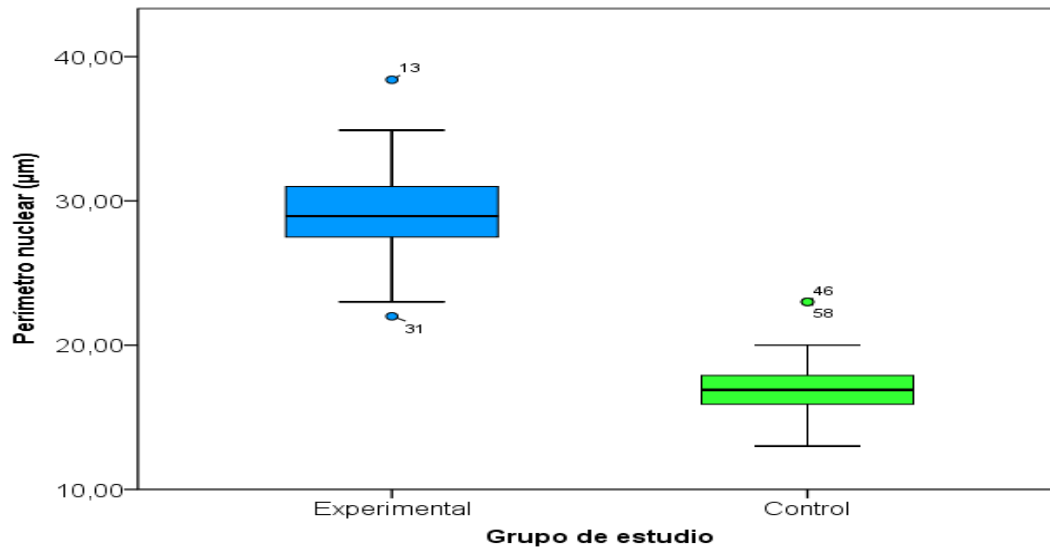
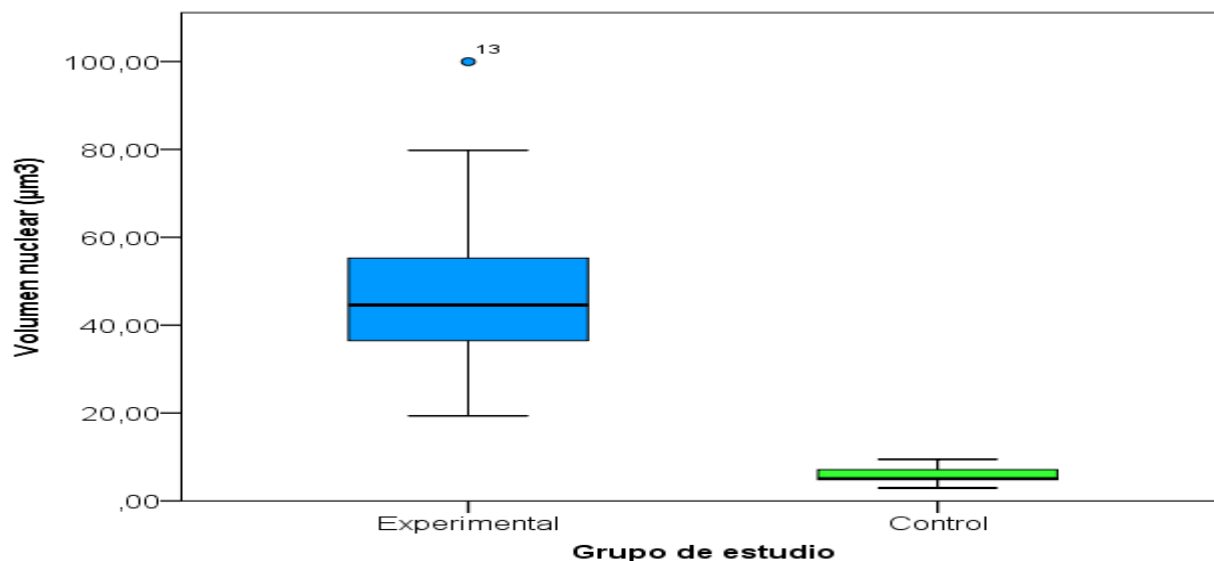


Figura 3. Perímetro nuclear de las espermatogonias de ratas Wistar machos teniendo en cuenta el grupo de estudio.

En el diagrama de cajas y bigotes de la figura 4 están representadas todas las mediciones del volumen nuclear en los dos grupos de estudio observándose clara mente que las ratas Wistar machos que consumieron semilla de calabaza presentaron mayor volumen nuclear en las espermatogonias.

En 2019 se encontró en un estudio que en las semillas existen un amplio espectro de ácidos grasos insaturados: fundamentalmente compuestos por ácido linoleico, oleico, esteárico y palmítico, fitosteroles, araquidónico, entre otros, cuyas funciones, especialmente el ácido oleico constituye un vital inductor en la proliferación celular además de que inhibe la apoptosis celular (15,16), lo que puede estar en relación con los resultados obtenidos en el presente trabajo.



CONCLUSIONES

La infertilidad es una enfermedad del sistema reproductor, en el caso de la infertilidad masculina son complejos los factores que la ocasionan, incluyendo enfermedades orgánicas, factores ambientales, factores genéticos y sus interacciones. Existen diferentes tratamientos para la infertilidad, donde la administración de la semilla de calabaza por sus ricas propiedades constituye en actualidad uno de los que se pudiera emplear debido a sus efectos beneficiosos. Al concluir el estudio se demostró que la administración de semilla de calabaza vía oral entre las 8:00 y 9:00 AM durante 30 días, produjo un incremento significativo de los diámetros tanto mayor como menor del núcleo de las espermatozonias, mayor área, perímetro y volumen nuclear.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Bhakat R, Chandra L, Saxena A, Sarda AK, Krishnamurthy K, Yadav P. Evaluation of Metabolic Syndrome and Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in Male Factor Infertility. Ind J Clin Biochem.[Internet]. 2017 Enero 19; 32(4).[citado 20 septiembre 2019]Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29062180>
- 2-Zhang Q, Yin G, Lui J, Liang Y, Li Y, Zhao J, et al. Association between MTHFR A1298C Polymorphism and Male Infertility: A Meta-analysis. Huazhong

University of Science and Technology and Springer-Verlag Berlin Heidelberg.[Internet]. 2017 Enero; 32(2).[citado 20 septiembre 2019] Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/316249449>

3- Huidobro C. Infertilidad masculina. Med. Clin. Condes.[Internet]. 2010 abril; 21(3).[citado 20 septiembre 2019]Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/272641367>

4- Rojas P, Medina DM, Torres L. Infertilidad. MedSur.[Internet]. 2011 Julio; 9(4).[citado 25septiembre 2019]Disponible en: <https://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1692>

5- Fernández H, Valle T, Fernández I, Ramírez N. Caracterización de la infertilidad en el municipio Pinar del Río. Rev. Universidad Médica Pinareña.[Internet]. 2013 Septiembre; 17(5).[citado 25septiembre 2019].Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942013000500007

6- Ramos K, Baños I, Armas I. Tratamiento de la infertilidad masculina con implantación de catgut en puntos de acupuntura. Universidad Médica Pinareña.[Internet]. 2016 Septiembre; 20(5).[citado 20 septiembre 2019]Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942016000500004

7-Rössel D, Ortiz H, Amante A, Durán H, López A. Características físicas y químicas de la semilla de calabaza para mecanización y procesamiento. Ciencias Naturales e Ingeniería.[Internet]. 2018 Junio; 10(21).[citado 10 septiembre 2019]Disponible en:http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052018000200061&lng=pt&nrm=iso

8- Lemus-Mondaca Roberto, MarinJessami, Rivas Josefa, Sanhueza Leyla, Soto Yasna, Vera Natalia et al .Pumpkinseeds (Cucurbitamaxima). A review of functionalattributes and by-products. Rev. chil. nutr.[Internet]. 2019 Dic; 46(

6): 783-791.[citado 2020 sep 21] Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000600783>

9-Rojas-Lemus M, Milán-Chávez R. Los límites entre la histología y la bioquímica: observando al núcleo celular. Fac Med UNAM.[Internet]. 2016 Enero; 59(1).[citado 2020 sep 21] Disponible en:<http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v59n1/2448-4865-facmed-59-01-45.pdf>

10-Aitken R. Oxidative stress and the etiology of male infertility. J Assist Reprod Genet.[Internet]. 2016 Diciembre; 33(12). [citado 30 septiembre 2019]Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5171887/>

11-Somaieh A, Hossein N, Mahabadi2 J, Taghizadeh M, Azami-Tameh A, Taherian A, et al. Protective effect of combined pumpkin seed and ginger extracts on sperm characteristics, biochemical parameters and epididymal histology in adult male rats treated with cyclophosphamide. Anat Sci Int.[Internet]. 2016 Diciembre; 91(5).[citado 30 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26714700>

12- Remedios S, Velázquez A, Del Campo E, Torres L, Fernández A. Ciclofosfamida en el tratamiento de la esclerosis sistémica. Correo Científico Médico de Holguín. [Internet]. 2015 Enero; 19(4).[citado 30 septiembre 2019]Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ccm/v19n4/ccm10415.pdf>

13- Rodríguez R, Valdés R, P M, Ortiz G, Sanin D. Características agronómicas y calidad nutricional de los frutos y semillas de zapallo Cucurbita sp. Rev Colombiana Cienc Anim.[Internet]. 2018 Noviembre; 10(1).[citado 30 septiembre 2019]Disponible en: <http://dx.doi.org/10.24188/recia.v10.n1.2018.636>.

14-Ortega B, Herrera M, Tecalco A. Nuclear receptors: from the nucleus to the cytoplasm. ScienceDirect.[Internet]. 2015 Diciembre; 18(2).[citado 30 septiembre 2019]Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405888X15000182>

15-Ferrer-González B, García-Martínez I, Totosa A. Textural properties, sensory acceptance and fatty acid profile of cooked meat batters employing pumpkin seed paste or soybean oil oleogel as fat replacers. *Grasas y Aceites*. [Internet]. 2019 [citado 14 septiembre 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.3989/gya.1055182>

16-Ácidos Grasos y Función Celular [Tesis]. España: Universidad Santiago de Compostela. [Internet]; 2015 [citado 12 septiembre 2019] Disponible en: <http://hdl.handle.net/10347/14628>

ANEXOS: Anexo#1



Anexo#2



