

Universidad Autónoma de Tlaxcala
División de Ciencias Biológicas

Caracterización morfológica de los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso y de las motoneuronas espinales que los inervan en el conejo doméstico intacto y castrado.

T e s i s
para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Biológicas
P r e s e n t a
Químico Farmacéutico Biólogo
V́ctor Manuel Xicoht́ncatl Ahuactzi

Director de tesis
Dra. Rosa Anǵlica Lucio Lucio

Comit́ Tutoral
Dr. Joś Ram3n Egúbar Cuenca
Dr. Jorge Manzo Denes
Dr. Luis Isauro Garća

Tlaxcala, Tlax.

2005

ÍNDICE

Pág.

I. Introducción

1. Anatomía de la musculatura perineal estriada en el macho
 - 1.1 Músculo bulboesponjoso
 - 1.2 Músculo isquiocavernoso
2. Músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso en funciones reproductivas y comunicación química
 - 2.1 Cópula
 - 2.1.1 Erección peneana
 - 2.1.2 Eyaculación seminal
 - 2.2 Comunicación química
3. Inervación de la musculatura perineal estriada
4. Influencia de las hormonas esteroides en la musculatura perineal estriada y motoneuronas que la inervan

Antecedentes

II. Justificación

III. Hipótesis

IV. Objetivos

Objetivo general

Objetivos específicos

V. Metodología

1. Descripción anatómica del bulboesponjoso e isquiocavernoso.

Animales

Procedimiento

2. Descripción de la columna vertebral lumbar y sacra y segmentos espinales correspondientes.

Animales

Procedimiento

3. Marcaje de motoneuronas que inervan a los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso

Animales

Procedimiento

Inyección del trazador

Perfusión transcardíaca

Obtención de cortes y reacción enzimática

Análisis de cortes histológicos

VI. Resultados

1. Descripción anatómica de los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso.

Origen e inserción

Tamaño de los músculos en animales intactos

Tamaño de los músculos en animales castrados

2. Descripción de la columna vertebral lumbar y sacra y segmentos espinales correspondientes.

Reconocimiento de las regiones vertebrales

Reconocimiento de los segmentos espinales lumbar y sacro

3. Marcaje de motoneuronas que inervan al músculo bulboesponjoso e isquiocavernoso

Músculo bulboesponjoso

Características morfométricas de las neuronas que inervan al mBE

Músculo isquiocavernoso

Características morfométricas de las neuronas que inervan al mIC

VII. Discusión

VIII. Conclusiones

Perspectivas

IX. Referencias

Glosario de términos

X. ANEXOS

5. Marcaje con sustancias transportadas retrógradamente

5.1 Origen

- 5.2 La enzima peroxidasa
- 5.3 La técnica de la peroxidasa de rábano
- 5.4 El transporte retrógrado
- 5.5 Los fijadores
- 5.6 Cortes de tejido
- 5.7 Reacción enzimática
- 5.8 Tipos de marcadores
- 5.9 Factores que afectan la absorción del trazador
- 5.10 Recomendaciones para la técnica
- 5.11 Precauciones

Publicaciones

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de la musculatura estriada de la región pélvica y perineal es de gran importancia para la comprensión de la fisiología reproductiva de diversas especies de mamíferos. Se ha atendido de manera importante a la musculatura lisa, dejando al margen a la musculatura estriada, que se encuentra estrechamente asociada, anatómica y funcionalmente con las estructuras del sistema reproductor. Dos músculos estriados de la región perineal que han sido estudiados en machos y en hembras adultos de algunos mamíferos son el bulboesponjoso (mBE), también llamado bulbocavernoso y el isquiocavernoso (mIC). Estos músculos han sido descritos anatómicamente en cuanto a su forma, origen, inserción e inervación en la rata hembra (sólo el mIC, McKenna y Nadelhaft 1986), en la coneja (Martínez-Gómez y cols. 1997), en la hiena (Forger y cols. 1996) en la rata macho (Hart y Melese-D'Hospital 1983, McKenna y Nadelhaft 1986), el caballo (Beckett y cols. 1973) y el perro (Hart 1972). En la rata macho, tanto el mBE como el mIC han sido estudiados electrofisiológicamente insertando electrodos de manera crónica, para determinar su actividad durante la cópula (Holmes y cols. 1991). Mediante técnicas de lesión, cortando las inserciones de tales músculos para analizar las funciones reproductivas masculinas (Hart y Melese-D'Hospital 1983, Sachs 1982). Con técnicas histológicas, mediante la administración de trazadores de transporte retrógrado para determinar la ubicación de las motoneuronas espinales que los inervan (Breedlove y Arnold 1980, 1981). Mediante la castración, para determinar el efecto de las hormonas esteroides en los núcleos motores sexualmente dimórficos en la médula espinal (Breedlove y Arnold 1980, 1981). Sin embargo, en el conejo, el conocimiento de la anatomía y fisiología de estos músculos aun es incompleto. En el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta se realizan estudios anatómicos y de la participación de ambos músculos en los procesos de micción, reproducción y parto. En la coneja doméstica de la raza Chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) estos músculos han sido descritos anatómicamente (Martínez-Gómez y cols. 1997) y fisiológicamente (Cruz y cols. 2002), se ha administrado peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés –horseradish peroxidase-) conjugada con aglutinina de germen de trigo (WGA por sus siglas en inglés –wheat germ agglutinin-) para determinar la localización de las motoneuronas que inervan al mBE y mIC. (Rodríguez y cols. 1999, 2000) y se estudia

actualmente su participación en los procesos de micción y parto. En el conejo macho las descripciones anatómicas de estos músculos existentes no son suficientemente detalladas. Barone y cols (1973) hacen una descripción general de la musculatura estriada de la especie, sin dar mayores características de algún músculo en particular. En el conejo doméstico de la raza Nueva Zelanda, se ha administrado HRP para determinar la localización de las motoneuronas que inervan al mBE y mIC (Nanasaki y Sakuma 2000), pero este estudio presenta metodología confusa, pocos resultados, descripción anatómica ambigua, presentando como vestigial al mBE, por lo que sólo se dan resultados del mIC, atribuyéndole una mayor participación en la erección peneana. No se conoce la participación de estos músculos durante las funciones sexuales masculinas ni durante procesos en los que pueden hallarse involucrados, como la micción.

ANTECEDENTES

1. Anatomía de la musculatura perineal estriada en el macho

Algunos músculos estriados perineales están relacionados con el pene. En el hombre, está constituido por la raíz (que limita con la región urogenital) y el cuerpo (que cuelga libremente). La raíz contiene tres cilindros de tejido eréctil, dos llamados crura (crus en singular) y un bulbo. Los crura están adosados al pubis y el bulbo está situado entre los crura y contiene la porción penéana de la uretra (Figura 1). Cada crura está rodeado por el mIC y el bulbo por el mBE (Schmidt y Schmidt 1983).

1.1 Músculo bulboesponjoso (mBE)

En el hombre, el mBE está localizado en la base del pene, es un músculo bilateral que se origina en el tendón central del perineo (Wilson y Wilson 1978) y se inserta en la línea media del bulbo penéano (Schmidt y Schmidt 1983).

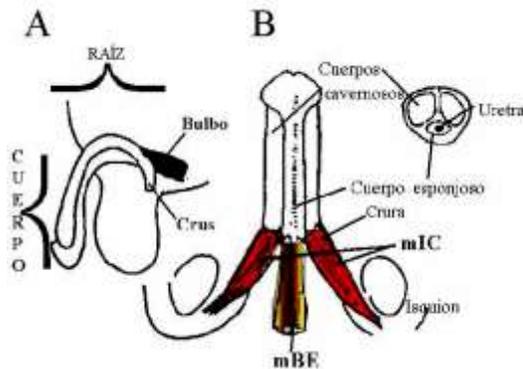


Figura 1. Musculatura perineal estriada del hombre. A) Vista lateral que muestra la raíz y el cuerpo del pene. B) Vista inferior de la región perineal con el pene elevado para mostrar los cuerpos eréctiles (crura y bulbo) y los músculos perineales que los rodean, bulboesponjoso (mBE) e isquiocavernoso (mIC, modificado de Wilson y Wilson 1978).

En la rata macho, el mBE es multilobulado, se origina en el isquiún y se inserta en el bulbo penéano. Está constituido por las porciones proximal y distal, que son ventrales,

conocidas también como mBE (Dail y Sachs 1991). La porción proximal cubre los brazos proximales del bulbo; la distal, la parte distal del bulbo peneano (Holmes y cols. 1991). El elevador del ano, también llamado mBE dorsal, se dispone sobre la cara dorsal del recto (Dail y Sachs 1991, Figura 2).

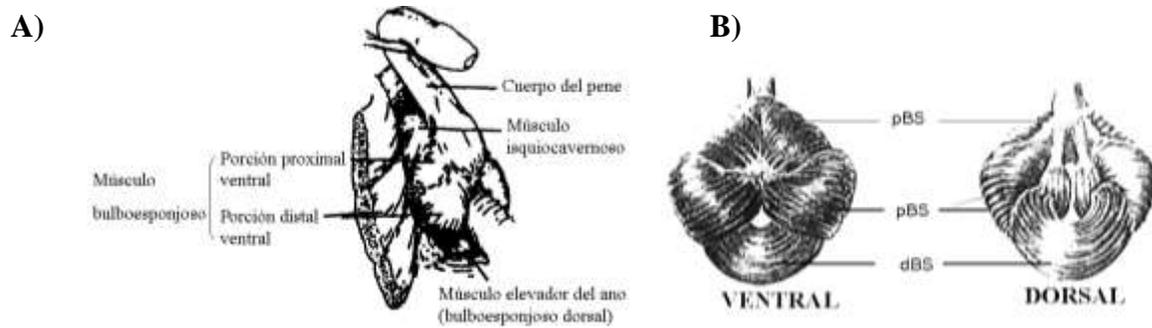


Figura 2. Músculos estriados de la rata macho. A) Vista lateral del bulboesponjoso (mBE), músculo multilobulado y constituido de las porciones proximal ventral y distal ventral y rodea al bulbo peneano; el isquicavernoso (mIC) músculo de forma triangular que rodea al crura y, el elevador del ano que rodea al recto (modificado de Dail y Sachs 1991). B) Vista ventral y dorsal que muestra las porciones del mBE (pBS = porción proximal, dBS = porción distal, modificado de Holmes y cols. 1991).

En la coneja, el mBE es fácilmente identificable sobre la porción protruida de la vagina. Cada mBE se origina en el borde medial del arco isquiático, se dispone bilateral y rostrocaudalmente, y se inserta en el ligamento suspensorio del clítoris (Martínez-Gómez y cols. 1997, Figura 3).

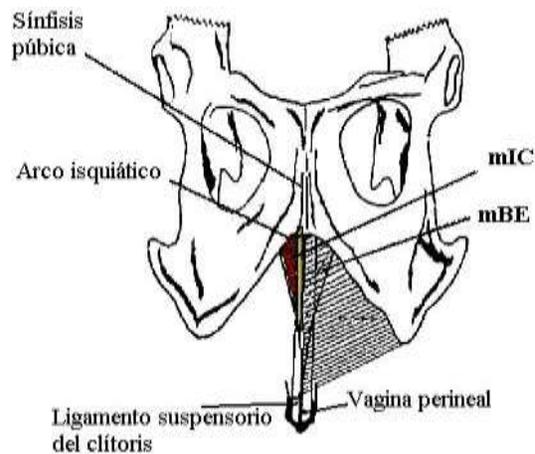


Figura 3. Musculatura perineal estriada de la coneja. Vista ventral de algunos músculos perineales, entre ellos el bulboesponjoso (mBE) e isquiocavernoso (mIC). Ambos músculos tienen su origen en el arco isquiático y se insertan en el ligamento suspensorio del clítoris (modificado de Martínez-Gómez y cols. 1997)

En el conejo doméstico, raza Nueva Zelanda, se ha identificado como mBE a un músculo bilateral localizado sobre la línea media del dorso del pene (Barone y cols. 1973) y fue descrito como vestigial por Nanasaki y Sakuma (2000), sin embargo, ésta última aseveración no parece estar bien fundamentada, ya sea desde un punto de vista anatómico o funcional (Figura 4).

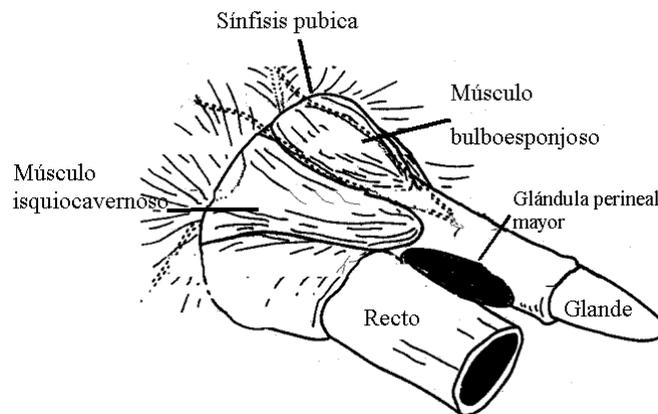


Figura 4. Musculatura perineal estriada del conejo. Vista lateral de dos músculos perineales, el bulboesponjoso (mBE) y el isquiocavernoso (mIC, modificado de Nanasaki y Sakuma 2000).

1.2 Músculo isquiocavernoso

En el hombre, los mIC son un par de músculos que están localizados a ambos lados de la base del pene. Cada mIC se origina en el isquión (Wilson y Wilson, 1978) y se inserta en el crura del cuerpo cavernoso peneano (Schmidt y Schmidt 1983). En la rata macho, el mIC se origina en la superficie interna de la tuberosidad isquiática y se inserta en cada crus peneano (Dail y Sachs 1991). En la coneja, el mIC se origina del borde lateral del arco isquiático, se dispone ventrodorsalmente insertándose mediante un tendón al crura del clítoris. El mBE y el mIC convergen antes de su inserción en la parte media de la vagina (Martínez-Gómez y cols. 1997). En el conejo se ha identificado como mIC a un par de músculos que se disponen simétricamente en el isquión y se insertan a cada lado de la base del pene (Nanasaki y Sakuma 2000). Se ha descrito que los músculos perineales estriados están inervados por los nervios periféricos que se originan de los segmentos espinales lumbares y sacros (Cruz y cols. 2002).

2. Músculo bulboesponjoso e isquiocavernoso en funciones reproductivas y comunicación química

2.1 Cópula

La conducta copulatoria incluye el cortejo, la cópula, la terminación y actividad postcopulatoria. La cópula en el conejo macho involucra la activación de tres distintos mecanismos interactuantes: 1) un componente motor, que implica la contracción y relajación de músculos involucrados en movimientos cópulatorios; 2) un componente de genitales externos, que involucra las respuestas peneanas participantes en la erección e inserción dentro de la vagina y 3) un componente de genitales internos, involucrando los patrones de contracción de varios órganos que participan en la emisión seminal y la eyaculación (Morali 1992).

En contraste con la rata, la cópula en el conejo macho, involucra sólo una monta con un periodo variable de movimientos pélvicos, dependiendo de la presentación de lordosis por

la hembra y una sola intromisión, durante la cual ocurre la eyaculación. Después de eyacular, el conejo cae del dorso de la hembra, emitiendo en ocasiones un chillido (Moralí 1992).

2.1.1 Erección peneana

En los eutéridos existen diferentes tipos de pene: indiferente (por ejemplo roedores), fibroelástico (por ejemplo rumiantes), vascular (por ejemplo primates) e intermedio (por ejemplo elefantes). El pene indiferente es corto mientras que el fibroelástico es largo y fibroso. El pene de los primates es largo y flexible; el del elefante tiene ambos tipos de tejidos, vascular y fibroelástico (Van Tienhoven 1983, citado por Lucio y cols. 1998).

Todos los tipos de pene presentan el proceso de erección mediante diferentes tejidos eréctiles: el pene humano como el de otros primates tiene poco tejido fibroso, carece de tejido óseo y de un músculo llamado retractor del pene. La erección, mecanismo que alarga el pene durante el coito, tiene diferente duración dependiendo el tipo de pene, siendo de mayor duración la del pene vascular (Hing-Sing 1994). La erección es un proceso esencial para la ejecución de la conducta copulatoria en mamíferos, resultante de un mecanismo hemodinámico, dado que la entrada de sangre al pene juega un papel principal. Sin embargo, es sabido que la erección para muchas especies resulta de la combinación de actividades vasculares, del músculo liso y del músculo estriado, aunque la contribución relativa de cada uno de esos sistemas efectores varía de una especie a otra. En el hombre resulta del incremento del flujo arterial, la relajación activa del músculo liso de las trabéculas de los cuerpos cavernosos y el incremento en la resistencia del flujo venoso. Los trabajos de Dorr y Brody (1967, citado en Lucio y cols. 1998) en perros, permiten concluir que el incremento de la entrada de sangre arterial es de importancia primaria para producir la erección, mientras que el incremento de la resistencia del flujo venoso es de menor importancia. Además, la mayor presión registrada en el cuerpo cavernoso coincide con la contracción del músculo isquicavernoso en el perro (Purohit y Beckett 1976).

En las cabras y los toros (que presentan pene fibroelástico) si se anestesia al músculo isquicavernoso, se evita que estos animales copulen, debido a la inhabilidad para alcanzar la erección (Beckett y cols. 1927). En la rata macho, el mIC parece ser esencial para producir

dorsiflexión del cuerpo peneano (Sachs 1982, Hart y Melese-d'Hospital 1983, Sachs 1983). Con la implantación crónica de electrodos en este músculo durante la conducta cópulatoria, se mostró que había actividad eléctrica cuando ocurría el despliegue del patrón motor correspondiente a la intromisión (Holmes y cols. 1991). A los machos que se les lesiona el mIC son incapaces de presentar intromisiones porque no tienen una erección suficiente (Sachs 1983). La contracción del mBE incrementa la dilatación del glande provocando que adquiera la forma de copa que se requiere para la expulsión seminal (Hart y Melese-d'Hospital 1983, Sachs 1983, Holmes y cols. 1991). La rata macho con remoción del mBE es incapaz de presentar las copas del glande y además tiene reducida su habilidad para remover de la vagina el tapón seminal depositado por él o por otro macho (Sachs 1982, Sachs y Melese-d'Hospital 1983).

En el conejo, se sugiere que el mIC es el músculo estriado con mayor participación en el proceso de erección; mientras el mBE parece ser vestigial y no tener participación (Nanasaki y Sakuma 2000). Sin embargo, no está demostrada la participación de estos músculos en la erección, pues la evidencia anatómica presentada no es suficiente para llegar a esa conclusión. Para demostrar la participación de estos músculos, hace falta estudiarlos anatómicamente de forma detallada (con respecto a su forma, tamaño, origen, inserción e inervación) y fisiológicamente utilizando métodos directos de estudio, por ejemplo, mediante técnicas electrofisiológicas (aplicando estímulos eléctricos, registrando los impulsos, insertando electrodos de manera crónica, observando la cópula y la inducción de la preñez) o técnicas de lesión (cortando o desinsertando unilateralmente o bilateralmente los músculos).

2.1.2 Eyaculación seminal

Durante la eyaculación ocurren contracciones espasmódicas de la musculatura esquelética, particularmente de la pelvis, miembros anteriores y posteriores, así como de la musculatura estriada del periné, que incluye entre otros, al mBE y mIC (Peterson y Stener 1970).

En el hombre, las contracciones repetidas de la musculatura estriada, principalmente del mBE y del mIC, son responsables de expeler el fluido seminal depositado en la parte posterior de la uretra (Benson 1994).

En la rata macho, el divertículo uretral (expansión de la uretra en el bulbo uretral) se encuentra rodeado por el cuerpo esponjoso del pene y el mBE, lo cual sugiere una participación importante de este músculo en la eyaculación, ya que al contraerse fuertemente (como ocurre durante las erecciones con copa) puede impulsar hacia el exterior el contenido del divertículo (Hart y Melese-D´Hospital 1983).

En el conejo se ha observado una notoria disminución en la erección peneana y eyaculación como resultado de la castración (Agmo 1976). Así mismo disminuye el peso del mIC y el tamaño del soma, del árbol dendrítico y de la longitud de las dendritas primarias de las motoneuronas espinales que lo inervan. No obstante, no se describe ningún efecto sobre el mBE o las motoneuronas que lo inervan (Nanasaki y Sakuma 2000).

2.3 Comunicación química

El conejo posee un complicado sistema de comunicación química, basado en sustancias odoríferas liberadas por glándulas cutáneas localizadas en varios sitios del cuerpo y con la orina durante el proceso de micción. Se ha encontrado que conejos machos sexualmente maduros muestran una secuencia muy estereotipada de conductas de investigación y marcaje en respuesta a la orina de un conoespecífico. El marcaje por frotamiento de la barbilla es la forma más típica de respuesta de marcaje, aunque individuos dominantes también defecan y orinan en chorro sobre las marcas de orina. Existen tres formas en que un conejo puede expulsar orina: en cuclillas, en chorro y en espray. Cada una de ellas difiere en volumen emitido, implicación o no de un mensaje a un conoespecífico y en la postura o comportamiento que acompaña la expulsión de orina. Algunos estudios han sugerido que la micción, permite transmitir información sobre el sexo, edad, estado social e identificación individual del animal emisor. Es posible la presencia de características aversivas dependientes de andrógenos en la orina de machos adultos o de sustancias atrayentes en la orina de hembras receptoras. La respuesta a la orina varía en relación al estado emocional o al rango del individuo receptor, mientras que el nivel de interés en orina de un individuo del mismo sexo (en machos adultos) declina conforme la muestra va envejeciendo (Bell 1980). Además cada miembro de un grupo puede contribuir en una mezcla para dar un “olor de grupo”, que es compartido por todos los

miembros. Tal mezcla de esencias puede ser logrado a través de marcaje con el mentón, orinando directamente el cuerpo de un conoespecifico o indirectamente, por ejemplo, por el uso comunal de entradas de madrigueras junto con acciones más deliberadas de marcaje con el mentón en letrinas y rasgaduras hechas con las garras (Bell 1977, Lechleitner 1958, Aldous 1937, Flux 1970, citados por Bell 1980). Sin embargo, el olor del macho dominante es seguramente el componente principal del olor que identifica al grupo. Es posible que este olor del macho dominante contribuya a mantener las diferencias entre el macho dominante y los machos subordinados, al ejercer cierto efecto inhibitorio en el sistema reproductivo en los conoespecificos de bajo rango. El conejo puede liberar la misma señal química en diferentes contextos, así mismo, puede liberar diferentes sustancias odoríferas en el mismo contexto. Por ejemplo, liberando simultáneamente orina, heces y marcaje con el mentón durante un encuentro entre dos machos rivales. La comunicación por medio de olores tiene varias variables que permiten su control, entre ellas:

- modo de control de producción del olor (hormonal, neuronal, etc.). Ciertos olores son producidos más fácilmente y con menor costo energético.
- modo de transmisión a las superficies blanco (proyección, contacto directo, etc.). Los olores que pueden proyectarse, por ejemplo en la orina, pueden ser dispersados más fácilmente sobre áreas más amplias y sobre conoespecificos no cooperativos, desde una distancia segura. El marcaje por contacto directo puede resultar en una mezcla de olores.
- efectos de parámetros ambientales (lluvia, temperatura, etc.). La duración de las señales varía en relación a condiciones climáticas adversas.
- tiempo de vida natural. Ciertos olores desaparecen más fácilmente y/o muestran su mayor efectividad a diferentes tiempos.
- rango de detección. Algunos olores necesitan contacto cercano para ser detectados, mientras otros pueden ser detectados a larga distancia.
- información visual o auditiva.
- contenido de componentes repulsivos o atractivos. otros olores pueden provocar respuestas de acercamiento o alejamiento, reforzando procesos de aprendizaje asociado.

- reacciones químicas con otros olores, por ejemplo, orina y secreciones glandulares. La mezcla de dos o más productos puede incrementar el tiempo de vida de uno o más componentes (Bell 1980).

Sin embargo, pese a la importancia de las formas en que la orina es emitida y las condiciones que deben cumplirse en cada forma de emisión de orina, no se conoce la participación de la musculatura perineal estriada en este proceso.

3. Inervación de la musculatura perineal estriada

La musculatura perineal está regulada por la región lumbosacra de la médula espinal, a través de nervios como el pélvico, el pudendo y el genitofemoral (Zempoalteca y cols. 2002). En el ser humano tanto el mBE como el mIC están inervados por el nervio pudendo (Wilson y Wilson 1978).

En la rata macho, el nervio pudendo mediante su rama motora inerva la musculatura estriada del pene (McKenna y Nadelhaft 1986). Se ha descrito que los cuerpos de las motoneuronas que inervan al mBE se localizan en los segmentos espinales lumbares 5 y 6 (L₅-L₆, Breedlove y Arnold 1980, McKenna y Nadelhaft 1986) formando un núcleo compacto sexualmente dimórfico en la parte dorsomedial del asta ventral. Los cuerpos de las motoneuronas que inervan el mIC se encuentran en un extremo del cuadrante ventrolateral del asta ventral (Breedlove y Arnold 1980).

En la coneja ambos músculos mBE y mIC están inervados por ramas separadas del nervio espinal sacro 2 (S₂) después de una conexión anastómotica con S₁ y S₃, según estudios electrofisiológicos (Cruz 2002). Además, se ha mostrado que los cuerpos de las motoneuronas que inervan a ambos músculos se hallan dispersas en el asta ventral de la médula espinal. Las motoneuronas que inervan al mBE se ubican en el en el cuadrante dorsomedial del segmento espinal L₇ y en el cuadrante dorsolateral del segmento espinal S₁ (Figura 5). Las motoneuronas que inervan al mIC se ubican en el cuadrante dorsomedial del segmento espinal L₇ (a partir de la porción media y en sentido rostrocaudal) y en el cuadrante dorsomedial y el área ventral del segmento espinal S₁, en las porciones rostral y caudal del mismo segmento espinal (Rodríguez y cols. 1999, 2000. Tabla 1).

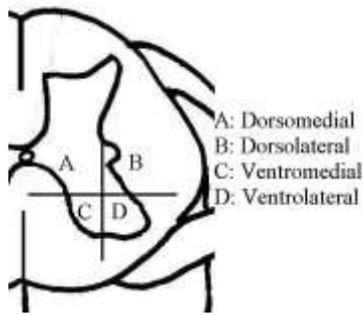


Figura 5. Disposición en cuadrantes de la sustancia gris de la médula espinal.

Tabla 1. Distribución de motoneuronas espinales que inervan al mBE y mIC en la coneja.

Músculo	Segmento espinal	Porción del segmento espinal	Cuadrante del asta ventral
mBE	L ₇	Caudal	Dorsomedial
	S ₁	Rostral	Dorsolateral
mIC	L ₇	Caudal	Dorsomedial
	S ₁	Rostral	Dorsomedial
	S ₁	Caudal	Dorsolateral

(Modificado de Rodríguez y cols. 1999, 2000).

Nanasaki y Sakuma (2000) determinaron en el conejo doméstico (raza Nueva Zelanda) intacto y castrado mediante la inyección de HRP, que las motoneuronas que inervan al mBE y mIC se encuentran en los segmentos espinales L₆, L₇ y S₁. Para el mBE el marcaje de las motoneuronas fue bilateral; para el mIC, ipsilateral al músculo inyectado. Se describió también que las motoneuronas de ambos músculos están distribuidas rostralmente en el segmento L₆ de la médula espinal, dispersas en el cuadrante dorsomedial del asta ventral pasando gradualmente al cuadrante ventrolateral en secciones más caudales.

4. Influencia de las hormonas esteroides en la musculatura perineal estriada y motoneuronas que la inervan

En los vertebrados, las principales hormonas esteroides producidas por los testículos son los andrógenos, testosterona y dihidrotestosterona. Los ovarios producen principalmente dos tipos de hormonas esteroides: estrógenos (entre ellos estradiol, estriol y estrona) y progestinas

(principalmente progesterona). Sin embargo, los testículos producen pequeñas cantidades de estrógenos y los ovarios, pequeñas cantidades de testosterona. Cada sexo tiene un equilibrio particular de varias hormonas, predominando la testosterona en los machos y la progesterona en las hembras (Becker y Breedlove 2002).

Las hormonas esteroides son lipofílicas, por lo que atraviesan fácilmente membranas. Las células blanco, tienen receptores que reconocen a un esteroide en particular. El complejo esteroide-receptor se une al ADN y modula la transcripción de genes específicos que controlan la producción de una gran variedad de proteínas. La expresión de receptores de hormonas esteroides es regulado por un sistema de retroalimentación positivo. Es decir, la presencia de hormonas estimula la expresión de receptores (Becker y Breedlove 2002). En general, las hormonas esteroides son de acción lenta, es decir, requieren de horas para producir un efecto.

El principal andrógeno (testosterona) y el principal estrógeno (estradiol) tienen estructuras químicas muy semejantes, de hecho, la testosterona puede convertirse a estradiol mediante la sustitución de un grupo hidroxilo por un doble enlace de oxígeno y la pérdida simultánea de una molécula de un átomo de hidrógeno y un grupo metilo, con lo que el anillo A se aromatiza (Breedlove y Hampson 2002). La transformación de andrógenos en estrógenos (principalmente estradiol), se realiza en las estructuras donde se encuentra presente la aromatasa, por lo que son masculinizadas por los estrógenos derivados de andrógenos testiculares (Rosenzweig y cols. 2001).

Acción de los andrógenos en el músculo.

Como se ha mencionado, las hormonas esteroides necesitan unirse a receptores específicos en el interior de la célula para afectar la expresión de proteínas. La testosterona tiene principalmente efectos anabólicos en los músculos que contienen los receptores correspondientes, por ejemplo, incrementando la división de mioblastos *in vitro* (Powers y Florini 1975; citado en Rand y Breedlove 1992) o el contenido de ADN (Galavazi y Szirmai 1971, Pizzichini y cols. 1986, citados en Rand y Breedlove 1992).

La masculinización de los músculos perineales y genitales externos (en particular la elongación del falo) es responsabilidad de andrógenos. Muchos mamíferos como el perro, gato

y los primates poseen músculos que, aunque difieren en forma y tamaño en machos y hembras, están presentes en ambos sexos. En la rata, la musculatura perineal es extremadamente dimorfica en los dos sexos, ya que algunos músculos se hallan presentes únicamente en el macho. Esos músculos son el mBE, LA y el mIC, que sin embargo, se hallan presentes en ratas hembras recién nacidas (Breedlove 1986). El tratamiento prenatal con testosterona o dihidrotestosterona (DHT) tiene diferentes efectos: La testosterona mantiene el músculo BC y el número de motoneuronas que lo inervan, mientras que la DHT, no mantiene el número de motoneuronas, aunque si mantiene al músculo BC (Breedlove, 1983).

Estudios en la rata adulta han demostrado que los músculos BE y LA son altamente sensibles a andrógenos sistémicos. Ambos músculos tienen receptores androgénicos (Fishman y cols. 1990), lo mismo que las motoneuronas que los inervan (Breedlove y Arnold 1983a). Algunas posibles explicaciones del efecto de la testosterona en el músculo son:

- 1) La testosterona o un producto muscular son captados por las motoneuronas que a su vez, liberan un factor trófico al músculo.
- 2) La testosterona puede afectar directamente la actividad muscular. Posiblemente a través de un incremento no genómico de la conductividad de la membrana de la célula muscular que altera su umbral de excitación, lo que afecta la actividad del músculo. Así mismo, el número de receptores a acetilcolina se incrementa en el músculo LA de la rata después de la administración sistémica de testosterona y disminuye después de la castración.
- 3) La testosterona puede alterar directamente la expresión genética en una población celular dentro del músculo para aumentar su masa. Esto incluye el incremento en la síntesis de proteínas dentro de fibras musculares para incrementar su diámetro, así como estimular la proliferación, migración y fusión de células satélites dentro de fibras musculares existentes. Esta última hipótesis es la más aceptada (Rand y Breedlove 1992)

Los andrógenos modulan directamente el tamaño y crecimiento de las miofibrillas musculares del mBE, con la castración se ve afectado el tamaño del músculo, al perderse algunas miofibrillas (Venable 1966, citado por Balice-Gordon y cols 1990) por lo que disminuye el volumen intracelular, causando pérdida de área en la membrana de las células musculares. La

masa de los músculos perineales se reduce marcadamente después de una gonadectomía. (Wainman y Shipounoff 1941; citado en Forger y Breedlove 1987).

La administración de testosterona sistémica puede evitar que músculos sensibles a andrógenos se atrofién, al añadir nuevas miofibrillas, lo que expande la membrana de las fibras musculares (Balice-Gordon y cols 1990). Este efecto se observó aun cuando el músculo no tenía inervación (Fishman 1989). Rand y Breedlove (1992) no encontraron efectos con la administración local de testosterona en los músculos BE y LA. Una posible razón de este nulo efecto metabólico de los andrógenos en los músculos denervados, es que el número de receptores disminuye, lo que evita los efectos anabólicos de la testosterona en, o cerca de los músculos mBE y LA, de tal manera que la testosterona solo disminuye la atrofia muscular producto de la castración.

En la rata, los músculos levator ani y BE son sexualmente dimorficos (Breedlove y Arnold 1980). Están presentes en el macho adulto, pero no en la hembra adulta, ya que desaparecen alrededor de la tercera semana de vida. Sin embargo, la administración de andrógenos evita la involución de los músculos (Breedlove y Arnold 1983).

Como el tamaño de un músculo afecta su latencia de respuesta y la fuerza máxima de contracción, una forma en que la testosterona puede alterar los reflejos penéanos, es a través de un simple cambio del tamaño de los músculos. De esta manera, el efecto anabólico directo de los andrógenos en los músculos BE y LA puede ser muy importante en la regulación de la conducta copulatoria (Rand y Breedlove 1987).

Acción de los andrógenos en el SNC

Las hormonas gonadales inducen diferencias sexuales permanentes en estructuras neurales al alterar procesos tales como la supervivencia de neuronas, desarrollo de la morfología y formación de sinapsis. El sistema nervioso en la rata es masculinizado a través de la acción de la Testosterona o de sus metabolitos, dihidrotestosterona (DHT) y estrógeno. El estrógeno es principalmente responsable de crear estructuras sexualmente dimorficas en el cerebro durante el desarrollo, mientras los andrógenos se considera que son responsables de masculinizar núcleos motores espinales. Sin embargo, en muchos casos, la expresión de características

fenotípicas o conductuales puede representar la acción combinada de andrógenos y estrógenos; por ejemplo, en el SNB algunos andrógenos tienen un papel único y exclusivo para el establecimiento del número de neuronas, tamaño del soma y eliminación de sinapsis neuromusculares, los estrógenos parecen estar involucrados en el desarrollo dendrítico (Burke y cols. 1997).

Cualquier diferencia sexual de la función o la estructura del cerebro establecida durante la diferenciación sexual se mantendrá en el adulto incluso tras una gonadectomía. Por el contrario, las diferencias sexuales debidas a los efectos de activación de los diferentes medios hormonales, si no están relacionadas con la diferenciación sexual *per se*, desaparecerán tras la gonadectomía (Kandel y cols. 2001).

Para evitar que el sistema nervioso en desarrollo sea masculinizado, una α -fetoproteína se une específicamente a los estrógenos maternos, lo que impide que sean captados en el cerebro. La rata macho resulta masculinizada cuando sus testículos producen testosterona, la cual, al no estar unida a la α -fetoproteína, es captada en el cerebro; allí la aromatasa la convierte en estrógeno, que se une a los receptores correspondientes y el complejo esteroide-receptor regula la expresión genética para que el cerebro se desarrolle de manera masculina. Si no hay andrógenos presentes, no llega al cerebro ningún estrógeno y el feto se desarrolla de un modo femenino (Rosenzweig y cols. 2001).

Un caso particular de la importancia de la aromatasa se observa en la hiena moteada. El aspecto sexualmente monomorfo puede indicar que ambos sexos están expuestos a andrógenos prenatales. A diferencia de otros mamíferos, donde la placenta aromatiza rápidamente los andrógenos a estrógenos (tal vez para proteger a la madre y fetos hembra de los andrógenos producidos por machos fetales), la hiena madre carece casi completamente de aromatasa y produce el andrógeno androstenediona (que no se convierte a estrógenos), por lo que todos los fetos son expuestos a cantidades considerables de andrógenos, lo que puede explicar su aspecto masculino (Rosenzweig y cols. 2001).

Los esteroides tienen un efecto organizador sólo cuando están presentes durante un período sensible. En las ratas, por ejemplo, que son altriciales (nacen con el sistema nervioso central en estado inmaduro), el andrógeno que se les da justo después de nacer puede afectar a la conducta posterior. Para que la conducta de las cobayas (que son precociales, es decir,

nacen relativamente maduras, con visión audición y locomoción desarrolladas y con un breve periodo de dependencia materna para la nutrición) sea afectada, deben ser expuestas a los andrógenos prenatalmente (Rosenzweig y cols. 2001). En el gerbil el desarrollo de las motoneuronas del SNB es más retardado comparado con la rata y puede continuar durante el periodo perinatal (Fraley y Ulibarri 2001).

La influencia de las hormonas en el sistema nervioso central es dinámica, es decir, los efectos morfológicos de los esteroides gonadales no se limitan a procesos que ocurren durante el desarrollo, sino también pueden inducir cambios estacionales y cambios permanentes o transitorios durante la pubertad.

El Núcleo espinal del bulboesponjoso en la rata.

La exposición a hormonas testiculares durante el desarrollo produce diferencias sexuales en el SNC. Se ha descrito dimorfismo sexual en el sistema nervioso central de los vertebrados (Gorski y Gordon, 1978; Greenough y cols. 1977; citados en Breedlove y Arnold 1981) y en muchas especies se han encontrado diferencias sexuales del comportamiento (materno o paterno, agresividad o de territorialidad). Las diferencias sexuales pueden ser, al menos en parte, resultado de diferencias sexuales del sistema nervioso central. Un ejemplo ese encuentra en un pequeño número de neuronas motoras que inerva a los músculos del pene de diversos mamíferos que forman el llamado núcleo espinal del mBE (SNB, por sus siglas en inglés). Este dimorfismo sexual es especialmente notorio en la rata. Al nacer, ambos sexos poseen la musculatura y las neuronas del núcleo espinal del mBE, pero en las ratas hembra desaparecen durante la primera semana de vida (Breedlove 1986). En los machos, el SNB está constituido por aproximadamente 200 motoneuronas que inervan al mBE, al músculo levator ani y al esfínter anal (Breedlove y Arnold 1980, Schroder 1980). En las hembras, el SNB está compuesto aproximadamente por 60 motoneuronas, que inervan al esfínter anal exclusivamente (McKenna y Nadelhaft 1986). El dimorfismo sexual del SNB de la rata es provocado a la acción de andrógenos durante el desarrollo y la edad adulta y no a la acción del genoma. El numero de neuronas en el SNB es determinado por la acción organizadora y de

desarrollo de los andrógenos, mientras que el tamaño individual de la neurona es alterado, por la influencia hormonal activacional, en el adulto (Breedlove y Arnold 1981).

La morfología de las motoneuronas en el SNB también es sexualmente dimórfica: el tamaño del soma en machos adultos, es significativamente mayor que en las hembras adultas (Breedlove y Arnold 1981, McKenna y Nadelhaft 1986). El establecimiento de diferencias sexuales la morfología de las motoneuronas en el SNB es asociada a la presencia de testosterona durante el desarrollo. El crecimiento del área del soma ocurre principalmente en las primeras cuatro semanas después del nacimiento (Goldstein y Sengelaub 1992). El área del soma de las motoneuronas del SNB de ratas hembras es aproximadamente de la mitad, de las motoneuronas del SNB en el macho (Breedlove y Arnold 1980). La administración perineal de andrógenos masculiniza el tamaño del soma en hembras y machos castrados (Breedlove y Arnold 1983, Goldstein y Sengelaub 1992). El crecimiento dendrítico también es dependiente de andrógenos

Otro núcleo sexualmente dimórfico es el llamado núcleo dorsolateral (nDL) en la región lumbar de la rata (L5-L6), está formado por motoneuronas que inervan al mIC y al esfínter uretral (Schroder 1980), no está presente en la rata hembra, pero sus motoneuronas pueden ser masculinizadas permanentemente (en número y tamaño) con una dosis única de propionato de testosterona en el segundo día de vida (Jordan y cols. 1982). El desarrollo de las motoneuronas del nDL es también, sensible a andrógenos. Por ejemplo, el número de motoneuronas es regulado por muerte celular dependiente de andrógenos (Jordan et al. 1982). En machos adultos, motoneuronas del nDL acumulan andrógenos (Breedlove y Arnold 1980) y la longitud de las dendritas en el nDL es sensible a manipulación hormonal (Kurz et al. 1991). Estos núcleos motores inervan músculos perineales anatómicamente distintos que están involucrados en diferentes reflejos copulatorios. (Goldstein y Sengelaub 1993).

Estudios en el conejo

Los efectos de la supresión de andrógenos en el conejo macho no han sido estudiados tan ampliamente como en la rata. Utilizando registros acelerométricos (en conejos de raza Nueva Zelanda) se observó que la castración no provoca la desaparición inmediata de la actividad

sexual y el patrón motor de monta puede continuar por algunos meses. Sólo una pequeña proporción de las montas realizadas por conejos castrados culminan en eyaculación, principalmente porque disminuye su efectividad para producir lordosis en la hembra (Stone 1932, Beyer y cols. 1980, citados en Morali y Beyer 1992). Además se observan claras alteraciones tanto en el vigor como en el patrón temporal de monta, lo cual sugiere que la frecuencia y el ritmo son más sensibles a la privación androgénica que la motivación sexual. La administración de propionato de testosterona (TP) en dosis de 10 mg diarios durante 15 días, a conejos castrados (30 días poscastración) restaura gradualmente la incidencia de montas al nivel de los intactos, pero no las intromisiones. También se incrementa tanto la frecuencia como la fuerza de los movimientos pélvicos (Morali y Beyer 1992). La secuencia que usualmente se observa durante la pérdida de la conducta sexual luego de la castración es una falla inicial para lograr la eyaculación, luego una disminución y pérdida de las montas con inserción peneana, hasta que finalmente el macho deja de montar a la hembra (Morali 1998).

La castración en el conejo de la raza Nueva Zelanda es seguida de una prolongada reducción en el tamaño de los somas y la longitud de las dendritas de motoneuronas que inervan al mIC marcadas con HRP, efecto que es revertido por la administración de testosterona, de manera similar a lo observado en la rata macho. Se encontró una disminución en el peso del mIC dos semanas después de la castración. No se reportan los efectos sobre el mBE ni las motoneuronas que lo inervan. (Nanasaki y Sakuma 2000).

A continuación se muestran algunos efectos de la castración en el conejo doméstico (Tabla 2).

Tabla 2. Algunos efectos observados por la castración en el conejo doméstico.

Periodo postcastración	Efecto observado	Autor
10 semanas	Disminución en la frecuencia de monta (animales expertos)	(Agmo 1976)
4 semanas	Desaparición de la erección y eyaculación	(Agmo 1976)
2 semanas	Disminución en la densidad de receptores autonómicos y la contractilidad del músculo liso de la vejiga urinaria	(Anderson y Navarro 1988)
2 semanas	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción de la presión intracavernosa - Reducción de la expresión de receptores α_1-adrenérgicos - Disminución de la actividad de fosfodiesterasa tipo 5 - Reducción del músculo liso trabecular y aumento de tejido conectivo en el cuerpo cavernoso 	(Traish 1999)
2 semanas	<ul style="list-style-type: none"> - Disminución en el peso del mIC - Disminución en el área del soma y longitud de dendritas principales de las motoneuronas espinales que inervan al mIC 	(Nanasaki y Sakuma 2000)

Variaciones estacionales

La exposición de ratones a una secuencia de diferentes ciclos de luz, simulando primavera e invierno, produce fluctuaciones en el tamaño testicular, que fueron acompañadas por cambios morfológicos reversibles en el sistema neuromuscular del SNB. Se observó reducción de los músculos perineales y neuronas del SNB, que fue asociada a regresión gonadal en ratones expuestos a condiciones de iluminación semejantes al invierno (“días cortos”), mientras que el aumento en el tamaño de músculos, motoneuronas y testículos, se asocia a condiciones semejantes a la época reproductiva (“días largos”). Estos cambios cíclicos en la masa de los

músculos sensibles a andrógenos puede ser un fenómeno general en mamíferos con reproducción estacional (Forger y Breedlove 1987).

5. Marcaje con sustancias de transporte retrógrado

La HRP sola o conjugada con lectinas como la aglutinina de germen de trigo (WGA, Broadwell y Balin 1985) es una enzima ampliamente utilizada para trazar conexiones nerviosas, dada su fácil captación por todos los tipos de células nerviosas mediante endocitosis y es transportada retrógradamente a través del axón. La capacidad de la HRP para cruzar membranas es la base de la técnica de marcaje retrógrado. La endocitosis ocurre a través de la membrana de la neurona, incluyendo dendritas, perikarion, axones y terminales nerviosas. Esta es actualmente una de las técnicas de trazado neuroanatómico más usadas, pues ofrece un método conveniente para trazar conexiones de neuronas centrales, ganglios periféricos nervios, músculos, piel, vísceras y estructuras relacionadas. Aunque la peroxidasa por si misma no es visible, sus productos de reacción son fácilmente detectables. La molécula de HRP en presencia de cromógeno (tetrametilbenzidina) y peróxido de hidrógeno, tiñe de color violáceo fibras, somas o dendritas neuronales (Mesulam y Marsel 1978). Entre sus ventajas se encuentran: es un método fácil y rápido de implementar, no se necesitan complicados equipos o aparatos complicados para la inyección o la reacción, los productos de reacción son visualizados a través de reacciones histoquímicas muy sencillas y son permanentes, además de ser observables con microscopio óptico o electrónico (Mesulam y Marcel, 1982).

II. JUSTIFICACIÓN

Los músculos estriados peneanos mBE y mIC participan en la fisiología sexual masculina. Conocer la inervación precisa de esta musculatura será útil para determinar las posibles vías involucradas en el control nervioso de las funciones sexuales del macho. El tamaño de estos músculos, así como la distribución espinal de las motoneuronas que los controlan varían de una especie a otra. La rata ha sido el modelo utilizado para determinar la participación del mBE y del mIC en la erección y eyaculación, además estos músculos y las motoneuronas que los controlan son sensibles a la disminución de testosterona, producto de la castración (Breedlove y Arnold 1981).

El conejo podría ser utilizado como otro modelo para tales fines ya que la anatomía de la vasculatura peneana y la conducta cópulatoria son más parecidos al del ser humano, sin embargo, los estudios sobre la musculatura pélvica y perineal estriada de este animal son incompletos. Se ha descrito la anatomía e inervación de tales músculos en la coneja doméstica (Martínez-Gómez y cols. 1997, Cruz y cols. 2001), pero falta por describirlos de forma detallada en el macho (Nanasaki y Sakuma 2000).

III. HIPÓTESIS

1. En el conejo doméstico de la raza chinchilla, los músculos perineales bulboesponjoso e isquiocavernoso están relacionados anatómicamente con el pene.
2. Las motoneuronas que inervan a los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso se distribuyen en los segmentos espinales L7 y S1.
3. Los valores morfométricos de los músculos mBE y mIC son mayores en machos intactos que en los castrados.
4. Los valores morfométricos de las motoneuronas que inervan a los músculos mBE e isquiocavernoso son mayores en los machos intactos que en los castrados.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar morfológicamente a los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso, la localización de las motoneuronas espinales que los inervan y sus características morfométricas, en el conejo doméstico de la raza chinchilla, intacto y castrado.

Objetivos específicos

1. Determinar la morfometría del mBE y mIC en machos intactos y castrados.
2. Describir la correspondencia de segmentos espinales y vértebras de las regiones lumbar y sacra.
3. Determinar los segmentos espinales donde se encuentran las motoneuronas que inervan a los mBE y mIC.

4. Caracterizar a las motoneuronas que inervan a los mBE y mIC (número de somas, área del soma, área del árbol dendrítico y longitud de las dendritas primarias) en machos intactos y castrados.

V. METODOLOGÍA

1. Análisis anatómico del músculo bulboesponjoso e isquiocavernoso

Animales

Se utilizarán 3 conejos adultos de 6 a 8 meses de edad de la raza Chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*), que se mantendrán a una temperatura de 23 ± 2 °C, con un ciclo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad (encendido de la luz 6:00 AM) alojados en jaulas de acero inoxidable (50x60x40 cm.). Se les proporcionará alimento comercial (Conejina Purina) y agua *ad libitum*.

Procedimiento

A los animales se les administrará ketamina (25 mg/kg, IM) y luego de 10 minutos, pentobarbital sódico (63 mg/kg; IP). Se hará una incisión sobre la piel que cubre al pene para localizar al mBE y mIC siguiendo la descripción anatómica de Barone y cols. (1973) posteriormente, se determinará el origen e inserción de cada uno. Se harán mediciones de cada músculo y se tomarán fotografías de los mismos.

Para la descripción anatómica y caracterización morfométrica del mBE se medirán las siguientes variables.

Longitud del músculo, considerada como la distancia en línea recta desde el punto de origen al punto de inserción del músculo.

Longitud del tendón, considerada como la distancia en línea recta desde el punto de unión del músculo en el tendón a la inserción del tendón en el ligamento suspensorio del pene.

Ancho proximal, considerado como la distancia en línea recta en sentido trasversal al haz de fibras musculares que componen a cada mBE, en el punto de origen.

Ancho medial, considerado como la distancia en línea recta en sentido trasversal al haz de fibras musculares que componen a cada mBE, en la parte medial del músculo, donde alcanza su valor máximo.

Ancho distal, considerado como la distancia en línea recta en sentido trasversal al haz de fibras musculares que componen a cada mBE, en el punto de inserción.

Grosor, considerado como la distancia en línea recta en sentido dorsoventral desde la superficie dorsal del haz de fibras musculares que componen al mBE a la superficie dorsal del pene, en la parte medial del músculo, dónde alcanza su valor máximo (Figura)

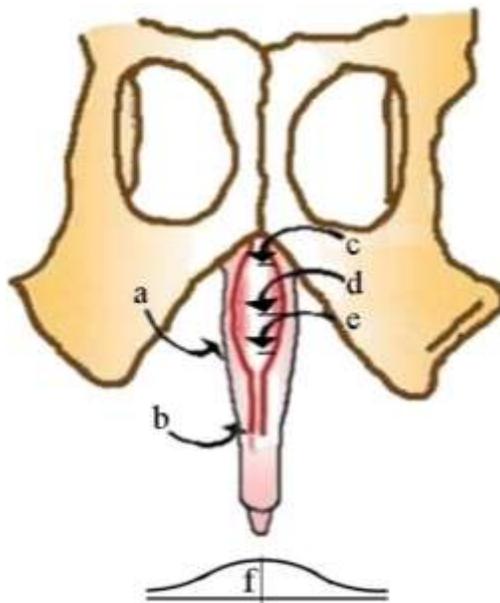


Figura 9. Variables que se medirán en el mBE: a) longitud del músculo, b) longitud del tendón, c) ancho proximal, d) ancho medial, e) ancho distal y f) grosor en la parte media.

Para la descripción anatómica y caracterización morfométrica del mIC se medirán las siguientes variables:

Longitud del lado de origen, considerada como la distancia en línea recta del área donde se originan todas las fibras musculares que forman el mIC sobre la cara externa del arco isquiático.

Longitud del lado opuesto, considerado como la distancia en línea recta de los extremos distales del lado de origen y el lado adyacente, en sentido paralelo a las fibras musculares del mIC.

Longitud del lado adyacente, considerado como la distancia en línea recta del área del cruce peneano donde se insertan las fibras musculares del mIC.

Grosor, considerado como la distancia en sentido dorsoventral del mIC en la parte inmediata al origen, donde alcanza su valor máximo (Figura)

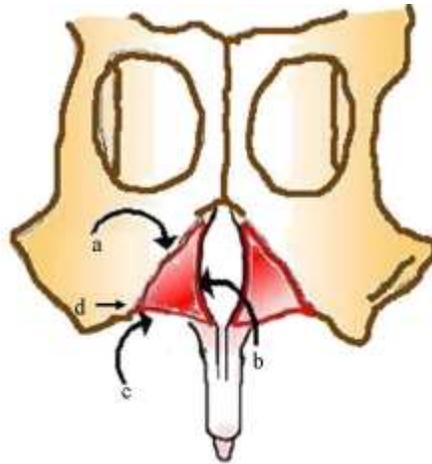


Figura 13. Variables que se medirán en el mIC: a) longitud del lado de origen, b) longitud del lado adyacente, c) longitud en el lado opuesto y d) grosor en el origen.

2. Reconocimiento de la columna vertebral lumbar y sacra y segmentos espinales correspondientes

Animales

Se utilizarán tres animales con las características descritas anteriormente y utilizados en otros proyectos.

Procedimiento

A los animales se les hará una incisión en la piel a lo largo del dorso. Los músculos dorsales serán removidos para exponer la columna vertebral, extrayendo sólo la región lumbar y sacra. Después de su descripción se hará una laminectomía para obtener los segmentos espinales lumbares y sacros para ser identificados y medidos.

3. Marcaje de motoneuronas que inervan al músculo bulboesponjoso e isquiocavernoso

Animales

Se utilizarán 32 conejos adultos con las características descritas anteriormente.

Procedimiento

Se harán dos grupos, uno de animales intactos (n=16) y otro de animales castrados (n=16), que serán inyectados con HRP-WGA disuelto en una solución 1:10 de dimetilsulfóxido. La castración se realizará a los 4 meses de edad, dejando transcurrir 10 semanas (Agmo 1976).

Inyección del trazador

Los conejos serán tranquilizados con ketamina (25 mg/kg, IM), después de diez minutos, serán anestesiados con pentobarbital sódico (63 mg/kg; IP), se hará una incisión sobre la piel que cubre al pene para descubrir al mBE o al mIC, cada músculo será inyectado unilateralmente con HRP-WGA al 5% utilizando una jeringa Hamilton de 50 μ l, un total de 5 μ l del trazador en dos puntos de administración (en la parte media del músculo y cerca del origen). Para evitar la difusión del trazador se denervará la musculatura adyacente. Posteriormente se aplicará electroestimulación al músculo inyectado para acelerar el transporte axoplásmico del trazador, mediante electrodos bipolares de plata clorurada colocados en la parte media de cada músculo.

Los electrodos se conectarán a una unidad SIU5 Grass, conectada a su vez al estimulador Grass S44. Se aplicarán pulsos eléctricos de 0.1 mseg de duración con una frecuencia de 5 pulsos/seg a una intensidad de 3 volts durante 2 minutos, que producirán contracciones musculares claras. Finalmente, la herida se cerrará utilizando sutura y se aplicará benzal como antiséptico local.

Los animales sobrevivirán 48 horas, tiempo suficiente para que ocurra el transporte retrógrado del trazador, luego serán perfundidos.

Perfusión transcárdica

Al conejo una vez anestesiado como se indicó anteriormente, se le abrirá la cavidad torácica, seccionando el diafragma y las costillas de ambos lados. Se expondrá el corazón y por el vértice inferior del ventrículo izquierdo se insertará una aguja de punta roma (conectada a un catéter) calibre 16 hasta el inicio de la aorta ascendente. Inmediatamente después se realizará una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de líquidos. La perfusión comenzará con cloruro de sodio al 0.9% en agua destilada y heparina, seguida de un fijador compuesto de paraformaldehído al 1%, glutaraldehído al 0.5%, cloruro de calcio 0.002% y sacarosa 1 molar (M) en buffer de fosfatos (PB) 0.1 M.

En el conejo perfundido se expondrá la región lumbosacra de la columna vertebral, se hará una laminectomía amplia para poder extraer los segmentos espinales L6, L7, S1, S2, al obtenerlos serán conservados en una solución de sacarosa 15% en buffer de fosfatos 1 M (pH 7.3) durante 72 horas a 4° C y posteriormente serán cortados.

Obtención de cortes y reacción enzimática

Cada segmento será cortado longitudinal o transversalmente en un criostato (Leica mod. CM 1850) en secciones de 50 μ de espesor que serán colectadas secuencialmente en recipientes que contengan una solución buffer de acetato 0.1 M (pH 3.0). Para el revelado de los cortes se utilizará el método de Mesulam (1978).

Los cortes se preincubarán durante 25 minutos en nitroprusiato de sodio (Aldrich, USA) y 3, 3', 5, 5' -tetrametilbenzidina (Sigma, USA) en buffer de acetato 0.1 M (pH 3.0). Inmediatamente después se incubarán 25 minutos en una solución igual a la anterior, a la cual se le añadirán 25 ml de peróxido de hidrógeno (30 %). La preincubación e incubación se harán en la oscuridad, para mejorar la especificidad de la reacción. Finalmente se realizarán cinco lavados en buffer de acetato 0.1 M (pH 3.0) de 5 minutos cada uno.

Los cortes se montarán en portaobjetos gelatinizados dejándolos secar a temperatura ambiente durante 24 horas, después se deshidratarán en concentraciones crecientes de etanol (70, 96 y 100%, 10 segundos en cada uno), se aclararán con xilol (10 segundos) y finalmente se les aplicará medio de montaje Cytoseal 60 (Stephens Scientific), dejándolos secar, 48 horas aproximadamente, a temperatura ambiente para luego ser analizados.

Los cortes longitudinales servirán para ubicar los segmentos espinales en que se encuentren motoneuronas con marcaje. Los cortes transversales servirán para determinar la posición de las motoneuronas en la sustancia gris de la médula espinal (Tabla 3).

Tabla 3. Número de animales para obtener los segmentos espinales (L6, L7, S1, S2) y orientación del corte que se obtendrá de ellos.

Conejos	mBE		mIC	
	Corte longitudinal	Corte transversal	Corte longitudinal	Corte transversal
Intactos	2	6	2	6
Castrados	2	6	2	6

Análisis de cortes histológicos

Las observaciones se harán con un microscopio BH2 (Olympus) con objetivo 4x buscando motoneuronas marcadas, para determinar su localización en los segmentos espinales (cortes longitudinales) y se contará el número de ellas en la sustancia gris (cortes transversales). Posteriormente, con un microscopio Axioscope 2 Plus (Zeiss) con objetivo 20x, conectado a una cámara fotográfica digital Evolution MC Megapixel Firewire que transferirá las imágenes

a una computadora HP Pavillion Mx 70, con el programa Image-Pro plus versión 4.5 (Media Cybernetics) para analizar las imágenes. Serán consideradas las siguientes variables:

% Motoneuronas en L7: Proporción de motoneuronas marcadas con WGA-HRP en el segmento espinal L7, con respecto al número total hallado.

% Motoneuronas en S1: Proporción de motoneuronas marcadas con WGA-HRP en el segmento espinal L7, con respecto al número total hallado.

Número de motoneuronas por animal: Motoneuronas halladas en cada sujeto estudiado.

Número de motoneuronas según corrección de Abercrombie:

Número de motoneuronas medidas:

Área del soma

Área del árbol dendrítico

Longitud de las dendritas primaria

Y número de dendritas primarias por neurona.

Se hará una comparación entre los datos obtenidos de los animales intactos versus los castrados. Algunas imágenes de motoneuronas serán fotografiados con una cámara fotográfica digital Powershot S50 (Canon) adaptada al microscopio.



Variables a considerar en las motoneuronas: A) Área de soma, B) Área del árbol dendrítico, C) Longitud de dendritas primarias.

VI. RESULTADOS

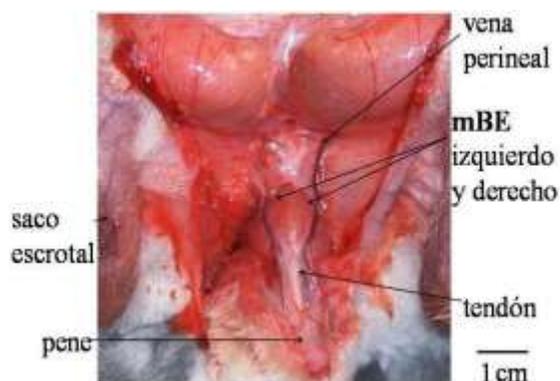
1. Descripción anatómica del músculo bulboesponjoso e isquiocavernoso

A) mBE

Origen e inserción del músculo bulboesponjoso

Se describió como mBE a un músculo par situado sobre la línea media del dorso en la parte proximal del pene. Las fibras musculares que constituyen a cada mBE tienen origen carnoso en el borde medial del arco isquiático, se disponen rostrocaudalmente de manera paralela a la línea media del dorso del pene y se insertan en un tendón común que se une al ligamento suspensorio del pene. El par de mBE se encuentra situado estrechamente uno al lado del otro flanqueado por la vena perineal (Figuras).

A)



B)

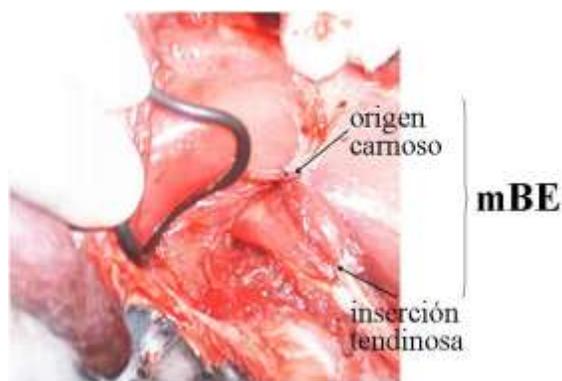


Figura 6. Localización del músculo bulboesponjoso (mBE) en el periné del conejo macho adulto intacto. A) Vista ventral, se observa sobre la parte dorsal del pene al par de mBE. B) Vista lateral, se observa el origen carnoso del mBE en el borde medial del arco isquiático y su inserción tendinosa en el ligamento suspensorio del pene.

Tamaño del músculo bulboesponjoso en animales intactos

El valor de las variables medidas en machos intactos se resume en la Figura 10.

Variable	♂103	♂ 4	♂112
Longitud del músculo	21.0	19.0	20.7
Longitud del tendón	19.5	20.5	20.3
Ancho proximal	4.5	3.5	0.48
Ancho medial	0.9	0.8	0.95
Ancho distal	0.4	0.3	0.45
Grosor	0.95	0.85	0.93

(valores en milímetros)

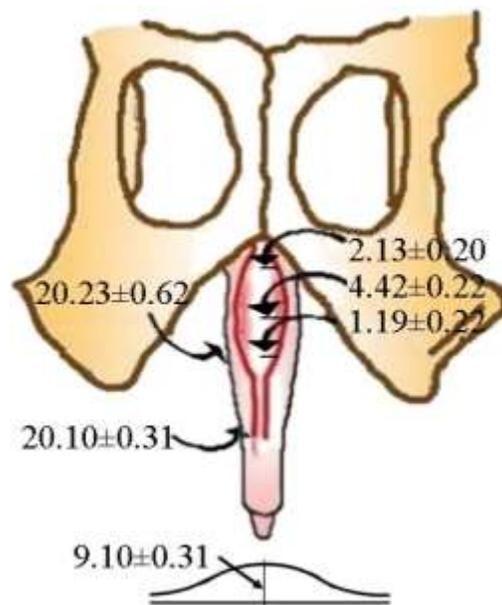


Figura 10. Valores morfométricos (media±e.e., en mm) de los músculos mBE en el conejo intacto. Se consideran los siguientes valores: longitud del músculo, longitud del tendón, ancho de la parte proximal, ancho de la parte media, ancho de la parte distal y grosor de la parte media.

Tamaño del músculo bulboesponjoso en animales castrados

Después de dos meses de realizada la castración, se encontró una marcada disminución de las variables consideradas. Los valores obtenidos de las variables medidas en el mBE de machos castrados se presentan en la figura .

Variable	♂103	♂102	♂105
Longitud del músculo	13.9	10.78	14.5
Longitud del tendón	18.2	18.8	17.9
Ancho proximal	4.0	3.2	3.5
Ancho medial	5.2	4.5	4.6
Ancho distal	4.0	3.0	3.5
Grosor	4.2	3.8	5.0

(valores en milímetros)

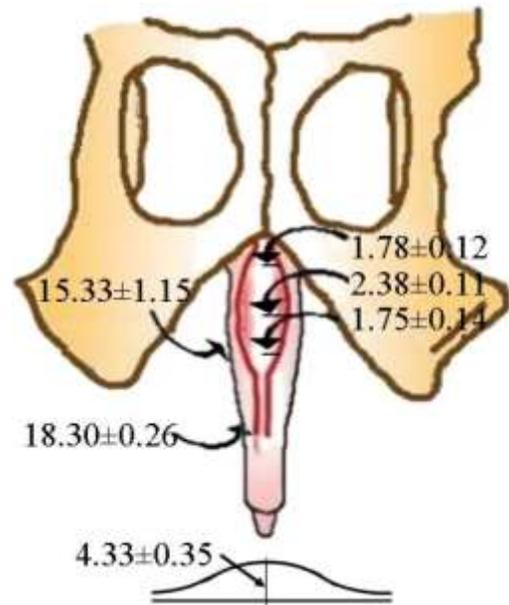


Figura 11. Valores morfométricos (media±e.e., en mm) del músculo mBE en el conejo castrado.

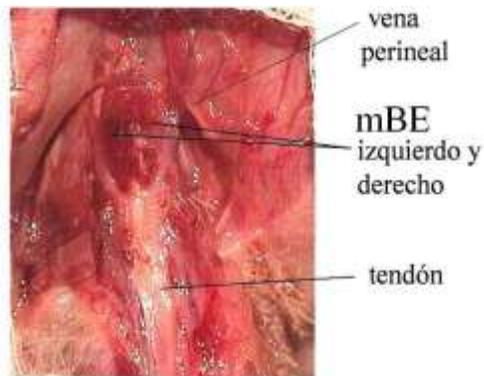


Figura 11. Vista ventral del músculo bulboesponjoso (mBE) en el conejo castrado. Se observa sobre la parte dorsal del pene al mBE de menor tamaño que en el conejo intacto.

B) mIC

Origen e inserción del músculo isquiocavernoso

Se describió como mIC a un músculo par que forma una lámina triangular a cada lado de la parte proximal del pene. Las fibras musculares que constituyen a cada mIC tienen origen carnoso presentando una aponeurosis en el borde caudal del arco isquiático, se disponen ventrodorsalmente de manera oblicua y tienen inserción carnosa en la crus peneana.

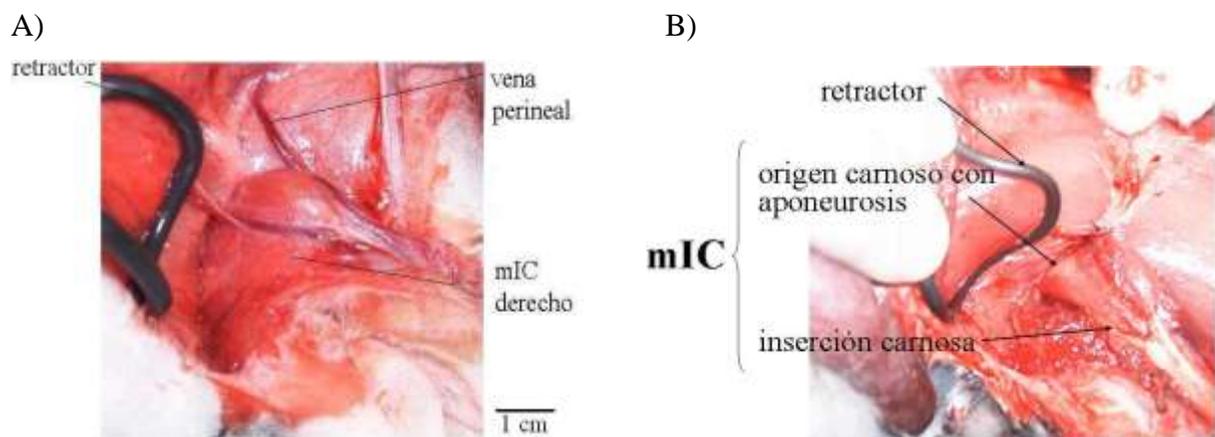


Figura . Localización del músculo isquiocavernoso (mIC) en el periné del conejo macho intacto. A) Vista lateral, se observa al costado del pene al mIC derecho. B) Vista lateral. Se observa el origen carnoso con aponeurosis del mIC en el borde caudal del arco isquiático y su inserción carnosa en la crus del pene.

Tamaño del músculo isquiocavernoso en animales intactos

El valor de las variables medidas en machos intactos se resume en la Figura 14. En el origen de estos músculos se observa una aponeurosis de aproximadamente 9 mm de largo y 8 mm de ancho.

Variable	♂103	♂ 4	♂112
Longitud lado de origen	22.0	18.6	21.5
Longitud lado opuesto	23.0	19.5	22.5
Longitud lado adyacente	21.0	20.5	20.5
Grosor en el origen	0.6	0.5	0.6

(valores en milímetros)

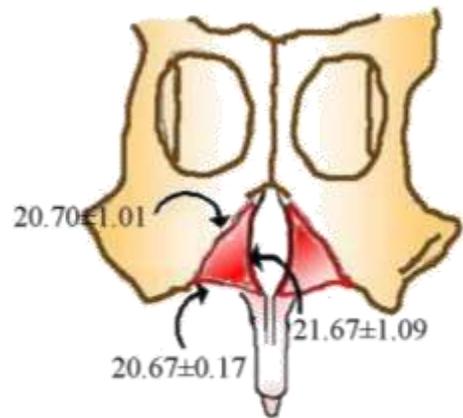


Figura 14. Valores morfométricos (media±e.e., en mm) de los músculos mIC en el conejo intacto. Se consideran los siguientes valores: longitud en el lado de origen, longitud en el lado adyacente y longitud en el lado opuesto.

Tamaño del músculo isquiocavernoso en animales castrados

Después de dos meses de realizada la castración, se encontró una marcada disminución de las variables consideradas. Los valores obtenidos de las variables medidas en el mIC de machos castrados se presentan en la figura.

Variable	♂103	♂102	♂105
Longitud lado de origen	16.2	13.9	15.5
Longitud lado opuesto	16.5	15.0	16.7
Longitud lado adyacente	16.0	17.4	16.7
Grosor en el origen	4.0	3.0	4.9

(valores en milímetros)

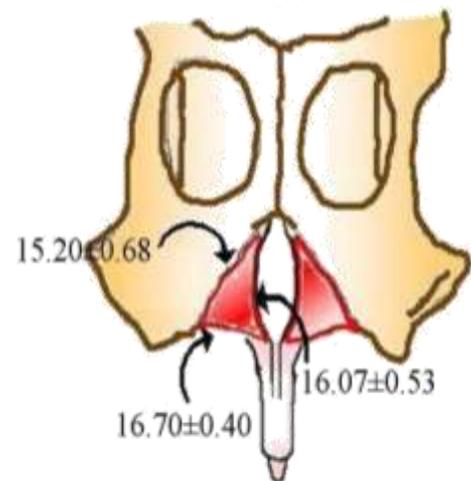


Figura 15. Valores morfométricos (media±e.e en mm) del músculo mIC en el conejo castrado.



Figura 12. Vista lateral del músculo isquiocavernoso (mIC) en el conejo castrado. Se observa en la parte lateral del pene al mIC izquierdo de menor tamaño que en el conejo intacto

2. Reconocimiento de la columna vertebral lumbar y sacra y de los segmentos espinales correspondientes

Reconocimiento de las regiones vertebrales lumbar y sacra

La región lumbar está constituida por siete vértebras, la longitud media (n=3 conejos) fue de 13.66 cm. Los valores de cada animal se muestran en la Tabla 8. Los agujeros intervertebrales se localizan lateralmente. Las apófisis espinosas de las vértebras lumbares fueron largas, anchas y altas; las apófisis transversas se dirigen de manera caudorostral. Se encontraron algunas variantes de forma en la vértebra L₁. Un conejo (macho 100) presentó variación en las apófisis transversas de la vértebra L₁, hallándose en posición perpendicular al neuroeje, formando una fina aguja. No se encontraron variaciones en el número de vértebras, ni en el número de segmentos espinales (Figura 13).

La región vertebral sacra está formada por cuatro vértebras que fusionadas, constituyen al hueso sacro. La longitud media de la región sacra fue de 4.4 cm y no se encontró variación en el número de vértebras. Los valores de cada animal (n=3) se muestran en la Tabla . En esta región los llamados agujeros intervertebrales se localizaron medialmente en el cuerpo de cada vértebra.

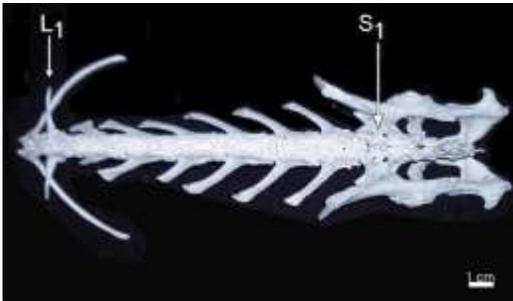
Tabla 8. Longitud de las regiones vertebrales lumbar y sacra.

Animal	♂100	♂103	♂s/n	Media±e.e.
--------	------	------	------	------------

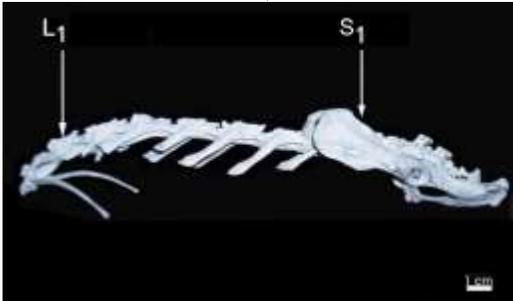
Región lumbar	Número de vértebras	7	7	7	7
	Longitud total de la región (cm)	13.5	13.7	13.8	13.66±0.06
Región sacra	Número de vértebras	4	4	4	4
	Longitud total de la región (cm)	4.3	4.5	4.4	4.4±0.04

Macho 100

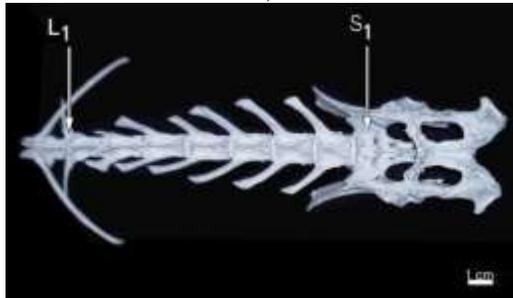
A)



B)



C)



Macho 103

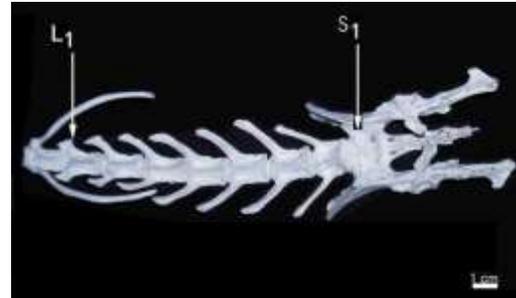
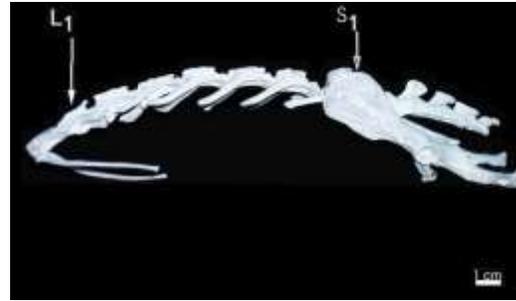
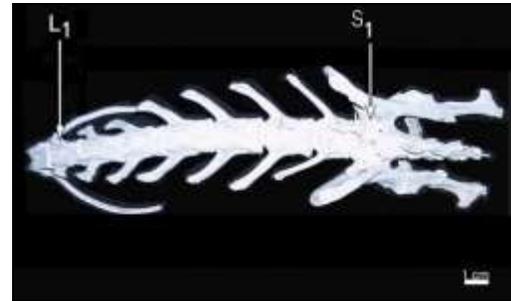


Figura 13. Fotografías de la columna vertebral de conejo adulto, en tres vistas A) dorsal, B) lateral y C) ventral. Se muestran las regiones lumbar y sacra. Note las diferencias halladas en la vértebra lumbar 1.

Reconocimiento de los segmentos espinales lumbar y sacro

Las raíces espinales salen por los agujeros intervertebrales siguiendo la dirección de su respectivo foramen, las primeras raíces lumbares mostraron una dirección lateral. A partir de la raíz L₅ y hasta L₇ la dirección de las raíces espinales fue rostrocaudal. Las raíces espinales sacras salen a través de sus respectivos agujeros vertebrales en la superficie media ventral del hueso sacro.

Los segmentos espinales obtenidos midieron en promedio (n=7): L₆=10.24±0.16mm, L₇=9.66±0.29mm, S₁=6.57±0.30mm y S₂= 5.86±0.22mm (Tabla 9).

Tabla 9. Longitud de los segmentos espinales L₆, L₇, S₁ y S₂.

Segmento	♂128	♂s/n	♂1117	♂111	♂127	♂126	♂125	Media±e.e. (mm)
L ₆	10.2	10.0	10	10.1	9.9	10.4	11.1	10.24±0.16
L ₇	9.5	9.4	11	10.0	8.8	8.9	10.0	9.66±0.29
S ₁	7.1	6.6	7.0	7.8	5.9	5.6	6.0	6.57±0.30
S ₂	6.2	6.0	6.8	6.1	5.2	5.4	5.3	5.86±0.22

El segmento espinal L₆ se encontró cubierto por la parte caudal de la vértebra L₅, el segmento espinal L₇ se halló cubierto por la vértebra L₆ mientras los segmentos espinales S₁ y S₂, se hallaron cubiertos por la vértebra L₇ (Figura 14).

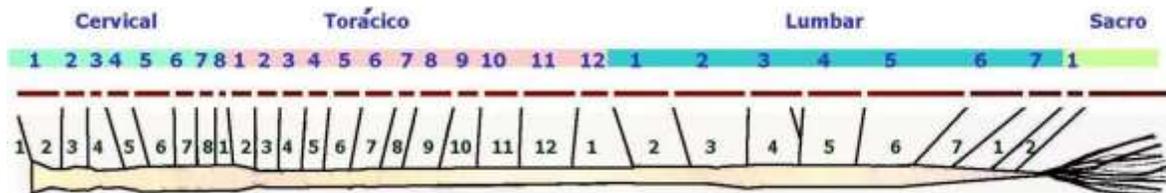


Figura 14. Correspondencia de las raíces espinales y su respectivo foramen intervertebral

3. Marcaje de motoneuronas que inervan al músculo bulboesponjoso e isquiocavernoso

A) Motoneuronas que inervan al músculo bulboesponjoso

Localización longitudinal

En cortes longitudinales de médula espinal, se encontraron motoneuronas marcadas en la región caudal del segmento espinal L₇ y la región rostral del segmento S₁, ipsilaterales al sitio de inyección. Las motoneuronas se encontraron distribuidas formando una columna en una extensión de aproximadamente 8.0 mm, con mayor porcentaje de somas en el segmento L₇.

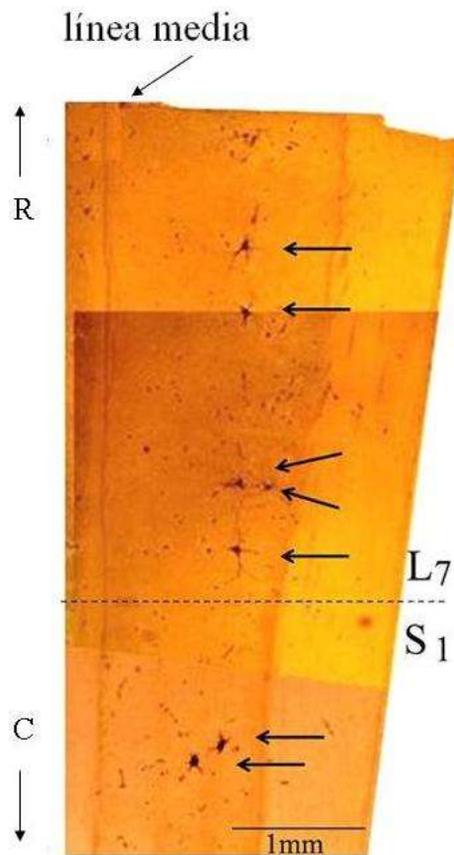


Figura 15. Corte longitudinal de los segmentos espinales L₇ y S₁. Cada flecha indica la ubicación espacial de las motoneuronas marcadas con HRP-WGA que inervan al músculo bulboesponjoso. R indica dirección rostral, C indica dirección caudal.

Tabla 10. Número y porcentaje de motoneuronas marcadas con HRP-WGA que inervan al músculo mBE en animales intactos y castrados (cortes longitudinales).

Conejo intacto		♂3	♂4	♂102	♂125	♂126	♂127	Total
L ₇	#	51	33	30	33	40	30	217
	Media±e.e							36.17±3.32
	%	(96.23%)	(91.66%)	(85.71%)	(94.28%)	(97.56%)	(96.77%)	(93.71%)
S ₁	#	2	3	5	2	1	1	14
	Media±e.e							2.33±0.61
	%	(3.77%)	(8.34%)	(14.29%)	(5.72%)	(2.44%)	(3.23%)	(6.30%)
Total/sujeto		53	36	35	35	41	31	231
Media±e.e								38.5±3.18
Conejo castrado		♂12	♂16	♂127	♂149	♂153	♂178	Total
L ₇	#	54	52	17	24	59	45	251
	Media±e.e							41.83±7.04
	%	(100%)	(92.85%)	(100%)	(75%)	(96.72%)	(83.33%)	(91.32%)
S ₁	#	0	4	0	8	2	9	23
	Media±e.e							3.83±1.60
	%	(0%)	(7.15%)	(0%)	(25%)	(3.28%)	(16.67%)	(8.68%)
Total/sujeto		54	56	17	32	61	54	274
Media±e.e								45.67±7.04

Algunos cortes con motoneuronas marcadas fueron fotografiados, las imágenes así obtenidas fueron digitalizadas y retocadas con el programa Corel Photo-Paint ver. 11.633 para Windows (Figura 16).

núcleos intermediomedial (IMM) y dorsolateral (DL) del segmento espinal L7, pasando gradualmente al núcleo ventral (V) en la región rostral del segmento S1 (Figura 17). Estas observaciones fueron confirmadas con cortes transversales teñidos mediante la técnica de Nissl.

Figura 17. Cortes transversales de los segmentos espinales lumbar 7 (L₇) y sacro 1 (S₁). Se muestra la ubicación de las motoneuronas marcadas con HRP-WGA que inervan al mBE así como el contorno de la sustancia gris y sustancia blanca y el conducto del epéndimo. La flecha indica una neurona marcada.



Características morfométricas

Las motoneuronas que inervan al mBE tienen soma de forma estrellada, con dendritas numerosas, largas, ramificadas y orientadas dorsomedialmente en la materia gris, con árboles dendríticos extensos. Para la medición de sus características morfométricas se seleccionaron algunos cortes con motoneuronas marcadas, como se muestra en la tabla

Tabla 11. Número de motoneuronas medidas por animal mBE

	♂3	♂4	♂102	♂125	♂126	♂127	Total
Conejo intacto							
Neuronas medidas	26	11	34	5	23	19	118
Conejo castrado	♂12	♂16	♂127	♂149	♂153	♂178	Total
Neuronas medidas	28	15	13	7	22	36	121

Los resultados de las variables medidas se muestran en la tabla.

Tabla 12. Características morfométricas de las motoneuronas que inervan al mBE.

Medidas	Conejo intacto	Conejo castrado
% Motoneuronas en L7	93.71	91.32
% Motoneuronas en S1	6.29	8.68
Motoneuronas marcadas	231	274
Motoneuronas marcadas/animal	38.5±3.18	45.67±7.04
Corrección de Abercrombie	29.65±2.45	35.44±5.46
Motoneuronas medidas	118	121
Área del soma (μ^2)	1487.62±46.81	864.26±25.75
Área del árbol dendrítico (μ^2)	9790.35±591.75	6034.87±355.59
Longitud de dendritas primarias (μ)	55.99±1.80	51.58± 1.64
Dendritas marcadas/neurona	4.09±0.11	3.74±0.10

En los animales castrados, se observa una disminución importante en las variables medidas.

a)	b)
----	----



Microfotografías de motoneuronas espinales marcadas con HRP-WGA que inervan al mBE.
a) Macho intacto. b) Macho castrado

B) Motoneuronas que inervan al músculo isquiocavernoso

Localización longitudinal

En cortes longitudinales de médula espinal, se encontraron motoneuronas marcadas en la región caudal del segmento espinal L₇ y en la región rostral del segmento S₁, ipsilaterales al sitio de inyección. Las motoneuronas se encontraron distribuidas formando una columna de aproximadamente 6.5 mm de longitud, con mayor porcentaje de somas en el segmento S1.

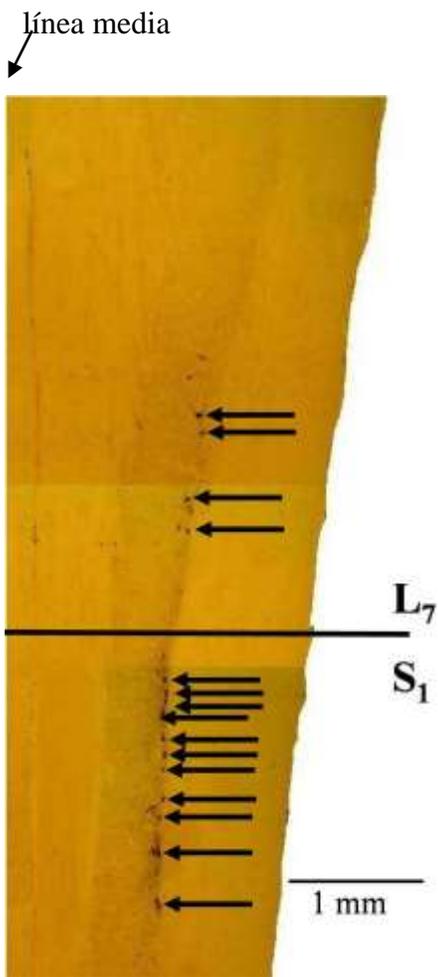


Figura 18. Corte longitudinal de los segmentos espinales L₇ y S₁. Cada flecha indica la ubicación espacial de las motoneuronas marcadas con HRP-WGA que inervan al músculo isquiocavernoso. R indica dirección rostral, C indica dirección caudal.

Tabla . Número y porcentaje de motoneuronas marcadas con HRP-WGA que inervan al mIC en animales intactos y castrados (cortes longitudinales).

Conejo intacto		♂2	♂6	♂112	♂116	♂119	♂120	Total
L ₇	#	15	17	13	16	30	32	123
	Media±e.e							20.50±3.37
	%	(20.55%)	(39.53%)	(24.07%)	(26.23%)	(29.13%)	(35.16%)	(29.11%)
S ₁	#	58	26	41	45	73	59	302
	Media±e.e							50.33±6.72
	%	(79.45%)	(60.47%)	(75.93%)	(73.77%)	(70.87%)	(64.84%)	(70.89%)
Total/sujeto		73	43	54	61	103	91	425
Media±e.e								70.83±9.31
Conejo castrado		♂11	♂108	♂109	♂128	♂130	♂156	Total
L ₇	#	31	19	2	29	22	28	131
	Media±e.e							21.83±4.37
	%	(33.33%)	(33.92%)	(27.91%)	(32.22%)	(30.98%)	(32.94%)	(31.89%)
S ₁	#	64	37	31	61	49	57	299
	Media±e.e							49.83±5.47
	%	(66.67%)	(66.07%)	(72.09%)	(67.78%)	(69.01%)	(67.05%)	(68.11%)
Total/sujeto		95	56	33	90	71	85	430
Media±e.e								71.66±9.66

Algunos cortes con motoneuronas marcadas fueron fotografiados, las imágenes así obtenidas fueron digitalizadas y retocadas con el programa Corel Photo-Paint ver. 11.633 para Windows (Figura 19).

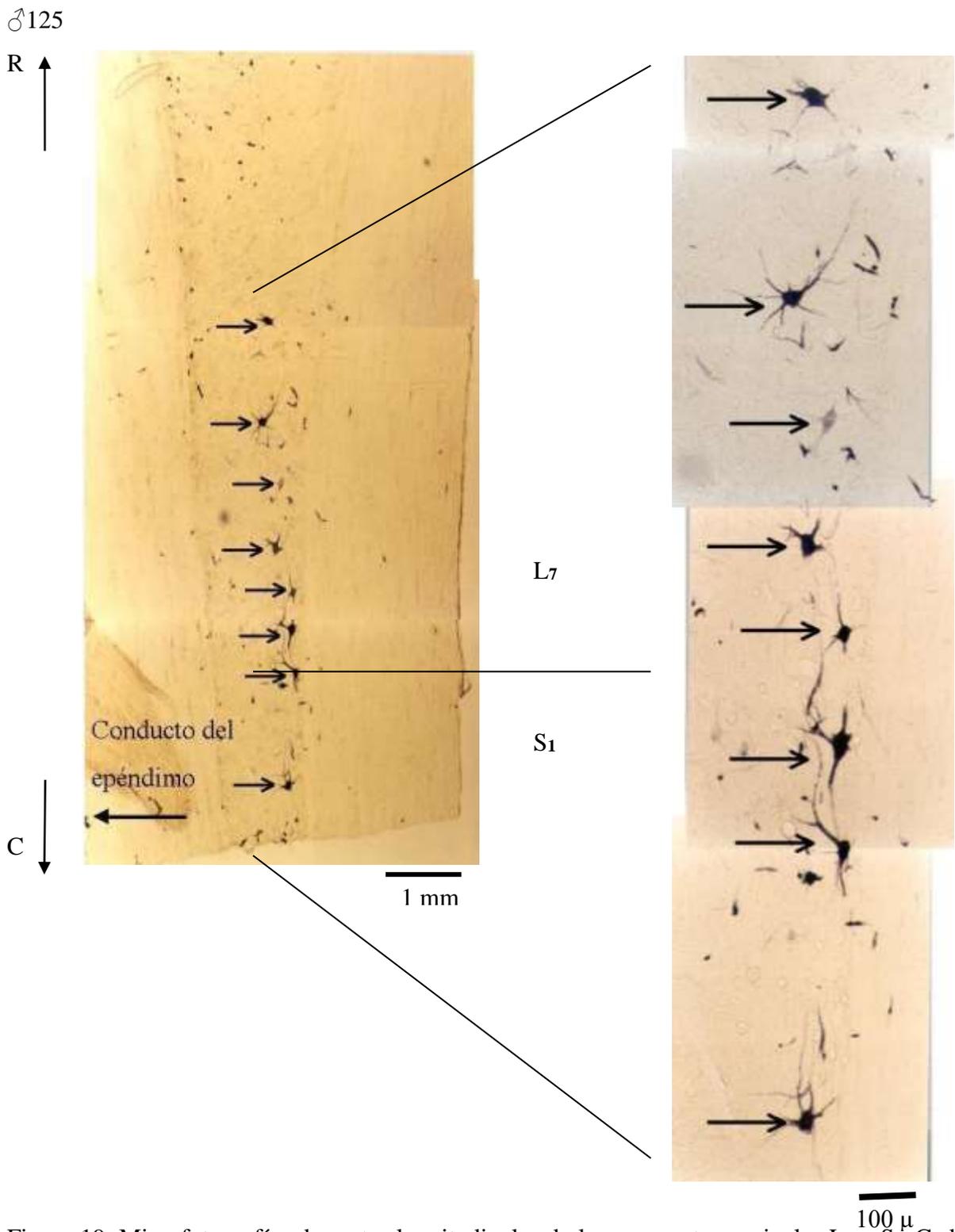
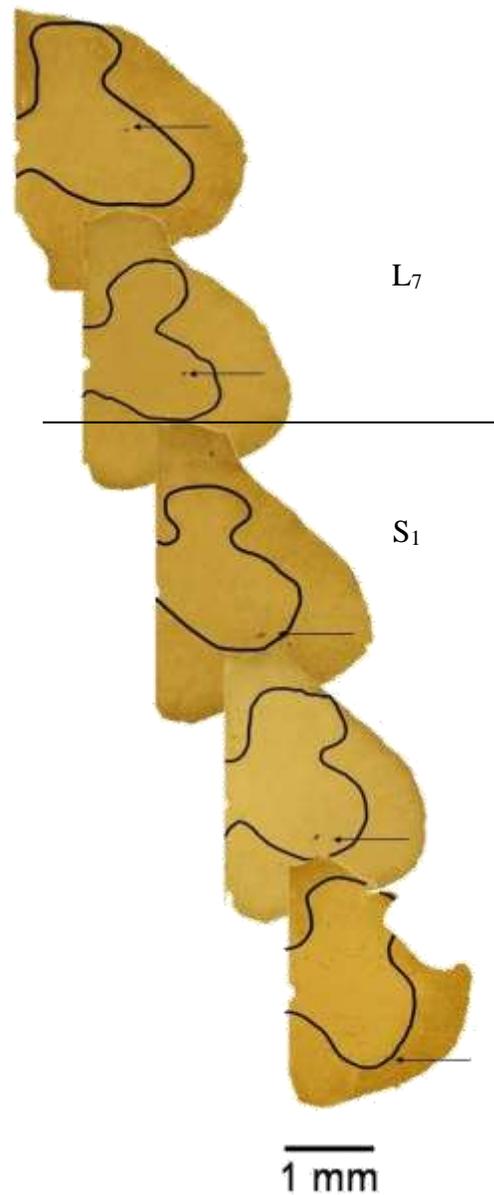


Figura 19. Microfotografías de cortes longitudinales de los segmentos espinales L₇ y S₁. Cada flecha indica una motoneurona marcada con HRP-WGA que inervan al músculo isquiocavernoso. R indica dirección rostral, C indica dirección caudal.

Localización transversal

En los cortes transversales, las motoneuronas que inervan al mIC fueron encontradas en las láminas VII y IX en el segmento L7 y en la lámina IX en el S1, agrupadas en los núcleos intermediomedial (IMM) y dorsolateral (DL) del segmento espinal L7, pasando gradualmente al núcleo ventral (V) en la región rostral del segmento S₁ (Figura 20). Estas observaciones fueron confirmadas con cortes transversales teñidos mediante la técnica de Nissl.

Figura 20. Cortes transversales de los segmentos espinales lumbar 7 (L₇) y sacro 1 (S₁). Se muestra la ubicación de las motoneuronas marcadas con HRP-WGA que inervan al músculo isquiocavernoso (mIC) así como el contorno de la sustancia gris y sustancia blanca y el conducto del epéndimo. La flecha indica una neurona marcada.



Características morfométricas

Las motoneuronas que inervan al mBE tienen soma de forma triangular y en algunos casos, estrellada, con dendritas numerosas, cortas, ramificadas y orientadas dorsomedialmente en la materia gris. Para la medición de sus características morfométricas se seleccionaron algunos cortes con motoneuronas marcadas, como se muestra en la tabla

	mIC						
Conejo intacto	♂2	♂6	♂112	♂116	♂119	♂120	Total
Neuronas medidas	26	15	21	15	25	26	128
Conejo castrado	♂11	♂108	♂109	♂128	♂130	♂156	Total
Neuronas medidas	37	26	15	44	67	19	208

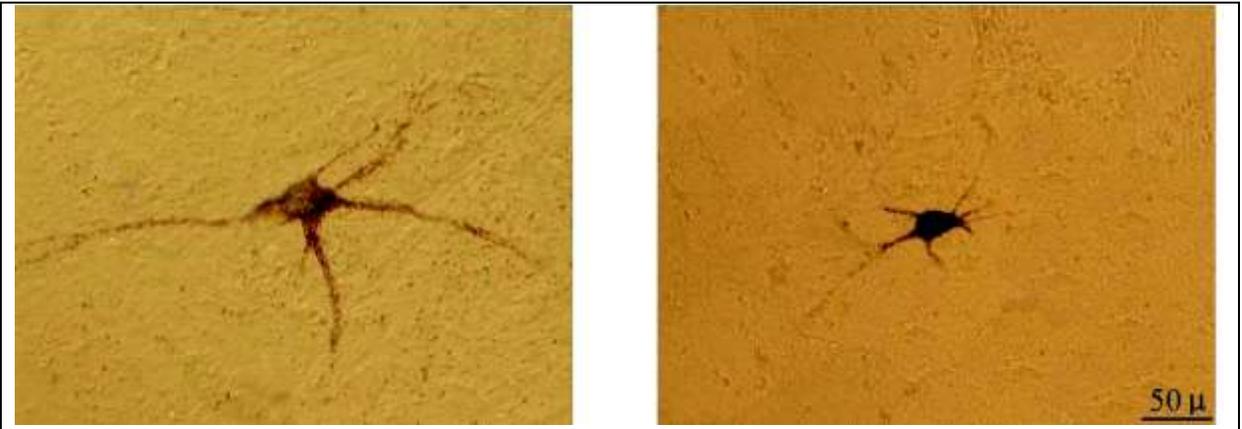
Los resultados de las variables medidas se muestran en la tabla

Tabla 16. Características morfométricas de las motoneuronas que inervan al mIC.

Medidas	Conejo intacto	Conejo castrado
% Motoneuronas en L7	29.11	31.89
% Motoneuronas en S1	70.89	68.11
Motoneuronas marcadas	425	359
Motoneuronas marcadas/animal	70.83±9.31	71.66±9.66
Corrección de Abercrombie	54.82±7.21	55.82±7.53
Motoneuronas medidas	128	208
Área del soma (μ^2)	948.21±32.86	674.08±27.07
Área del árbol dendrítico (μ^2)	5406.53±430.70	2899.34±292.12
Longitud de dendritas primarias (μ)	53.89±2.05	42.37±1.73
Dendritas marcadas/neurona	3.30±0.10	2.99±0.11

En los animales castrados, se observa una disminución importante en las variables medidas.

a)	b)
----	----



Microfotografías de motoneuronas espinales marcadas con HRP-WGA que inervan al músculo isquiocavernoso. a) Macho intacto. b) Macho castrado

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las comparaciones entre animales intactos y castrados fueron analizados estadísticamente utilizando el programa GraphPad InStat, ver. 3.05 (GraphPad Software Inc). Para las graficas correspondientes se utilizó el programa Sigma Plot, ver 7.0 (SPSS Inc.).

Análisis de los valores morfométricos de las neuronas que inervan al mBE

La prueba de U Mann-Whitney mostró diferencias en algunas comparaciones de las variables morfológicas medidas en las motoneuronas que inervan al mBC de animales intactos contra animales castrados. Estas variables son: Área de soma (1487.62 ± 46.81 vs 864.26 ± 25.75 , $U=2000$; $P<0.0001$), área del árbol dendrítico (9790.35 ± 591.75 vs 6034.87 ± 355.59 , $U=4464$; $P<0.0001$) y longitud de las dendritas primarias (55.99 ± 1.80 vs 51.58 ± 1.64 , $U=6215$; $P=0.0420$).

Otras variables medidas fueron comparadas con la prueba X^2 , donde no se encontraron diferencias significativas entre animales intactos y castrados. Estas son: número de neuronas por individuo (38.5 ± 3.18 vs 45.67 ± 7.04 , $X_{c 1, 0.05}=3.49$, $P>0.05$) y número de dendritas primarias por neurona (4.09 ± 0.11 vs 3.74 ± 0.10 ; $P>0.05$, no significativa).

Tabla... Consideraciones para las pruebas estadísticas aplicadas a las variables medidas en las motoneuronas que inervan al mBE.

Variable	Característica	Prueba
Número de neuronas	2 grupos independientes Variables discretas	X^2
Área de soma	2 grupos independientes Datos no paramétricos Variables continuas Prueba de normalidad ($P=0.120$) Prueba igualdad de varianza ($P<0.001$)	U- Mann whitney
Área del árbol dendrítico	2 grupos independientes	U- Mann whitney

	Datos no paramétricos Variables continuas Prueba de normalidad (P=0.120)	
Longitud de dendritas	2 grupos independientes Datos no paramétricos Variables continuas Prueba de normalidad; (P<0.001)	U- Mann whitney
Número de dendritas/neurona	2 grupos independientes Datos empataados Variable discreta	X ²

Características morfométricas de las motoneuronas que inervan al mBE en machos intactos y castrados

Variable	♂ intacto	♂ castrado	Estadística
# de motoneuronas marcadas/animal (n=6) Media±e.e. (min-max)	38.5±3.18	45.67±7.04	X _c 1,0.05=3.49 P>0.05
# de motoneuronas medidas	118	121	
Área de soma (μ ²) Media±e.e (min-max) Mediana Qi-Qs	1487.62±46.81 481.40-2816.10 1142.19 1127.21-1806.24	864.26±25.75 322.42-1714.10 863.28 614.32-1054.18	U= 2000; P<0.0001
Área de árbol dendrítico (μ ²) Media±e.e Mediana (min-max) Qi-Qs	9790.35±591.75 8126.00 69.53-33635 5160.23-13396.25	6034.87±355.59 5159.50 379.40-21566 3162.45-8480.00	(U=4464; P<0.0001).
Longitud de dendritas primarias (μ) Media±e.e Mediana (min-max) Qi-Qs	55.99±1.80 51.58 22.00-126.33 42.94-66.59	51.58±1.64 48.50 18.62-111.32 39.83-62.13	(U=6215; P=0.0420).
# de dendritas primarias marcadas/motoneuronas Media	4.09±0.11	3.74±0.10	0.10>P>0.05

Análisis de los valores morfométricos de las neuronas que inervan al mIC

La prueba de U Mann-Whitney mostró diferencias en algunas comparaciones de las variables morfológicas medidas en las motoneuronas que inervan al mIC de animales intactos contra animales castrados. Estas variables son: área de soma ($958,28 \pm 29.67$ vs 559.49 ± 559.49 , $U=4161$; $p < 0.0001$), área del árbol dendrítico ($5615,43 \pm 363.83$ vs 2790.14 ± 162.77 , $U=$; $P < 0.0001$ y longitud de las dendritas primarias (54.20 ± 1.95 vs $35.96 \pm 1,29$, $U=6268$, $P < 0.0001$).

Otras variables medidas fueron comparadas con la prueba X^2 , sin presentar diferencias significativas entre animales intactos y castrados. Estas son: número de neuronas por individuo (70.83 ± 9.31 vs 71.66 ± 9.66 ; $p > 0.05$) y número de dendritas primarias (3.30 ± 0.10 vs 2.99 ± 0.11 ; $P > 0.05$).

Consideraciones para las pruebas estadísticas aplicadas a las variables medidas en las motoneuronas que inervan al mIC.

Variable	Característica	Prueba
# de neuronas	2 grupos independientes Variables discretas	X^2
Área de soma	2 grupos independientes Datos no paramétricos Variables continuas Prueba de normalidad ($P < 0.001$)	U- Mann whitney
Área del árbol dendrítico	2 grupos independientes Datos no paramétricos Variables continuas Prueba de normalidad ($P < 0.001$)	U- Mann whitney
Longitud de dendritas	2 grupos independientes Datos no paramétricos Variables continuas Prueba de normalidad ($P < 0.001$)	U- Mann whitney
Número de dendritas/neurona	2 grupos independientes Datos empatados	X^2

	Variable discreta	
--	-------------------	--

Características morfométricas de las motoneuronas que inervan al mIC en machos intactos y castrados

Variable	♂ intacto	♂ castrado	Estadística
# de motoneuronas marcadas/animal (n=6) Media±e.e. (min-max)	70.83±9.31	71.66±9.66	X_c 1,0.05 =3.49 P>0.05
# de motoneuronas medidas	128	208	
Área de soma (μ^2) Media±e.e Mediana (min-max) Qi-Qs	958,28±29.67 910.22 369.43-2027.9 703.04-1172.50	559.49±559.49 515.79 124.33-1642.00 381.02-695.86	U= 4161; p<0.0001
Área de árbol dendrítico (μ^2) Media±e.e Mediana (min-max) Qi-Qs	5615,43±363.83 4699.50 276.50-21949.00 2519.13-7328.28	2790.14±162.77 2117.29 236.82-16999.00 1253.10-3553.63	U=6782; p<0.0001
Longitud de dendritas primarias (μ) Media±e.e Mediana (min-max) Qi-Qs	54.20±1.95 49.60 16.97-121.75 38.30-68.27	35.96±1,29 32.92 12.91-113.38 26.00-42.46	U=6268, P=0.0001
# de dendritas primarias marcadas /motoneuronas Media±e.e	 3,30±0,10	 2,99±0,11	X^2 P>0.05

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue describir las características morfométricas de los mBE y mIC, así como a las motoneuronas espinales que los inervan en el conejo doméstico macho adulto intacto y castrado. Estos músculos y motoneuronas han sido ampliamente estudiados en machos de especies como la rata (Dail y Sach 1991, Holmes y cols.1991, Breedlove y Arnold 1980), el gerbil (Ulibarri y cols. 1995) y el ratón (Wagner y Clemens, 1989), no así en el conejo, del cual, pese a ser uno de los animales de laboratorio de mayor uso en investigación, el conocimiento al respecto es escaso. Existen trabajos previos en la coneja doméstica de la raza Chinchilla, donde se ha determinado la anatomía (Martínez-Gómez y cols. 1997) y fisiología del mBE y el mIC, así como la localización espinal de las motoneuronas espinales que los inervan (Cruz y cols. 2002). Actualmente se estudia su participación en los procesos de micción y parto (Corona y cols. 2005). En el macho, existen descripciones anatómicas ambiguas de estos músculos (Barone y cols. 1973) y en particular en el conejo de la raza Nueva Zelanda (Nanasaki y Sakuma 2000). Las motoneuronas espinales del mBE y del mIC han sido estudiadas en el conejo de la raza nueva Zelanda, sin embargo, los resultados reportados son escasos y confusos. La técnica de marcaje con HRP-WGA, es un método ampliamente usado en neuroanatomía para determinar vías y conexiones neurales.

Descripción anatómica de los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso.

Tamaño de los músculos en animales intactos

Tamaño de los músculos en animales castrados

Estos músculos como otros de la región perineal que han sido estudiados en otras especies, son sensibles a la disminución de andrógenos producto de la castración. El mBE presentó una reducción en las variables medidas de acuerdo a la siguiente tabla:

Variable medida	% de Reducción (Aproximado)
Ancho proximal	20%
Ancho medial	46%
Ancho distal	9%
Longitud del músculo	25%
Longitud del tendón	9%
Grosor	53%

El mIC presentó una reducción en las variables medidas de acuerdo a la siguiente tabla:

Variable medida	% de Reducción (Aproximado)
Longitud lado de origen	27%
Longitud lado opuesto	26%
Longitud lado adyacente	20%
Grosor en el origen	30%

En el conejo se encontró una disminución en el peso del mIC dos semanas después de la castración. Inyecciones diarias de testosterona (dosis 5 ó 10 mg/día en 50mg/ml de solución en aceite por vía subcutánea) durante dos semanas, produjeron que el peso del mIC fuera similar al peso del mIC los controles. (Nanasaki y Sakuma, 2000).

Marcaje de motoneuronas que inervan al músculo bulboesponjoso e isquiocavernoso

- Localización longitudinal

Nuestros resultados de marcaje retrogrado con HRP-WGA en cortes longitudinales de médula espinal indican que las motoneuronas que inervan a los músculos perineales mBE en el conejo doméstico de la raza Chinchilla se encuentran localizadas de manera ipsilateral al músculo inyectado distribuidas uniformemente formando una columna en la región lumbosacra de la médula espinal. El porcentaje de motoneuronas fue mayor en el segmento espinal L₇ (93.71%) y en menor porcentaje (6.3%) en la región rostral del segmento espinal S₁ en conejos intactos. Las motoneuronas que inervan al mIC fueron encontradas en la región caudal del segmento espinal L₇ (29.11%) y en mayor porcentaje (70.89%) a lo largo del segmento espinal S₁, también de forma ipsilateral al músculo inyectado, formando una columna de menor longitud que la observada para el mBE.

En el conejo doméstico de la raza Nueva Zelanda se ha descrito que las motoneuronas que inervan a estos músculos se distribuyen en los segmentos espinales L₆, L₇ y S₁ de manera bilateral para el músculo mBE e ipsilateral para el mIC (Nanasaki y Sakuma 2000). No es posible hacer una comparación con los datos del presente estudio, debido a los errores metodológicos y resultados confusos que se observan en el trabajo anterior, entre ellos que no se presentan fotografías de las motoneuronas marcadas, sólo esquemas en cámara lúcida de cortes longitudinales y transversales del marcaje de las neuronas del mIC y ninguno del mBE. Los esquemas generan confusión, al no indicar claramente los segmentos, la escala usada y no

indican cuales son los somas de las neuronas. Sin embargo, algunas diferencias podrían ser atribuibles a variación por la raza de los animales utilizados en ambos trabajos.

Tal como en el conejo macho, en la coneja de la raza Chinchilla (que ha sido motivo de estudio en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta) las motoneuronas que inervan al mBE y al mIC se ubican en el segmento espinal L7 y en el segmento espinal S1, así mismo, hay coincidencia en la longitud de las columnas de motoneuronas y su localización en los segmentos lumbosacros de la médula espinal (Rodríguez, 2000, Tablas).

Tabla . Comparación de los resultados obtenidos de motoneuronas marcadas con HRP que inervan al músculo mBE (B) Indica número corregido utilizando corrección de Abercrombie.

Estudio	Animales	Número de motoneuronas marcadas			
		L6	L7	S1	Total
Actual*	6 ♂'s	---	(A) 36.17±3.32	(A) 2.33±0.61	(A) 38.5±3.18
			(B) 27.85±2.56	(B) 1.79±0.47	(B) 29.65±2.45
Actual **	6 ♂'s	---	(A) 41.83±7.04	(A) 3.83±1.6	(A) 45.67±7.04
			(B) 32.46±5.46	(B) 2.97±1.24	(B) 35.44±5.46
Nanasaki y Sakuma, 2000	3 ♂'s	Presentes	Presentes	Presentes	---
Rodríguez, 2000	7 ♀'s	---	(A) 46.8±2.4	18.8±0.5	---
			(B) 30.93±1.6	12.42±0.3	---

*Machos adultos intactos

*Machos adultos castrados

Tabla 8. Comparación de los resultados obtenidos de motoneuronas marcadas con HRP que inervan al músculo isquicavernoso. (A) Indica conteo crudo, (B) Indica número corregido utilizando corrección de Abercrombie.

Estudio	Animales	Número de motoneuronas marcadas			
		L6	L7	S1	Total
Actual	6 ♂'s	---	(A) 20.50±3.37	(A) 50.33±6.72	(A) 70.83±9.31

			(B) 15.87±2.61	(B) 38.96±5.20	(B) 54.82±7.21
Actual	6 ♂'s	---	(A) 21.83±4.37 (B) 17.01±3.40	(A) 49.83±5.47 (B) 38.82±4.26	(A) 71.66±9.66 (B) 55.82±7.53
Nanasaki Sakuma, 2000	y 3 ♂'s	presentes	Presentes	Presentes	
Rodríguez, 2000	7 ♀'s		(A) 15.2±1.0 (B) 10.82±0.7	60.6±1.5 43.14±1.1	

Al comparar los resultados obtenidos en otras especies, se observa que aunque todos los mamíferos macho tienen mBE y mIC, las motoneuronas que inervan a estos músculos tienen diferente localización en la región lumbosacra de la médula espinal. Por ejemplo, en la rata macho las motoneuronas del mBE se encuentran en los segmentos espinales L₅ y L₆ (Breedlove y Arnold 1980), en el gerbil macho en L₄, L₅, S₁ y S₂ (Ulibarri y cols 1995), en el conejo las motoneuronas del mBE y del mIC se encuentran en los segmentos L₆ y S₁ (Freeman y Breedlove 1995), mientras que en los no roedores se encuentran en el llamado núcleo de Onuf, por ejemplo, en el hombre, donde se extiende de la parte caudal del segmento espinal S₁ a la parte rostral del segmento S₃ (Onufrowicz 1900). De esta manera, la hipótesis formulada al inicio de este trabajo es aceptada. Es decir, las motoneuronas espinales que inervan a los mBE y mIC se encuentran localizadas en los segmentos espinales L₇ y S₁, en hembras y machos de conejo de raza Chinchilla.

Diferencias SNB-nDL

La morfología adulta de las motoneuronas del SNB y del nDL es distintiva y se desarrolla a través de diferentes patrones. La longitud de las dendritas en el nDL se incrementa monotónicamente, mientras que las dendritas en el SNB crecen y luego se retraen durante su desarrollo (Goldstein et al. 1990). Este crecimiento bimodal ha sido sugerido como un reflejo de la diferenciación de las subpoblaciones α y γ de motoneuronas (Goldstein y Sengelaub 1993). En ambos núcleos el desarrollo de las dendritas y del soma depende de la presencia de hormonas gonadales. En ambos núcleos, el crecimiento es severamente atenuado como

consecuencia de la castración, pero es mantenido en animales castrados y tratados con testosterona. Por lo tanto, en el nDL y el SNB, es probable que hormonas esteroides interactúen con otros factores en el establecimiento de la morfología dendrítica adulta. Entre estos factores se puede incluir las limitaciones mecánicas impuestas por la forma de la médula espinal, origen y distribución de aferentes y las interacciones dentro-dendríticas (Goldstein et al. 1990, Goldstein y Sengelaub 1993).

-transversal

La distribución de los somas de las motoneuronas que inervan a los músculos mBE y mIC en la sustancia gris de la médula espinal, fue determinada con los cortes transversales, observándose que las motoneuronas se hallan distribuidas formando agregados de células (núcleos) bien definidos en el asta ventral de la sustancia gris de los segmentos espinales descritos. Para el caso del mBE, las motoneuronas se agrupan en el núcleo dorsomedial del segmento espinal L7 y en el núcleo ventrolateral del segmento S1, mientras que para el mIC. Se encuentran en los núcleos _____y _____. Este resultado contrasta con las motoneuronas dispersas en tres segmentos espinales (L6, L7 y S1) y sin formar grupos definidos para el conejo de la raza Nueva Zelanda. En ambas razas, las motoneuronas marcadas se localizaron en la región dorsal del asta ventral, en cortes rostrales de los segmentos lumbares, pasando gradualmente a la región ventral, a medida que los cortes son más caudales. En la hembra, las motoneuronas del mBE y mIC también se hallan formando núcleos definidos en las mismas posiciones que en el macho.

La situación del núcleo de motoneuronas que inerva al mBE y al mIC en el conejo es diferente a lo encontrado en otros mamíferos. En la rata macho, el Núcleo del Bulboesponjoso (NBS) se encuentra en porción dorsomedial (núcleo dorsomedial, según Schroder, 1980) del asta ventral e inerva tres músculos: mBE, levator ani y esfínter anal externo (Breedlove 1980, Schroder, 1980, McKenna y Nadelhaft 1986), mientras que el núcleo dorsolateral (nDL) inerva al mIC y al esfínter uretral externo. En el cuyo las motoneuronas que inervan al mBE se encuentran principalmente en posición medial y dorsomedial (a nivel rostral) y algunas otras en posición similar a lo observado en el núcleo del SNB de la rata (Freeman y Breedlove 1995), mientras que las motoneuronas que inervan al mIC se encontraron formando núcleos en la columna

lateral. En el humano, el perro, la hiena y el mono, las motoneuronas se encuentran en el Núcleo de Onuf, situado en posición ventral o ventrolateral. En el cuyo, las motoneuronas que inervan al se encuentran en similar ubicación. En el gerbil, el SNB, se halla situado en el área X (Ulibarri y cols. 1995), en el ratón (Hybrid B6D2F1) las motoneuronas del mBE se encuentran en el núcleo dorsomedial (DM), núcleo ventral (V) y en la región media del hasta ventral (MVH), para el mIC las motoneuronas marcadas se encontraron en el núcleo dorsolateral (DL), así como en V, DM y MVH (Wagner y Clemens, 1989). En el conejo, las motoneuronas de los esfínteres uretral y anal externo forman un núcleo separado en los segmentos S2 y S3, que se considera homólogo al núcleo de Onuf de otras especies (Nagashima y cols. 1979, citado en Nanasaki y Sakuma, 2000).

- Como en otros mamíferos se encontraron núcleos de motoneuronas en el asta ventral de la sustancia gris de la médula espinal. En el segmento espinal L7 las motoneuronas se agrupan en el núcleo dorsomedial y en el segmento S1 se agrupan en el núcleo ventrolateral.

- Como en otros mamíferos se encontraron núcleos de motoneuronas en el asta ventral de la sustancia gris de la médula espinal. En el segmento espinal L7 las motoneuronas se agrupan en el núcleo _____ y en el segmento S1 se agrupan en el núcleo _____.

Características morfométricas de las neuronas que inervan al mBE y al mIC

Las motoneuronas que inervan al mBE son de mayor tamaño, forman columnas más largas, presentan mayor número de dendritas y área de árbol dendrítico, que las correspondientes al mIC. Esto sugiere que las motoneuronas que inervan al mBE requieren de un mayor número de conexiones y por lo tanto mayor estímulo para activarse que las motoneuronas correspondientes al mIC, que forman columnas de menor longitud, con somas más pequeños y árboles dendríticos menos extensos.

- En la rata macho, la morfología de las neuronas que inervan al mIC es diferente a las que inervan al mBE:

En motoneuronas de SNB, el árbol dendrítico es grande, proyectándose ventrolateralmente al margen de la sustancia gris, dorsalmente pasando el canal central, dentro de la comisura de la

materia gris y a través de la línea media (Schroder 1980). Las dendritas de motoneuronas situadas en el SNB (ubicado medialmente) son radiales y traslapadas, mientras las que inervan al nDL (situado lateralmente) son bilaterales (Goldstein y Sengelaub, 1993). Las dendritas se proyectan lateralmente y ventromedialmente a lo largo del borde de la materia gris (Schroder 1980).

El núcleo espinal del mBE, situado en los segmentos espinales L₅ y L₆ de la rata macho, está constituido por motoneuronas grandes, multipolares, que inervan al mBE y al *levator ani*. Se describe que este núcleo espinal y estos músculos, son vestigiales o están ausentes en la rata hembra (Breedlove y Arnold, 1980)

-

Intactos

-

-

Castrados

La disminución en las variables de los mBE y mIC y las motoneuronas que los inervan es causada por la supresión de andrógenos producto de la castración.

En la rata, el periodo sensible para la regulación androgénica del número de células es similar para el SNB Y nDL, sin embargo, el periodo sensitivo para la regulación androgénica del tamaño celular comienza más tarde para el nDL (Hodges y cols. 1992). Se ha encontrado en el conejo, al igual que la rata o el ratón, que los mBE y mIC, que intervienen en funciones sexuales, disminuyen su masa como producto de la castración, mientras que el músculo gastrocnemio, (que no participa en estas funciones) no es afectado (Nanasaki y Sakuma 2000).

- La localización y número de las motoneuronas del mBE y del mIC no presentó diferencias significativas entre machos intactos y castrados (93.71% vs 91.32% respectivamente en L₇ y - 6.30% vs 8.68% en S₁) sin embargo, como se ha visto en machos de otras especies (rata, cuyo, hiena.....) las motoneuronas que inervan el mBE y mIC son sensibles a la disminución de estrógenos circulantes, producto de la castración. En la rata adulta, tanto en los machos como en las hembras, el número de neuronas en el SNB no es alterado por la gonadectomía o el tratamiento con propionato de testosterona. Sin embargo, el tamaño de cada motoneurona en

el SNB se incrementa en presencia de andrógenos en ambos sexos (Breedlove y Arnold 1981). el número de Nuestros resultados indican que el músculo m_____ es más sensible que el m_____ a la disminución de andrógenos circulantes. En ambos casos, la mayor disminución se observó en -----, el _____ fue el parámetro afectada en segundo termino y finalmente el -----. El ----- no presentó diferencias significativas.

La localización de las motoneuronas de los animales castrados) no se vio afectada con respecto a los animales intactos..

El SNB de ratas macho adultas contiene de 3 a 4 veces mas motoneuronas que el de ratas hembras adultas (Sengelaub y Arnold, 1986). Cuando se inyecta testosterona tritiada, más del 95% de las motoneuronas del SNB acumularon significativamente el esteroide (Breedlove, 1986). El dimorfismo sexual del SNB depende de la acción de los andrógenos, que determinan el número de neuronas en el núcleo y el tamaño de los somas y árboles dendríticos. Las diferencias entre sexos se han estudiado mediante la comparación de cortes de los segmentos espinales L₅ y L₆ teñidos con tionina, obtenidos de hembras y machos. Los resultados de varios estudios indican claramente que es la testosterona y, no los estrógenos, la que mantiene la musculatura peneana. Se propone que el mayor grado de diferenciación muscular promueve la supervivencia de las motoneuronas de este núcleo espinal. En la rata macho recién nacida, las secreciones testiculares, específicamente de esteroides androgénicos, reducen la muerte de las motoneuronas del núcleo de mBE, mientras en la hembra las motoneuronas desaparecen (Forger et al, 1992a), sin embargo, una única inyección de andrógenos a la rata recién nacida, antes del séptimo día de vida (Breedlove, 1986) preservará permanentemente algunas motoneuronas del SNB y sus músculos (Breedlove, 1986; Rosenzweig y cols. 2001). Así mismo, los andrógenos pueden estar involucrados en la regulación prenatal de la migración de las motoneuronas del SNB desde la columna lateral de motoneuronas y la estabilización de las proyecciones periféricas. Ambos sexos tienen motoneuronas del SNB con sus axones en los músculos blanco durante el tiempo en que las diferencias sexuales en el número se desarrollan, sugiriendo que la interacción de motoneuronas del SNB con sus músculos blanco puede estar involucrada en la regulación dimorfica de la sobrevivencia celular. El dimorfismo sexual se estabiliza al décimo día después del nacimiento (Sengelaub y Arnold, 1986).

En otras especies, como perro, gato y primates se observa dimorfismo sexual en las motoneuronas que inervan algunos músculos perineales, en el llamado núcleo de Onuf's, donde los andrógenos tienen un papel crucial en el desarrollo de tal dimorfismo. La proliferación y diferenciación de motoneuronas en esta región son similares en hembras y machos, sin embargo, en ausencia de andrógenos, las motoneuronas desaparecen por apoptosis (muerte celular programada). Por el contrario, si hay andrógenos presentes, las motoneuronas sobreviven y el núcleo espinal contiene gran número de células, en concordancia con lo observado en modelos animales ampliamente estudiados (Catala, 1999, 2002; Forger y Breedlove 1986; Forger y cols. 1992b).

Se encontró una disminución en el área del soma y en la longitud de las dendritas primarias de las motoneuronas a las dos semanas postcastración, pero la administración diaria de testosterona durante un periodo de dos semanas, produjo que el tamaño de las motoneuronas y sus dendritas fuera similar al de los animales intactos sin embargo, el trabajo presenta imprecisiones en

1. El número de animales para las diferentes manipulaciones no es claro. Se menciona que tres animales fueron usados para identificar la musculatura perineal. Tres intactos y ocho castrados fueron usados para los estudios de marcaje, de ellos, 5 recibieron el tratamiento con propionato de testosterona y 3 no lo recibieron. Números-Letras
2. El período postcastración fue de dos semanas, seguido de la administración HRP.
3. Las mediciones de las motoneuronas que inervan al mIC de los animales castrados y de los animales castrados y tratados hormonalmente fueron comparados con las mediciones de los animales control. Según la descripción metodológica, los animales controles fueron los animales inyectados en el mBE, sin embargo, no se muestran los datos que obtuvieron para este músculo.
4. No se determinó el número de motoneuronas que inervan ni al mBE ni al mIC, ni se menciona la formación de agrupaciones de somas. Se determinó para ambos músculos que las motoneuronas están dispersas en el asta ventral de la sustancia gris de L7- S1.

5. No se muestran datos del efecto sobre el peso del mBE ni de las mediciones de sus motoneuronas (área de soma y longitud de las dendritas), pues se considera un músculo vestigial, con poca importancia en el proceso de erección del pene en el conejo.

6. No se presentan fotografías de las motoneuronas marcadas, solo esquemas en cámara lúcida de cortes longitudinales y transversales del marcaje de las neuronas del mIC. Los esquemas generan confusión, al no indicar claramente cuales son las somas de las neuronas.

No se menciona en cuantos animales, los segmentos espinales fueron cortados de manera longitudinal o transversal. En los esquemas, no se indica el segmento examinado.

¿Qué disminuye primero el músculo o la neurona?

-(todo es rata)

El bloqueo de factores neurotróficos endógenos previene el rescate androgénico de motoneuronas espinales en la rata. Aunque las motoneuronas del SNB y sus músculos blanco se desarrollan prenatalmente en ambos sexos, la sobrevivencia postnatal de éste sistema es dependiente de andrógenos. Como resultado, los músculos BC y LA y muchas motoneuronas del SNB normalmente degeneran en las hembras pero pueden ser preservados con inyecciones perinatales de testosterona (Breedlove 1986). Los andrógenos actúan directamente en los músculos BC/LA para prevenir su degeneración, permitiendo además, como consecuencia indirecta de la acción de los andrógenos en los músculos, la conservación de las neuronas del SNB (Fishman y cols. 1990). La pérdida de las motoneuronas en las hembras es provocada por la falta del estímulo dado por múltiples factores tróficos proveniente del músculo blanco degenerado, entre ellos el CNTF (ciliary neurotrophic factor) y algunos miembros de la familia de neurotrofinas, incluyendo el BDNF (brain-derived neurotrophic factor), la NT-3 (neurotrofina-3) y la NT-4/5 (neurotrofina 4/5) entre otros factores tróficos que no están totalmente caracterizados, producidos por los músculos perineales. De esta manera, la sobrevivencia de las motoneuronas del SNB requiere la activación simultánea de al menos dos clases de receptores, además de una cascada de señales traslapadas, sin embargo, las bases moleculares de las acciones de colaboración entre citoquinas neurales y neurotrofinas permanecen desconocidas (Xu y cols. 2001). Así mismo, en la rata recién nacida, se ha encontrado la presencia de factores de unión a andrógenos en el mBE y LA, pero no se halló

evidencia de acumulación de andrógenos en el SNB. Los músculos BE y LA pueden ser preservados, aun en ausencia de inervación del SNB, si existen andrógenos presentes (Fishman y Breedlove 1988, Fishman y cols. 1990). Estos hallazgos sugieren que son los músculos el blanco primario para la masculinización androgénica de músculos y sus motoneuronas (Fishman et al. 1990).

-

IX CONCLUSIONES

Las motoneuronas que inervan al mBE se localizan de manera ipsilateral al músculo inyectado, en los segmentos espinales L7 (región caudal) y S1 (región rostral) formando una columna. Como en otros mamíferos se encontraron núcleos de motoneuronas en el asta ventral de la sustancia gris de la médula espinal. En el segmento espinal L7 las motoneuronas se agrupan en el núcleo dorsomedial y en el segmento S1 se agrupan en el núcleo ventrolateral.

Las motoneuronas que inervan al músculo mIC se localizan de manera ipsilateral al músculo inyectado, en los segmentos espinales L7 (región caudal) y a lo largo del S1 formando una columna. Como en otros mamíferos se encontraron núcleos de motoneuronas en el asta ventral de la sustancia gris de la médula espinal. En el segmento espinal L7 las motoneuronas se agrupan en el núcleo _____y en el segmento S1 se agrupan en el núcleo _____.

Las motoneuronas que inervan al mBE se encontraron en mayor proporción en el segmento espinal L7, mientras que las motoneuronas que inervan al mIC se encontraron en mayor proporción en el segmento S1.

Estos músculos, como otros de la región perineal en otras especies y las motoneuronas que lo inervan, son sensibles a la disminución de andrógenos producto de la castración, siendo el _____, _____y _____las variables que presentan mayor diferencia, respecto a los valores de animales intactos.

Los andrógenos pueden tener efecto sobre las variables medidas de las motoneuronas que inervan al mBE y al mIC y sobre los músculos de forma directa o a través de interacciones con factores originados en el músculo blanco.

Los efectos directos e indirectos de los andrógenos en las motoneuronas tienen un papel muy importante en la regulación de la conducta copulatoria en el conejo

El mBE del conejo es alargado en forma de huso y no rodea al tejido eréctil del pene como se ha descrito en otras especies. El mIC tiene forma triangular y se encuentra adosado a ambos lados del tejido eréctil del pene.

PERSPECTIVAS

El arreglo anatómico del mBE y mIC y su dependencia de hormonas esteroides sugiere determinar su participación en la actividad copulatoria y en el proceso de micción. Se observa una relación directa entre mBE y motoneuronas por efecto de la castración.

Para conocer la participación de ambos músculos durante la actividad copulatoria y en el proceso de micción es necesaria la realización de más estudios (electrofisiológicos, de lesión, etc), que permitan identificar la secuencia de eventos y la participación de los músculos mBE y mIC en los procesos mencionados.

X. REFERENCIAS

Agmo A. 1976. Sexual behaviour following castration in experienced and inexperienced male rabbits. *Z Tierpsychol* 40: 390-395.

Anderson G y Navarro SP. 1988. The response of autonomic receptors to castration and testosterone in the urinary bladder of the rabbit. *J Urol* 140: 885-889.

Balice-Gordon RJ, Breedlove SM, Berstein S y Kichtman JW. 1990. Neuromuscular junctions shrink and expand as muscle fiber size is manipulated in vivo: observations in the androgen-sensitive bulbocavernosus muscle of the mice. *J Neurosci* 10:2660-2671.

Barone R, Paveaux C, Blin PC y Cuq P. 1973. *Atlas d'anatomie du Lapin*. Masson. París.

Beach FA. 1948. Effects of hormone administration upon the male. En: *Hormones and Behavior*. Medical Book Department of Harpener and Brothers. New York. pp 34-41.

Becker JB y Breedlove SM. 2002. Introduction to behavioral endocrinology. En: *Behavioral Endocrinology*. Becker JB, Breedlove SM, Crews D y Mc Carthy MM (eds) MIT Press. Cambridge. pp. 75-111.

Beckett SD, Hudson R, Walker DF, Reynolds TM y Vachon RI. 1973. Blood pressure and penile muscle activity in the stallion during coitus. *Am J Physiol*. 225:1072-1075.

Beckett SD, Hudson R, Walker DF, Vachon RI y Reynolds TM. 1972. Corpus cavernosum penis pressure and external penile muscle activity during erection in the goat. *Biol Reprod*. 7:359-364.

Benson GS. 1994. Male sexual function: Erection, emission and ejaculation. En: Knobil E, Neil JD (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. pp 1518-1520.

Breedlove SM. 1986. Cellular analyses of hormone influence on motoneuronal development and function. *J Neurobiol.* 3:157-176

Breedlove SM, Hampson E. 2002. Sexual differentiation of the brain and behavior. En: *Behavioral Endocrinology*. Becker JB, Breedlove SM, Crews D y Mc Carthy MM (eds) MIT Press. Cambridge. pp. 75-111.

Breedlove SM y Arnold AP. 1980. Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus in the rat spinal cord. *Science* 210:564-566.

Breedlove SM y Arnold AP. 1981. Sexually dimorphic motor nucleus in the rat lumbar spinal cord: Response to adult hormone manipulation, absence in androgen-insensitive rats. *Brain Res.* 225:297-307.

Breedlove SM y Arnold AP. 1983. Sex differences in the pattern of steroid accumulation by motoneurons of the rat spinal cord. *J Comp Neurol.* 215:211-216.

Breedlove SM y Arnold AP. 1983. Hormonal control of a developing neuromuscular system: II Sensitive periods for the androgen induced masculinization of the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J Neurosci.* 3: 424-432

Broadwell RD y Balin BJ. 1985. Endocytic and exocytic pathway of the neuronal secretory process and transynaptic transfer of wheat germ agglutinin horseradish peroxidase in vitro. *J Comp Neurol.* 242:632-650.

Burke KA, Kuwajima M y Sengelaub DR. 1999. Aromatase inhibition reduces dendritic growth in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J Neurobiol* 38: 301-312

Burke KA, Widows MR y Sengelaub DR. 1997. Synergistic effects of testosterone metabolites on the development of motoneuron morphology in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J Neurobiol* 33:1-10

Catala M. 1999. How sex dimorphism is established in the spinal nucleus of Onuf? *Morphologie*. 83:5-8

Catala M. 2002. Control of the development of Onuf's spinal nucleus. *Prog Urol*. 340:343

Cruz Y, Hudson R, Pacheco P, Lucio RA y Martínez-Gómez M. 2002. Anatomical and physiological characteristics of perineal muscles in the female rabbit. *Physiol Behav*. 75:33-40.

Dail WG y Sachs BD. 1991. The ischiourethralis muscle of the rat: Anatomy, innervation and function. *Anat Rec*. 229:203-208.

Fishman RB y Breedlove SM. 1988. Neonatal androgen maintains sexually dimorphic muscles in the absence of innervation. *Muscle Nerve*. 11:553-560

Fishman RB, Chism L, Firestone GL, Breedlove SM. 1990. Evidence for androgen receptors in sexually dimorphic perineal muscles of neonatal male rats. Absence of androgen accumulation by perineal motoneurons. *J Neurobiol*. 21:694-704.

Forger NG y Breedlove SM. 1986. Sexual dimorphism in human and canine spinal cord: role of early androgen. *Proc Acad Sci USA*. 83:7527-7531.

Forger NG y Breedlove SM. 1987. Seasonal variation in mammalian striated muscle mass and motoneuron morphology. *J Neurobiol*. 18:155-165.

Forger NG, Fishman RB y Breedlove SM. 1992. Differential effects of testosterone metabolites upon the size of sexually dimorphic motoneurons in adulthood. *Horm Behav.* 26:204-213.

Forger NG, Hodges LL, Roberts SL y Breedlove SM. 1992. Regulation of motoneuron death in the spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J Neurobiol.* 23:1192-1203.

Forger NG, Roberts SL, Wong V y Breedlove SM. 1993. Ciliary neurotrophic factor maintains motoneurons and their targets muscles in developing rats. *J Neurosci.* 13:4720-4726.

Forger NG, Frank LG, Breedlove SM y Glickman SE. 1996. Sexual dimorphism of perineal muscles and motoneurons in spotted hyenas. *J Comp Neurol.* 375:333-343.

Fraley GS y Ulibarri C. 2001. Sexual dimorphism in the number and size of motoneurons: delayed development during normal ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res.* 126:57-64

Freeman LM y Breedlove. 1995. Motoneurons innervating guinea pig perineal muscles are sexually dimorphic in size but not number. *Brain Res* 690:1-7.

Goldstein LA, Kurz EM y Sengelaub DR. 1990. Androgen regulation of dendritic growth and retraction in the development of a sexually dimorphic spinal nucleus. *J Neurosci.* 10:935-946.

Goldstein LA y Sengelaub DR. 1992. Timing and duration of dihydrotestosterone treatment affect the development of motoneuron number and morphology in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J Comp Neurol.* 326:147-157.

Goldstein LA y Sengelaub DR. 1993. Motoneuron morphology in the dorsolateral nucleus of the rat spinal cord: normal development and androgenic regulation. *J Comp Neurol.* 338:588-600.

Harcourt-Brown F. 2002. The rabbit consultation and clinical techniques. En: Harcourt-Brown F (ed) Textbook of Rabbit Medicine. Butterworth Heinemann. Oxford. pp 52.

Hart BL. 1972. The action of extrinsic penile muscles during copulation in the male dog. Anat Rec. 173:1-6.

Hart BL y Melese-D'Hospital PY. 1983. Penile mechanisms and the role of the striated penile muscles in penile reflexes. Physiol Behav. 31:807-813.

Hing-Sing Y. 1994. The male reproductive system. En Hing-Sing Y (ed) Human Reproductive Biology. CRC Press, Inc pp 109-125.

Hodges LL, Jordan CL y Breedlove SM. 1992. Hormone-sensitive periods for the control of motoneuron number and soma size in the dorsolateral nucleus of the rat spinal cord. Brain Res. 602:187-190.

Holmes GM, Chapple WD, Leipheimer RE y Sachs BD. 1991. Electromyographic analysis of male rat perineal muscles during copulation and reflexive erections. Physiol Behav. 49:1235-1246.

Jordan CL. 1997. Androgen receptor (AR) immunoreactivity in rat pudendal motoneurons: implications for accessory proteins. Horm Behav. 32:1-10

Jordan CL, Breedlove SM y Arnold AP. 1982. Sexual dimorphism and the influence of neonatal androgen in the dorsolateral motor nucleus of the rat lumbar spinal cord. Brain Res. 249:309-314.

Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM. 2001. Principios de neurociencias. Madrid. McGraw-Hill/Interamericana de España. pp 1330.

Kurz EM, Brewer RG y Sengelaub DR. 1991. Hormonally mediated plasticity of motoneuron morphology in the adult rat spinal cord: a cholera toxin-HRP study. *J Neurobiol.* 22:976-988.

Leslie M, Forger NG y Breedlove SM. 1991. Does androgen affect axonal transport of cholera toxin HRP in spinal motoneurons? *Neurosci Lett.* 126:199-202.

Lucio RA, Zempoalteca R, Rodríguez J, Aguilar F, Flores G y Velázquez J. 1998. Erección, emisión y eyaculación. En: Velázquez J (ed). *Biología de la reproducción.* Universidad Autónoma Metropolitana pp 305-333.

Luttge WG. 1979. Endocrine control of mammalian male sexual behavior: an analysis of the potential role of testosterone metabolites. En: Beyer C (ed.) *Endocrine Control of Sexual Behavior.* Raven Press. New York. pp 341-363.

Martínez-Gómez M, Lucio RA, Carro M, Pacheco P y Hudson R. 1997. Striated muscles and scent glands associated with the vaginal tract of the rabbit. *Anat Rec.* 247:486-495.

McKenna KE y Nadelhaft I. 1986. The organization of the pudendal nerve in the male and the female rat. *J Comp Neurol.* 248:532-549.

Mesulam MM. 1978. Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurochemistry, a non carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neuronal afferents and efferents. *J Histochem Cytochem.* 26:106-107.

Moralí G y Beyer C. 1992. Motor aspects of masculine sexual behavior in rats and rabbits. En: *Advances in the Study of Behavior.* Academic Press. Vol 21. pp 201-238.

Nanasaki Y y Sakuma Y. 2000. Perineal musculature and its innervation by spinal motoneurons in the male rabbit. *J Nippon Med Sch.* 67:164-171.

Onufrowicz B. 1900. On arrangement and formation of the cell groups of the sacral region of the spinal cord in man. *Arch Neurol Psychopathol.* 3:387-412.

Purhoit RC y Beckett SD. 1976. Penile pressures and muscle activity associated with erection and ejaculation in the dog. *Am J Physiol* 231:1343-1348.

Popesko P, Rajtová V y Horák J. 1992. A color atlas of the anatomy of small laboratory animals. Londres. Wolfe Publishing Ltd. pp 107.

Rand MN y Breedlove SM. 1991. Androgens locally regulates rat bulbocavernosus and levator ani size. *J Neurobiol* 23:17-30

Raouf S, Van Roo B y Sengelaub D. 2000. Adult plasticity in hormone-sensitive motoneuron morphology: methodological/behavioral confounds. *Horm Behav.* 38:210-221

Rodríguez J, Hudson R, Martínez-Gómez M y Lucio RA. 1999. Spinal localization of motoneurons innervating the ischiocavernosus muscles in chinchilla female rabbits. *Soc Neurosci Abs.* 25:653.

Rodríguez J, Hudson R, Martínez-Gómez M y Lucio RA. 2000. Spinal motoneurons innervating the bulbospongiosus muscle in female rabbits. *Soc Neurosci Abs.* 26:688

Rozenzweig MR, Leiman AL y Breedlove SM. 2001. *Psicología Biológica.* Barcelona. Editorial Ariel, S. A. pp 930.

Sachs BD. 1982. Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation and induction of pregnancy in the rat. *J Reprod Fertil.* 66: 433-443.

Schmidt MH y Schmidt HS. 1983. The ischiocavernosus and bulbospongiosus muscles in mammalian penile rigidity. *Sleep.* 16: 171-183.

Schroder HD. 1980. Organization of the motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat. *J Comp Neurol.* 192: 567-587

Sengelaub DR y Arnold AP. 1986. Development and loss of early projections in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J Neurosci.*6:1613-1620.

Venable JH. 1966. Morphology of the cells of normal, testosterone deprived and testosterone stimulated levator ani muscles. *Am J Anat.* 119:271-302.

Xu J, Gingras KM, Bengston L, Di Marco A y Forger NG. 2001. Blockade of endogenous neurotrophic factors prevents the androgenic rescue of rat spinal motoneurons. *J Neurosci.* 21:4366-4372.

Wagner CK y Clemens LG. 1989. Anatomical organization of the sexually dimorphic perineal neuromuscular system in the house mouse. *Brain Res.* 499:93-100

Wilson DB y Wilson WJ. 1978. *Human Anatomy.* New York. Oxford University Press. pp 470.

Yang LY, Verhovshek T y Sengelaub DR. 2004. Brain-derived neurotrophic factor and androgen interact in the maintenance of dendritic morphology in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *Endocrinology.* 145:161-168

Zempoalteca R, Martínez-Gómez M, Hudson R, Cruz Y y Lucio RA. 2002. An anatomical and electrophysiological study of the genitofemoral nerve and some of its targets in the male rat. *J Anat.* 201: 493-505.

ANEXO

Marcaje con sustancias transportadas retrógradamente

El hallazgo de que los axones transportan sustancias, no sólo hacia sus terminales, sino también hacia los cuerpos celulares de los que se han originado, permitió el surgimiento de algunos métodos para el estudio de la morfología de las neuronas, entre ellas, la técnica de la peroxidasa.

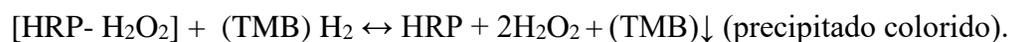
5.1 Origen

El neuropatólogo sueco Krister Kristensson en 1970 halló que la albúmina del suero bovino, una proteína de gran tamaño, era absorbida por los terminales nerviosos del músculo gastronemio y transportada de manera retrograda hasta las neuronas correspondientes en la médula espinal. La búsqueda de un trazador más fácilmente detectable, motivó el uso de la HRP (Nauta y Feirtag 1987). Holtzman y Peterson encontraron que neuronas de mamíferos pueden incorporar HRP administrada por vía intravenosa por medio de endocitosis. Zach y Saito mostraron que inyecciones intramusculares de HRP en ratón, causaron un rápido marcaje dentro de vesículas en las terminales nerviosas en la unión neuromuscular. Becker y cols. Describieron como las vesículas con la HRP endocitada son transportadas dentro del axón.

5.2 La enzima peroxidasa

La actividad de la peroxidasa fue descrita en 1855 por Schoenbein, quien notó que los extractos de hongos y otros tejidos en presencia de aire o peróxido de hidrógeno cambian a azul soluciones de guayacol (Mesulam y Marcel, 1982). Esta enzima se encuentra en casi todo tejido vivo, especialmente en plantas. La raíz del rábano (*Cochlearia armoracia*) es una de las fuentes más abundantes. Es una glicohemoproteína con un peso de 44kDa y un diámetro de 5.34 nm en estado hidratado (Van der Want y cols. 1997). Su actividad enzimática proviene la

reducción y oxidación cíclica de un átomo de hierro en el grupo hematina. La isoenzima más común contiene 308 residuos de aminoácidos y ocho carbohidratos neutros unidos a grupos asparagina de la cadena carbonatada. El grupo hematina (que contiene al hierro) está unido covalentemente a una apoenzima glicoproteíca. En un medio apropiado, la HRP unida al tejido se combina de forma rápida y específica con su sustrato (H_2O_2) y el complejo resultante $[\text{HRP}-\text{H}_2\text{O}_2]$ puede oxidar una amplia variedad de compuestos cromógenos, donadores de hidrógeno. Por otra parte, se libera un átomo de oxígeno del peróxido de hidrógeno, quedando reducido a agua. Los compuestos cromógenos se colorean densamente al oxidarse y al precipitarse son fácilmente detectables, marcando la actividad de HRP de acuerdo a la siguiente reacción:



Aunque existen muchas sustancias cromógenas, sólo algunas de ellas tienen aplicación en histoquímica. Adler y Adler comenzaron a utilizar la benzidina. Kreibich dio consistencia y estabilidad a la benzidina al acidificar el medio de incubación. Goodpasture, al observar que el producto obtenido tiende a adquirir una coloración café, agregó nitroferricianuro de sodio como un agente estabilizante para el color azul del producto de la reacción. Graham y Karnovsky introdujeron la fijación del tejido con una mezcla de glutaraldehído-paraformaldehído y el uso de la diaminobenzidina como cromógeno. Estudios cuantitativos han demostrado que la tetrametilbenzidina es uno de los cromógenos que tiene mayor nivel de sensibilidad y que permite una mayor área de demostración de conexiones neuronales.

La capacidad de la HRP para cruzar membranas es la base de la técnica de marcaje retrógrado. La endocitosis ocurre a través de la membrana de la neurona, incluyendo dendritas, perikarion, axones y terminales nerviosas. Es frecuente en la terminal del axón y muy rara en la parte mielinizada del mismo.

5.3 La técnica de la peroxidasa de rábano.

Esta técnica comienza con la inyección de HRP en una estructura nerviosa o muscular. La enzima puede ser inyectada en solución acuosa, en forma sólida, en gel o pasta. Las soluciones acuosas son las más adecuadas. Es recomendable que los volúmenes administrados sean pequeños, para confinar al trazador a la zona de interés. La distribución del trazador inyectado depende de la cantidad de líquido que es inyectado y la presión utilizada. Por lo tanto, volúmenes grandes y velocidades de administración altas, extienden el trazador más allá de la zona de administración. Esta área alcanza un tamaño estable a los 10 minutos y permanece estable durante casi 2 horas. La absorción del trazador dura alrededor de 15 minutos, en neuronas estructuralmente intactas. Métodos muy sensibles requieren de cantidades de 0.02 a 0.1 microlitros de una solución al 5 al 20% de HRP. De 2 a 8 horas después el área que rodea el sitio de inyección y que contiene deposición densa de productos de reacción se expande dramáticamente. Después de 17 a 18 horas el área comienza a disminuir y después de 5-7 días es virtualmente imposible encontrar productos de reacción en el área (Fig. 21, Mesulam y Marcel, 1982).

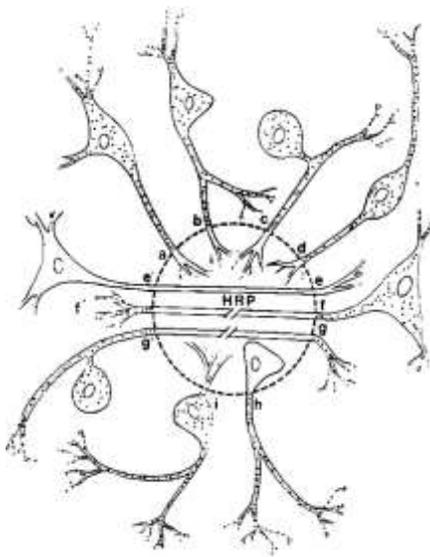


Fig. 21. Tipos de transporte de HRP. La línea punteada indica el sitio de inyección. a) Absorción en las terminales intactas resulta en transporte retrógrado al perikarion y dendritas. b) El mismo tipo de absorción resulta en el marcaje de colaterales axónicas. c) Absorción en

terminales sensoriales periféricas intactas, resulta en el marcaje de la célula ganglionar así como en marcaje transganglionar de terminales axónicas sensoriales centrales. d) Un proceso similar de transporte ocurre en neuronas bipolares. e y e') Virtualmente no hay absorción ni transporte de HRP en axones intactos que cruzan la zona de inyección. f) y f') Entrada de HRP al muñón proximal resulta en marcaje retrógrado. El marcaje es granular y ocurre dentro de organelos delimitados por membranas dependiendo de la distancia del perikarion al sitio del corte y de si el tiempo de sobrevivencia es suficientemente largo. El marcaje en el muñón distal del axón se debe principalmente a difusión citoplasmática. g y g') La entrada de HRP a un axón sensorial periférico dañado, resulta en marcaje retrógrado, anterógrado y transganglionar (casi siempre por transporte activo vesicular. h) absorción en el perikarion intacto resulta en transporte anterógrado a los campos terminales. i) absorción en dendritas intactas puede resultar en marcaje del perikarion y ramas axonales (Mesulam y Marcel, 1982).

La HRP se absorbe de forma pasiva (endocitosis) por los botones terminales de un axón a ese nivel, formando una vacuola de alrededor de 100 nm de diámetro, que entra al espacio intracelular y su laberinto de canales de transporte. Algunas lecitinas como la aglutinina de germen de trigo (WGA, wheat germ agglutinin) y fragmentos de toxinas bacterianas (CTB, subunidad B de toxina de cólera) inducen mecanismos activos mediados por receptores, acelerando su absorción. El marcaje retrógrado con HRP-WGA es cuantitativamente más extenso que con HRP sola. La WGA tiene fuerte afinidad por residuos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuroamínico, que se hallan presentes en la membrana de todas las neuronas. Esta especial afinidad por membranas neuronales hace de la WGA un excelente trazador de conexiones neuronales por si mismo o después de su unión a HRP. Sin embargo, la variación local en la distribución de estos receptores puede determinar la mayor o menor absorción del trazador, así mismo, la eficacia de la absorción y transporte, pueden verse afectados por una fuerte respuesta inmune. Un número elevado de células sanguíneas en el sitio de inyección puede competir por endocitar el trazador, disminuyendo el marcaje de las neuronas investigadas (Van der Want y cols. 1997).

5.4 El transporte retrógrado

La HRP y sus conjugados, son transportados tanto en sentido retrógrado como anterógrado. El transporte retrógrado ocurre en pequeñas vesículas que son incorporadas en el aparato de Golgi. Estas vesículas tienden a fusionarse y acumulan alta densidad de HRP, facilitando la visualización del producto final de reacción. A continuación viajan a lo largo de los axones hasta los cuerpos celulares que les dan origen gracias a los microtubulos), a una velocidad entre 48 y 120 por día (animales eutérmicos). Puede haber un retraso de 15 minutos desde el momento de administración de la enzima y el inicio de la endocitosis. De ahí que el animal sea sacrificado de uno a dos días después de la inyección. Tiempos mayores de supervivencia de 5 a 7 días provocan considerable pérdida de la actividad enzimática. Por ello es necesario individualizar el tiempo de supervivencia para cada experimento (Van der Want, 1997).

Se cree que las moléculas de HRP originadas en las terminales axonales son transportadas primero a la región perinuclear, y pueden ser transferidas dentro de compartimientos delimitados por membranas mediante transporte somatofugo a las dendritas y colaterales axonales. La fusión con lisosomas inician la degradación enzimática de la HRP. Este es un proceso lento, pues la HRP puede ser detectada 5 días después del comienzo del transporte retrógrado (Mesulam y Marcel, 1982).

5.5 Los fijadores

El animal debe ser perfundido con sustancias tales como formaldehído, glutaraldehído o ambos. La solución de perfusión coagula las proteínas y de esta forma fija el tejido, es decir, proporciona rigidez al tejido nervioso. Sin embargo, la mayoría de los fijadores reducen la actividad enzimática óptima, por lo que deben evitarse periodos prolongados de exposición. Se recomienda una pre-perfusión con solución salina, así como la adición de heparina, para limpiar los vasos de eritrocitos. Después el animal es perfundido con una mezcla de aldehídos en buffer a 21 °C. Inmediatamente se perfunde con una solución de sucrosa en buffer a 4 °C. Mientras que la temperatura del fijador facilita la penetración de los aldehídos al tejido, la temperatura baja de la sucrosa minimiza la inactivación de la HRP (desplaza aldehídos libres presentes en el tejido) y actúa como un crioprotector, permitiendo que el tejido pueda ser

congelado, cortado y procesado. El tejido puede permanecer hasta siete días sin disminuir el marcaje obtenido, sin embargo se recomienda que se mantenga en esta solución de tres a cuatro días antes de cortarlo. Una perfusión adecuada es esencial para todo el proceso del tejido en general, pues no solo los eritrocitos se colorean densamente con el cromógeno, sino también puede haber tinción inespecífica cuando la perfusión es pobre (Mesulam y Marcel, 1982).

5.6 Cortes de tejido

El tejido así fijado, se congela y puede entonces cortarse en finos cortes que no suelen superar las 50 micras de grosor.

5.7 Reacción enzimática

Cada corte se expone a la tetrametilbencidina (TMB, Figura 22) y a continuación se añade peróxido de hidrógeno. La TMB he demostrado ofrecer mejor sensibilidad que otros cromógenos, como la diaminobenzicida y el dihidroclorhidrato de benzidina.

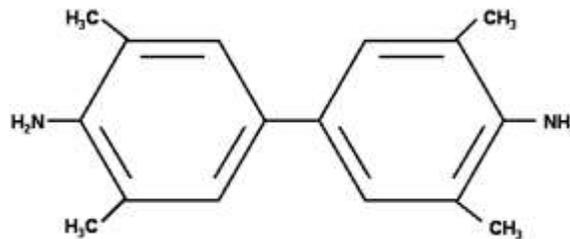


Figura 22. Estructura química de la tetrametilbencidina

El peróxido de hidrógeno se reduce, el oxígeno liberado se combina con el compuesto de bencidina para dar lugar a un pigmento y, mediante esta reacción histoquímica, los cuerpos neuronales que contienen HRP transportada destacan por la coloración contenida en su interior.

La incubación de la TMB se ve influenciada por algunos parámetros, que pueden maximizar la visibilidad y estabilidad de los productos de reacción formados. Algunos de ellos son:

- Concentración del cromógeno (TMB) y el sustrato (H_2O_2). El incremento en la concentración de TMB o H_2O_2 en el medio de incubación provoca una mayor generación de productos de reacción. Sin embargo es posible también acelerar la oxidación no específica de TMB. Concentraciones excesivas de H_2O_2 pueden destruir la enzima.
- Duración de la incubación. La duración de la incubación enzimática es un factor crítico. Tiempos muy cortos no permiten una sensibilidad satisfactoria. Tiempos muy largos pueden causar precipitados no específicos. El tiempo de reacción recomendado es de 20 min, con 20 minutos de pre-reacción antes de agregar el H_2O_2 , para permitir un mayor acceso de la TMB al tejido.
- Temperatura de reacción. Se recomienda mantener la reacción entre 19-23 °C. Temperaturas más altas resultan en la formación más efectiva de productos de reacción, sin embargo, también aumenta la formación de precipitados no específicos. Temperaturas bajas, disminuyen la sensibilidad del método y la formación de productos de reacción no específicos, además de prolongar el tiempo necesario para la reacción (45-60 minutos).
- Balance ácido-base y fuerza iónica. El pH de la reacción es una de las variables críticas para la reacción de la TMB.
- El nivel de sensibilidad es satisfactorio si el buffer de acetato está en un rango de pH de 2.5-4. Si el pH es mayor a 5 la sensibilidad se deprime notablemente, los cristales individuales de TMB incrementan su tamaño, sobrepasando los límites de la neurona y por otra parte, afecta el color y solubilidad de los productos de reacción. Un pH menor a 2.5 provoca problemas en el manejo del tejido. Un nivel satisfactorio de sensibilidad y preservación del tejido es lograda a pH de 3.3. El tipo de buffer usado también puede influenciar la reacción, sin embargo, el buffer de acetato a pH 3.3 ha demostrado ser adecuado.

- Concentración de alcohol. Concentraciones del 50% de etanol en la reacción provocan una dramática disminución de la sensibilidad. La eliminación de etanol, del medio de reacción provee el mayor nivel de formación de productos de reacción. Sin embargo, no se puede eliminar por completo al etanol, pues constituye el vehículo adecuado para disolver a la TMB. Se recomienda usar concentraciones de etanol de 2.5%, que da especificidad histológica sensibilidad satisfactorias.
- Agentes estabilizantes. Se recomienda el uso de nitroferricianuro de sodio para evitar que el color azul producido por los productos de reacción se desvanezca rápidamente. No se conoce el mecanismo, pero se cree que el nitroferricianuro de sodio forma una sal estable con los productos de reacción. Cantidades elevadas de nitroferricianuro aumenta la formación de precipitados no específicos (Mesulam y Marcel, 1982). El nitroprusiato de sodio, es otro agente estabilizante de la reacción frecuentemente usado y que provoca productos de reacción cristalinos. Sin embargo, frecuentemente el tamaño de los cristales puede causar fuerte distorsión del tejido, por lo que se recomienda usar a bajas concentraciones (Van der Want y cols. 1997).
- Efecto de la luz. La observación de que la diaminobenzidina puede ser oxidada al ser expuesta a la luz en ausencia de HRP sugiere la realización de la reacción en condiciones de oscuridad. En ausencia de H_2O_2 la TMB en el medio de incubación no sufre oxidación espontanea aunque se exponga a la luz durante 4 horas. Sin embargo, al agregar H_2O_2 la oxidación espontánea ocurre en ausencia de HRP, y la solución adquiere un color verde esmeralda. Aunque realizar la reacción en total oscuridad no reduce de manera significativa la precipitación no específica de los productos de reacción, se recomienda evitar la exposición de la reacción a luz muy fuerte (Mesulam y Marcel, 1982).

El examen al microscopio de neuronas marcadas retrógradamente muestra una colección perinuclear de agregados de productos de reacción granulados. Estos productos de reacción se extienden a las ramas dendríticas mayores.

5.8 Tipos de marcadores

Existen al menos cuatro tipos de marcadores para detectar la distribución de la HRP en el tejido nervioso:

- Sustancias fluorescentes unidas covalentemente a la HRP, que pueden actuar como marcadores específicos cuando los tejidos son examinados en microscopia de fluorescencia.
- Formación de complejos HRP-antiHRP y la detección histoquímica o por fluorescencia de la enzima.
- Marcado radiactivo de la HRP, que permite detectar la distribución de la enzima unida al tejido mediante autoradiografía.
- Uso de la actividad enzimática de la HRP para producir productos de reacción visibles (Mesulam y Marcel, 1982).

5.9 Factores que afectan la absorción del trazador

Trazar vías neuronales con la técnica de la HRP implica la administración de una preparación adecuada de la enzima, su absorción y transporte por elementos neuronales, la preservación post-mortem de la actividad enzimática, la traducción histoquímica de la actividad enzimática a productos de reacción detectables y procedimientos histológicos para preparar el tejido para su examen microscópico.

La rapidez en la determinación de vías neuronales mediante la técnica de HRP es influenciada por varios factores, entre ellos:

- Tipo de isoenzima de HRP. Del rábano se extraen al menos siete tipos de isoenzimas peroxidasas, con diferentes grados de actividad, aunque no se ha demostrado que efecto tiene en el marcaje la variación en el tipo de isoenzima utilizada.

- Adición de aditivos policationicos. La adición de polipéptidos cationicos (como la Poli-L-ornitina) a bajas concentraciones favorece la absorción de HRP. Se cree que se debe a un aumento en la pinocitosis.
- Adición de detergentes. La adición de sustancias semejantes a los detergentes, como el dimetilsulfóxido (DMSO), lisolecitina y el detergente comercial noninet 40, incrementa el paso de la HRP a través de la membrana. El incremento en el transporte de la enzima causada por el DMSO puede deberse a la ruptura local de la integridad de la membrana. Esta HRP puede migrar entonces, parcialmente en vesículas y parcialmente en el citoplasma.
- Preparaciones de liberación lenta. La HRP inyectada es absorbida durante un pequeño lapso de tiempo después de la inyección. por lo tanto es posible prolongar el periodo de absorción mediante la preparación de polimeros impregnados de HRP, que permiten la liberación lenta de la enzima y por lo tanto, mayor tiempo de exposición.
- Actividad neuronal. La absorción y transporte de HRP se ve dramáticamente incrementada cuando se estimula eléctricamente el nervio o el músculo inyectado (Ceccarelli y cols. 1973, Cooke y cols. 1975, Holtzman y cols. 1973, Heuser y Reese, 1973, Teichberg y cols. 1975, Litchy, 1973, citados en Mesulam y Marcel, 1982). Así mismo, el ejercicio continuo (pero no excesivo) aumenta la velocidad de y la cantidad de proteínas marcadas transportadas axonalmente en ratas hembras (Jasmin y cols. 1988).

5.10 Recomendaciones para la técnica

La falta de exactitud en la determinación de conexiones neuronales se puede deber a la pérdida de actividad enzimática durante la fijación, (que interfiere con la formación de productos de reacción en los sitios que contienen HRP) y las condiciones de la incubación enzimática (afectan la cantidad y visibilidad de los productos de reacción precipitados por unidad de HRP). Por ello es recomendable:

- Poner especial cuidado en el modo de administración de la enzima, de tal manera que la absorción y subsiguiente transporte sea confinada al área de estudio y sus conexiones.
- Es necesario seleccionar un intervalo de sobrevivencia que permita el transporte y acumulación sin excesiva degradación de la actividad de la enzima.
- La fijación debe preservar adecuadamente el tejido y localización de la enzima sin pérdida excesiva de la actividad de HRP.
- Los procedimientos histoquímicos deben tener un alto nivel de sensibilidad y especificidad.
- Los procedimientos histológicos en la preparación del tejido para su examen al microscopio deben preservar la localización y visibilidad de los productos de reacción (Mesulam y Marcel, 1982).

Así, la selección de los dispositivos de inyección, la preparación de la enzima, los agentes anestésicos, el tiempo de sobrevivencia, los procedimientos de fijación y los métodos histoquímicos, influyen en la efectividad de los experimentos donde la HRP es utilizada como un trazador de conexiones neuronales.

Una vez realizada la reacción es necesario realizar procedimientos para preservar el color, cantidad y localización de los productos de reacción para su análisis al microscopio: inmediatamente después de la terminación de la incubación las secciones de tejido deben ser pasadas a través de 6 sucesivos lavados en una solución de 1 parte de buffer HCl-NaAc 0.2M a pH 3.3 y 19 partes de agua, durante aproximadamente 30 minutos. Las secciones de tejido pueden permanecer durante 4 horas en esta solución. Periodos mayores o el uso de soluciones con pH mayor o mayor temperatura causan una marcada y rápida pérdida del marcaje. Los cortes obtenidos son montados del buffer de acetato en portaobjetos cubiertos con alumbre de cromo y se dejan secar al aire por al menos 7 días a temperatura ambiente, sin pérdida de los productos de reacción. Se puede hacer una tinción de contraste con rojo neutro. El siguiente paso es la deshidratación del tejido con etanol. Aunque la deshidratación es una causa potencial de resultados menos óptimos, es un paso necesario para la preservación a largo plazo del marcaje. Todos los cortes deben ser sumergidos por periodos de 10 segundos en una

secuencia de agua destilada, etanol (o acetona) al 70%, etanol (o acetona) al 95% y dos veces en etanol (o acetona) al 100%. Si los cortes son aclarados directamente en Xileno, el marcaje va desapareciendo en los siguientes 10 días. No se conoce el mecanismo de la deshidratación en la estabilización a largo plazo del marcaje. El último paso consiste en aclarar los cortes, mediante su inmersión en 2 baños de Xileno durante periodos de tiempo entre 2 a 20 minutos cada uno y cubrir las laminillas con medio de montaje sin diluir (Mesulam y Marcel, 1982).

5.11 Precauciones

Como los derivados de la benzidina pueden ser carcinogénicos, es necesario realizar las reacciones que los incluyan con mucha precaución. La TMB no tiene propiedades carcinogénicas conocidas, sin embargo, es tóxica, irrita la piel, tiene potencial carcinogénico y puede ser mutagénica, por que se recomienda el uso de guantes y trabajar en campanas ventiladas (Van der Want y cols. 1997).