



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Contribución de las Vesículas Seminales y
Glándulas Coagulantes en la Formación del Tapón
Seminal Durante el Encuentro Copulatorio
de la Rata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Verónica Rodríguez Piedracruz

Director de tesis
Dra. Rosa Angélica Lucio

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2014



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en Ciencias Biológicas

Contribución de las Vesículas Seminales y Glándulas Coagulante en la Formación del Tapón Seminal Durante el Encuentro Copulatorio de la Rata

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Verónica Rodríguez Piedracruz

Comité Tutorial

Dra. Rosa Angélica Lucio

Dr. Armando Ferreira Nuño

Dr. René Zempoalteca Ramírez

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2014

La presente tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Rosa Angélica Lucio. El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México).

El proyecto de investigación fue desarrollado dentro del programa de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, el cual está registrado en el Padrón Nacional de Posgrados del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

El presente trabajo fue financiado parcialmente por CONACYT Proyecto 105502 (RAL) y de Infraestructura 225126. Además, CONACYT otorgó la beca de posgrado 277930 (VRP).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

Maestría en Ciencias Biológicas



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

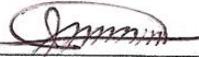
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Verónica Rodríguez Piedracruz realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “Contribución de las vesículas seminales y glándulas coagulantes en la formación del tapón seminal durante el encuentro copulatorio de la rata”.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., DICIEMBRE 20 DE 2014



DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO



DR. ANGEL ISMAEL MELO SALAZAR



DR. RENÉ ZEMOPALTECA RAMÍREZ



DRA. ADRIANA MARGARITA MORALES OTAL



DR. ARMANDO FERREIRA NUÑO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

A CONACYT por haber otorgado la beca 277930 (VRP) de posgrado, además de los proyectos 105502 (RAL) y de Infraestructura 225126.

A la Dra. Rosa Angélica Lucio por haberme aceptado como su estudiante. Gracias por apoyarme, por darme palabras de aliento y ánimos en los momentos que no sentí ser capaz de lograr las cosas. Yo sé que Dios no le puso fácil el camino conmigo.

A mi comité tutorial a los Dres. Armando Ferreira Nuño, René Zempoalteca Ramírez, Adriana Margarita Morales Otal y Angel Melo Salazar por haberme dedicado parte de su tiempo, por los consejos y enseñanzas para enriquecer este trabajo que hoy concluye.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis amigos y compañeros de Maestría con los que pasé buenos momentos, cada uno de ellos con sus ocurrencias que los caracteriza.

A mi familia que espero haya comprendido que la ciencia es muy celosa y no me quería compartir con nadie más.

A mis amigos María Reyna Fuentes, José Luis Tlachi, Vero Villamar, Rhode, Diana e Irene.

A todos aquellos que se cruzaron en mi camino y me dieron ánimos para seguir en el camino de la investigación.

DEDICATORIA

A mi madre y hermanos.

*A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota.*

Madre Teresa de Calcuta

RESUMEN

La rata macho despliega patrones motores conductuales de monta e intromisión intercalados entre sí que culminan con la eyaculación. A esto se le conoce como serie eyaculatoria. Después de 8 a 12 intromisiones acompañadas de inserciones vaginales, durante la primera serie), el macho alcanza el umbral eyaculatorio y realiza el patrón conductual de eyaculación acompañado de la expulsión del fluido seminal, que es depositado en la vagina. La eyaculación comprende dos fases, emisión y expulsión seminal. La emisión seminal implica la confluencia de los espermatozoides provenientes de la cauda del epidídimo y las distintas secreciones de las glándulas sexuales accesorias en la uretra prostática. En la fase de expulsión seminal acontece la salida del semen, constituido por las secreciones de las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, glándulas coagulantes, próstata) más espermatozoides. Durante la expulsión, el semen recorre la uretra la cual se divide en cuatro regiones: prostática, membranosa, bulbar y peneana. Tras la eyaculación, en la vagina de la hembra recién inseminada se observa un tapón seminal, formado principalmente por secreciones de las vesículas seminales y las coagulantes. Debe enfatizarse que existe controversia respecto al momento en que se forma este tapón, ya que, algunos investigadores han propuesto que el macho expelle semen más un coagulado o tapón seminal, mientras que otros contradicen esta idea, indicando que la rata expelle semen y que en la vagina, el tapón seminal es formado. Existe la duda de la formación del tapón en la vagina y de la participación de las glándulas coagulantes en dicha formación es controversial. El objetivo general del presente trabajo es evidenciar que la formación del tapón seminal inicia en la uretra masculina y culmina en la vagina durante el encuentro copulatorio de la rata y que dicha formación depende de las secreciones de las glándulas coagulantes y vesículas seminales. Para lograr este objetivo se utilizaron ratas de la cepa *Wistar*. Las hembras fueron ovariectomizadas con el fin de inducirles el estro hormonalmente, mientras que los machos fueron entrenados para que adquirieran experiencia sexual. Posteriormente, se dividieron en cuatro grupos dependiendo del tipo de cirugía realizada: cirugía simulada (Sim), extirpación de glándulas coagulantes (GCx), extirpación de vesículas seminales (VSx) y extirpación de ambas glándulas (GCx+VSx) para determinar su papel en la formación del tapón vaginal. Los grupos de machos fueron sometidos a diferentes tipos de pruebas copulatorias que concluyeron hasta que ocurrieron los siguientes eventos: tres intromisiones, seis intromisiones o una eyaculación, dependiendo del número de intromisiones que realizaron para eyacular, durante sus entrenamientos copulatorios. Así, aquellos machos que desplegaron pocas intromisiones para eyacular durante sus entrenamientos fueron asignados a la prueba de tres intromisiones, mientras que los que requirieron mayor número, realizaron la prueba de seis intromisiones. Para la prueba de una eyaculación se seleccionaron aquellos machos que presentaron siempre el patrón de eyaculación durante sus entrenamientos. Hubo diferencias significativas entre los tapones seminales encontrados en las uretras de los machos (obtenidos después de haber realizado tres o seis intromisiones) *versus* los tapones vaginales (obtenidos después de una eyaculación) en los machos Sim. Las diferencias entre tapones se encontraron en los valores de sus parámetros de largo, ancho y peso. El tamaño de los tapones seminales uretrales obtenidos de la prueba de tres intromisiones fue 2.6 x 0.8 milímetros (largo x ancho) y 0.60 miligramos de peso. Los tapones de seis intromisiones midieron 2.0 x 1.0 milímetros (largo x ancho) y 0.90 miligramos de peso. Los tapones vaginales obtenidos después de la eyaculación de los machos Sim midieron

11.5 x 5.3 milímetros (largo x ancho) y pesaron 89.8 miligramos. Los tapones de los machos GCx también mostraron diferencias significativas en sus parámetros entre los tapones uretrales *versus* los vaginales. Los uretrales de las pruebas de tres y seis intromisiones midieron 2.9 y 2.1 milímetros de largo, 1.0 y 0.9 milímetros de ancho y pesaron 1.7 y 2.7 miligramos, respectivamente. Después de la eyaculación los tapones midieron 15.5 milímetros de largo, 4.9 milímetros de ancho y 123.8 miligramos de peso. Los tapones uretrales de seis intromisiones *versus* los vaginales de machos VSx solo mostraron diferencias significativas en el ancho, ya que midieron 0.8 y 1.8 milímetros, mientras que en el largo y peso no hubo diferencias significativas. Se realizó otra comparación estadística para conocer el efecto que tenía la ablación de las glándulas accesorias sobre la formación de los tapones uretrales y vaginales. Se encontró que el 84 % de los machos que ejecutaron tres intromisiones presentaron tapones seminales uretrales. La mayoría de estos tapones se encontraron en la uretra membranosa y unos cuantos en la prostática. Este resultado fue independiente del tipo de cirugía realizada. No hubo diferencias significativas entre los valores de los parámetros de los tapones de machos Sim *versus* GCx *versus* VSx obtenidos durante las pruebas de tres y seis intromisiones. Las diferencias significativas entre los grupos de machos fueron evidentes cuando los tapones seminales se obtuvieron de la vagina. En cuanto al largo, Sim *versus* GCx fueron diferentes significativamente, mientras que en el ancho y peso no hubo diferencias. Se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los machos Sim *versus* VSx en todos sus parámetros, de la misma manera, esto sucedió al comparar GCx *versus* VSx. En el caso de los machos GCx+VSx el tapón seminal vaginal estuvo ausente, lo que pone de manifiesto la participación de ambas glándulas en su formación. Después de realizar la cuenta espermática se obtuvieron diferencias significativas entre los machos Sim *versus* VSx y Sim *versus* GCx+VSx ya que la cuenta espermática en los dos últimos grupos fue cero en los Sim fue 43.2 millones de espermatozoides. La cuenta espermática de los machos GCx fue de 19.2 millones, por lo que también hubo diferencias significativas entre este grupo de machos *versus* VSx *versus* GCx+VSx. La ablación de las coagulantes modificó la consistencia de los tapones uretrales y vaginales, siendo en ambos casos blanda. De igual forma, la extirpación de las seminales hizo aún más blanda la consistencia de los tapones, la cual suele ser dura en los machos intactos. Por lo tanto, podemos concluir que el tapón seminal, inicia su formación en la uretra membranosa y ocurre durante las intromisiones pre-eyaculatorias, sugiriendo que la fase de emisión seminal, no ocurre inmediatamente antes de la expulsión del semen. La ausencia de las secreciones de las coagulantes o de las seminales, no afecta la formación de los tapones uretrales, pero si afecta la de los vaginales, incluso la extirpación de ambos pares de glándulas, ocasiona que el tapón seminal no se forme.

ÍNDICE

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Conducta copulatoria de la rata macho.....	1
1.1.2 Intromisión.....	1
1.1.3 Eyaculación.....	2
1.2 Anatomía de la uretra de la rata macho.....	3
1.3 Glándulas sexuales accesorias que participan en el eyaculado.....	4
1.3.2 Glándulas sexuales accesorias en mamíferos.....	4
1.3.3 Glándulas sexuales accesorias en la rata.....	8
1.3.4 Glándulas sexuales y tapón seminal de la rata macho.....	9
2 ANTECEDENTES.....	11
2.1 Extirpación de las glándulas sexuales accesorias.....	11
2.1.1 Extirpación de vesículas seminales.....	11
2.1.2 Extirpación de glándulas coagulantes.....	12
2.1.3 Formación, constitución y presencia del tapón seminal.....	13
3 JUSTIFICACIÓN.....	16
4 HIPÓTESIS.....	17
5 OBJETIVO GENERAL.....	18
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
7 METODOLOGÍA.....	19
7.1 Animales.....	19
7.2 Pruebas de entrenamiento copulatorio.....	19
7.3 Grupos experimentales.....	20
7.3.1 Cirugía simulada de extirpación bilateral de glándulas coagulantes y vesículas seminales (Sim).....	20
7.3.2 Extirpación bilateral de glándulas coagulantes (GCx).....	21
7.3.3 Extirpación bilateral de vesículas seminales (VSx).....	22
7.3.4 Extirpación bilateral de las glándulas coagulantes y vesículas seminales (GCx+VSx).....	22
7.3.5 Pruebas copulatorias post-cirugía de tres o seis intromisiones o una eyaculación.....	22
7.3.5.1 Revisión de la uretra del macho después de las pruebas de tres o seis intromisiones o una eyaculación.....	23
7.3.5.2 Exploración de la vagina y cuernos uterinos de la hembra después de la prueba de una eyaculación.....	23
7.4 Diseño experimental.....	26
7.10 Análisis estadístico.....	27
8 RESULTADOS.....	28
8.1 Entrenamientos copulatorios para la asignación de machos a distintas pruebas copulatorias (tres, seis intromisiones o una eyaculación).....	28
8.2 Preformación del tapón seminal durante la cópula de los machos Sim, GCx y VSx.....	30
8.2.1 Tapones de machos Sim que ejecutaron tres o seis intromisiones o una eyaculación.....	30
8.2.2 Tapones de machos GCx que ejecutaron tres o seis intromisiones o una eyaculación.....	33
8.2.3 Tapones de machos VSx que ejecutaron tres o seis intromisiones o una eyaculación.....	35
8.3 Ablación de las glándulas sexuales (glándulas coagulantes y vesículas seminales) sobre los parámetros de los tapones (uretrales y vaginales) durante la cópula.....	37
8.3.1 Prueba de tres intromisiones realizada por los machos Sim, GCx y VSx.....	37

8.3.2	Prueba de seis intromisiones realizada por los machos Sim, GCx y VSx.....	39
8.3.3	Prueba de una eyaculación realizada por los machos Sim, GCx y VSx.....	41
9	DISCUSIÓN.....	45
10	CONCLUSIÓN.....	51
11	PERSPECTIVAS.....	52
12	REFERENCIAS.....	53
13	PUBLICACIONES.....	58

A. Artículos

Lucio RA, **Rodríguez-Piedracruz V**, Tlachi-López JL, García-Lorenzana M y Fernández-Guasti A (2014) Copulation without seminal expulsion: the consequence of sexual satiation and the coolidge effect. *Andrology* 2: 450-457.

B. Congresos nacionales

Tlachi-López JL, **Rodríguez-Piedracruz V**, Lucio RA (2013) Recuperación de la capacidad fértil de la rata macho saciada sexualmente. LVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Tlaxcala, Tlax. Sep 2-5.

Rodríguez-Piedracruz V, Tlachi-López JL, Lucio RA (2013) Interrupción o evitación del transporte espermático transcervical como estrategia reproductiva de la rata macho saciada sexualmente. LVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Tlaxcala, Tlax. Sep 2-5.

Aguilar C, Lucio RA, Flórez Jiménez M, **Rodríguez Piedracruz V**, Melo AI (2014) Evaluación de la conducta copulatoria de la rata macho sometida al aislamiento socio-materno durante el período postnatal. XXXIX Reunión Anual de la Academia de Biología de la Reproducción. Veracruz, Ver. May 28-31.

Rodríguez Piedracruz V, Lucio RA (2014) Formación del tapón seminal durante el encuentro copulatorio de la rata: contribución de las vesículas seminales y glándulas coagulantes. XXXIX Reunión Anual de la Academia de Biología de la Reproducción. Veracruz, Ver. May 28-31.

C. Congresos internacionales

Rodríguez Piedracruz V, Lucio RA (2012) Contribución de las vesículas seminales y glándulas coagulantes en la formación del tapón seminal durante el encuentro copulatorio de la rata. XVII Curso Internacional Bases Biológicas de la Conducta. Tlaxcala, Tlax. Oct 3-6.

Lucio RA, **Rodríguez-Piedracruz V**, Tlachi-López JL, Martínez-Jaimes MD, Velázquez-Moctezuma J y García-Lorenzana M. (2012) Sexually satiated male rats under the coolidge effect are capable to display copulatory motor patterns but not to induce pregnancy. 1er Congreso FALAN y LV Congreso de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Federación de Asociaciones Latinoamericanas y del Caribe de Neurociencias de Fisiología. Cancún, Q. Roo. Nov. 4-9.

Rodríguez Piedracruz V, Tlachi-López JL, Lucio RA (2013) ¿Cópulas sin expulsión seminal? el caso de la rata de laboratorio después de la saciedad sexual. XVIII Curso Internacional Bases Biológicas de la Conducta. Tlaxcala, Tlax. Oct 9-12.

García Lorenzana M, **Rodríguez Piedracruz V**, Tlachi-López JL, Martínez-Jaimes MD y Lucio RA (2013) Análisis histológico prostático, epididimal y testicular en ratas wistar saciadas sexualmente. XVIII Congreso Panamericano de Anatomía, XX Reunión Nacional de Morfología y IX Simposio Ibero-latino-americano de Terminología. Huatulco, Oax. Oct

4.

Rodríguez-Piedracruz V y Lucio RA (2014) Tapones uretrales y tapones vaginales: participación de las vesículas seminales y glándulas coagulantes. XIX Curso Internacional Bases Biológicas de la Conducta. Guanajuato, Gto. Ago 26-29.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Conducta copulatoria de la rata macho

Durante la conducta copulatoria, la rata macho despliega patrones motores de monta e intromisión intercalados, después de 8 a 12 intromisiones el macho alcanza el umbral eyaculatorio y realiza el patrón motor de eyaculación (Larsson, 1956). Éste se acompaña de la expulsión del fluido seminal que se deposita en la vagina (Pollak y Sachs, 1976). Se reconoce que la cópula incluye no sólo patrones motores, sino también respuestas genitales (Sachs y Meisel, 1988). Los patrones motores que realiza el macho pueden observarse y distinguirse fácilmente, en tres distintos (monta, intromisión y eyaculación). En cambio, las respuestas genitales no pueden observarse, sino se asume que ocurren concomitantemente con los patrones de intromisión y eyaculación. En otras palabras, el patrón motor de intromisión se acompaña de la respuesta genital de erección e inserción del pene en la vagina y el patrón motor de eyaculación, de la respuesta genital de expulsión seminal, insertando previamente el pene en la vagina (Pollak y Sachs, 1976). Dichas respuestas genitales constituyen las funciones sexuales masculinas.

1.1.2 Intromisión

En los roedores el contacto genital, es decir, la inserción peneana que ocurre durante la cópula tiene una duración de 200-400 milisegundos (Meisel y Sachs, 1994). Para que ocurra la inserción peneana debe presentarse la erección. La erección es una de las dos funciones sexuales del macho y se define como la tumescencia o rigidez del pene (Benson, 1994). Además, la conducta de lordosis de la hembra es importante para que el macho pueda insertar el pene en la vagina (Meisel y Sachs, 1994). La rata durante la cópula ejecuta múltiples intromisiones o inserciones peneanas antes de eyacular, por lo que el número de intromisiones es considerado una medida de sensibilidad del mecanismo de eyaculación (Meisel y Sachs, 1994).

En la rata macho, las intromisiones están separadas por intervalos de segundos a minutos. Se ha realizado la manipulación de estos intervalos para mostrar que las intromisiones aumentan la excitación de macho, hasta alcanzar el umbral eyaculatorio. Utilizando intervalos inter-intromisión de 90 segundos se observa que la rata macho eyacula al

realizar de 4 a 5 intromisiones. En cambio, los machos que se sometieron a intervalos de 20 minutos entre cada intromisión, a pesar de que realizan de 8 a 15 intromisiones, nunca logran eyacular. Asimismo, cuando el intervalo inter-intromisión es de 120 minutos o mayor a éste, el efecto excitatorio desaparece y los machos no eyaculan (Larsson, 1959); incluso cuando se realizan intervalos inter-intromisión forzados de 30 minutos, el macho no eyacula a pesar de realizar más de 20 intromisiones (Bermant, 1967).

La estimulación genital es importante para que el macho pueda eyacular durante el contexto copulatorio. La anestesia local del pene con tetracaína afecta la erección, de modo que el macho no logra la intromisión porque el pene se muestra semi-flácido. Sin embargo, esto no interfiere con la motivación sexual para dar inicio al encuentro copulatorio, lo que demuestra que la motivación del macho es independiente de la estimulación genital (Carlsson y Larsson, 1964).

1.1.3 Eyaculación

La eyaculación es la segunda función sexual del macho y consta de dos fases, la emisión y la expulsión seminal. En el hombre, la emisión seminal implica la confluencia de los espermatozoides provenientes de la cauda del epidídimo y las distintas secreciones de las glándulas sexuales accesorias, en la uretra prostática (Bhasin y Benson, 2006). En mamíferos como es el caso del humano, la mezcla de secreciones ocurre en distintas fracciones: la primera está libre de espermatozoides y contiene secreciones de la ámpula. La segunda fracción se compone de la secreción de vesículas seminales y es rica en espermatozoides (Carballada y Esponda, 1993). En el caso de la rata, la segunda fracción se acompaña además de las secreciones de las glándulas coagulantes (McClintock y Adler, 1978). Además, ocurre el cierre del cuello de la vejiga urinaria, para evitar la eyaculación retrógrada (McDonnell, 1992). En la fase de expulsión seminal, acontece la salida de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias más los espermatozoides, es decir, el semen. La salida enérgica de semen, se debe a la contracción de la musculatura estriada de la región perineal, particularmente de los músculos bulboesponjosos (Holmes y cols., 1991). Durante la expulsión, el semen debe recorrer un conducto llamado uretra, el cual está involucrado en la eyaculación seminal (Benson, 1994) y la expulsión de orina (Juárez y Cruz, 2014). La uretra es un conducto largo no-recto, que en su trayecto se observan curvaturas y ensanchamientos en su lumen, por lo que

se le reconocen cuatro regiones: prostática, membranosa, bulbar y peneana (ver más adelante; Miller y Leavel, 1979; Hebel y Stromberg, 1986). Durante el reflejo de eyaculación, las secreciones de las distintas glándulas sexuales accesorias vierten su contenido en la uretra prostática. No obstante, las secreciones de las glándulas bulbouretrales son vertidas en la uretra bulbar, en el caso de la rata (Benson, 1994).

1.2 Anatomía de la uretra de la rata macho

La uretra de la rata, se encuentra dividida en cuatro regiones anatómicas, en las cuales existe variación en sus diferentes segmentos (Hebel y Stromberg, 1986) es decir, diferentes longitudes y diámetros. La uretra prostática, membranosa, bulbar y parte de la peneana se encuentran en la cavidad abdominal. El resto de la uretra peneana se localiza en el perineo. La uretra prostática es un conducto cilíndrico de 6 mm de largo y 1 mm diámetro interno. La uretra membranosa tiene 15 mm longitud, su forma es piramidal de base proximal, la parte más ancha tiene un diámetro interno proximal de 4 mm y 2 mm de diámetro distal, mismos que se reducen hasta medir 1 mm en su porción más angosta. La uretra bulbar tiene forma de saco cuya base mide 10 mm de diámetro interno. La uretra peneana comprende dos porciones, la interna en la cavidad abdominal y la externa en el periné. La uretra peneana interna mide 17 mm de largo; la externa, 7 mm. Toda la uretra peneana tiene un diámetro interno de 1 mm. Desde la uretra prostática hasta la peneana se observan dos curvaturas, la primera está en la región bulbar; la segunda al iniciar la peneana externa (Martínez Reyes 2003; Figura 1).

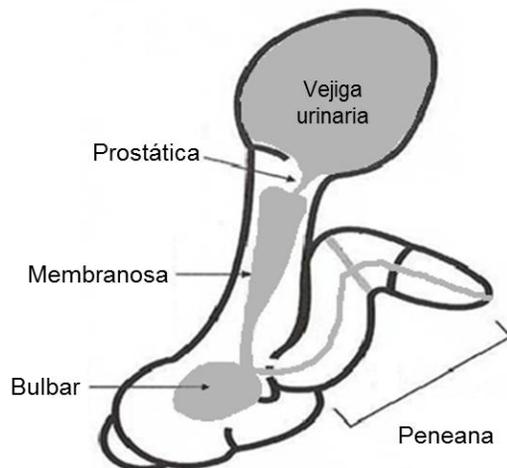


Figura 1. Se muestran los segmentos anatómicos de la uretra de la rata macho, inicia en la vejiga urinaria y finaliza en el meato uretral (modificada de Martínez Reyes, 2003).

1.3 Glándulas sexuales accesorias que participan en el eyaculado

1.3.1 Glándulas sexuales accesorias en mamíferos

Los mamíferos macho tienen glándulas sexuales accesorias que difieren en número, morfología y tamaño según la especie a la que pertenezca el macho, presentando siempre al menos una glándula, la próstata, como es el caso del perro. Incluso pueden presentar varios pares de una misma glándula (Setchell y cols., 1994). Las glándulas bulbouretrales se encuentran ausentes en los mamíferos acuáticos, mustélidos, osos y perros (Einarsson, 1971: citado en Setchell y cols., 1994), mientras que en los demás mamíferos presentan un par de bulbouretrales, sin embargo, los marsupiales tienen tres pares (Setchell y cols., 1994; Figura 2). Las vesículas seminales están presentes en la mayoría de los mamíferos, excepto en los carnívoros. La rata macho, como todos los roedores, presenta mayor número de glándulas accesorias, a saber, vesículas seminales, glándulas coagulantes, próstata dividida en tres lóbulos y glándulas bulbouretrales (Setchell y cols., 1994; Figura 3).

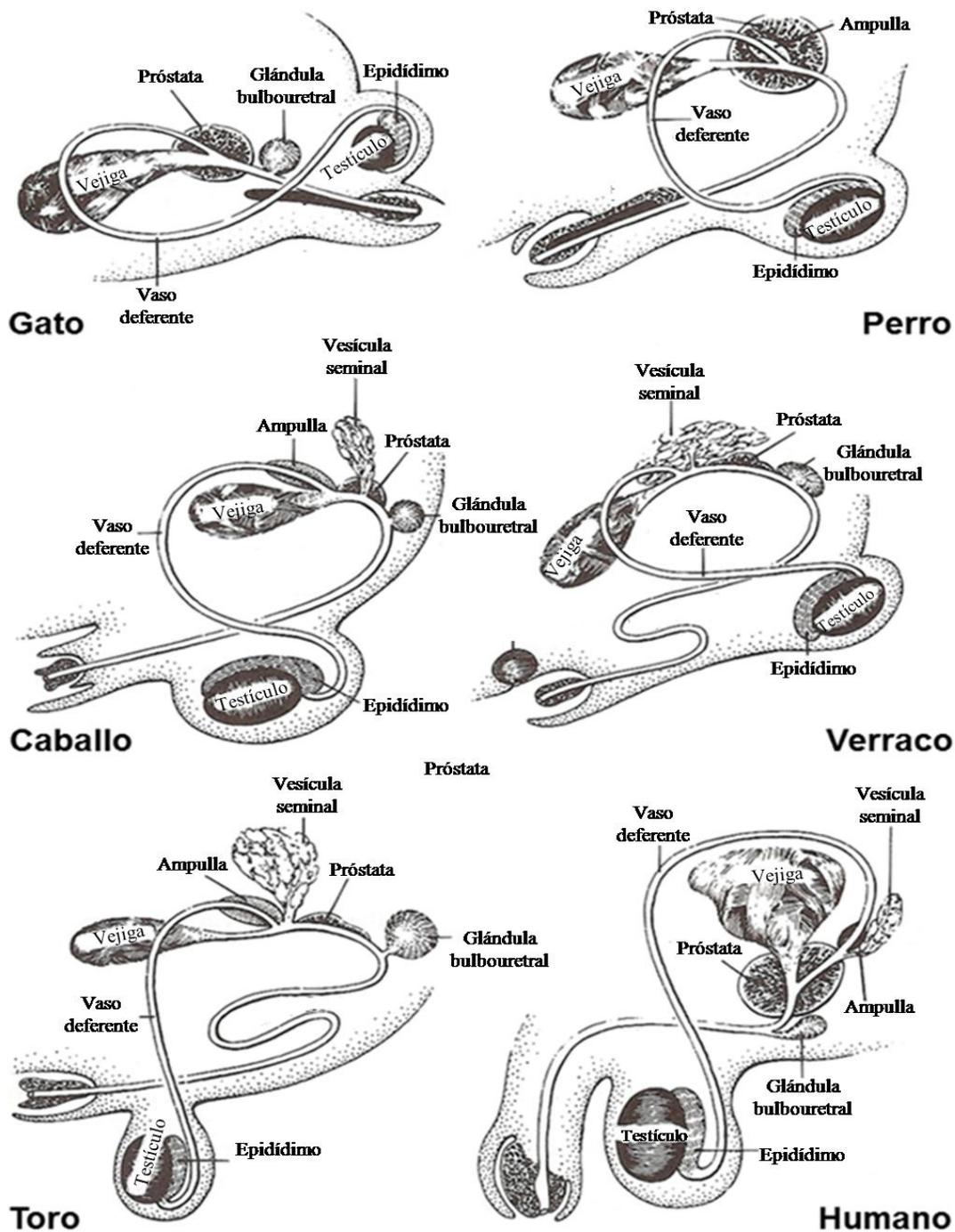


Figura 2. Representación del tracto genital de diferentes mamíferos donde se muestran las diferentes glándulas sexuales accesorias de cada especie de macho (modificada de Nalbandov, 1976).

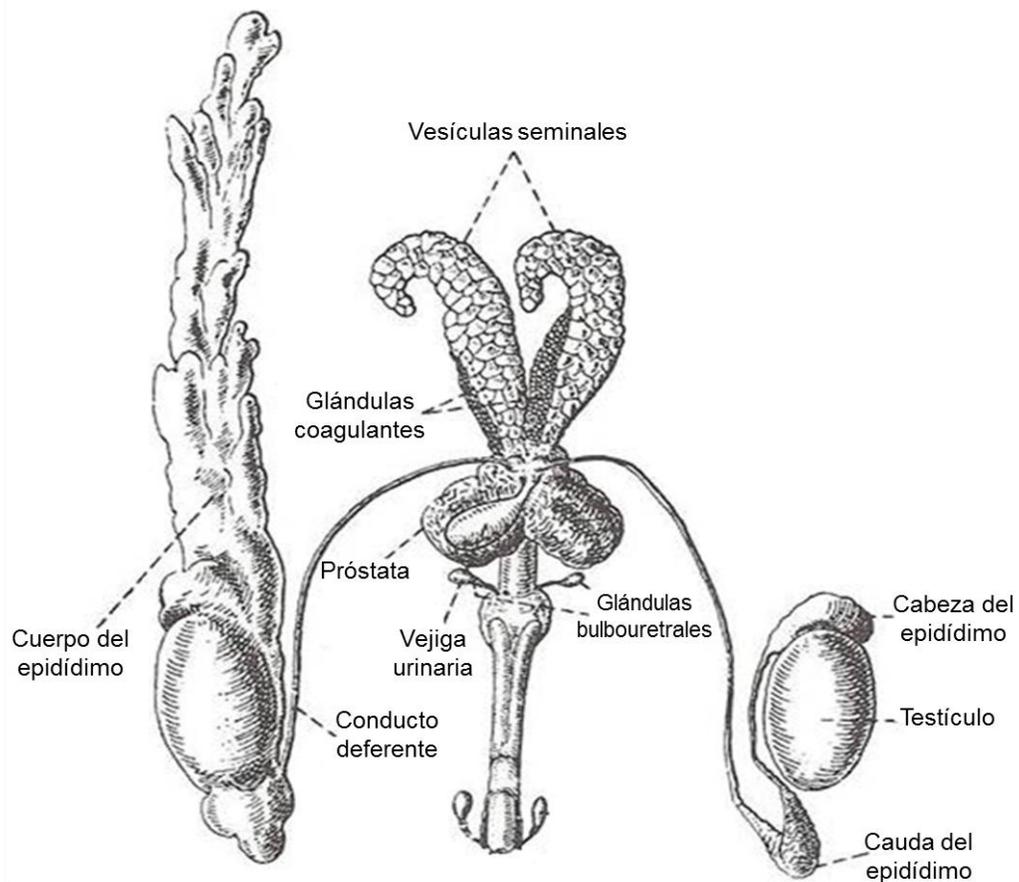


Figura 3. Se muestran las diferentes glándulas sexuales accesorias de la rata macho (modificada de Zuckerman, 1956).

Se ha mostrado que la actividad de las glándulas sexuales accesorias es influenciada por los andrógenos, testosterona y 5- α -dihidrotestosterona (Poiani, 2006), actuando directamente sobre las glándulas. En el toro, al inyectar testosterona directamente en las vesículas seminales, transcurridas tres semanas se observa que contienen cuatro veces más fructuosa y ácido cítrico que los machos intactos (Mann, 1974). En la rata se ha observado correlación entre la concentración de testosterona y el tamaño de las glándulas sexuales accesorias, ya que la disminución de la concentración de testosterona, reduce el tamaño de las glándulas (Melis, 1999).

La mezcla de secreciones de las glándulas sexuales accesorias, forman el plasma seminal que junto con los espermatozoides constituyen el eyaculado o semen (Setchell y cols.,

1994). El plasma seminal sirve de vehículo para transportar a los espermatozoides, desde la uretra prostática, hasta el meato uretral, donde serán expulsados y en caso de ocurrir la cópula, serán depositados en la vagina. Así mismo, provee protección y nutrientes (zinc, fructosa) a los espermatozoides durante su trayecto en el tracto reproductor femenino (Luke y Coffe., 1994). Además, se ha mencionado que en el hombre, del 100 % del fluido seminal expelido durante la eyaculación, el 99% corresponde al plasma seminal y el 1 % a los espermatozoides (Setchell y cols., 1994).

Cuando el semen es colectado artificialmente, es decir, por electro-eyaculación, se afecta la contribución de las secreciones de las glándulas accesorias, porque su liberación es dependiente de la posición de los electrodos estimulantes (Setchell y cols., 1994).

El plasma seminal cumple principalmente tres papeles en la reproducción: 1) contribuye al proceso de capacitación espermática (Poiani, 2006). 2) influye en la competencia espermática, porque sirve para formar tapones seminales, además de transportar espermicidas que modifican la velocidad de los espermatozoides (Poiani, 2006). 3) contribuye al proceso de fertilización, facilitando el movimiento de los espermatozoides (Poiani, 2006). Cada glándula sexual accesoria secreta diferentes sustancias (fructosa, ácido cítrico, zinc, proteínas) constituyentes del plasma seminal.

Las vesículas seminales contribuyen con el mayor volumen del semen y sus secreciones contienen fructosa y sorbitol, que actúan como fuentes energéticas para los espermatozoides. Estos compuestos se encuentran en concentraciones elevadas en toros y carneros. En jabalíes y caballos sus concentraciones son bajas. Además, contienen fosfatos y carbonatos cuya función es proteger a los espermatozoides de los cambios del pH en la vagina de la hembra (Setchell y cols., 1994).

Las secreciones de las glándulas bulbouretrales en el toro tienen la función de limpiar la uretra de residuos de orina antes de que ocurra la eyaculación. En el jabalí el componente es la sialomucina que es la responsable de gelatinizar el semen (Setchell y cols., 1994).

La próstata es la fuente principal de ácido cítrico, además, sus secreciones son ricas en iones tales como, sodio, cloro, calcio, magnesio y zinc.

Las glándulas accesorias son importantes, ya que si no funcionan correctamente causan infertilidad, como se ha demostrado en el hombre (Philippov y cols., 1998). La extracción de las vesículas seminales y glándulas coagulantes en el ratón, se asocia con la reducción en la

fertilidad (Suzuki y cols., 1994). Sin embargo, la extirpación de las glándulas accesorias en el hámster dorado, pueden o no afectar la fertilidad, dependiendo de la glándula removida (Jiang y cols., 2001).

1.3.2 Glándulas sexuales accesorias en la rata

Próstata. Esta glándula se localiza anterior a la vejiga urinaria y posterior a las vesículas seminales. Rodea a la uretra prostática (Lee y cols., 1999). Está dividida en tres pares de lóbulos: ventrales, dorsales y laterales (Hebel y Stromberg, 1986). En la rata, la forma es difusa, ya que está formada por acinos glandulares y cada uno drena en la uretra por múltiples ductos. Los lóbulos ventrales tienen superficie curva y longitud de 14-17 mm. Los lóbulos dorsales y laterales tienen 26.7 mm de largo (Hebel y Stromberg, 1986). Cada par de lóbulos secreta diferentes componentes, los ventrales citratos y poliaminas, como la espermidina y espermita (Rosenthal y Tabor, 1956; Pegg y cols., 1970). Esta última se relaciona con la movilidad y fertilización de los espermatozoides (Pegg y cols., 1970). Los lóbulos dorsales secretan mayor cantidad de fructosa (Wilson y French, 1980). La secreción de los lóbulos laterales es poco conocida. En el hombre, la próstata aporta 0.5 ml de un total de 3 ml (Luke y Coffe, 1994).

Glándula bulbouretral. En la rata se localiza cerca del bulbo del pene y se conecta a la uretra por un ducto (Sikorski, 1978). Es una glándula pareada, con forma esférica y mide 5 mm de diámetro (Hebel y Stromberg, 1986; Setchell y cols., 1994). Secreta mucoproteínas cuya función es neutralizar el pH y revestir la pared uretral antes de que ocurra la expulsión seminal (Setchell y cols., 1994). En el hombre aportan 0.1-0.2 ml del total de volumen expelido que corresponde a 3 ml (Luke y Coffe, 1994). La glándula bulbouretral también es llamada de Cowper.

Vesícula seminal. En la rata se localiza dorso-lateral a la vejiga urinaria, es una glándula pareada, tiene pliegues de forma irregular. Cada vesícula mide 17-25 mm de longitud, 8-11 mm de ancho y 5-6 mm de grosor (Hebel y Stromberg, 1986), (Setchell y cols., 1994). Son las responsables de la secreción de fructosa (Fouquet, 1971; Mann, 1974) y sorbitol, que actúan como fuentes energéticas para los espermatozoides. Además, contiene fosfatos y carbonatos cuya función es proteger a los espermatozoides de cambios de pH (Setchell y cols., 1994). Contribuyen con el mayor volumen del semen. Se ha encontrado que

en el semen del humano aportan de 1.5-2 ml de un total de 3 ml expelidos (Luke y Coffe, 1994). Principalmente, secreta proteínas (SVS I-SVS VII), que contribuyen a la formación del tapón seminal en la rata (William-Ashman, 1983).

Glándula coagulante. Se adosa a la pared cóncava de la vesícula (Jesik y cols., 1982). Es una glándula pareada, tiene forma de pequeño saco; su longitud varía de 3-6 mm (Hebel y Stromberg, 1986) y sólo está presente en los roedores (Setchell y cols., 1994). Su secreción contiene una enzima llamada vesiculasa, que al unirse con las proteínas secretadas por las vesículas seminales, forman el tapón seminal (Williams-Ashman, 1984). Las glándulas coagulantes también se conocen con el nombre de próstata anterior (Setchell y cols., 1994).

1.3.4 Glándulas sexuales y tapón seminal de la rata macho

Cuando la eyaculación ocurre, se mezclan las secreciones de las vesículas seminales y las glándulas coagulantes. Así, la mayor parte del fluido seminal se coagula y endurece para formar un **tapón seminal** y el resto de tal fluido llega a los cuernos uterinos (Wallach y Hart, 1983; Williams-Ashman, 1983). El tapón seminal se adhiere al cérvix y a las paredes vaginales adquiriendo la forma de copa (Blandau, 1945; Matthews y Adler, 1977).

Función: El tapón seminal tiene diferentes funciones: a) previene la salida del semen de la vagina de la hembra (Leuckart, 1847: citado en Carballada y Esponda, 1993) b) bloquea la inseminación inmediata de subsecuentes machos (Martan y Shepherd, 1976) y c) facilita el transporte espermático transcervical (Blandau, 1945). Esto es posible, porque el tapón seminal se adhiere fuertemente al cérvix y a las paredes vaginales, ejerciendo una presión que impulsa a los espermatozoides depositados en la vagina, a cruzar el cérvix y así, llegar a los cuernos uterinos (Blandau, 1945). Además, se muestra que la localización adecuada del tapón seminal es importante para que ocurra el transporte espermático, lo cual fue evidenciado en machos que mantuvieron la pelvis hacia atrás o hacia adelante durante la eyaculación. En el primer caso, la cuenta obtenida fue de 43.4 millones de espermatozoides, mientras que en el segundo, la cuenta fue de 24.6 millones. Se observa que existe relación entre la posición del tapón seminal y el conteo espermático en útero, porque si los tapones no están alojados al menos tres cuartas partes en la unión vagino-cervical, el conteo disminuye (Matthews y Adler, 1978).

La adhesión adecuada del tapón seminal, también influye sobre el transporte espermático de la vagina hacia los cuernos uterinos. Se ha evidenciado que los lóbulos

dorsales de la próstata son los responsables de que el tapón se adhiera, cuando ésta no ocurre los espermatozoides permanecen en la vagina (Tlachi-López y cols., 2011).

Formación: Las características del tapón seminal, como son el tamaño y la forma de copa, se ven modificadas si no ocurre la inmovilidad coordinada de la pareja durante la eyaculación. Cuando no ocurren los segundos de inmovilidad, el tapón no se aloja en la posición adecuada (adosado al cérvix y a la vagina). Cuando la cantidad de secreción seminal es menor, se observa una concavidad en la parte proximal del tapón (Carballada y Esponda, 1993).

En estudios *in vitro* se separaron las diferentes fracciones de las secreciones de las vesículas seminales: la fracción A contiene prolina, nitrógeno y proteínas, la fracción B contiene proteínas. Esta fracción puede ser degradada por colagenasa parecida a la peptidasa (CLP) (Koren y cols., 1974). La fracción C contiene proteínas, que no puede ser degradada por CLP. Al mezclar las fracciones A, B y C con la enzima vesiculasa, se observa que esta mezcla forma un coagulado compacto de apariencia similar a la del tapón seminal. Esto mismo se obtiene al excluir la fracción C. Con esto, se evidencia que la prolina es rica en péptidos y juega un papel principal en la estructura del tapón seminal (Koren y cols., 1975).

2. ANTECEDENTES

2.1. Extirpación de las glándulas sexuales accesorias

Se han extirpado diferentes glándulas sexuales accesorias, para conocer su importancia en la conducta copulatoria, fertilidad y eyaculado de la rata macho. Las vesículas seminales y glándulas coagulantes, son los dos pares de glándulas sobre las que se enfoca el presente trabajo, por lo que solo se mencionará el efecto de la extirpación de dichas glándulas.

2.1.1. Extirpación de las vesículas seminales

Conducta copulatoria. Se ha realizado la extracción completa de las vesículas seminales, para conocer su efecto sobre los valores de los parámetros copulatorios de la rata macho, encontrando que éstos no se modifican después de la cirugía (Cukierski y cols., 1991). Asimismo, los machos son capaces de alcanzar la saciedad sexual, sin modificar sus parámetros ni el número de series eyaculatorias (Beach y Wilson, 1963).

Fertilidad. Se ha demostrado que la remoción completa de las vesículas seminales afecta la fertilidad, ya que los machos son infértiles (Cukierski y cols., 1991). La completa extracción las vesículas seminales, afecta la fertilidad del macho, dado que no hay embriones 14 días después del apareamiento (Carballada y Esponda, 1992). En otros estudios después de la cohabitación con los machos no se encontraron crías transcurrido el tiempo de gestación (Queen y cols., 1981).

Eyaculado. Se ha observado que la extracción de diferentes porciones de las vesículas seminales, está relacionada con el decremento del conteo espermático en útero, En virtud de que una mayor extirpación de porciones de las vesículas (1/3, 1/2, 2/3, de cada una, una glándula completa o ambas) disminuye el conteo espermático en útero y aumenta en vagina. A su vez, ambos conteos se correlacionan con la reducción del peso del tapón seminal, ya que, conforme se van extirpando más porciones de vesículas, el peso del tapón va en declive (Carballada y Esponda, 1992). Se ha observado que después de la completa ablación de las vesículas seminales, el macho no produce tapón seminal y, por consecuencia, no ocurre el transporte espermático y todos los espermatozoides se quedan en la vagina (Cukierski y cols., 1991). Sin embargo, la extracción de los espermatozoides del epidídimo, mostró que estos son capaces de fertilizar después de realizar la inseminación intrauterina (Cukierski y cols., 1991).

2.1.2 Extirpación de glándulas coagulantes

Fertilidad. Después de la completa ablación de las glándulas coagulantes, las ratas macho se vuelven infértiles, dado que transcurrido el tiempo de gestación no hay camadas (Queen y cols., 1981).

Eyaculado. La ablación de las glándulas coagulantes, muestra que las secreciones de dichas glándulas parecen ser indispensables para la formación del tapón seminal, porque en el 53% de los machos, después de la cópula, no se forma el tapón seminal en la vagina de la hembra y no ocurre el transporte espermático. En el 47 % restante, sí se forman los tapones, sin embargo, son de diferentes tamaños y pesos. El 27 % produce tapón de tamaño moderado y el conteo espermático disminuye un 65 %, es decir, sólo el 45 % logra cruzar el cérvix, por lo que, estos machos son fértiles. El 20 % restante de los machos produce tapones de tamaños muy pequeños y sólo un macho logra ser fértil (Carballada y Esponda, 1992).

2.1.3 Formación, constitución y presencia del tapón seminal

Formación. Existe controversia respecto a la formación del tapón seminal. Algunos dicen que la rata macho deposita el semen y un coagulado seminal (tapón seminal) en la vagina de la hembra (Chester y Zucker, 1970). Otros concuerdan con esta descripción, diciendo que durante la eyacuación, un tapón copulatorio es depositado en la vagina de la hembra después de una masa espermática (Wilson y cols., 1965). Esto sugiere que el tapón seminal ya está formado dentro de la uretra del macho. En cambio, otros consideran que la rata expelle espermatozoides, seguido de secreciones de las glándulas accesorias y que el tapón seminal se forma dentro de la vagina (Wallach y Hart, 1983).

La estimulación eléctrica del nervio intermesentérico, muestra que la rata macho anestesiada, expelle el tapón seminal cuando se contraen las vesículas seminales y los músculos bulboesponjosos, además, son acompañados de las erecciones intensas (Bernabé y cols., 2007). Las emisiones seminales espontáneas apoyan la idea de que el tapón es expulsado, estas emisiones ocurren cuando el macho no ha tenido actividad copulatoria, para la colecta del eyaculado se colocaron hojas de papel debajo de la jaula donde habitaba el macho, con el fin de que al momento que expeliera el semen este fuera depositado en la hoja,

observando que existe la presencia de tapones seminales en la eyaculación (Kihlström, 1966; Beach, 1975).

Constitución: El análisis microscópico del tapón seminal, muestra que los machos con aparato reproductor intacto producen tapones sólidos, homogéneos que se adhieren a la pared vaginal de la hembra después de la cópula. En cambio, tapones producidos por machos sometidos a la extirpación de porciones de las vesículas seminales, son blandos y de menor tamaño. Estos tapones tienen apariencia de copa en la región de la abertura cervical, la cual está llena de espermatozoides (Carballada y Esponda, 1993; Figura 4).

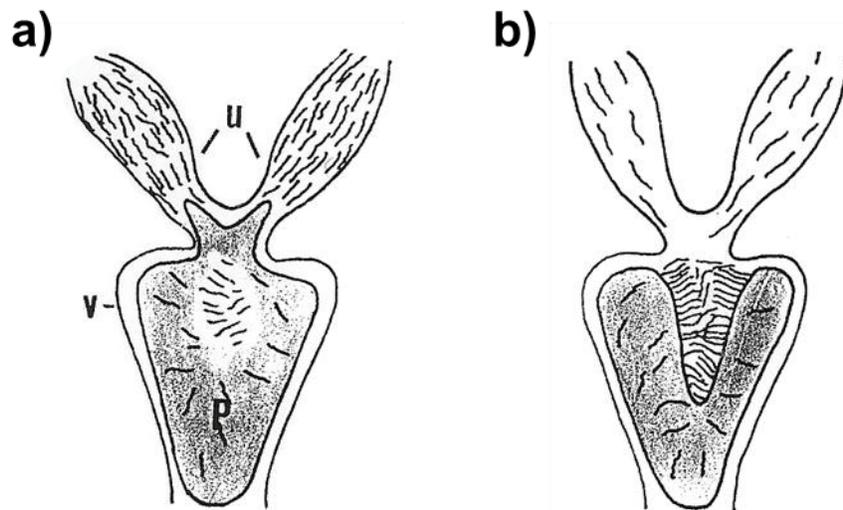


Figura 4. Se muestra la estructura del tapón seminal y distribución de los espermatozoides en la vagina y cuernos uterinos. a) tapón de un macho intacto llenando la vagina, b) tapón seminal de un macho que le fueron extirpados segmentos de las vesículas seminales, el tapón presenta la forma de copa en la región proximal llena de espermatozoides, v=vagina con tapón en cuyo centro se encuentran espermatozoides, u= cuernos uterinos, p= tapón seminal (modificada de Carballada y Esponda, 1993).

Se ha mostrado que el tapón seminal está compuesto por dos partes: la región central, conformada principalmente por un gran número de espermatozoides, y la región periférica compuesta por fluido seminal (Lataste, 1883: citados en Carballada y Esponda, 1993). En la región central existen espermatozoides entrelazados y mezclados con las secreciones que constituyen al tapón. Esto indica que los espermatozoides forman un esqueleto (Carballada y Esponda, 1993). Además, se ha propuesto que estos espermatozoides son morfológica y fisiológicamente adaptados para actuar como “kamikazes”, al “sacrificarse” para desempeñar una función distinta de la fecundación. El número de espermatozoides “kamikazes” es bajo. Por ejemplo, en un eyaculado de 60 millones de espermatozoides, alrededor del 1-5% corresponde a los “kamikazes” (Baker y Bellis, 1988).

Presencia: El tapón seminal se encuentra presente en diferentes regiones de la uretra de roedores machos adultos, cabe mencionar que estos machos no han tenido actividad copulatoria (Kunstyr y cols., 1982). Los tapones se localizan desde la vejiga urinaria hasta el prepucio, aunque usualmente se encuentran en la uretra proximal, causando sólo oclusión parcial, sin presentar dificultad al momento de orinar (Figura 5). Tales tapones uretrales pesan en promedio 0.063 g. Treinta días después de la remoción de las vesículas seminales se observa que el peso de los tapones obtenidos de las uretras disminuye significativamente (Kunstyr y cols., 1982).

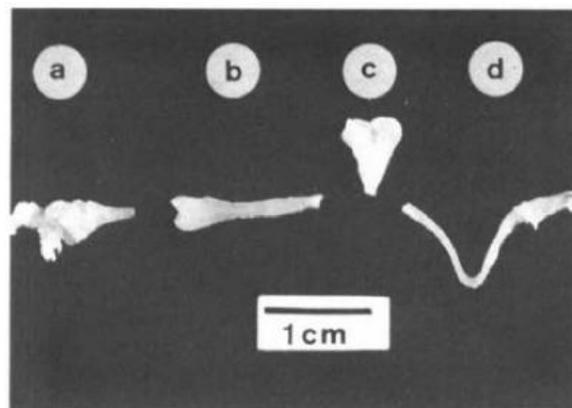


Figura 5. Tapones extraídos de las uretras masculinas. a: encontrado en la vejiga urinaria; b: en la uretra proximal; c: divertículo uretral o uretra bulbar; d: uretral distal y prepucio (modificada de Kunstyr y cols., 1982).

Se realizaron experimentos donde mezclaron las secreciones de las vesículas seminales, más bulbouretrales o bien de vesículas seminales más coagulantes, se observa la producción de coagulado débil, mientras que si se mezclan las secreciones de las tres glándulas, se produce un coagulado fuerte (Hart y Greestein, 1968).

3. JUSTIFICACIÓN

La rata de laboratorio ha sido una de las especies más utilizadas en los estudios reproductivos. Sobre la rata, existen numerosos trabajos que detallan su conducta copulatoria, así como su fisiología sexual, sin embargo, algunas interrogantes aún permanecen sin contestar. Por ejemplo, se desconoce si el tapón seminal que se encuentra en la vagina inicia su formación en la uretra del macho, durante las intromisiones pre-eyaculatorias, así como la participación de las glándulas coagulantes y vesículas seminales en este proceso. De no ser así, entonces el tapón se formaría hasta después de la expulsión seminal dependiendo esta formación de las secreciones de las glándulas coagulantes. Así, la presente propuesta de estudiar la formación del tapón seminal ayuda a entender detalles del proceso de la emisión seminal como parte de la eyaculación.

4. HIPÓTESIS

El tapón seminal inicia su formación en la uretra de la rata macho durante las intromisiones pre-eyaculatorias. La formación culmina en la vagina después de la expulsión seminal durante la eyaculación, en el encuentro copulatorio. Dicho proceso se debe a la aportación de las secreciones de las vesículas seminales y glándulas coagulantes.

5. OBJETIVO GENERAL

Evidenciar que la formación del tapón seminal inicia en la uretra masculina y culmina en la vagina durante el encuentro copulatorio de la rata y que la formación del tapón depende de las secreciones de las glándulas coagulantes y vesículas seminales.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Constatar la presencia de tapones seminales en la uretra de los machos después de realizar 3 intromisiones ó 6 intromisiones previas a la eyaculación.
- 2) Conocer la participación de las glándulas coagulantes sobre la formación de los tapones seminales en la uretra de los machos después de realizar 3 intromisiones, 6 intromisiones ó 1 eyaculación.
- 3) Determinar la contribución de las vesículas seminales sobre la formación de los tapones seminales en la uretra de los machos, después de realizar 3 intromisiones, 6 intromisiones ó 1 eyaculación.
- 4) Determinar la contribución de las glándulas coagulantes más vesículas seminales sobre la formación de los tapones seminales en la uretra de los machos después de realizar 3 intromisiones, 6 intromisiones ó 1 eyaculación.
- 5) Verificar la presencia de tapones seminales en la vagina de las hembras, después de la eyaculación de machos sin glándulas coagulantes, vesículas seminales o ambas glándulas.

7. METODOLOGÍA

7.1 Animales

Se utilizaron ratas de la cepa *Wistar*, machos y hembras sexualmente maduras, de 3 meses de edad. Los machos pesaron alrededor de 300 gramos y las hembras pesaron 250 gramos aproximadamente. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, con ciclo invertido de luz-oscuridad 12-12 horas (la luz se apagaba a las 8:00 horas. Se les proporcionó alimento (Rodent Laboratory Chow 5001) y agua *ad libitum*. El protocolo experimental fue aprobado por el comité de animales de laboratorio, de acuerdo con las líneas del Consejo Mexicano sobre el Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM-062-Z00-1999).

7.2 Pruebas de entrenamiento copulatorio

Las pruebas de entrenamiento copulatorio de los machos se realizaron durante la fase oscura del ciclo invertido de luz-oscuridad. Además, de los machos, se utilizaron hembras, las cuales fueron previamente ovariectomizadas y tratadas con 10 µg de estradiol y 2 mg de progesterona, a las 48 y 4 horas previas a la prueba copulatoria, para la inducción del estro. Así mismo, se utilizó un redondel de observación cuyo diámetro y altura eran de 60 centímetros, en el cual el macho se introdujo durante 5 minutos para su habituación; posteriormente, la hembra con estro inducido fue introducida al redondel para dar inicio a la prueba copulatoria. Dada la inexperiencia sexual de los machos, las pruebas terminaron cuando se cumplieron los siguientes criterios: 1) a los 15 minutos después de iniciada la prueba, si el macho no tenía actividad sexual o sólo realizaba montas, 2) a los 30 minutos después de la primera intromisión, aunque el macho no eyaculara, o bien 3) en el momento en que ocurría la eyaculación. Los machos fueron sometidos a cuatro pruebas copulatorias, con tres días de intervalo entre ellas (Lucio y Tlachi-López, 2008). Los machos sexualmente inexpertos fueron sometidos a 4-6 pruebas de entrenamiento copulatorio. Sólo aquellos machos que eyacularon en las seis o en sus últimas cuatro pruebas, fueron considerados como sexualmente expertos e incluidos en los grupos experimentales, mismos que fueron sometidos a pruebas copulatorias post-cirugía.

7.3 Grupos experimentales

Una vez que los machos adquirieron la experiencia para ser considerados sexualmente expertos, les fue realizada la cirugía, dos días después de la última prueba copulatoria. Las cirugías fueron distintas dependiendo del grupo experimental: cirugía simulada, extirpación de las glándulas coagulantes, extirpación de las vesículas seminales y extirpación de ambas glándulas. Después de cada cirugía, se dejaron transcurrir dos semanas para realizar la prueba copulatoria post-cirugía correspondiente.

7.3.1 Cirugía simulada de extirpación bilateral de glándulas coagulantes y vesículas seminales (Sim)

Los machos (n = 17) fueron anestesiados con pentobarbital sódico (26 mg/kg de peso, Pet's Pharma de México, vía intraperitoneal). Se les rasuró la región abdominal, se les aplicó cloruro de benzalconio al 10%, para desinfectar la región y se realizó una incisión longitudinal en la pared abdominal sobre la línea media, para exponer las vísceras abdominales. Los intestinos y el estómago fueron colocados fuera de la cavidad abdominal y se cubrieron con gasa humedecida con solución salina fisiológica al 0.9%, a 37° C. Posteriormente, se identificaron las vesículas seminales y las glándulas coagulantes que están adosadas a las primeras (Figura 6). Con una pinza de disección, se sujetó una de las glándulas coagulantes por el ápice y suavemente se separó de la vesícula seminal correspondiente con un hisopo, hasta llegar a su conducto. Las glándulas del lado contralateral, tuvieron la misma manipulación. Después, los intestinos y el estómago fueron introducidos nuevamente a la cavidad abdominal. La pared muscular y la piel fueron suturadas utilizando una aguja e hilo seda. Al término de la cirugía, el macho fue colocado en una jaula con cama de aserrín y una lámpara de calor hasta su recuperación.

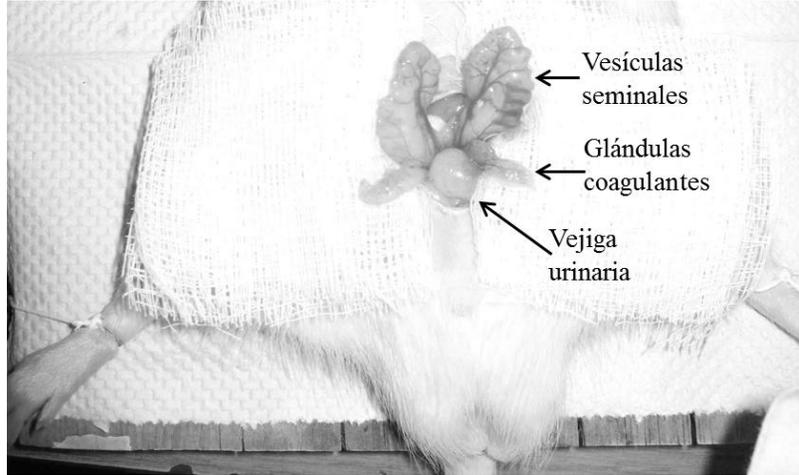


Figura 6. Región abdominal del macho sexualmente experto con cirugía simulada. Note que las glándulas coagulantes están separadas de las vesículas seminales.

7.3.2 Extirpación bilateral de glándulas coagulantes (GCx)

Con este grupo de machos (n = 19) se siguió el mismo procedimiento de la cirugía simulada aunque, una vez que fueron separadas las glándulas coagulantes se ligaron sus conductos y las coagulantes fueron extraídas de la cavidad abdominal (Figura 7).

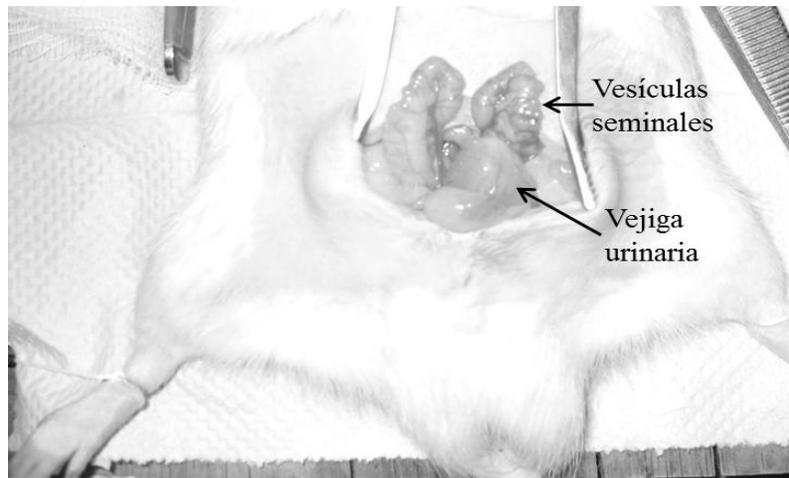


Figura 7. Región abdominal del macho sexualmente experto con extirpación bilateral de las glándulas coagulantes, sólo se observan las vesículas seminales.

7.3.3 Extirpación bilateral de vesículas seminales (VSx)

Con este grupo de machos (n = 19) se realizó la misma manipulación de la cirugía simulada, y después de haber separado las glándulas coagulantes de las vesículas seminales, se ligaron los conductos de estas últimas para extraerlas de la cavidad abdominal (n= 19 animales; Figura 8).

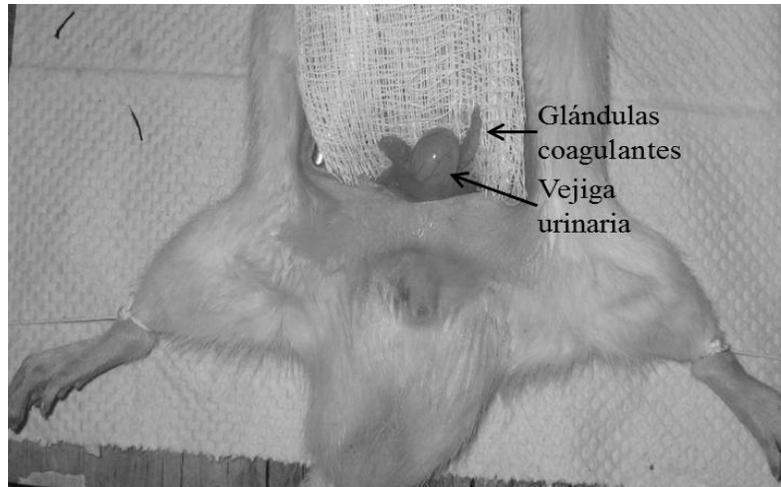


Figura 8. Región abdominal del macho sexualmente experto con extirpación bilateral de las vesículas seminales, sólo se muestran las vesículas seminales.

7.3.4 Extirpación bilateral de las glándulas coagulantes y vesículas seminales (GCx+VSx)

En este grupo de machos (n = 6) la cirugía se realizó de manera similar al procedimiento mencionado para la cirugía simulada. Además, se localizaron y ligaron los conductos tanto de las glándulas coagulantes como de las vesículas seminales para extraer ambos pares de glándulas de la cavidad abdominal (n= 6 animales).

7.3.5 Pruebas copulatorias post-cirugía de tres o seis intromisiones o una eyaculación

Con el fin de determinar la influencia de las intromisiones en la formación del tapón seminal, los machos de cada grupo experimental fueron sometidos a una de estas tres pruebas copulatorias: tres intromisiones (machos Sim, CGx y VSx), seis intromisiones (machos Sim,

CGx y VSx) o una eyaculación (machos Sim, GCx, VSx y GCx+VSx). Cabe mencionar que a los machos se les permitió realizar una serie eyaculatoria, 30 minutos antes de iniciar la prueba correspondiente, para descartar la posibilidad de que la uretra tuviera residuos de secreciones de las glándulas accesorias. Al término de cada prueba de 3 y 6 intromisiones los machos fueron sacrificados para revisar la uretra. Al grupo de machos que se les permitió eyacular, se les revisó la uretra, a las hembras se les revisó tanto la vagina como los cuernos uterinos.

7.3.5.1 Revisión de la uretra del macho después de las pruebas de tres o seis intromisiones o una eyaculación

Al concluir las pruebas, los machos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (26 mg/kg de peso, Pet's Pharma de México, vía intraperitoneal). Se rasuró la piel abdominal. El área fue desinfectada con cloruro de benzalconio al 10%. Se realizó una incisión en la línea media, iniciando desde el meato uretral hasta el cuello de la vejiga urinaria, para exponer la uretra en sus cuatro regiones (prostática, membranosa, bulbar y peneana). La uretra fue cuidadosamente revisada en toda su longitud, con la finalidad de encontrar el tapón uretral preformado. Los tapones encontrados fueron retirados para medir sus parámetros: peso y tamaño. El peso, expresado en miligramos, se determinó utilizando una balanza analítica. El tamaño, expresado en milímetros (largo y ancho), se determinó utilizando un vernier digital. Al finalizar el análisis, los machos fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico.

7.3.5.2 Exploración de la vagina y cuernos uterinos de la hembra después de la prueba de una eyaculación

Cinco minutos después de haber ocurrido la eyaculación, las hembras fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (26 mg/kg de peso, Pet's Pharma de México, vía intraperitoneal). Se les rasuró la piel abdominal, se aplicó cloruro de benzalconio al 10% para desinfectar la región. Posteriormente, se realizó una incisión sobre la línea media del abdomen. Se localizaron los cuernos uterinos y se ligaron en sus extremos proximal y distal. Los cuernos se extrajeron de la cavidad abdominal y se colocaron en una caja Petri con solución salina a 37 °C, para retirarles los vasos sanguíneos y la grasa adyacente. Una vez que los cuernos quedaron limpios, fueron cortados sus extremos proximales, para depositar su contenido en un tubo de

microcentrífuga, que se mantuvo en un termo-baño a 37 °C (Figura 9; Lucio y Tlachi-López, 2008).

Para la obtención del tapón, se separó la sínfisis púbica y se realizó una incisión longitudinal en la pared de la vagina. Se desprendió y extrajo el tapón vaginal y se midieron sus parámetros: peso y tamaño.

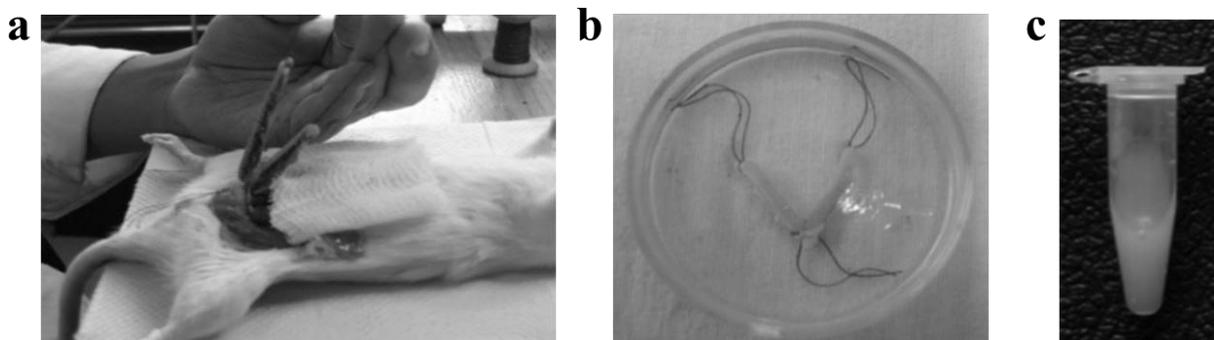


Figura 9. Obtención del semen contenido en los cuernos uterinos. a) disección de los cuernos uterinos. b) cuernos uterinos limpios sumergidos en solución salina. c) fluido seminal de los cuernos uterinos dentro de un tubo de microcentrífuga (Lucio y Tlachi-López, 2008).

El fluido de los cuernos uterinos se obtuvo para realizar la cuenta espermática. Esta se define como el número de espermatozoides expresado en millones por mililitro. Para ello, se determinó primero la densidad espermática. Se tomaron 10 μl del fluido colectado, se vertieron en un portaobjetos y se le puso un cubreobjetos. La muestra se colocó en un microscopio óptico (Optiphot 2 Nikon) con el objetivo 20x. Tres campos al azar fueron seleccionados y se trazaron cinco líneas imaginarias en zig-zag. Todos los espermatozoides que tocaron las líneas fueron contados. Después se obtuvo el promedio de los tres campos. Una vez conociendo la densidad espermática, se determinó la dilución adecuada (Tabla 1; Lucio y Tlachi-López, 2008).

Para realizar la cuenta espermática, se utilizó una cámara de Neubauer. Después de haber elaborado la dilución correspondiente, se colocaron 10 μl en cada una de las dos cuadrículas de la cámara. Cada cuadrícula tiene 5 cuadrantes -A, B, C, D, E- (Figura 10). Sólo se contaron las cabezas de los espermatozoides que se encontraban dentro de la cuadrícula E (que incluye E₁, E₂, E₃, E₄ y E₅). El resultado se sumó, se promedió y multiplicó por

1,000,000. Se utilizó el objetivo 20x del microscopio óptico (Optiphot 2 Nikon) para realizar la cuenta.

Tabla 1. Dilución del semen según la densidad espermática.

Densidad espermática	Dilución del semen (semen:diluyente)
Mayor de 200	1:400
121-200	1:300
61-120	1:200
10-60	1:100

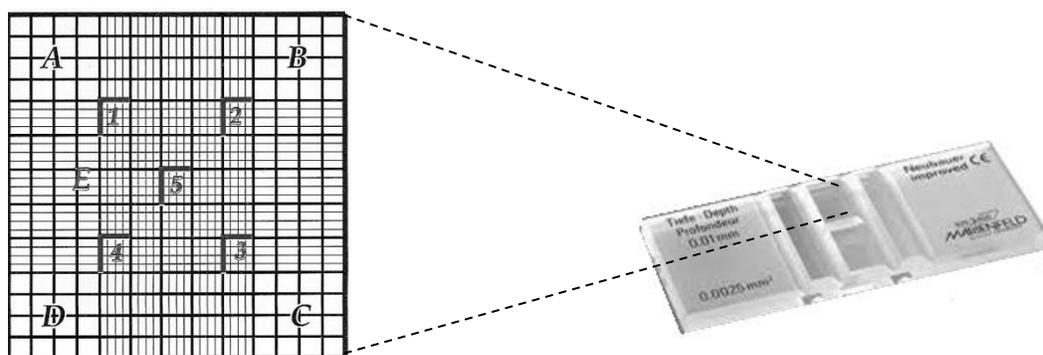
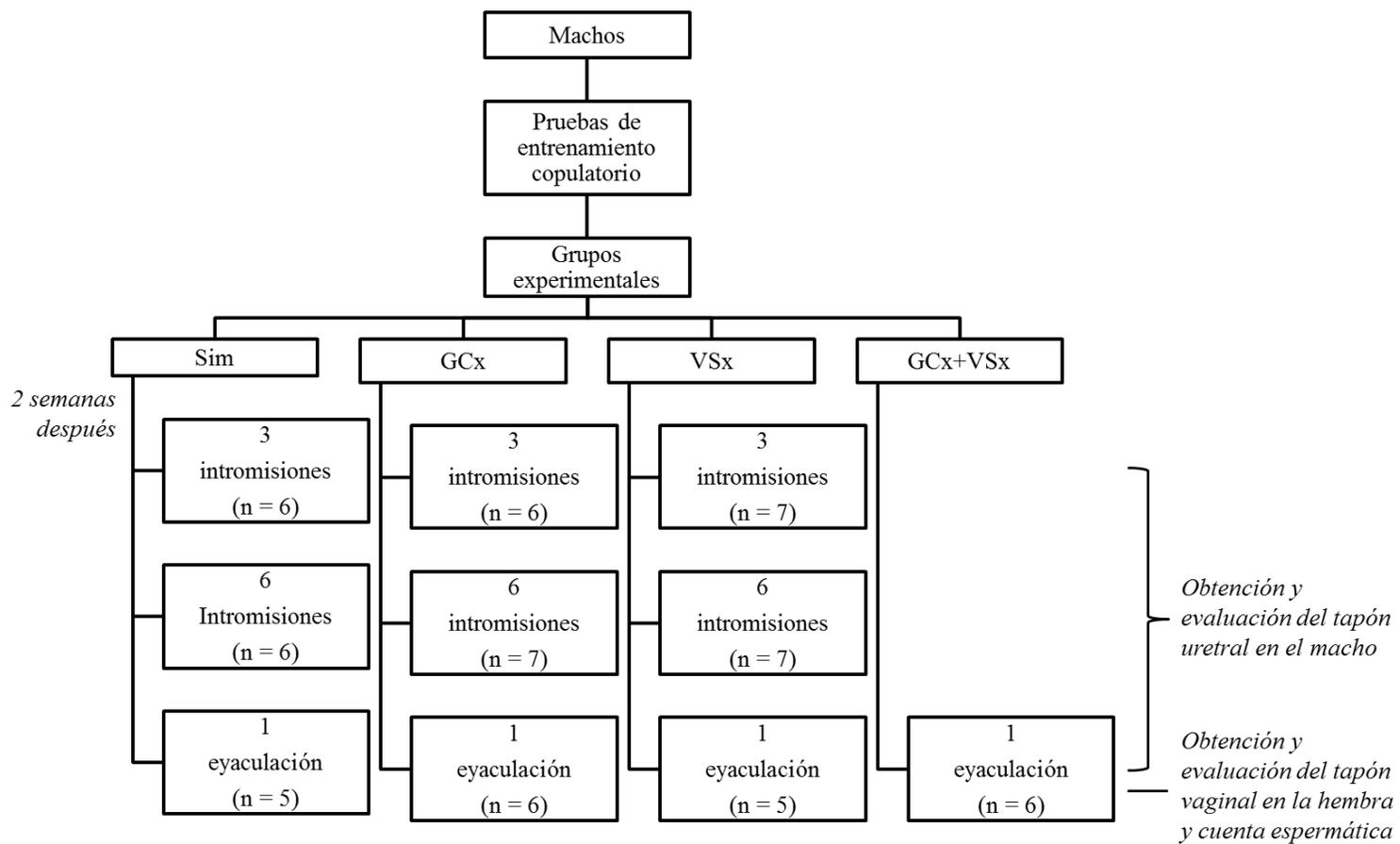


Figura 10. Cámara de Neubauer resaltando la vista detallada de una cuadrícula que muestra los cuadros A, B, C y D que corresponden a las esquinas de la cuadrícula y el cuadro E es el centro (tomada de Lucio y Tlachi-López, 2008).

7.4 Diseño experimental



Sim = cirugía simulada, GCx = extirpación bilateral de glándulas coagulantes, VSx = extirpación bilateral de vesículas seminales, GCx+VSx = extirpación bilateral de glándulas coagulantes más extirpación bilateral de vesículas seminales.

7.10 Análisis estadístico

Los datos de los parámetros de largo, ancho y peso de los tapones uretrales y vaginales, así como la cuenta espermática se analizaron mediante la prueba H de Kruskal Wallis, con valor de significancia de 0.05. Como la prueba post-hoc se empleó el ajuste de Bonferroni. El primer análisis estadístico se realizó considerando el tipo de la prueba copulatoria, es decir, tres o seis intromisiones o una eyaculación, cada una con sus manipulaciones experimentales de machos Sim, GCx y VSx. El segundo análisis estadístico se realizó para conocer el efecto de la ablación de las glándulas coagulantes y vesículas seminales, sobre los parámetros de los tapones tanto uretrales como vaginales, en los tres tipos de pruebas copulatorias.

El análisis estadístico se efectuó con el programa IBM SPSS Statistics Base 20.0. Las gráficas se realizaron con el programa Prism 6 para Windows, versión 6.01.

8. RESULTADOS

8.1 Entrenamientos copulatorios para la asignación de machos a distintas pruebas copulatorias (tres, seis intromisiones o una eyaculación)

Los machos que realizaron pocas intromisiones para eyacular (en promedio entre 9.13 y 10.38) se asignaron a las pruebas de tres intromisiones; los que presentaron mayor número de intromisiones (en promedio entre 9.5 y 13.92) fueron asignados a la prueba de seis intromisiones. Para el grupo de machos de una eyaculación, solo se consideraron los que eyacularon. Se consideraron solo aquellos machos que eyacularon en las últimas cuatro pruebas copulatorias (Tabla 2).

Tabla 2. Asignación de los machos a pruebas copulatorias y tipo de cirugía dependiendo de su entrenamiento copulatorio.

Entrenamientos copulatorios				Promedio individual	Promedio grupal	Promedio por tipo de prueba	Tipo de cirugía y prueba
1ro.	2do.	3ro.	4to.				
6	9	10	10	8.75	9.13	Sim 3 intromisiones	
6	9	13	7	8.75			
4	13	7	5	7.25			
10	15	11	11	11.75			
13	10	9	9	10.25			
7	8	9	8	8	9.46	GCx 3 intromisiones	
7	9	8	9	8.25			
14	9	11	8	10.5			
9	10	8	10	9.25			
11	9	11	13	11			
3	17	9	5	8.5	9.60	GCx 3 intromisiones	
10	7	11	9	9.25			
17	12	19	10	14.5			
5	8	9	9	7.75			
6	7	6	17	9			
15	5	5	11	9	10.21	VSx 3 intromisiones	
13	12	9	10	11			
8	17	9	10	11			
9	12	6	10	9.25			
11	12	7	11	10.25			
14	8	12	7	10.25	13.92	Sim 6 intromisiones	
16	17	21	13	16.75			
19	25	16	13	18.25			
10	11	18	23	15.5			
12	15	12	11	12.5			
17	12	17	14	15	11.57	GCx 6 intromisiones	
10	11	10	12	10.75			
16	12	14	8	12.5			
10	16	10	11	11.75			
11	8	12	13	11			
9	12	8	8	9.25	12.33	GCx 6 intromisiones	
17	10	6	10	10.75			
6	7	12	9	8.5			
13	14	8	7	10.5			
9	17	13	16	13.75			
12	15	11	11	12.25	11.50	VSx 6 intromisiones	
23	10	12	15	15			
8	10	4	19	10.25			
8	10	4	19	10.25			

Promedio (individual y grupal) del número de intromisiones que realizaron los machos para su asignación a las pruebas de copulatorias (de tres o seis intromisiones) y tipo de cirugía (Sim=simulada, GCx=Extirpación de coagulantes, VSx=Extirpación de seminales). Los datos resaltados en gris corresponden a los machos que en las pruebas copulatorias no presentaron tapones uretrales.

8.2 Formación del tapón seminal durante la cópula de los machos Sim, GCx y VSx

8.2.1 Tapones de machos Sim que ejecutaron tres o seis intromisiones o una eyaculación

Tapones seminales uretrales y vaginales

La mayoría de los machos con cirugía simulada (Sim) tuvieron tapones uretrales, cuando realizaron las pruebas de tres o seis intromisiones. En la prueba de tres intromisiones, el 83 % de los machos presentaron tapones, localizándose en la uretra membranosa, en el 17 % restante no hubo tapón uretral. Los machos que ejecutaron seis intromisiones presentaron tapones uretrales: 17 % en la uretra prostática y 66 % en la membranosa, el resto (17 %) no tuvo tapón. Las vaginas de las hembras utilizadas en las pruebas de tres o seis intromisiones, no fueron revisadas para verificar la ausencia o presencia del tapón, porque a los machos no se les permitió eyacular.

Los machos Sim que ejecutaron una eyaculación no presentaron tapones uretrales. Al revisar las vaginas de las hembras, en el 100% de ellas se encontraron tapones vaginales después de ocurrida la eyaculación.

Los tapones uretrales y los vaginales obtenidos de los machos con cirugía Sim, fueron estadísticamente diferentes entre ellos, respecto al largo (H de Kruskal Wallis = 9.620, gl = 2, p = 0.008), ancho (H de Kruskal Wallis = 9.833, gl = 2, p = 0.007) y peso (H de Kruskal Wallis = 9.446, gl = 2, p = 0.009). Los tapones uretrales obtenidos en las pruebas de tres intromisiones *versus* seis intromisiones, no mostraron diferencias significativas en cuanto al largo (Ajuste de Bonferroni, p = 0.54; Figura 11-I), ancho (Ajuste de Bonferroni, p = 0.42; Figura 11-II) ni peso (Ajuste de Bonferroni, 0.84; Figura 11-III). El tamaño de los tapones uretrales obtenidos después de tres intromisiones, fue 2.6 x 0.80 milímetros (largo x ancho; mediana) y 0.60 miligramos de peso (mediana) *versus* los tapones obtenidos con seis intromisiones, el tamaño fue 2.0 x 1.0 milímetros (largo x ancho) y 0.90 miligramos de peso. Cuando los tapones fueron obtenidos de las vaginas, la diferencia significativa fue evidente, respecto al largo (Ajuste de Bonferroni, p = 0.008; Figura 11-I), ancho (Ajuste de Bonferroni, p = 0.008; Figura 11-II), y peso (Ajuste de Bonferroni, p = 0.008; Figura 11-III) *versus* los tapones uretrales, porque los tapones de las pruebas de tres y seis intromisiones, fueron de

menor tamaño comparados con los de la eyaculación. El tamaño de los tapones vaginales fue de 11.5 x 5.3 milímetros (largo x ancho) y 89.8 miligramos de peso. Tanto los tapones uretrales como los vaginales fueron de forma cilíndrica y de consistencia dura y ésta se mantuvo en los tres tipos de pruebas copulatorias.

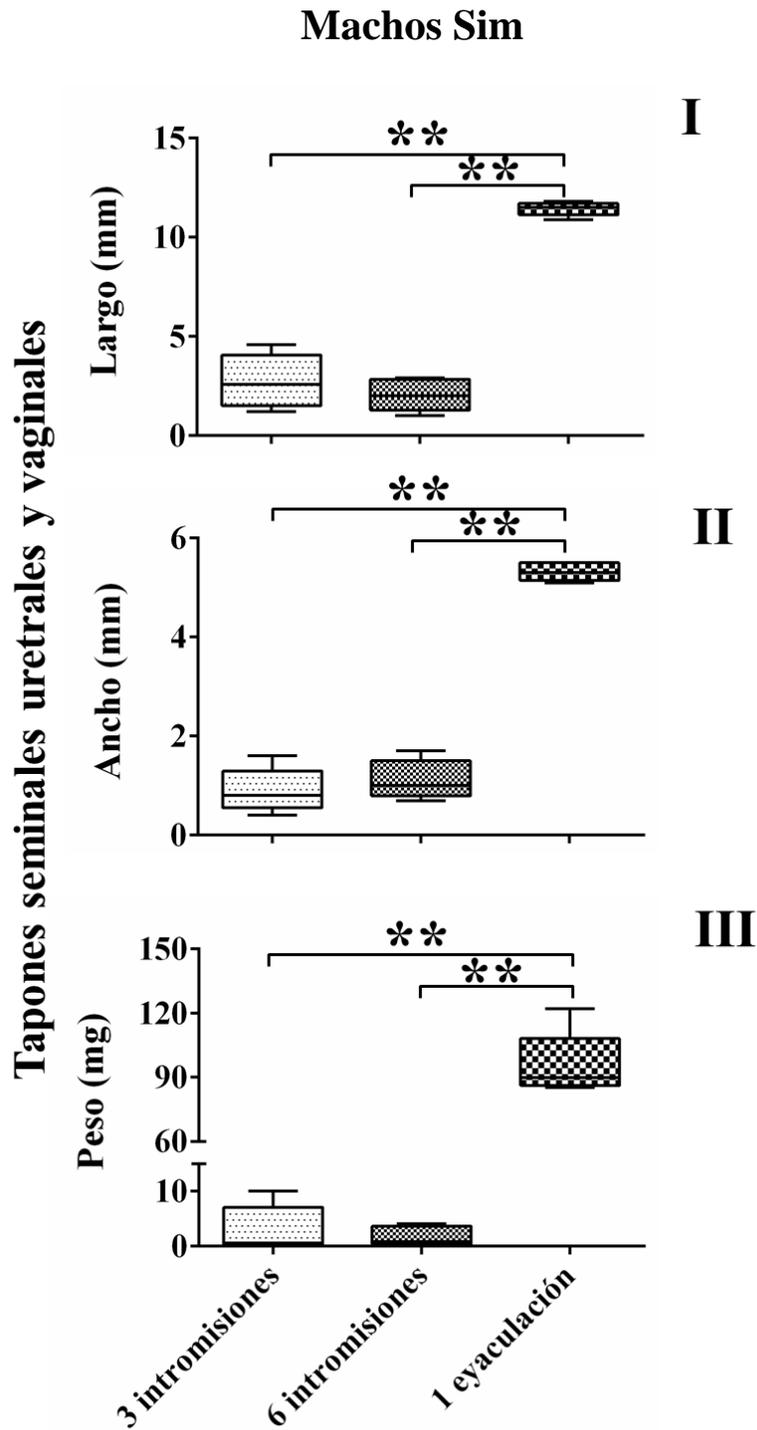


Figura 11. Se muestran los parámetros I) largo, II) ancho, III) peso de los tapones uretrales (obtenidos de 3 y 6 intromisiones) y vaginales (obtenidos de una eyacuación) de machos con cirugía simulada. H de Kruskal Wallis, $p > 0.05$.

8.2.2 Tapones de machos GCx que ejecutaron tres o seis intromisiones o una eyaculación

Tapones seminales uretrales y vaginales

El 83% de los machos GCx que realizaron la prueba de tres intromisiones, presentaron tapones uretrales localizados en el segmento de la uretra membranosa. En el caso de los machos que realizaron seis intromisiones, el 71% de ellos presentaron tapones, el 14 % de ellos en la uretra prostática, el 57 % restante, en la membranosa.

Nuevamente, las hembras que se utilizaron en las pruebas de intromisiones, no se les reviso la presencia/ausencia del tapón en la vagina, porque los machos no eyacularon.

Tras la eyaculación se revisaron los segmentos de la uretra masculina, no se encontró presencia de tapones uretrales. Además, se inspeccionaron las hembras, donde se encontraron tapones vaginales en el 100% de ellas.

Los tapones uretrales y los vaginales de los machos GCx presentaron diferencias significativas entre los parámetros de largo (H de Kruskal Wallis = 10.903, gl = 2, p = 0.004) y ancho (H de Kruskal Wallis = 10.622, gl = 2, p = 0.005), es decir, en su tamaño, además del peso (H de Kruskal Wallis = 10.644, gl = 2, p = 0.005). Respecto a los parámetros de los tapones uretrales de las pruebas copulatorias de tres *versus* seis intromisiones, no mostraron diferencias en el largo (Ajuste de Bonferroni, p = 0.421; Figura 12-I), ancho (Ajuste de Bonferroni, p = 0.841; Figura 12-II) ni peso (Ajuste de Bonferroni, p = 0.841; Figura 12-III). Los tapones obtenidos de las pruebas de tres intromisiones, tuvieron 2.9 milímetros de largo x 1.0 milímetros de ancho (mediana) y 1.0 miligramos de peso, *versus* los obtenidos de seis intromisiones, cuyas medidas fueron 1.9 milímetros x 0.8 milímetros (largo x ancho) y 1.7 miligramos de peso (Figura 12-I, II, III). Los tapones uretrales fueron de menor tamaño *versus* los tapones vaginales. Las diferencias significativas fueron evidentes cuando los tapones se obtuvieron de las vaginas *versus* las uretras en los parámetros de largo (Ajuste de Bonferroni, p = 0.004; Figura 12-I), ancho (Ajuste de Bonferroni, p = 0.004; Figura 12-II) y peso (Ajuste de Bonferroni, p = 0.004; Figura 12-III). Los parámetros de los tapones vaginales fueron 15.5 milímetros de largo, 4.9 milímetros de ancho y 123.8 miligramos de peso. Estos tapones fueron planos vistos lateralmente, además, su consistencia es blanda. La consistencia fue la misma tanto para los tapones uretrales como para los vaginales.

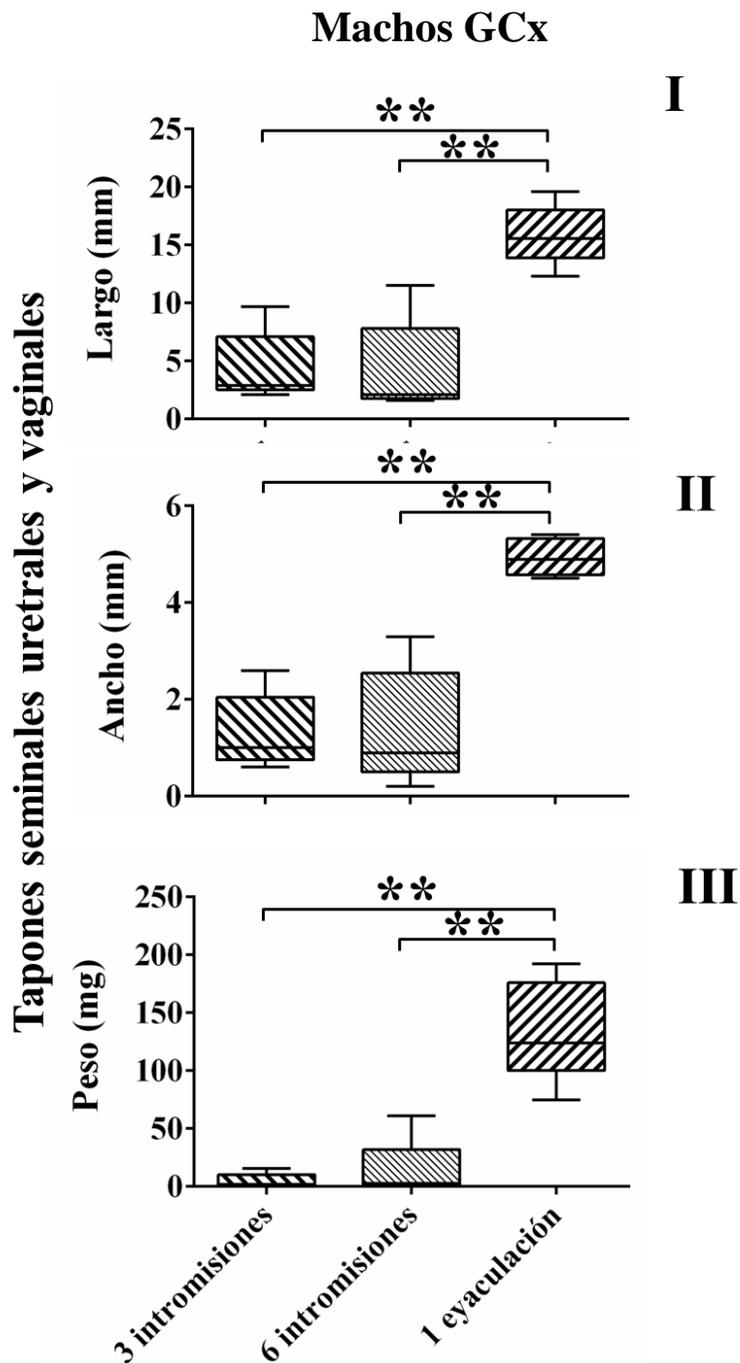


Figura 12. Se muestran los parámetros I) largo, II) ancho, III) peso de los tapones uretrales (obtenidos de 3 y 6 intromisiones) y vaginales (obtenidos de una eyaculación) del grupo de machos que se les extirparon las glándulas coagulantes. H de Kruskal Wallis, $p < 0.05$.

8.2.3 Tapones de machos VSx que ejecutaron tres o seis intromisiones o una eyaculación

Tapones seminales uretrales y vaginales

El 86% de los machos VSx presentaron tapones uretrales después de ejecutar tres intromisiones; 14% en la uretra prostática y 72% en la membranosa. En el 14% restante, la uretra estuvo vacía. El 86% de los machos que realizaron la prueba de seis intromisiones tuvieron tapones uretrales, localizándose en la uretra membranosa. En el 14 % restante el tapón estuvo ausente.

No se encontraron tapones en las uretras de los machos después de haber ocurrido la eyaculación. En el 100% de las vaginas se encontraron masas viscosas, de consistencia blanda y sin forma. No hubo variación en la consistencia de los tapones uretrales y vaginales.

Los machos VSx no mostraron diferencias significativas en los parámetros de largo (H de Kruskal Wallis = 3.155, gl = 2, p = 0.206; Figura 13-I) y peso (H de Kruskal Wallis = 5.509, gl = 2, p = 0.064; Figura 13-III) de sus tapones uretrales de tres intromisiones *versus* seis intromisiones *versus* los vaginales obtenidos de la eyaculación. Sin embargo, si hubo diferencias significativas en el ancho de los tapones uretrales y vaginales (H de Kruskal Wallis = 6.768, gl =2, p = 0.034; Figura 13-II). La diferencia se evidenció entre los tapones uretrales obtenidos de la prueba de seis intromisiones *versus* los vaginales obtenidos de la eyaculación (Ajuste de Bonferroni, p = 0.01). En las pruebas de tres intromisiones se encontraron tapones de 2.5 milímetros de largo, 0.95 milímetros de ancho y 0.89 miligramos de peso (mediana). Los parámetros de los tapones de las pruebas de seis intromisiones fueron 1.8 milímetros x 0.8 milímetros (largo x ancho) y 0.55 miligramos de peso. El tamaño de los tapones vaginales fue de 3.6milímetros x 1.8 milímetros (largo x ancho) y 4.2 miligramos de peso. Por lo que los parámetros de largo y peso se mantuvieron independientemente de la prueba copulatoria a la que fueron sometidos los machos.

Machos VSx

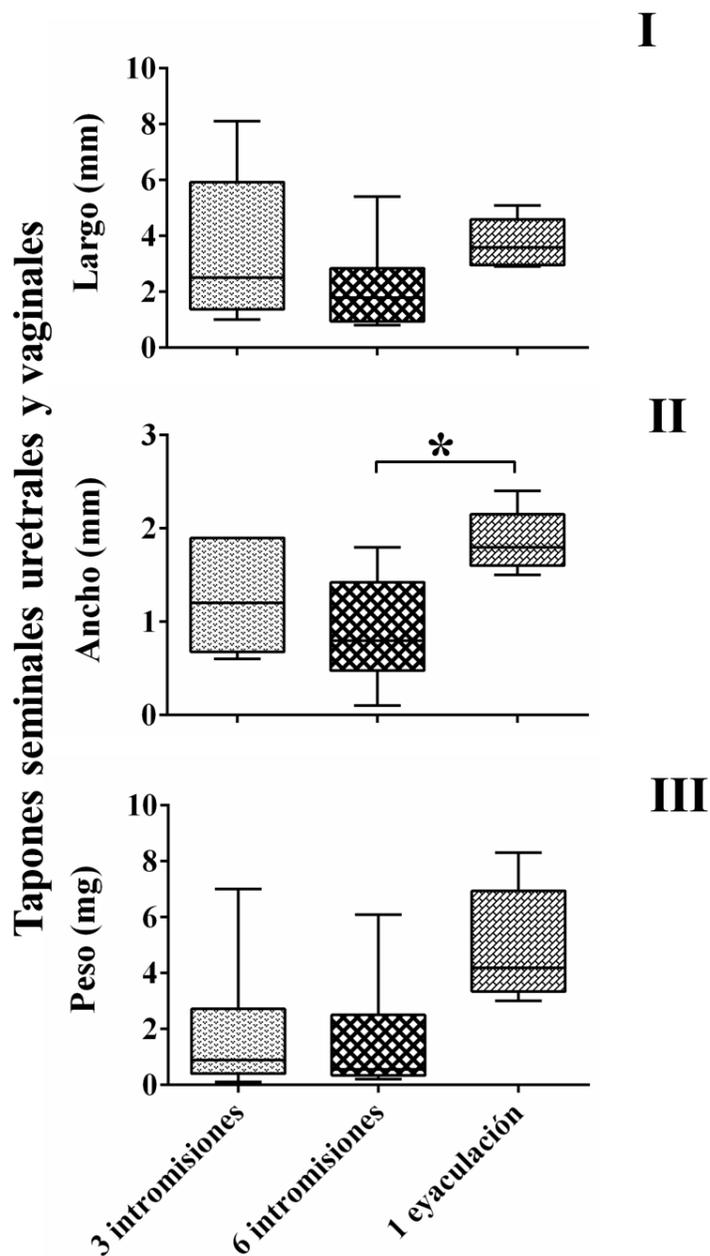


Figura 13. Se muestran los parámetros I) largo, II) ancho, III) peso de los tapones uretrales (obtenidos de 3 y 6 intromisiones) y vaginales (obtenidos de una eyaculación) del grupo de machos que se les extirparon las vesículas seminales. H de Kruskal Wallis, $p < 0.05$

8.3 Ablación de las glándulas sexuales (glándulas coagulantes y vesículas seminales) sobre los parámetros de los tapones (uretrales y vaginales) durante la cópula

Otra comparación estadística fue realizada con el objetivo de conocer el efecto de la extirpación de las coagulantes, así como de las seminales, sobre la formación tanto de los tapones uretrales, como la de los vaginales. Las pruebas estadísticas se aplicaron comparando los parámetros de los tapones de machos Sim *versus* GCx *versus* VSx de acuerdo al tipo de prueba copulatoria a la que fueron sometidos, recordemos que las pruebas consistieron en ejecutar tres o seis intromisiones o una eyaculación.

8.3.1 Prueba de tres intromisiones realizada por los machos Sim, GCx y VSx

Tapones seminales uretrales

Cabe recordar que se encontraron tapones uretrales, sólo en el 83 % de los machos Sim, GCx y VSx. Este resultado fue independiente del tipo de cirugía que les fue realizada a los grupos experimentales. En el 17 % de los machos pertenecientes a los tres diferentes grupos, la uretra estuvo vacía.

Los parámetros evaluados de los tapones uretrales fueron largo, ancho, peso y consistencia. No hubo diferencias significativas en el largo de los tapones uretrales de los machos Sim *versus* GCx *versus* VSx (H de Kruskal Wallis = 0.972, gl = 2, p = 0.615; Figura 14-I), tampoco en el ancho (H de Kruskal Wallis = 0.815, gl = 2, p = 0.665; Figura 14-II) ni en el peso (H de Kruskal Wallis = 3.569, gl = 2, p = 0.168; Figura 14-III). Los tapones uretrales de machos Sim midieron 2.6 milímetros de largo, 0.8 milímetros de ancho y pesaron 0.6 miligramos (mediana). El tamaño de los tapones de machos GCx fue 2.9 x 1.0 milímetros (largo x ancho) y pesaron 1.7 miligramos. Los parámetros de los tapones de machos VSx fueron 2.5 milímetros de largo, 0.95 milímetros de ancho y 0.89 miligramos de peso. La consistencia de los tapones uretrales fue diferente entre los grupos; ésta fue dura, blanda y muy blanda para los machos Sim, GCx y VSx, respectivamente.

Tres intromisiones

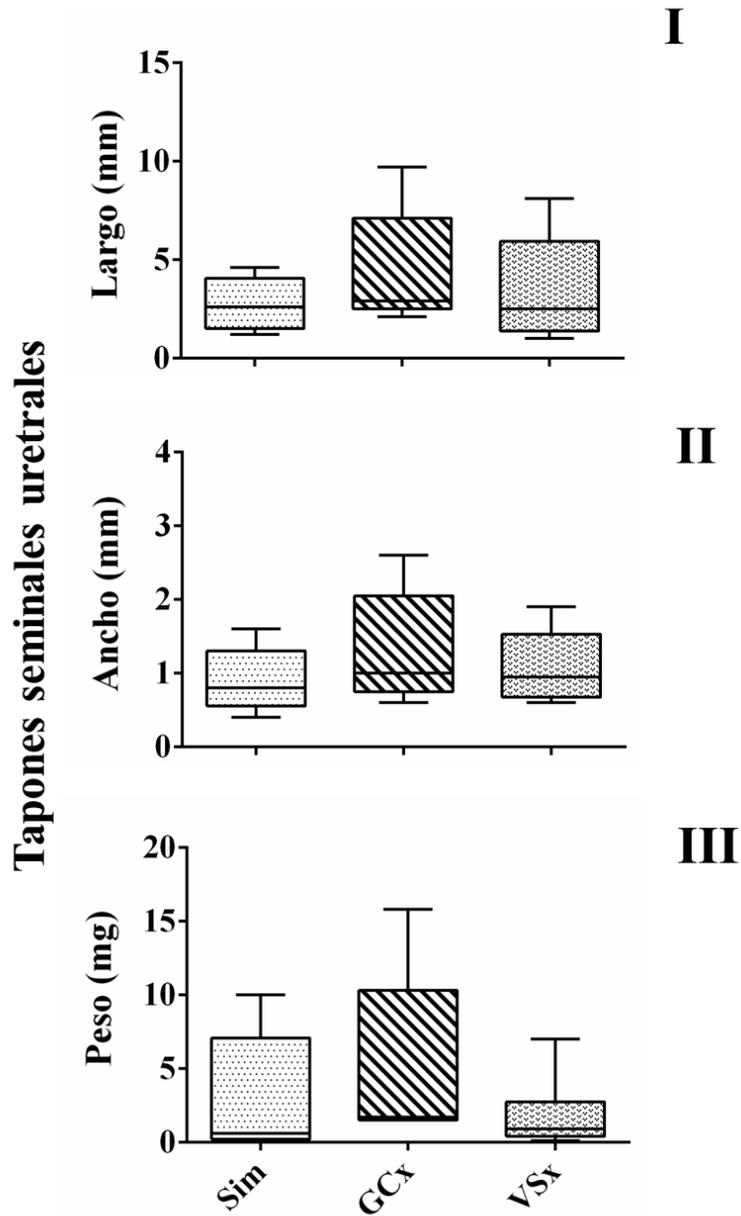


Figura 14. Se muestra que parámetros I) largo, II) ancho y III) peso de los tapones uretrales durante la prueba de tres intromisiones, según el tipo de cirugía a la que se sometieron los machos. Cirugía simulada (Sim), extirpación bilateral de: glándulas coagulantes (GCx), vesículas seminales (VSx). H de Kruskal Wallis, $p > 0.05$

8.3.2 Prueba de seis intromisiones realizada por los machos Sim, GCx y VSx

Tapones seminales uretrales

Se encontraron tapones uretrales preformados en el 83 % de los machos Sim, en el 71 % de machos GCx y en el 86 % de machos VSx que les fue permitido realizar seis intromisiones sin eyacular.

Los tapones uretrales de los machos Sim *versus* GCx *versus* VSx no mostraron diferencias significativas entre sus parámetros. Los machos Sim, GCx y VSx tuvieron tapones de 2.0, 2.1 y 1.8 milímetros de largo (mediana), respectivamente (H de Kruskal Wallis = 1.655, gl = 2, p = 0.437; Figura 15-I), 1.0, 0.9 y 0.95 milímetros de ancho (H de Kruskal Wallis = 0.860, gl = 2, p = 0.651; Figura 15-II) y 0.9, 2.7 y 0.55 miligramos de peso (H de Kruskal Wallis = 0.362, gl = 2, p = 0.834; Figura 15-III), respectivamente. La consistencia fue diferente en los tres casos, dura (Sim), blanda (GCx) y muy blanda (VSx).

Seis intromisiones

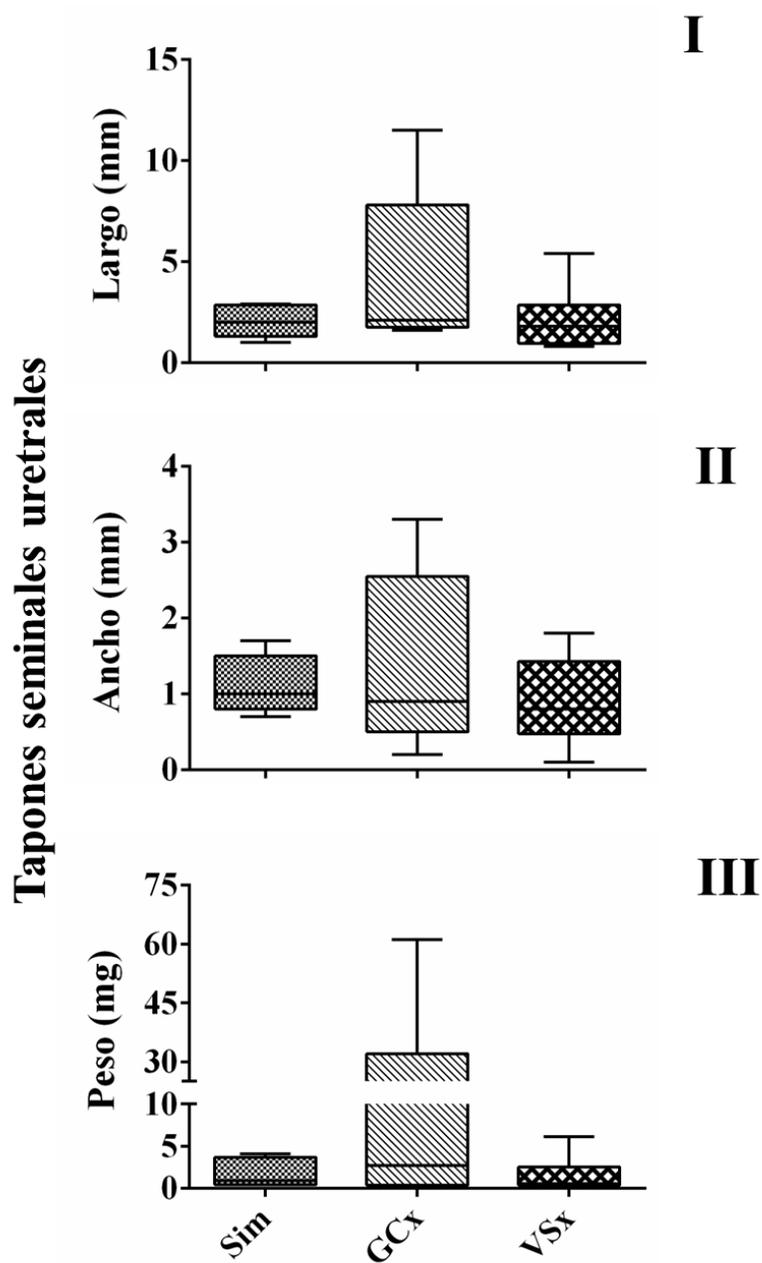


Figura 15. Se muestra el I) largo, II) ancho y III) peso de los tapones durante la prueba de seis intromisiones, según el tipo de cirugía a la que se sometieron los machos. Cirugía simulada (Sim), extirpación bilateral de: glándulas coagulantes (GCx), vesículas seminales (VSx). H de Kruskal Wallis, $p > 0.05$.

8.3.3 Tapones seminales obtenidos en la Prueba de una eyaculación realizada por los machos Sim, GCx, VSx y GCx+VSx

Tapones seminales vaginales

Los tapones de los machos Sim fueron coagulados, de consistencia dura y forma cilíndrica. Los de machos GCx fueron coagulados, de consistencia blanda y forma plana vistos lateralmente, a diferencia de los tapones Sim. Los machos VSx no formaron tapón tras la eyaculación y en la vagina sólo se encontró una masa viscosa sin forma. Los machos GCx+VSx no formaron tapón; sólo se encontraron secreciones de las glándulas accesorias que no les fueron extirpadas (no se formó la masa viscosa).

Los parámetros de los tapones obtenidos de las vaginas fueron diferentes dependiendo del tipo de cirugía realizada. Respecto al largo, se presentaron diferencias significativas entre los grupos de machos Sim *versus* GCx *versus* VSx (H de Kruskal Wallis = 13.346, gl = 2, p = 0.001; Figura 16-I). Entre los machos Sim *versus* GCx existió una diferencia significativa, dado que los tapones de los machos Sim fueron de menor tamaño, midiendo 11.5 milímetros *versus* 15.5 milímetros de largo (Ajuste de Bonferroni, p = 0.004). Entre los machos Sim *versus* VSx también existió diferencia significativa, ya que los tapones de VSx tuvieron 3.6 milímetros de largo (Ajuste de Bonferroni, p = 0.008). Asimismo, la diferencia en el largo de los tapones fue notable entre los machos GCx *versus* VSx (Ajuste de Bonferroni, p = 0.004).

En cuanto al ancho de los tapones vaginales, hubo diferencias significativas entre los tres grupos de machos (H de Kruskal Wallis = 11.065, gl = 2, p = 0.004; Figura 16-II). Esta diferencia fue entre GCx *versus* VSx (Ajuste de Bonferroni, p = 0.010) porque los tapones de machos GCx midieron 4.9 milímetros *versus* 1.8 milímetros de ancho. También existió diferencia entre machos Sim *versus* VSx, porque los tapones de los machos Sim midieron 5.3 milímetros de ancho (Ajuste de Bonferroni, p = 0.008). Entre los machos Sim *versus* GCx, no existió diferencia significativa en este parámetro.

Otro parámetro evaluado fue el peso, en el que se encontró diferencia significativa entre los machos Sim *versus* GCx *versus* VSx (H de Kruskal Wallis = 10.741, gl = 2, p = 0.005; Figura 16-III). La diferencia significativa fue entre los machos GCx *versus* VSx, porque los tapones pesaron 123.8 miligramos *contra* 4.2 miligramos (Ajuste de Bonferroni, p = 0.004). Además, los tapones de machos VSx, también fueron diferentes significativamente

comparados con los de machos Sim, porque estos pesaron 89.8 miligramos (Ajuste de Bonferroni, $p = 0.008$). La consistencia de los tapones vaginales fue dura, blanda y muy blanda para Sim, GCx y VSx. Entre los machos Sim *versus* GCx no hubo diferencias en este parámetro.

Cabe recordar que la función del tapón seminal es favorecer el transporte espermático transcervical, de la vagina hacia los cuernos uterinos. Se realizó la cuenta espermática para conocer el efecto de los parámetros de los tapones de machos Sim, GCx, VSx y GCx+VSx sobre el transporte espermático. En el caso de los machos que formaron tapones seminales en la vagina, ocurrió el transporte espermático. La cuenta espermática obtenida de los machos Sim fue de 43.2 millones, la de machos GCx fue de 19.2 millones de espermatozoides. Los espermatozoides que fueron expelidos por los machos VSx y GCx+VSx tras la eyaculación, se quedaron en la vagina, por lo que se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la cuenta espermática (H de Kruskal Wallis = 20.552, $gl = 3$, $p = 0.0001$). Entre los machos Sim *versus* los GCx no se encontraron diferencias significativas (Ajuste de Bonferroni, $p = 0.030$). En cambio, cuando se compararon los machos Sim *versus* los VSx si hubo diferencias significativas entre ambos grupos (Ajuste de Bonferroni, $p = 0.004$). Además, los machos Sim manifestaron diferencia entre los GCx+VSx (Ajuste de Bonferroni, $p = 0.004$). Así mismo, la cuenta espermática de los machos GCx fue diferente significativamente *versus* los VSx (Ajuste de Bonferroni, $p = 0.002$) y *versus* GCx+VSx (Ajuste de Bonferroni, $p = 0.002$; Figura 17).

Una eyaculación

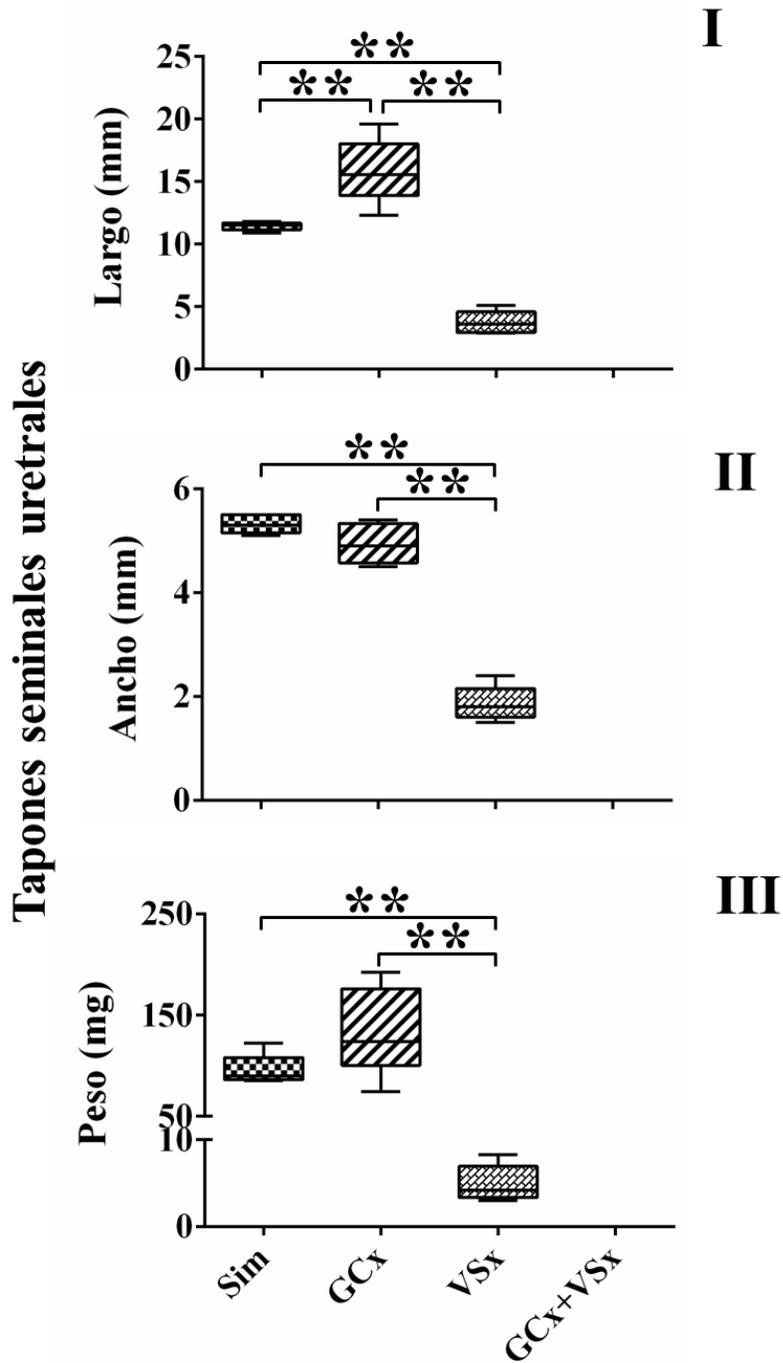


Figura 16. Se muestra el I) largo, II) ancho y III) peso de los tapones seminales obtenidos después de la eyaculación, según el tipo de cirugía a la que se sometieron los machos. Cirugía simulada (Sim), extirpación bilateral de: glándulas coagulantes (GCx), vesículas seminales (VSx) y glándulas coagulantes+vesículas seminales (GCx+VSx). H de Kruskal Wallis, $p < 0.05$.

Cuenta espermática en útero

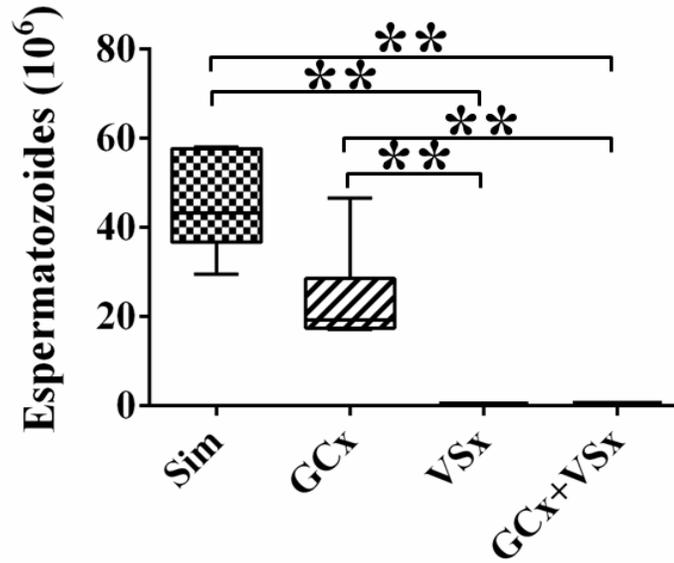


Figura 17. Se muestra el número de espermatozoides obtenido del útero de la hembra con la que eyacularon los machos, dependiendo el tipo de cirugía. Cirugía simulada (Sim), extirpación bilateral de: glándulas coagulantes (GCx), vesículas seminales (VSx) y glándulas coagulantes+vesículas seminales (GCx+VSx). H de Kruskal Wallis, $p < 0.05$.

9. DISCUSIÓN

Se ha evidenciado que los machos requieren entre 5-18 intromisiones para eyacular en su primera serie eyaculatoria (Bermant, 1967; citado en Chester y Zucker, 1970). Por tal razón, en el presente estudio los machos que realizaron alrededor de 9 intromisiones para eyacular, fueron asignados a las pruebas de tres intromisiones; en tanto que los que realizaron cerca de 12, se asignaron a las pruebas de seis intromisiones. Consideramos que en las pruebas de tres intromisiones, los machos estarían por debajo de la mitad de su umbral eyaculatorio, mientras que aquellos de las pruebas de 6 intromisiones estarían a la mitad de su excitación sexual. En teoría esto supondría encontrar tapones uretrales de distintos tamaños y pesos, siendo más pequeños y de menor peso aquellos de las pruebas de tres intromisiones. Esto se especuló a principio porque se pensó que conforme el macho se aproxima a su umbral eyaculatorio, es mayor la cantidad de secreciones de las glándulas accesorias vertida en la uretra. Sin embargo, se encontró que tanto los tapones uretrales obtenidos en las pruebas de tres como de seis intromisiones fueron similares en sus tamaños (ancho y largo) y pesos de los machos Sim. Sorprendentemente, tampoco hubo diferencias en los tapones uretrales en las pruebas de tres y seis intromisiones de los machos GCx, ni VSx; siendo similares con los de machos Sim. Este resultado no se esperaba, porque la literatura menciona que las secreciones de las glándulas coagulantes, así como de las vesículas seminales son importantes para la formación del tapón vaginal, en cambio, estos resultados muestran que las secreciones de una u otra glándula son suficientes para la formación del tapón uretral. Cabe mencionar que la localización de los tapones uretrales de los machos Sim y GCx fue en la uretra membranosa en la prueba de tres intromisiones, mientras que en la prueba de seis intromisiones la mayoría de los tapones se encontraron en la membranosa y unos cuantos en la prostática, tanto de machos Sim como GCx. Los tapones de los machos VSx en la prueba de tres intromisiones se localizaron principalmente en la uretra prostática, los otros en la membranosa, y en la prueba de 6 intromisiones se localizaron todos en la uretra membranosa. Teóricamente, se consideró que a menor número de intromisiones *i.e.*, tres, se encontrarían los tapones uretrales en los segmentos más proximales de la uretra y que a mayor número de intromisiones *i.e.*, seis, estarían más distales, siendo de mayor tamaño y peso los tapones obtenidos con mayor número de intromisiones. Curiosamente no fue así, dado que, tanto en las pruebas de tres

como de seis intromisiones, los tapones fueron similares, además, la mayoría de los tapones fueron encontrados en la uretra membranosa tanto en los machos Sim como en aquellos con ablación de GC o VS. Nuestros resultados, que incluyen tamaño y peso de tapones uretrales, así como la localización de estos en la uretra sugieren primero que, efectivamente, hay formación de tapones durante el encuentro copulatorio. Segundo que los tapones uretrales formados se localizan en la uretra membranosa. Tercero que los tapones uretrales formados están constituidos de las secreciones prostáticas y de las glándulas coagulantes, cuando no hay vesículas seminales o bien de secreciones prostáticas y secreciones de las seminales cuando no hay glándulas coagulantes. La única diferencia estriba en la consistencia, siendo menos consistentes los tapones uretrales de los machos VSx. Cuarto, la formación del tapón seminal en la uretra depende de las inserciones peneanas que realiza el macho favoreciendo la liberación de las secreciones de las glándulas hasta el óptimo de tamaño y peso del tapón seminal.

Aunque los tapones preformados en las uretras no mostraron diferencias significativas en sus tamaños (largo y ancho) y pesos. Sin embargo, los tapones uretrales obtenidos en los machos Sim, en las pruebas de tres intromisiones, equivalieron al 24 % del largo, 17 % del ancho y al 3 % del peso, respecto a los tapones vaginales. Los tapones de seis intromisiones correspondieron al 18 %, 21 % y 2 % de los tapones vaginales, para largo, ancho y peso, respectivamente. Los tapones uretrales de las pruebas de tres intromisiones de machos GCx equivalen al 12 % del largo, al 26 % del ancho y al 6 % del peso, para la de seis equivalen al 16 %, 12 % u 1 % para largo, ancho y peso, respectivamente. Los tapones uretrales de machos VSx equivalen al 35 % del peso, 21 % del ancho y 2 % del peso en la prueba de tres intromisiones, en la de seis equivalen al 28 % del largo, 18 % del ancho y al 3 % del peso. Se observó el incremento de 0.6 a 0.9 mg entre los tapones obtenidos de tres a seis intromisiones en los machos Sim, esto indica que las secreciones de las glándulas sexuales accesorias, son liberadas acumulativamente sin mostrar diferencias significativas, probablemente porque los machos que realizaron tres intromisiones están tan excitados como los que realizaron seis intromisiones, alcanzando el tamaño y peso óptimo de tapón uretral para poder ser expelido sin dificultad.

Los tapones seminales están constituidos por las diferentes secreciones de las glándulas accesorias (Mann y Lutwak-Mann, 1981; citado en Chow y cols., 1996). Las glándulas

sexuales accesorias están inervadas por el ganglio pélvico mayor (Setchell y cols., 1994), el cual recibe información de los nervios hipogástrico y pélvico. El nervio hipogástrico se origina en los segmentos espinales torácicos; el nervio pélvico, en el segmento lumbar 6 y sacro 1, que también dan origen al nervio pudendo (Hulsebosch y Coggeshall, 1982). El hipogástrico es un nervio de fibras simpáticas en tanto que el pélvico además de fibras simpáticas tiene fibras parasimpáticas (Hulsebosch y Coggeshall, 1982). De esta forma, las glándulas sexuales accesorias reciben inervación tanto del sistema nervioso simpático como del parasimpático. El sistema nervioso simpático provoca la contracción de las vísceras; el parasimpático, las relaja (Hsieh y cols., 2011). Cuando el macho realiza la inserción peneana en la vagina de la hembra, el pene recibe estimulación sensorial mediante el nervio dorsal que es una rama del pudendo. Esta información llega hasta los segmentos espinales por las fibras sensoriales del pudendo y hacen sinapsis con las neuronas autonómicas (Dail y cols., 1989). Probablemente, en la rata macho, la excitación sexual que se incrementa gradualmente con el número de intromisiones produce la activación de las fibras simpáticas que inervan a las glándulas accesorias. De este modo, se liberan pequeñas secreciones en la uretra proximal (prostática y/o membranosa) dando lugar al inicio de la formación del tapón uretral. Se ha descrito que en la fase de emisión seminal, además del cierre del cuello de la vejiga urinaria, ocurre la confluencia tanto de las secreciones de las glándulas accesorias en la uretra prostática, así como de los espermatozoides provenientes de la cauda epididimaria (Mitsuya y cols., 1960; citado en Toner y Adler, 1986). Nuestros resultados de las pruebas de tres y seis intromisiones sugieren que la fase de emisión seminal, comprende la liberación de las secreciones de las glándulas accesorias para iniciar la formación del tapón en la uretra del macho. Esto hace pensar que la fase de emisión comprende dos eventos. Durante el primero las glándulas accesorias liberan la cantidad necesaria para formar el tapón uretral, ocurriendo esto con las primeras intromisiones. La segunda comprendería el transporte de los espermatozoides por el vaso deferente, hasta la uretra proximal, acompañado de la cantidad necesaria de las secreciones de las glándulas accesorias para expeler el eyaculado óptimo. Debe recordarse que de este eyaculado, se forma el tapón vaginal (Koren y col., 1975), que además de adherirse a las paredes vaginales y al cérvix (Blandau, 1945; Matthews y Adler, 1977), debe cumplir con los parámetros estándar (100-120 mg de peso y 5 x 10 mm aproximadamente de tamaño, ancho y

largo respectivamente (Austin y Dewsbury, 1986; Lucio y Tlachi-López, 2008) para que cumpla con su función de favorecer el transporte espermático transcervical.

Se ha sugerido que la presencia de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias en la uretra prostática, es una condición requerida para que ocurra el reflejo eyaculatorio, es decir, para que suceda la expulsión del fluido seminal por el meato uretral (Holmes y Sachs, 1991). Los resultados del presente trabajo indican que, en la rata macho, más que la presencia de las secreciones de las glándulas accesorias, es la presencia de los tapones uretrales.

Los machos intactos durante la cópula, pueden no expeler semen a pesar de presentar la conducta eyaculatoria (el patrón motor de eyaculación), a esto se le conoce como eyaculación seca. En el presente estudio el 15 % de los machos (7 % Sim, 4 % GCx y 4 % VSx) no presentaron tapones uretrales, posiblemente a que presentaron eyaculaciones secas y por esta razón las uretras estaban vacías después de la ejecución de las intromisiones. La ausencia de tapones uretrales no se debió a la extirpación de glándulas coagulantes o vesículas seminales dado que, en algunos machos Sim, también hubo ausencia de tapones uretrales. Las descripciones de otros investigadores y nuestros resultados muestran lo que se ha mencionado con anterioridad, que el patrón motor de eyaculación puede acompañarse o no de su respuesta genital, consistente en la expulsión de semen.

Los machos de diferentes especies (hombre, hámster, rata, gato y chimpancé) presentan emisiones seminales espontáneas fuera del contexto copulatorio, liberando el contenido de las glándulas accesorias con espermatozoides (Beach, 1975). Las emisiones se manifiestan en machos que no han tenido actividad copulatoria. Por ejemplo, las ratas macho presentan estas emisiones, transcurridas 51 horas después de haber eyaculado una vez. Si eyaculan hasta 5 veces durante la cópula, presentan emisiones espontáneas 114 horas después del encuentro copulatorio (Beach, 1975). Por esta razón, nuestros machos fueron sometidos a una eyaculación 30 minutos antes de la realización de las pruebas copulatorias de tres o seis intromisiones o una eyaculación, dado que no habían tenido actividad copulatoria durante dos semanas (tiempo transcurrido entre las ablaciones quirúrgicas y la ejecución de la prueba copulatoria). Esto fue así, para que las uretras estuvieran libres de cualquier contenido remanente de secreciones de las glándulas sexuales accesorias, durante la primera serie copulatoria. Esos remanentes podrían confundir la formación de los tapones uretrales durante

el encuentro copulatorio. Éste suele finalizar con la eyaculación, que puede constatarse con la presencia de un tapón vaginal (Carballada y Esponda, 1993).

Los tapones vaginales difieren significativamente en peso y tamaño de los tapones uretrales, descritos en párrafos anteriores. En el presente estudio se encontró que los tapones vaginales de los machos Sim fueron parecidos en sus parámetros respecto a los parámetros estándar (Lucio y Tlachi-López, 2008). En contraste, la extirpación de las coagulantes modifica la forma, la consistencia y el largo de los tapones vaginales, sin interferir con el ancho, ni peso. Los parámetros se afectaron porque la función de las glándulas coagulantes es, como su nombre lo dice, coagular el semen (Williams-Ashman, 1984), actuando sobre las proteínas SV I-VII aportadas por las seminales (Fawell y Higgins, 1987; Bradshaw y Wolfie, 1977; citado en Carballada y Esponda, 1992). Curiosamente, los tapones vaginales de los machos sin coagulantes fueron planos, blandos y más largos en el 100 % de las hembras. Esto difiere a lo obtenido por Carballada y Esponda (1992) luego de extirpar las coagulantes, dado que ellos solo encontraron tapones en el 50% de las hembras. El mayor efecto sobre los tapones vaginales, fue tras la extirpación de las vesículas seminales. Nuestros resultados mostraron que los tapones vaginales no se formaron, y en lugar de ello, sólo se encontró una masa viscosa sin cuerpo. Esto indica que las secreciones de las vesículas seminales son cruciales para la formación del tapón vaginal, ya que su ablación provoca que el tapón no se forme, porque aportan el 70% del plasma seminal, así como el sustrato para la enzima coagulasa, provista por las glándulas coagulantes, así la unión de ambas secreciones forman el tapón. Pessah y Kochva (1975) no extirparon las vesículas seminales, sino que hicieron que los machos eyacularan varias veces y esto sirvió para mostrar que el peso del tapón vaginal disminuye con las sucesivas eyaculaciones, sugiriendo que es debido a la disminución de las secreciones de las seminales.

La función del tapón vaginal es favorecer el transporte de los espermatozoides que fueron depositados en la vagina, hacia los cuernos uterinos. Esto implica el cruce de la gran mayoría de los espermatozoides por el cérvix, lo que se manifiesta en una mayor o menor cuenta espermática en el útero. La cuenta espermática de los machos Sim fue de 43.25 millones de espermatozoides, la de los machos GCx fue de 19.25 millones. En cambio, en los casos de machos VSx y GCx+VSx fue cero espermatozoides en el útero. Esto se debió a que no hubo tapón seminal y por lo tanto, no hubo transporte espermático. Dado que el transporte

espermático no ocurrió, los espermatozoides fueron encontrados en la vagina donde fueron depositados en el momento de la eyaculación. El transporte espermático no se afectó en el caso de los machos Sim, porque los parámetros de los tapones vaginales se mantuvieron similares al estándar. La ablación de las coagulantes provocó que los tapones vaginales fueran planos, lo que redujo la cuenta espermática aproximadamente 50 %. Para que la mayoría de los espermatozoides alcancen el útero, el tapón debe ocupar el mayor espacio vaginal y estar firmemente adherido a las paredes vaginales y al cérvix (Matthews y Adler, 1978). Si bien, los tapones de los machos GCx estuvieron firmemente adheridos al cérvix, esto no bastó para que ocurriera el transporte; ya que fue necesario también que el tapón ocupara el conducto vaginal y dada la forma plana del tapón el espacio vaginal no se ocupó. La forma del tapón es importante para que facilite el transporte espermático en los roedores (Mann y Lutwak-Mann, 1981; citado en Chow y cols., 1996). Estos resultados difieren a los de Carballada y Esponda (1992) al extirpar las coagulantes. Ellos encontraron que el 50 % de los machos que no formaron tapón mientras que la otra mitad si lo formó, 50 %. Los que no formaron tapón presentaron una cuenta espermática *in útero* de cero. Los que sí formaron tapón (de tamaños y pesos diferentes) presentaron cuentas desde 1 millón hasta 44 millones de espermatozoides. Estas diferencias quizás se deban a la completa o incompleta extirpación de las glándulas coagulantes. Nosotros nos cercioramos de retirar el par de glándulas con sus respectivos conductos. De los machos VSx sólo se obtuvieron masas viscosas en lugar de tapones y en los machos GCx+VSx ni siquiera se formó la masa viscosa. Estos resultados constatan que la formación del tapón vaginal, es indispensable para que ocurra el transporte espermático al 100 % (Matthews y Adler, 1977). Los resultados de los machos VSx coinciden con los de Carballada y Esponda (1992) quienes mostraron que el principal efecto de la remoción de las seminales es el fracaso del transporte transcervical.

10. CONCLUSIONES

Nuestros resultados demostraron que el tapón seminal inicia su formación en la uretra membranosa con las intromisiones pre-eyaculatorias, alcanzando su óptimo en tamaño-peso, desde la ejecución de las primeras intromisiones (tres). Este tapón uretral carece de espermatozoides. Esto sugiere que durante las primeras intromisiones, solo se liberan las secreciones de las glándulas accesorias y que en la intromisión que acompaña a la eyaculación, los espermatozoides epididimarios son transportados hacia la uretra membranosa, acompañados de la cantidad suficiente de secreciones glandulares, para formar el eyaculado y el tapón vaginal. La formación de los tapones uretrales, no es afectada por la ausencia de las secreciones de las glándulas coagulantes o de las vesículas seminales, en otras palabras, basta con las secreciones de algunas de ellas. En cambio, la formación del tapón vaginal depende de ambas glándulas, siendo más importante la participación de las vesículas seminales. A menor cantidad del plasma seminal provisto por las seminales, menor es el tamaño de los tapones vaginales, alterando su forma y disminuyendo así, el transporte espermático transcervical. Además, la ablación de ambos pares de glándulas, es decir, coagulantes y seminales, provoca que el tapón seminal no se forme.

11. PERSPECTIVAS

Este trabajo nos permitió conocer más detalles sobre la fase de emisión seminal y la fase de expulsión del eyaculado. No obstante, abre más interrogantes tales como: ¿los tapones uretrales contienen espermatozoides de manera similar a los tapones vaginales? Para ello, sería atinado descoagular los tapones seminales encontrados en las uretras de los machos para comprobar la ausencia/presencia de espermatozoides. Esto permitirá describir más procesos incluidos en la fase de emisión seminal.

Otra interrogante, es saber ¿qué está ocurriendo en la uretra del macho antes de la eyaculación? Esto podría responderse mediante el análisis de presión insertando electrodos de manera crónica en las glándulas accesorias (próstata, vesículas seminales y glándulas coagulantes). Esto nos ayudaría a diferenciar cuál de las tres glándulas vierte primero sus secreciones en la uretra proximal.

Nuestros resultados sugieren que existe la liberación gradual de las secreciones de las glándulas accesorias conforme el macho ejecuta las intromisiones antes de eyacular. Se sabe que a medida que incrementa el número de intromisiones a intervalos regulares de tiempo se incrementa el nivel de excitación del macho. De ahí que se podrían forzar los intervalos inter-intromisión, unos breves y otros largos en animales de distintos fenotipos copulatorios.

12. REFERENCIAS

- Austin D y Dewsbury DA (1986) Reproductive capacity of male laboratory rats. *Physiol Behav*, 37: 627-632.
- Baker R y Bellis MA (1988) "Kamikaze" sperm in mammals? *Anim Behav* 36: 936-938.
- Beach FA (1975) Variables affecting "spontaneous" seminal emission in rats. *Physiol Behav* 15: 91-95.
- Beach FA y Wilson JR (1963) Mating Behavior in male rats after removal of the seminal vesicles. *Proc Natl Acad Sci EUA* 49: 624-626.
- Benson SG (1994) Male sexual function: erection, emission, and ejaculation. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill JD (eds). Raven Press. New York 1489-1506.
- Bermant G (1967) Copulation in rats. *Psychol Today* 52-60.
- Bernabé J, Clement P, Denys P, Alexandre L y Giuliano F (2007) Seminal plug expulsion induced by electrical stimulation of the intermesenteric nerve in anesthetized rats. *Biol Reprod* 77: 717-722.
- Beyer C, Contreras JL, Larsson K, Olmedo M y Morali G (1982) Patterns of motor and seminal vesicle activities during copulation in the male rat. *Physiol Behav* 29: 495-500.
- Bhasin S y Benson GS (2006) Male sexual function. En: *The Physiology of Reproduction*. Neill JD (ed). Elsevier Press. New York 1173-1194.
- Blandau RJ (1945) On factors involved in sperm transport through the cervix uteri of the albino rat. *Am J Anat* 77: 253-272.
- Carballada R y Esponda P (1992) Role of fluid seminal vesicles and coagulating glands in sperm transport into uterus and fertility in rats. *J Reprod Fertil* 95: 639-648.
- Carballada R y Esponda P (1993) Structure of the vaginal plugs generated by normal rat and by with partially removed seminal vesicles. *J Exp Zool* 265: 61-68.
- Carlsson SG y Larsson K (1964) Mating in male rats after local anesthetization of the glands penis. *Inter J Behav Biol* 854-856.
- Chester RV y Zucker I (1970) Influence of male copulatory behavior on sperm transport, pregnancy and pseudopregnancy in female rats. *Physiol Behav* 5: 35-43.

Chow PH, Ng KW y Pang SF (1996) Lack of effect of bilateral removal of accessory sex glands on sexual behavior in the male golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Physiol Behav* 59: 393-396.

Cukierski MA, Sina JL, Prahalada S, Robertson RT (1991) Effects of seminal vesicle and coagulating gland ablation on fertility in rats. *Reprod Toxicol* 5: 347-52.

Dail WG, Trujillo D, de la Rosa D y Walton G (1989) Autonomic innervation of reproductive organs: analysis of the neurons whose axons project in the main penile nerve in the pelvic plexus on the rat. *Anat Rec* 224: 94-101.

Fawell SE y Higgins SJ (1987) Formation of rat copulatory plug: purified seminal vesicle secretory proteins serve as transglutaminase substrates. *Mol Cell Endocrinol* 53: 149-152.

Fouquet JP (1971) Secretion of free glucose and related carbohydrates in the male accessory organs of rodents. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 40: 305-17.

Hart RG y Greenstein JS (1968) A new discovered role for Cowper's gland secretion in rodent semen coagulation. *J Reprod Fertil* 17: 87-94.

Hebel R y Stromberg MW (1986) *Anatomy and Embriology of the Laboratory Rat*. Editorial Biomed Verlag. Alemania.

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.

Holmes GM y Sachs BD (1991) The ejaculatory reflex rats: normal bulbospongiosus activity without apparent urethral stimulation. *Neurosci Lett* 125: 195-197.

Hsieh JT, Liu SP, Chang HC, Tsai VFS, Chien CT, Yu HJ y Ho CH (2011) The activation of peripheral 5-HT_{1A} receptors can inhibit seminal vesicle contraction: an *in vivo* animal study. *Urology* 78: 376-379.

Hulsebosch CE y Coggeshal RE (1982) An analysis of the axon populations in the nerve to the pelvic viscera in the rat. *J Comp Neurol* 211: 1-10.

Jesik CJ, Holland JM, Lee C (1982) An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* 3: 81-97.

Jiang HY, O WS, Lee KH y Tang PL (2001) Ablation of paternal accessory sex glands is detrimental to embryo development during implantation. *Anat Embryol* 203: 255-263.

Juárez R y Cruz Y (2014) Urinary and ejaculatory dysfunction induced by denervation of specific striated muscles anatomically related to the urethra in male rats. *Neurorol Urodyn* 33: 437-442.

Kihlström JE (1966) Diurnal variation in the spontaneous ejaculations of the male albino rat. *Nature* 209: 513-514.

Koren E, Lucac J y Milkovic S (1974) The effect of collagenase-like peptidase from rat testis and clostridial collagenase A on the rat seminal vesicle secretion and its coagulation. *J Reprod Fertil* 32: 349-356.

Koren E, Schön E y Lukac J (1975) The coagulation of insoluble and basic proteins from rat seminal vesicle secretion with vesiculase: influence of collagenase-like peptidase from rat testis. *J Reprod Fertil* 42: 491-495.

Kunstyr I, Küpper W, Weisser H, Naumann S y Messow C (1982) Urethral plug- a new secondary male sex characteristic in rat and other rodents. *Lab Anim* 16: 151-155.

Larsson K (1956) Conditioning and Sexual Behavior in the Male Albino Rat. Almqvist y Wiksell. Estocolmo, Suecia.

Larsson K (1959) Excitatory effects of intromission in mating behavior of the male rat. *Behaviour* 16: 66-73.

Lee C, Sinthich SM, Matthews EP, Shah AH, Kundu SD, Perry KT, Cho JS, Llio KY, Cronauer MV, Janulis L y Sensibar JA (1999) Transforming growth factor-beta in benign and malignant prostate. *Prostate* 39: 285-290.

Lucio RA y Tlachi-López JL (2008) Análisis de la cópula y el eyaculado en la rata albina (*Rattus norvegicus*) Manual de Laboratorio. Editorial Góngora Ediciones. Tlaxcala, México.

Luke MC y Coffe D (1994) The male sex accessory tissues: structure, androgen action and physiology. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill JD (eds). Raven Press. New York 1435-1488.

Mann T (1974) Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J Reprod Fertil* 37: 179-188.

Martan J y Shepherd BA (1976) The role of the copulatory plug in reproduction of the guinea pig. *J Exp Zool* 196: 79-84.

Martínez Reyes A (2003) Caracterización anatómica y funcional de la uretra y de su esfínter externo de la rata macho. Tesis Doctorado en Neuroetología. Instituto de Neuroetología. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz.

Matthews M y Adler NT (1977) Facilitative and inhibitory influences of reproductive behavior on sperm transport in rats. *J Comp Physiol Psychol* 91: 721-741.

Matthews MK Jr y Adler NT (1978) Systematic interrelationship of mating, vaginal plug position, and sperm transport in the rat. *Physiol Behav* 20: 303-309.

McClintock MK y Adler NT (1978) The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*) *Behavior* 67: 67-96.

McDonnell SM (1992) Ejaculation: physiology and dysfunction. *Vet Clin N Am Equine Pract* 8: 57-70.

Meisel RL y Sachs BD (1994) The physiology of male sexual behavior. En *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill JD (eds). Raven Press. New York. 3-106.

Melis MS (1999) Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. *J Ethnopharmacol* 167: 157-161.

Miller MA y Leavell LC (1979) *Manual de Anatomía y Fisiología*. Editorial La Prensa Médica Mexicana. Segunda Edición. México 1-842.

Nalbandov AV (1976) *Reproductive Physiology of Mammals and Birds*, 3er. Ed., WH Freeman and Company. San Francisco.

Pegg AE, Lockwood DH y Williams-Ashman HG (1970) Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic synthesis during androgen-induced prostatic growth. *Biochem J* 117: 17-31.

Pessah H y Kochva E (1975) The secretory activity of the seminal vesicles in the rat after copulation. *Biol Reprod*, 13: 557-560.

Philippov OS, Radionchenko AA, Bolotova VP, Voronovskaya NI y Potemkina TV (1998) Estimation of the prevalence and causes of infertility in Western Siberia. *Bulletin of the World Health Organization* 76: 183-187.

Poiani A (2006) Complexity of seminal fluid: a review. *Behav Ecol Sociobiol* 60: 289-310.

Pollak EI y Sachs BD (1976) Penile movements and the sensory control of copulation in the rat. *Behav Biol* 17: 177-186.

Queen K, Dhabuwala CB y Pierrepont CG (1981) The effect of the removal of the various accessory sex glands on the fertility of male rats. *J Reprod Fertil* 62: 423-426.

Rosenthal SM y Tabor CW (1956) The pharmacology of spermine and spermidine. Distribution and excretion. *J Pharmacol Exp Ther* 116: 131-138.

- Sachs BD y Meisel RL (1988) The physiology of male sexual behavior. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E y Neill J (eds). Raven Press. New York 585-611.
- Setchell BP, Maddocks S y Brooks DE (1994) Anatomy, vasculature, innervations and fluids of male reproductive tract. En The Physiology of Reproduction. Knobil E y Neill J (eds). Raven Press. New York 1063-1116.
- Sikorski A (1978) Comparative anatomy of the bulbourethral gland. *Folia Morphol* 37: 151-156.
- Suzuki H, Ueda O y Kamada N (1994) Male accessory secretions promote the ability of sperm to fertilize eggs in vitro in mice. *J Reprod Dev* 40: 177-182.
- Tlachi-López JL, López A, Hoffman K, Velázquez-Moctezuma, García-Lorenzana y Lucio RA (2011) Rat dorsal prostate is necessary for vaginal adhesion of the seminal plug and sperm motility in the uterine horns. *Biol Res* 44: 259-267.
- Toner JP y Adler NT (1986) The pre-ejaculatory behavior if male and female rats affects the number of sperm in the vagina and uterus. *Physiol Behav* 36: 363-367.
- Wallach SJR y Hart BL (1983) The role of the striated penile muscles of the male rat in seminal plug dislodgement and deposition. *Physiol Behav* 31: 815-821.
- Williams-Ashman HG (1983) Regulatory features of seminal vesicle development and function. *Curr Topics Cell Regulation*, 22: 201-275.
- Williams-Ashman HG (1984) Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluids. *Mol Cell Biochem* 58: 51-61.
- Wilson EM y French FS (1980) Biochemical homology between rat dorsal prostate and coagulating gland. Purification of a major androgen-induced protein. *J Biol Chem* 255: 10946-10953.
- Wilson JR, Adler NT y LeBoeuf B (1965) The effects of intromission frequency on successful pregnancy in the female rat. *Proc Natl Acad Sci* 53: 1322-1395.
- Zuckerman EK (1956) Morphology of the reproductive tract. En: Parkes AS (ed). Marshall's Physiology of Reproduction, London, 1956. 43-155.

13. PUBLICACIONES

A. Artículos

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

Rosa Angélica Lucio, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.
E-mail: lucioral@yahoo.com.mx

Keywords:

copulatory motor patterns, ejaculation, male genital responses, novel female, penile erection, sexual satiety

Received: 19-Dec-2013

Revised: 29-Jan-2014

Accepted: 23-Feb-2014

doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00209.x

Copulation without seminal expulsion: the consequence of sexual satiety and the Coolidge effect

¹R. A. Lucio, ¹V. Rodríguez-Piedracruz, ¹J. L. Tlachi-López, ²M. García-Lorenzana and ³A. Fernández-Guasti

¹Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, ²Área de Neurociencias, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, and ³Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV-Sede Sur, México D.F., México

SUMMARY

The studies of sexual satiety in male rats under the Coolidge effect indicate that males reassume copulation until ejaculation. Recently, it was demonstrated that sexually satiated males preserve the motor patterns of intromission and ejaculation, also penile erection, but not seminal expulsion. The first aim was to investigate if penile erections displayed by sexually satiated males dislodge the seminal plugs from the vagina and its effect on sperm transcervical transport. The second aim was to determine the recovery time of seminal expulsion after sexual satiety and its optimal ability to induce pregnancy. Results show that during the Coolidge effect males were able to dislodge the seminal plugs deposited by others (experiment 1A) disturbing the sperm transport (experiment 1B) then interfering with pregnancy (experiment 1C). After satiety, the ejaculate parameters recover slowly: it starts after 10 days with the seminal plug formation, and continues with an increase in sperm count in the uterus 15 days post-satiety (experiment 2). Sexually satiated males impregnated only 28% of the females during 15 days of cohabitation, whereas, satiated males that rested for 15 days impregnated 89% of the females (experiment 3). We concluded that males with successive ejaculations remain potential rivals, because they may disrupt the sperm transport of other males. The ejaculate features recovery after sexual satiety is gradual, begins with the secretions of the sex accessory glands and is followed by the sperm count. Full fertility recovery is reached after 15 days of sexual abstinence when males are able to impregnate most females.

INTRODUCTION

Copulation not only comprises the behavioural acts but also has external and internal genital components. The behavioural acts include the pelvic thrusting pattern of mount, intromission and ejaculation. The external genital elements include the vascular and muscular events required for penile erection, whereas the internal genital constituents comprise the autonomic activities of sexual accessory glands involved in seminal emission and expulsion (Moralí *et al.*, 2003). During intromissions males insert the penis into the vagina. The skeletal movements of this copulatory pattern are easily recognized, however, penile erection is commonly inferred unless observed by a mirror located at 45° under the mating arena (Sachs & Meisel, 1988). Similarly, when the ejaculatory behavioural pattern is observed the corresponding genital response is inferred unless seminal expulsion is corroborated by examining the presence of the seminal plug in the female's vagina (Sachs & Meisel, 1988; Ágmo, 1997). Upon

ejaculation, spermatozoa are followed by the secretions of the accessory sexual glands, which coagulate within the vagina to form the seminal plug (Blandau, 1945; Matthews & Adler, 1977). The plug holds the spermatozoa under pressure permitting its transcervical transport that lasts around 6 minutes after ejaculation (Matthews & Adler, 1978). Thus, if the plugs are removed from the vagina in less than 6 minutes the sperm transport is disrupted (Matthews & Adler, 1977). Males are able to remove his own or others plugs after executing few intromissions (Wallach & Hart, 1983; Lucio *et al.*, 1994).

In laboratory conditions, males display a mean of 7 to 10 ejaculatory series (with a variation from 5 to 18) before reaching sexual satiety (Fernández-Guasti & Rodríguez-Manzo, 2003; Tlachi-López *et al.*, 2012). Sexual satiety in rats is accredited when the males stop copulating for long periods (30–90 min) after several consecutive ejaculations (Beach & Jordan, 1956). Interestingly, also after various successive ejaculations there is a sharp

reduction in sperm count in the female (Toner & Adler, 1985; Austin & Dewsbury, 1986; Tlachi-López *et al.*, 2012) and male (Judd *et al.*, 1997; Tlachi-López *et al.*, 2012) reproductive tracts, accompanied by a diminished seminal plug weight and size (Toner & Adler, 1985; Austin & Dewsbury, 1986; Tlachi-López *et al.*, 2012).

Remarkably, several authors have reported that in sexually satiated males the female partner change re-stimulates mating: the so-called Coolidge effect (Fowler & Whalen, 1961; Fisher, 1962; Wilson *et al.*, 1963; Zucker & Wade, 1968; Hsiao, 1969). Recently, we demonstrated that sexually satiated males, under the Coolidge effect, display the three behavioural copulatory patterns (mount, intromission and ejaculation) but fail to expel seminal fluid, as no spermatozoa or seminal plugs were found in the female genital tract (Tlachi-López *et al.*, 2012). Surprisingly, we also found that sexually satiated males, exposed to the Coolidge effect, displayed a similar number of intromissions as control non-sexually satiated ones, to remove from the vagina the seminal plugs deposited by others (Tlachi-López *et al.*, 2012). These data suggest that the biological aim of the Coolidge effect could be the interference of transcervical sperm transport, thus maintaining sexually satiated males as reproductive competitors. The purpose of the initial series of experiments was to analyse this proposition. In the first experiment (1A) we re-assessed the ability of the same animals before and after sexual satiety to remove the seminal plugs deposited by other males. In a second part of this experiment (1B) we studied the capacity of sexually satiated males to disrupt the transcervical sperm transport when presented to a recently mated unknown female. Thirdly (1C), in an independent group of females we studied whether such sperm transport disruption effectively precluded pregnancy.

Previous studies indicate that spontaneous recovery from sexual satiety starts 72 h after exhaustion (Romano-Torres *et al.*, 2007) and is complete after 15–21 days (Beach & Jordan, 1956; Larsson, 1956). Considering the disparity between behavioural ejaculation and seminal expulsion (*vide supra*), we asked when after sexual satiety the males regain a functional seminal plug accompanied by spermatozoa. To answer this question, we analysed the seminal plug and the sperm count in the same animals tested at 5, 10 and 15 days post-satiety and also in an independent set of animals that rested for 15 days post-satiety (experiment 2) and the fertile capacity of sexually satiated males, immediately after satiety or 15 days post-recovery (experiment 3).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rats from the *vivarium* of the *Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta* were used. Males and females weighed around 300 and 230 g, respectively, at the beginning of the study. Rats were kept under standard conditions, in a room with controlled temperature of 20 ± 2 °C, and under an inverted 12/12 light–dark cycle, lights on at 2000. Animals were provided with commercial rat pellets (Purina Chow, México DF, México) and water *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Tlaxcala University Committee on Laboratory Animals, according to the guidelines of the Mexican Council on Laboratory Animals' Care (NOM-062-Z00-1999).

Copulatory tests for sexual satiety

Males were sexually experienced (rats ejaculating in less than 15 min in four training trials). Ovariectomized females were brought into behavioural estrus by the sequential treatment with 10 µg of estradiol benzoate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 2 mg of progesterone (Sigma-Aldrich) administered *sc*, 48 and 4 h before the copulatory encounters respectively. Steroids were dissolved in olive oil and injected in the neck region.

Rats were allowed to mate in Plexiglas cylinders (50 cm diameter and 50 cm height) with wood shavings covering the floor. Tests were performed during the second third of the dark period. The male was given five minutes of adaptation, after which a sexually receptive female was introduced. Males ejaculated to reach sexual satiety, defined as 30 min of sexual inactivity, with the same female (Beach & Jordan, 1956; Tlachi-López *et al.*, 2012). The number of ejaculatory series to reach sexual satiation was recorded.

Experiment 1

(A) Ability of sexually satiated males to take-out the seminal plugs deposited by other males

Sexually experienced males ($n = 9$) were used before and after sexual satiety. In this experiment, all females were ovariectomized and treated with steroids as previously described. The observation cylinders were located over a black cardboard to quickly visualize the seminal plugs. The time to take out the seminal plug was calculated from the female's introduction in the copulatory arena. Control tests implied the execution of one ejaculatory series. After the post-ejaculatory interval, the first female was replaced by another recently mated female that had another male's seminal plug in her vagina. One week later, the same group of males was retested after sexual satiety. Animals copulated continually to reach sexual satiety. After 30 minutes of sexual inactivity, following an ejaculation, the first female was replaced by another one recently mated and also with another male's seminal plug in the vagina. In both conditions (control and sexually satiated), after the female change the following parameters were registered: (i) latency to the first behavioural pattern of intromission, (ii) number of behavioural patterns of intromission necessary to remove the seminal plug from the vagina and (iii) time to take-out the seminal plug from the vagina.

(B) Capacity of sexually satiated males to disrupt other male's sperm transport

Following the aforementioned design, 5 min after the males under the control or sexual satiety condition removed the seminal plug from the vagina deposited by another male, the female was anaesthetized with sodium pentobarbital (26 mg/kg, *i.p.*; Pfizer, México DF, México). Later a medial abdominal incision, the uterine horns were tied proximally and distally using 000 silk threads, removed from the abdominal cavity, and immersed in a Petri dish containing physiological saline solution at 37 °C. This procedure allows the elimination of blood, fat tissue and external uterine vessels, besides serving to maintain the uterine fluid under a controlled temperature for adequate spermatozoa survival. The uterine fluid content of both uterine horns was placed into a 1.5 mL micro-centrifuge tube and maintained

in a thermo bath at 37 °C. The variable evaluated in the uterine fluid content was the sperm count as described in detail elsewhere (Lucio *et al.*, 2009). Sperm count was evaluated as follows: 10 µL of semen was diluted 1 : 200 with the help of a Shali pipette. After vigorous shaking, 10 µL of the diluted semen was placed in a Neubauer haemocytometer for counting under a 20× microscope objective. The number of spermatozoa in five squares was counted. The mean was multiplied by 10⁶ to obtain the sperm count in the uterine sample. Sperm count is defined as the number of spermatozoa expressed in millions. A complete absence of spermatozoa in the female's uterine horns was designated as sperm transport prevention, whereas a reduced count spermatozoa was designated as sperm transport interruption.

(C) Effectiveness of sexually satiated males to preclude pregnancy after other male's sperm transport disruption

Eight males were tested before and after sexual satiety. This sample was independent of that used for the previous experiments. The experimental design was the same as that reported for experiment A; however, recently mated, non-ovariectomized females were exposed to control or sexually satiated males. Immediately after the seminal plug removal the females were individually caged and twice daily checked for pups' delivery for 21 days.

Experiment 2

Ejaculate features along recovery after sexual satiety

Immediately after sexual satiety, the males ($n = 8$) were individually housed for recovery. Five, 10 and 15 days later they executed one ejaculatory series. To prevent testing after-effects, an independent group of males that reached sexual satiety and that rested for 15 days was added ($n = 8$). The control group, before sexual satiety, consisted of males executing only one ejaculatory series.

Once the ejaculatory behavioural motor pattern was observed, the female was transferred from the observation cylinder to an empty cage, where it was left for 5 min before anaesthetization with sodium pentobarbital (26 mg/kg, i.p.; Pfizer). The procedure to obtain the uteri fluid content was the same as that used for experiment 1B (vide supra). In the uterine fluid we evaluated the sperm count, defined as the number of spermatozoa expressed in millions. The seminal plug was removed surgically from the vagina by separating the pubic symphysis and making an incision in the vaginal wall. The seminal plug was detached from the lateral and ventral vaginal walls plus the cervix (Lucio *et al.*, 2009). The seminal plug parameters measured were as follows: size using a digital calliper (length and width), expressed in millimetres, and weight, using an analytical balance, expressed in milligrams. After collecting the semen and the seminal plug, the females were euthanized using an additional injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.; Pfizer) (Lucio *et al.*, 2009).

Experiment 3

Impregnation capacity of sexually satiated and rested males

Control and sexually satiated males ($n = 6$, each) were tested for their fertile capacity. The sexually satiated group was divided in two: tested immediately after sexual satiety or after allowing 15 days of sexual abstinence during which the animals were

individually caged (27 cm height × 37 cm length × 15 cm width). Control, sexually satiated and sexually rested males were placed in reproductive cages to evaluate impregnation capacity. Reproductive cages (32 cm height × 47 cm length × 20 cm width) contained one male and three naturally cycling females, cohabiting during 15 days, corresponding to three oestrous cycles. The females were placed when showing a vaginal pro-oestrous, determined by vaginal smear. The date of parturition was recorded to determine the day of pregnancy by subtracting 21 days regressively. The parameters evaluated were as follows: (i) Fertility index, established by dividing the number of pregnant females by the number of available females, (ii) number of pregnant females in the three different cycles and (iii) number of pups per female.

Statistical analysis

All data were expressed as mean ± SE. Most data did not follow a normal distribution and therefore were compared with non-parametric statistics. Two independent samples of rank scale numeric data were compared by the Mann–Whitney *U*-test, whereas for dependent samples: before and after sexual satiety, the Wilcoxon *T* test was used. Proportion comparisons were made with the Fisher *F* test. All statistical measurements were performed using Sigma Stat version 3.5 software for Windows Vista (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). The significance level was fixed at 0.05 (Zar, 1999).

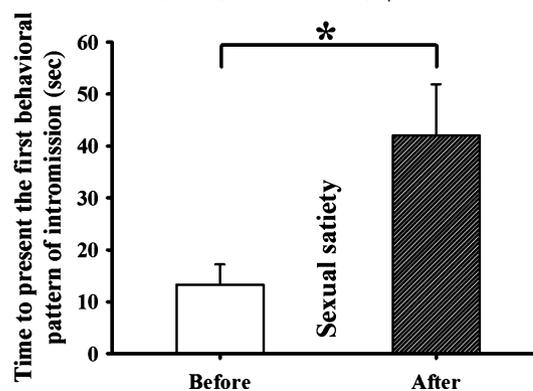
RESULTS

Experiment 1

(A) Ability of sexually satiated males to take-out the seminal plugs deposited by other males

Seven of nine sexually satiated males reassumed copulation when a novel inseminated female was introduced. One of these seven males presented the behavioural ejaculatory pattern before the seminal plug was dislodged. Thus, the analysis of seminal plug dislodgement includes six males. The time to present the first behavioural intromission was longer for the sexually satiated males, under the Coolidge effect than for males before sexual satiety ($p = 0.031$ Wilcoxon *T* test) (Fig. 1). As previously reported (Tlachi-López *et al.*, 2012) sexually satiated males

Figure 1 Time to present the first behavioural pattern of intromission before and after sexual satiety. After sexual satiety, males under the Coolidge effect spent more time to present this behavioural parameter. Data are expressed as mean ± SE; $n = 6$; Wilcoxon *T* test, * $p < 0.05$.



executed a similar number of behavioural patterns of intromission to take-out the seminal plug from the vagina before (mean \pm SE, 2.8 ± 0.5) and after sexual satiation (2.1 ± 0.4 , $p = 0.875$, Wilcoxon T test). The time to take-out the seminal plug from the vagina was 63.2 ± 25.0 sec before sexual satiation and 96.8 ± 31.5 sec after sexual satiety ($p = 0.313$, Wilcoxon T test).

(B) Capacity of sexually satiated males to disrupt other male's sperm transport

Before sexual satiation, one of six males interrupted sperm transport, whereas the remaining five prevented it, defined as the complete absence of spermatozoa in the female's uterine horns. After sexual satiation two of six males interrupted sperm transport, whereas four prevented it. No difference was observed in this proportion before and after satiation (Fisher F test, $p = 1.000$). Regardless of the sexual condition, three animals did not completely prevent other male's sperm transport, however, their sexual activity effectively diminished to less than 22% the sperm count in the female's uterine horns.

(C) Effectiveness of sexually satiated males to preclude pregnancy after other male's sperm transport disruption

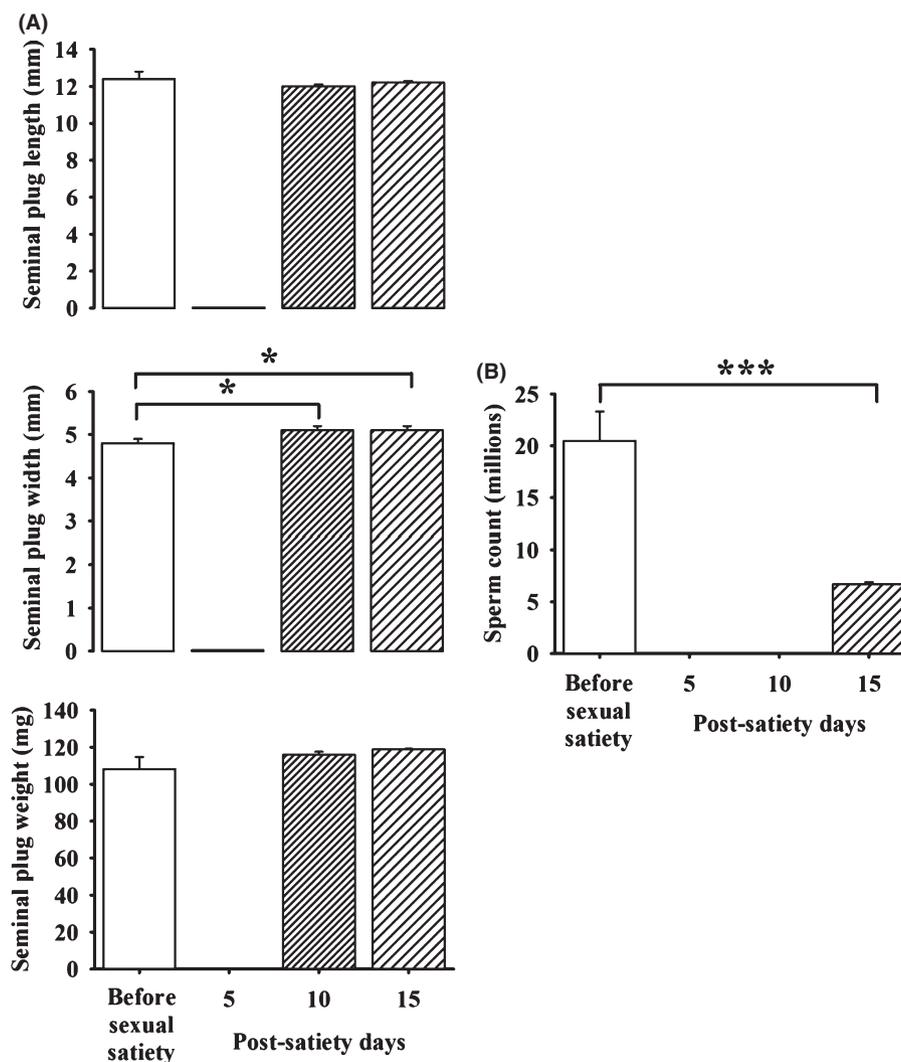
Before and after satiation males equally abolished pregnancy because of the disruption of sperm transport induced by their sexual activity. Thus, none of the females previously impregnated by other males showed pups after they copulated with sexually satiated males, under the Coolidge effect. Six of eight satiated males reinitiated copulation and all six dislodged seminal plugs from the inseminated females.

Experiment 2

Ejaculate features along recovery after sexual satiety

The ejaculate of the sexually satiated males was different in the various days after sexual satiation. At day 5 post-satiety, there was no seminal plug in the vagina or spermatozoa in the uteri. The same animals tested 5 days later, at day 10 post-satiety, deposited seminal plugs with features similar to those of control ones (Fig. 2A) without being adhered to the vaginal walls

Figure 2 Seminal plug's characteristics (A) and sperm count (B) in control and sexually satiated males tested 5, 10 and 15 days after satiation. No seminal plug (A) or sperm (B) were found in the vagina or uteri 5 days after satiation. At the 10th day after satiety well-formed plugs were found but no spermatozoa was present in the uterine horns. At day 15 post-satiation spermatozoa were found in uteri, and its count was reduced. Data are expressed as mean \pm SE; $n = 8$; Mann-Whitney U -test, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.



and cervix. This lack of adhesion resulted in retention of the spermatozoa in the vagina. In a final test of these same subjects, on day 15 post-satiety, 5 days after the previous test, the seminal plugs had the control characteristics (Fig. 2A) and were adhered to the vaginal walls and cervix. Seminal plugs obtained at 10 or 15 post-satiety days were similar in weight and length, but showed statistical differences in width vs. those obtained before sexual satiety (Fig. 2A; 10 days vs. control $p = 0.045$; and 15 days vs. control $p = 0.031$; Mann–Whitney U -tests). The sperm count in the uterine horns at day 15 post-satiety was reduced (Fig. 2B) as compared with controls. Notwithstanding, such reduction in sperm count could be the result of previous ejaculations (at days 5 and 10). In the independent group of males that rested for 15 days after sexual satiety the sperm count was higher than that obtained from animals with previous ejaculations 15.2 ± 2.0 vs. 6.7 ± 0.2 million, respectively ($p = 0.001$; Mann–Whitney U -test) and similar to that obtained from control males that were not subjected to sexual satiety: 20.5 ± 2.8 million ($p = 0.184$; Mann–Whitney U -test).

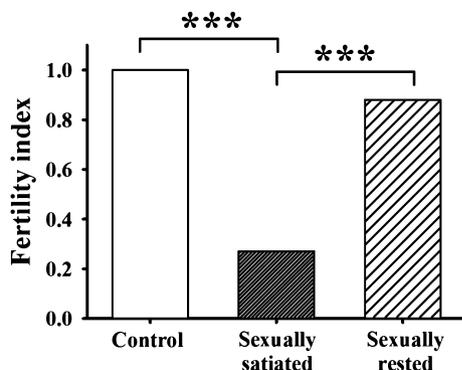
Experiment 3

Impregnation capacity of sexually satiated and rested males

Sexually satiated males impregnated (5/18) females and the sexually satiated males that rested for 15 days impregnated 16 of 18 females. However, control males impregnated all females (18/18). Thus, the fertility index was 0.28, 0.89 and 1.0 for the sexually satiated, sexually rested and control males respectively. Rested and control males did not differ in their fertility index, whereas this parameter diverged between sexually satiated vs. control and vs. rested males (Fisher F test, $p = 0.001$ in both comparisons) (Fig. 3).

Females that copulated with control males became pregnant in the first (14 of 18) or the second cycle (4 of 18). The females that cohabited with sexually satiated males were impregnated in the second (3 of 18) or third cycle (2 out of 18). Only one of the sexually satiated males impregnated all three females. Interestingly, when the sexually satiated males rested for 15 days they impregnated 16 of the 18 females: 9 in the first, 5 in the second and 2 in the third oestrous cycles. Four rested males impregnated their three corresponding females, only one of them

Figure 3 Fertility index (number of pregnant females/total available females) shown by control, sexually satiated and sexually satiated males that rested for 15 days. Sexually satiated males showed lowest fertility index compared with sexually rested and control males. Six males and 18 females per sexual condition; Fisher F test, *** $p < 0.001$.



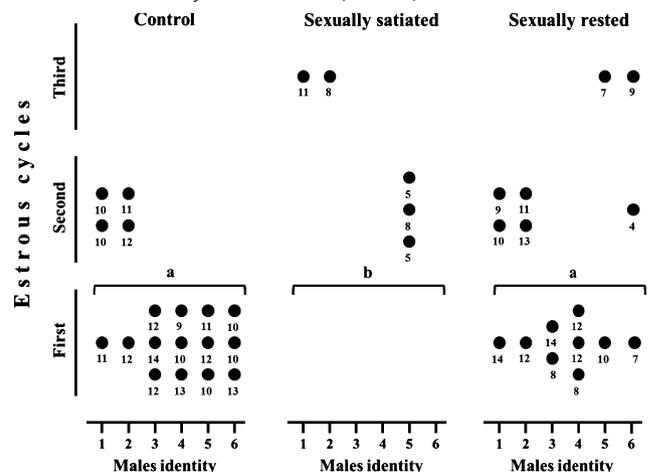
during the first cycle (Fig. 4). Statistical comparisons between the number of pregnant females in the three oestrous cycles and the male's sexual condition (control, satiated and rested) revealed differences only in the first cycle: sexually satiated males vs. both control and rested males (Fisher F test, $p = 0.001$, for both cases). In the second and third cycles no differences were found. Thus, during the first cycle sexually satiated males rested for 15 days were able to impregnate 50% of females (9 out of 18) similar to the 78% (14 of 18) of the females impregnated by control subjects.

The analysis of the number of pups was based only on those females that became pregnant. Clearly, the five pregnant females after cohabitation with sexually satiated males had a lower number of pups than those of the 18 females impregnated by control males (mean number of pups \pm SE, 7.4 ± 1.1 vs. 11.2 ± 0.3 , Mann–Whitney U -test, $p = 0.006$). The females that mated with males that rested for 15 days had a mean of 10 (± 0.7) pups. Such number did not differ from that observed in females that copulated with control or sexually satiated males.

DISCUSSION

As described by others (Fisher, 1962; Wilson *et al.*, 1963; Zucker & Wade, 1968; Fiorino *et al.*, 1997) and ourselves (Tlachi-López *et al.*, 2012), we found that most of the males resumed copulation after changing the female with which they copulated to satiety, that is, showed the Coolidge effect. It has been described that such copulatory resumption includes ejaculation (Karen & Barfield, 1975; Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994, 1995; Phillips-Farfán & Fernández-Guasti, 2009). However, the males displayed the behavioural motor pattern characteristic of ejaculation, but failed to expel semen (Tlachi-López *et al.*, 2012).

Figure 4 Number of pregnant females in three consecutive oestrous cycles and number of pups delivered after cohabitation for 15 days with control, sexually satiated or sexually rested males. Each dot represents a pregnant female accompanied by the number of pups distributed in three oestrous cycles distributed in the three groups: control, satiated and rested – after 15 days of sexual abstinence. Control males impregnated all females during the first and second cycles. Sexually satiated males impregnated few females during the second and third cycles, whereas the sexually rested males impregnated most of the females during the first and second cycles. The number of pregnant females in the first oestrous cycle differed between sexually satiated males and the other two groups (see text). Mann–Whitney U -test $p = 0.001$ for both cases. The number of pups/pregnant female was also reduced in sexually satiated males (see text). 'b' is different from 'a'.



Present results of the first experiment (1A) further support the notion that each behavioural motor pattern of intromission was accompanied by a penile erection, because the number of intromissions and the time to dislodge the seminal plug from the vagina was similar in males tested before and after sexual satiation. Thus, after sexual satiety the penile erection remains equally effective as before satiation, although satiated males showed longer latencies to display the first behavioural pattern of intromission.

It has been described that one of the main functions of the seminal plug is to hold the spermatozoa under pressure until transcervical transport is completed (Matthews & Adler, 1977). In Norway rats, the first post-ejaculatory interval lasts 5–10 min (Dewsbury, 1972), time enough to prevent the male from dislodging his own plug before transcervical sperm transport. Present data (experiment 1B) revealed an almost abolished spermatozoa presence in the uterine horns of just mated females that copulated under the Coolidge effect with sexually satiated males. This finding suggests that during the first behavioural patterns of intromission the penile spines detach the plug from the cervix and vagina, inducing its dislodgement and preventing the spermatozoa to flux across the cervix. After these observations, we propose that the male does not require taking out the plug from the vagina to disturb sperm transport. In fact the study of Matthews & Adler (1977) supports this idea. They showed that a single post-ejaculatory intromission executed at 0–2 min produced a large reduction in uterine sperm count. Furthermore, the hugely reduced sperm count, produced by the mating activity of sexually satiated males exposed to the Coolidge effect, successfully prevented putative pregnancy generated by other males (experiment 1C). These results, taken together, reinforce the idea (Tlachi-López *et al.*, 2012) that impregnation rivalry might be a biological explanation to maintain copulation capacity after sexual satiety in rats that have promiscuous, multi-male mating encounters (Wallach & Hart, 1983). If the main function of copulation in sexually satiated rats, exposed to the Coolidge effect, is to withdraw the seminal plug deposited by other males and such action is accomplished after few intromissions, it is valid to ask why sexually satiated males under this condition display one (or several) behavioural ejaculations (Hsiao, 1965). The answer to this question remains a matter of speculation. We suppose that behavioural ejaculation is achieved as a result of the excitement obtained by the previous intromissions (Bermant, 1967; Clement & Giuliano, 2011). That is the excitation produced by intromissions arrives to the ejaculation threshold producing this behavioural response that seems similar between sexually satiated and non-satiated males.

The biological significance of many ejaculations may be initially (up to the fourth) to impregnate the female (Toner & Adler, 1986) and to safeguard the male's investment from displacement of its ejaculate by another male (Lanier *et al.*, 1979), and later (from the fifth ejaculation onwards) to prevent that other males fertilize the receptive female (Tlachi-López *et al.*, 2012). However, to copulate several times, as occurs in natural conditions, or to copulate until sexual satiety in laboratory circumstances has behavioural and physiological costs. The behavioural consequences are primarily the inhibition of sexual intercourse (Phillips-Farfán & Fernández-Guasti, 2009), whereas the physiological costs are a dramatic reduction in seminal plug and sperm concentration (Austin & Dewsbury, 1986; Toner & Adler, 1986),

implying the depletion of the accessory sexual glands secretions (Pessah & Kochva, 1975; Purvis *et al.*, 1986) and a drastic decrease in epididymal spermatozoa (Judd *et al.*, 1997; Tlachi-López *et al.*, 2012). Interestingly, it has been demonstrated that during copulation to sexual satiety and immediately after there is an increase in serum testosterone levels (Bonilla-Jaime *et al.*, 2006) that return to a basal concentration 24 h later (Fernández-Guasti *et al.*, 2003). The recovery of the behavioural patterns after sexual satiety must be also accompanied by the recuperation of the internal and external genital components that lead to fertility; however, they do not seem to be parallel. Thus, the maximal behavioural inhibition is found 24–48 h after sexual satiety when males do not mate even if exposed to unknown sexually receptive females (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994; Romano-Torres *et al.*, 2007). Four days after sexual satiety, most males (63%) showed a single ejaculatory series that contains various mounts, intromissions and a behavioural ejaculation after which males do not resume mating, whereas 3 days later (i.e. 7 days after sexual satiety) all males displayed few ejaculatory series but much less than control males (Romano-Torres *et al.*, 2007). Interestingly, a drastic reduction in seminal vesicles secretion is observed after many hours of continuous copulation and its recovery requires 4–6 days (Pessah & Kochva, 1975; Purvis *et al.*, 1986). To remind, the seminal plug's formation depends on the seminal vesicles and coagulating glands activities (Beil & Hart, 1973; Williams-Ashman, 1983). The seminal vesicles secretions constitute the substrate to the vesiculosa synthesized and excreted by the coagulating glands (Beil & Hart, 1973; Curry & Atherton, 1990). Present data revealed that 5 days after sexual satiety the behavioural ejaculations were unaccompanied by seminal plug deposition in vagina or spermatozoa in the uterine horns (experiment 2), leading to the conclusion that the secretions of all accessory glands, and possibly also the epididymal sperm count (vide infra), remained unrecovered. Interestingly at 10 days post-satiety, the ejaculate includes seminal plug and spermatozoa. The weight and size of the plug indicate that the seminal vesicles and coagulating glands secretions are re-established (Dewsbury, 1982), although at this interval the spermatozoa was found in the vagina instead of in the uterus most likely because of the lack of adhesion of the well-coagulated plug. As aforementioned, sperm transport occurs because the plug exerts a hydrostatic pressure pushing spermatozoa from the vagina to the uterus (Blandau, 1945) and for this process the seminal plug strong adhesion is crucial. In the past, we found that the prostate lesion prevents vaginal plug's adhesion (Tlachi-López *et al.*, 2011) suggesting that prostate's secretion recovery is slower than that of the seminal vesicles and coagulating glands. Future histological experiments are in progress to explore this suggestion.

The total recuperation of the secretions of the accessory sexual glands seems to be completed 15 days after sexual satiety when coagulated seminal plugs are tightly adhered to the vagina promoting the sperm transport from the vagina to the uteri. Nonetheless, the sperm count of the males that repeatedly ejaculated (at 5 and 10 days post-satiety) was still reduced by 67%, and of the animals that rested for 15 days after satiety was reduced by 26% of the expected quantity, with about 20 million, corresponding to 100%. In line, sexually exhausted males under the Coolidge effect have a decreased sperm count in the epididymal caudae of around 44% (Tlachi-López *et al.*, 2012). These findings, taken together, suggest that the testicular and epididymal

functions are still incomplete even 15 days after copulation to satiety. It seems that full sperm count recovery needs a longer time than that required for the seminal plasma. Thus, we propose that after a continuous ad libitum copulation test the different ejaculate components recover at different intervals: the seminal vesicles and coagulating gland secretions' recover first (within 10 days), the prostate secretions recover later (within the 10th and 15th day's post-satiety) and finally the full sperm count (after the 15th day). In addition, the sperm count was much higher in males that rested for 15 days post-satiety (15 millions) than that of animals also tested 15 days after satiety, but that were sequentially tested three times with a 5 days interval (6 millions). These data strengthen the relevance of after-effects of previous ejaculations on sperm counts as it does on copulatory behaviour parameters (Larsson, 1956). It is well known that the accessory glands' secretion depend upon the presence of androgens (Mann & Lutwak-Mann, 1981); thus, it may be proposed that the testosterone serum levels drastic increase after repeated mating triggers the synthesis of the accessory glands secretions.

It is considered that sexual behaviour after satiety is fully recovered when males present the behavioural copulatory capacity at basal values (similar to that displayed by sexually experienced non-satiated males). Generally, it is accepted that such capacity is attained 15–18 days after exhaustion (Beach & Jordan, 1956; Larsson, 1956). In a final experiment we showed that sexually satiated males were able to impregnate only five females during the second and third cycles, and those females had the lower number of pups; whereas males that rested for 15 days after satiety impregnated almost all females: 50, 28 and 11% during the first, second and third cycles, and those females produced a number of pups that did not differ from those produced by control males. Considering the results of sperm count in experiment 2 and those of fertility in experiment 3, it seems that males that rested for 15 days after satiety were equally able as control ones to ejaculate, to impregnate most of the females (89%) and to produce the same number of pups per litter. These data reveal that a sperm count of around of 15 million is equally effective as 20 million to fertilize and those 15 days of sexual abstinence are enough to recover full fertility although the sperm count seemed reduced.

CONCLUSION

The Coolidge effect is a study model useful to demonstrate that seminal expulsion is independent of the behavioural pattern of ejaculation. Sexually satiated males, exposed to the Coolidge effect, are unable to expel seminal fluid, but retain their penile erectile ability, which permits intromission and removal of the seminal plugs deposited by other males. This capacity gives sexually satiated males the ability to interfere with the transcervical sperm transport and to effectively prevent putative impregnation of other males, rendering them reproductive competitors. After sexual satiety, the recuperation of the full copulatory behaviour parameters is not accompanied by a parallel recovery of the ejaculate features: the sex accessory glands function seems to be recuperated earlier than that of the testicle and epididymis.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge the technical support received by M. Sc. Rebeca Reyes Serrano and Mrs. Blanca Gómez Quintanar. This

work was partially supported by CONACYT grant 105502 to RAL, and PROMEP/UATx Red de Cuerpos Académicos "Fisiología, Farmacología y Biología Molecular de la Conducta", Universidad Autónoma de Tlaxcala (Proyecto CACyPi-UATx-2013). VRP received a fellowship from SEP Becanet-Superior IAB-STAA921R4VAAIR and 2ABST4VAA1RAA921R. Experiments were carried out at the Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala and CINVESTAV.

REFERENCES

- Ágmo A. (1997) Male rat sexual behavior. *Brain Res Protocol* 1, 203–209.
- Austin D & Dewsbury DA. (1986) Reproductive capacity of male laboratory rats. *Physiol Behav* 37, 627–632.
- Beach FA & Jordan L. (1956) Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *Q J Exp Psychol* 8, 121–133.
- Beil ER & Hart GR. (1973) Cowper's gland secretion in rat semen coagulation. II Identification of the potentiating factor secreted by the coagulating glands. *Biol Reprod* 8, 613–617.
- Bermant G. (1967) Copulation in rats. *Psychol Today* 1, 52–61.
- Blandau RJ. (1945) On the factors involved in sperm transport through the cervix uteri of the albino rat. *Am J Anat* 77, 253–273.
- Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Arteaga-Silva M & Retana-Márquez S. (2006) Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Horm Behav* 49, 376–382.
- Clement F & Giuliano F. (2011) Physiology of ejaculation. In: *Cancer and Sexual Health, Current Clinical Urology* (eds JP Mulhall, I Incrocci, I Goldstein & R Rosen), pp. 77–89. Humana Press, New England.
- Curry PT & Atherton W. (1990) Seminal vesicles: development, secretory products, and fertility. *Arch Androl* 25, 107–113.
- Dewsbury DA. (1972) Patterns of copulatory behavior in male mammals. *Q Rev Biol* 47, 1–33.
- Dewsbury DA. (1982) Ejaculate cost and male choice. *Am Nat* 119, 601–610.
- Fernández-Guasti A & Rodríguez-Manzo G. (2003) Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scand J Psychol* 44, 257–263.
- Fernández-Guasti A, Swaab D & Rodríguez-Manzo G. (2003) Sexual behavior reduces hypothalamic androgen receptor immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* 28, 501–512.
- Fiorino DF, Coury A & Phillips AG. (1997) Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats. *J Neurosci* 17, 4849–4855.
- Fisher AE. (1962) Effects of stimulus variation on sexual satiation in the male rat. *J Comp Physiol Psychol* 55, 614–620.
- Fowler H & Whalen RE. (1961) Variation in incentive stimulus and sexual behaviour in the male rat. *J Comp Physiol Psychol* 54, 68–71.
- Hsiao S. (1965) Effect of female variation on sexual satiation in the male rat. *J Comp Physiol Psychol* 60, 467–469.
- Hsiao S. (1969) The Coolidge effect in male rat copulatory behaviour: failure to replicate Fisher's results. *Psychon Sci* 14, 1–2.
- Judd JE, Berndtson WE & Castro ACS. (1997) Extragonadal sperm reserves, sperm-depletion rates, numbers of sperm per mating, and fertility with successive mating by intact or unilaterally vasectomized rats. *J Androl* 18, 698–707.
- Karen LM & Barfield RJ. (1975) Differential rates of exhaustion and recovery of several parameters of male rat sexual behavior. *J Comp Physiol Psychol* 88, 693–703.
- Lanier DI, Estep DQ & Dewsbury DA. (1979) Role of prolonged copulatory behavior in facilitating reproductive success in a competitive mating situation in laboratory rats. *J Comp Physiol Psychol* 93, 781–792.
- Larsson K. (1956) *Conditioning and Sexual Behavior in the Male Albino Rat*, pp. 101–113. Almqvist and Wiksells Stockholm, Stockholm.

- Lucio RA, Manzo J, Martínez-Gómez M, Sachs BD & Pacheco P. (1994) Participation of pelvic nerve branches in lame rat copulatory behavior. *Physiol Behav* 55, 241–246.
- Lucio RA, Tlachi-López JL, López AA, Zempoalteca R & Velázquez-Moctezuma J. (2009) Analysis of the parameters of the ejaculate in the laboratory Wistar rat: technical description. *Vet Mex* 40, 405–415.
- Mann T & Lutwak-Mann C. (1981) *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin.
- Matthews MK & Adler NT. (1977) Facilitative and inhibitory influences of reproductive behavior on sperm transport in rats. *J Comp Physiol Psychol* 91, 727–741.
- Matthews MK & Adler NT. (1978) Systematic interrelationship of mating, vaginal plug and sperm transport in the rat. *Physiol Behav* 20, 303–309.
- Moralí G, Pia MA, Contreras JL, Arteaga M, González-Vidal MD & Beyer C. (2003) Detailed analysis of the male copulatory motor patterns in mammals: hormonal bases. *Scand J Psychol* 44, 79–288.
- Pessah H & Kochva E. (1975) The secretory activity of the seminal vesicles in the rat after copulation. *Biol Reprod* 13, 557–560.
- Phillips-Farfán BV & Fernández-Guasti A. (2009) Endocrine, neural and pharmacological aspects of sexual satiety in male rats. *Neurosci Biobehav Rev* 33, 442–455.
- Purvis K, Haug E, Thomassen Y, Mevag B & Rui H. (1986) Short-term effects of mating on the accessory sex gland of the male rat. *J Reprod Fertil* 77, 373–380.
- Rodríguez-Manzo G & Fernández-Guasti A. (1994) Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. *Behav Brain Res* 62, 127–134.
- Rodríguez-Manzo G & Fernández-Guasti A. (1995) Opioid antagonists and the sexual satiation phenomenon. *Psychopharmacology* 122, 131–136.
- Romano-Torres M, Phillips-Farfán BV, Chavira R, Rodríguez-Manzo G & Fernández-Guasti A. (2007) Relationship between sexual satiety and brain androgen receptors. *Neuroendocrinology* 85, 16–26.
- Sachs BD & Meisel RL. (1988) The physiology of male sexual behavior. In: *The Physiology of Reproduction* (eds E Knobil & JD Neill), pp. 1393–1485. Raven Press, New York.
- Tlachi-López JL, López A, Hoffman K, Velázquez-Moctezuma J, García-Lorenzana M & Lucio RA. (2011) Rat dorsal prostate is necessary for vaginal adhesion of the seminal plug and sperm motility in the uterine horns. *Biol Res* 44, 259–267.
- Tlachi-López JL, Eguibar JR, Fernández-Guasti A & Lucio RA. (2012) Copulation and ejaculation in male rats under sexual satiety and the Coolidge effect. *Physiol Behav* 106, 626–630.
- Toner JP & Adler NT. (1985) Potency of rat ejaculations varies with their order and with male age. *Physiol Behav* 35, 113–115.
- Toner JP & Adler NT. (1986) The pre-ejaculatory behavior of male and female rats affects the number of sperm in the vagina and uterus. *Physiol Behav* 36, 363–367.
- Wallach SJR & Hart BL. (1983) The role of the striated penile muscles of the male rat in seminal plug dislodgement and deposition. *Physiol Behav* 31, 815–821.
- Williams-Ashman GH. (1983) Regulatory features of seminal vesicle development and function. *Curr Top Cell Regul* 22, 201–275.
- Wilson JR, Kuehn RE & Beach FA. (1963) Modification in the sexual behaviour of male rats produced by changing the stimulus female. *J Comp Physiol Psychol* 56, 636–644.
- Zar HJ. (1999) *Biostatistical Analysis*, pp. 1–663. Prentice Hall Inc., Upper Saddle River, NJ.
- Zucker I & Wade G. (1968) Sexual preferences of male rats. *J Comp Physiol* 66, 816–819.

B. Congresos nacionales



Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas

Memoria



56

congreso
nacional
de ciencias
fisiológicas

Tlaxcala, Tlaxcala del 1 al 5 de Septiembre 2013



0-1.4 Recuperación de la capacidad fértil de la rata macho saciada sexualmente

Tlachi-López JL, Rodríguez-Piedracruz V, Lucio RA.
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

La rata macho al copular repetidamente muestra saciedad sexual. No obstante, al reemplazarle a la hembra, reanuda su actividad, desplegando los patrones motores copulatorios, incluso hasta el de la eyaculación. Durante tal "eyaculación" no expele fluido seminal que le permita fertilizar a la hembra con la que reanudó la cópula. Tras la sexta eyaculación, los espermatozoides y tapón seminal prácticamente desaparecen. Por ello, nos preguntamos ¿cuánto tiempo requieren los machos saciados sexualmente para recuperar la capacidad eyaculatoria que les permita inducir preñez? Se utilizaron ratas de la cepa Wistar mantenidas en condiciones estándar de bioterio. Machos expertos sexualmente y hembras en estro natural. Con ellos se formaron unidades reproductivas, un macho y tres hembras, cohabitando durante 15 días. La cohabitación se dividió en períodos de 1-5, 6-10 y 11-15 días, abarcando tres ciclos estrales. La etapa de estro se determinó mediante frotis vaginales realizados durante 15 días continuos. Conforme las hembras se preñaban, se colocaban en jaulas individuales hasta el parto. Los grupos (n=6) fueron de machos expertos sexualmente (G1); machos saciados sexualmente (G2) y machos con abstinencia sexual de 15 días tras la saciedad sexual (G3). Los parámetros evaluados fueron, día de fertilización, número de hembras preñadas y número de crías. Los machos G1 preñaron al 78% de sus hembras (14/18), en días 1-5 de cohabitación y al 22% (4/18) en los días 6-10. Los machos G2 preñaron al 16% de sus hembras (3/18), en días 6-10 de cohabitación y al 11% (2/18) en los días 11-15. Los machos G3 preñaron al 50% de sus hembras (9/18) en los días 16-20, 28% (4/18) en los días 21-25 y 12% (3/18) en los días 26-30. El número de crías disminuyó significativamente en los G2 y G3 versus G1 (7.4 ± 0.4 ; 8.8 ± 0.9 ; 11.6 ± 0.2 , respectivamente). Así, 15 días de recuperación sexual son insuficientes para producir el eyaculado óptimo que fertilice al mayor número de hembras. Esto indica que no existe correlación entre la recuperación de la actividad motora que ocurre a los 15-16 días post-saciedad y la expulsión seminal para preñar a un mayor número de hembras.

Agradecimientos:

Financiamiento: CONACYT-105502 (RAL).





C - 165 **Interrupción o evitación del transporte espermático transcervical como estrategia reproductiva de la rata macho saciada sexualmente**

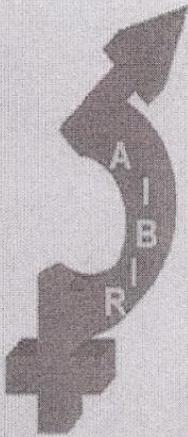
Rodríguez-Piedracruz V, Tlachi-López JL, Lucio RA.
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta; Universidad Autónoma de Tlaxcala.

La rata macho ejecuta patrones motores copulatorios acompañados de respuestas genitales; la intromisión de la erección peneana, la eyaculación de la expulsión seminal. Esta última no es presentada por los machos saciados sexualmente. Por ello, nos preguntamos si la respuesta genital de erección la manifiestan los machos saciados sexualmente. Una forma indirecta de evaluar la erección es mediante la obtención del tapón seminal al realizar inserciones peneanas. El desprendimiento de tapones entre 5-6 min tras la eyaculación, interfiere con el transporte espermático transcervical. Ratas Wistar; machos expertos sexualmente, hembras ovariectomizadas (estro inducido) e intactas (estro natural) fueron utilizadas. Los machos (n=9) realizaron una eyaculación con hembras ovariectomizadas, posteriormente, fueron reemplazadas por otras ovariectomizadas recién inseminadas, copularon hasta desprender el tapón de la vagina. Transcurridos 7 días, los machos copularon hasta saciarse sexualmente con hembras ovariectomizadas, 6 de 9 machos reanudaron la cópula hasta desprender el tapón seminal. Obtuvimos que los machos antes y después de la saciedad sexual presentan tiempo similar para desprender los tapones (63.20 ± 25.0 vs 96.80 ± 31.5 seg, respectivamente) y despliegan el mismo número de intromisiones (2.8 ± 0.50 vs 2.1 ± 0.04 , respectivamente). Sin embargo, el tiempo para realizar la primera intromisión, es significativamente mayor después de la saciedad sexual (42.0 ± 9.90 seg) que antes de ella (11.80 ± 3.6 seg). Por ello, determinamos la cuenta espermática en útero. Antes de la saciedad, 5 de 6 machos impidieron el transporte (no hubo espermatozoides) y 1 lo interrumpió (1.5×10^6 espermatozoides). Después de la saciedad, 4 de 6 machos impidieron el transporte y 2 lo interrumpieron (4.5×10^6 espermatozoides). En otro experimento, los machos copularon con hembras ovariectomizadas hasta saciarse sexualmente, inmediatamente después las hembras fueron reemplazadas por intactas recién inseminadas para desprenderles el tapón y determinar el efecto sobre la preñez. Observamos que los machos impidieron la preñez. Estos resultados indican irrefutablemente que los machos saciados sexualmente mantienen la erección peneana, siendo igual de óptima que antes de la saciedad. Esto les permite interferir con el transporte espermático de otros machos manteniéndolos como rivales copulatorios.

Agradecimientos:

FINANCIAMIENTO: SEP BECANET-Superior-Titulación y CONACYT 105502 (RAL).



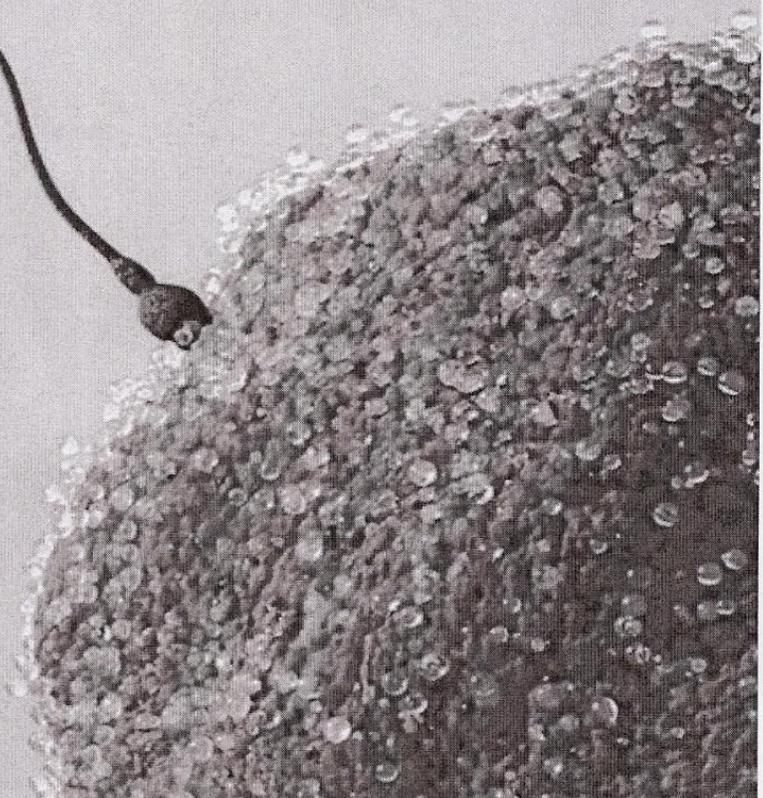


Academia de Investigación en Biología de la
Reproducción, A.C.

AIBIR

XXXIX REUNIÓN ANUAL

Veracruz, Ver.
Del 28 al 31 de Mayo de
2014
Gran Hotel Diligencias



Coordinación de la
Investigación Científica

SEP

SUBSECRETARIA DE
EDUCACIÓN SUPERIOR

Evaluación de la conducta copulatoria de la rata macho sometida al aislamiento socio-materno durante el periodo postnatal: papel de los estímulos táctiles.



Aguilar C^{1,2}, Lucio RA³, Flórez-Jiménez M¹ Rodríguez-Piedracruz V², y Melo AI¹

¹ *Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

² *Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

³ *Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

En ratas macho, el aislamiento socio-materno temprano, a través de la crianza artificial (CA), altera los reflejos peneanos ex copula. En los experimentos en copula encontramos que se reduce el porcentaje de machos que ejecutan el patrón motor de eyaculación y están muy incrementadas las latencias de monta e intromisión, aún tras cuatro pruebas copulatorias. Consideramos que al duplicar el número de oportunidades copulatorias, a ocho pruebas, y proveyéndoles de estimulación táctil-perineal mejorarían su desempeño copulatorio. Tal estimulación fue en sustitución de los lamidos genitales que la madre proporciona y que, incide en los procesos de masculinización. Para ello, machos de 4 días de edad fueron distribuidos al azar en los siguiente grupos: 1) Criados por su madre (CM), 2) Separados del nido y mantenidos dentro de un sistema de crianza artificial (CA), 3) Mantenidos en CA y provistos de estimulación táctil-perineal, 5 veces al día durante 45 seg, (CA-Perineal), 4) Mantenidos en CA y provistos de estimulación táctil-perineal-corporal, 5 veces al día durante 45 seg, (CA-Perineal-Corporal). Todas las crías fueron destetadas al día 22 de vida y alojadas en cajas colectivas dentro del bioterio. A la edad de 3 meses se iniciaron las pruebas copulatorias con hembras ovariectomizadas con estro inducido hormonalmente. Encontramos que el porcentaje de machos CA y CA-Táctil-Perineal que presentaron el patrón eyaculatorio, en la octava prueba, fue significativamente menor que el de los machos CM y CA-Perineal-Corporal (0% y 25% vs 91% y 100%, respectivamente; $p < 0.05$ en todas las comparaciones). Además, los machos CA presentaron mayor latencia de monta y de intromisión en las pruebas 3, 4 y 6, respecto a los machos CM y CA-Perineal-Corporal, $p < 0.05$. El número de intromisiones de los machos CA fue significativamente menor en comparación con los machos CM y CA-Perineal-Corporal ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que, a pesar de una mayor número de oportunidades copulatorias, los machos CA no mejoraron su desempeño sexual. Además que el reemplazo de la estimulación táctil-perineales-corporal previene algunos de los efectos del aislamiento temprano. Proyecto parcialmente apoyado por CONACYT # 156413 a Dr. Angel I. Melo.

Formación del Tapón Seminal durante el encuentro copulatorio de la Rata: Contribución de las Vesículas Seminales y Glándulas Coagulantes.



Rodríguez Piedracruz V¹ y Lucio Rosa A²

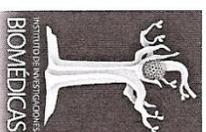
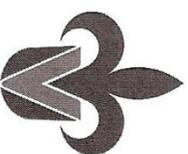
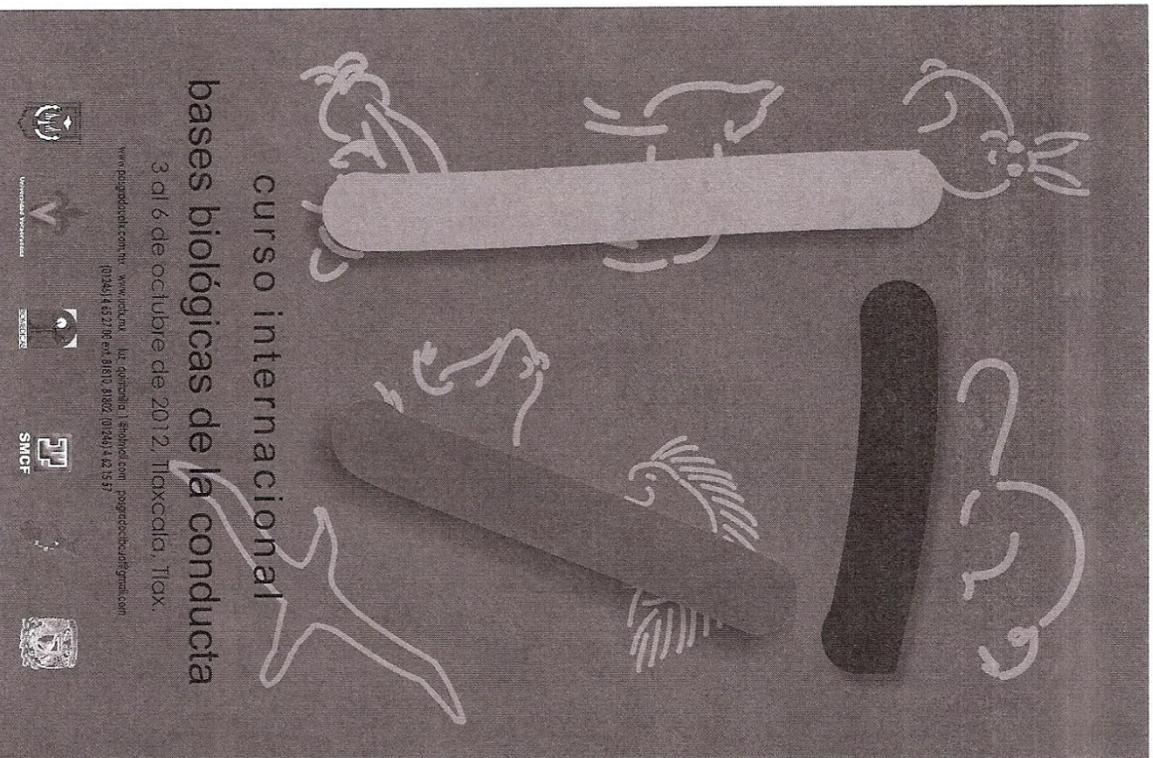
¹ *Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala,*

² *Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

La cópula de la rata macho incluye montas e intromisiones que culminan cuando deposita el semen en la vagina. Parte del fluido seminal se coagula formando el tapón que se adhiere al cérvix-vagina favoreciendo el transporte espermático transcervical. El tapón contiene proteínas de las vesículas seminales (VS) que sirven de sustrato para la vesiculasa, secretada por las glándulas coagulantes (GC). Existe controversia respecto a la formación del tapón, algunos mencionan que el macho deposita semen más tapón; otros sostienen que tras la expulsión seminal se forma el tapón dentro de la vagina. Por lo que el objetivo fue evidenciar que la formación del tapón seminal inicia en la uretra masculina y culmina en la vagina durante el encuentro copulatorio y que, su preformación depende de las secreciones de VS y GC. Se utilizaron ratas Wistar: hembras ovariectomizadas con estro inducido y machos sexualmente expertos (n=26) identificados en aquellos de extirpación bilateral de VS, GC, VS+GC y cirugía simulada. A los machos se les permitió realizar tres intromisiones o una eyaculación. Al término se sacrificaron para verificar la presencia del tapón uretral preformado, cuyos parámetros evaluados fueron: largo-ancho, peso y consistencia. Además, en el caso de la eyaculación, las hembras se sacrificaron para obtener el tapón de la vagina y el fluido uterino para el conteo espermático. Los machos que realizaron tres intromisiones presentaron tapones uretrales preformados de largo-ancho (mm): $3.23 \pm 1.07 \times 1.03 \pm 0.20$ (VS); $6.63 \pm 2.31 \times 1.70 \pm 0.58$ (GC), $2.43 \pm 0.66 \times 1.0 \pm 0.28$ (Sim). Además, de peso (mg) 1.0 ± 0.17 (VS), 8.1 ± 4.1 (GC), 3.60 ± 3.2 (Sim), y de consistencia muy blanda, blanda y dura, respectivamente. Los machos de una eyaculación no presentaron tapones uretrales; en cambio, los obtenidos de vagina tuvieron de largo-ancho (mm) $4.03 \pm 0.63 \times 1.86 \pm 0.27$ (VS), $15.90 \pm 1.25 \times 4.86 \pm 0.16$ (GC), $10.24 \pm 1.16 \times 5.42 \pm 0.10$ (Sim) y de peso (mg) 5.40 ± 1.46 , 133 ± 21.4 , $p=88.7 \pm 10.8$, respectivamente. La consistencia fue similar a la mencionada anteriormente. Los machos VS+GC no formaron tapón tras la eyaculación. No hubo efecto sobre el transporte espermático 42.6 ± 4.61 (Sim) y 19.1 ± 0.99 (GCx) millones de espermatozoides; no hubo transporte en VS y VS+GC. Entonces el tapón se preforma durante la cópula y su formación depende de las secreciones de las GC aunque principalmente de las VS. Financiamiento: Beca CONACYT 277930 (VRP).

C. Congresos internacionales

BIENVENIDOS



Universidad Veracruzana

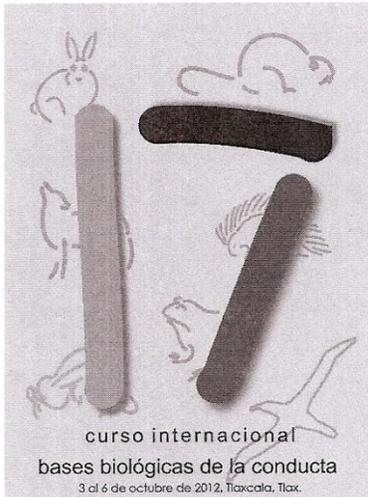


Sociedad Mexicana de Circuitos Fisiológicos, A.C.

Contribución de las vesículas seminales y glándulas coagulantes en la formación del tapón seminal durante el encuentro copulatorio de la rata

Verónica Rodríguez Piedracruz¹ y Rosa Angélica Lucio Lucio²

¹Maestría en Ciencias Biológicas¹, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta²,
Universidad Autónoma de Tlaxcala



Durante el encuentro copulatorio, la rata macho despliega numerosos patrones intercalados de monta e intromisión. Después de 8 a 12 intromisiones el macho alcanza el umbral eyaculatorio y realiza el patrón motor de eyaculación. Éste incluye la expulsión de semen por el meato urinario. El semen para ser expelido debe recorrer la uretra, que es un conducto largo con distintas regiones anatómicas: prostática, membranosa, bulbar y peneana (Figura 1).

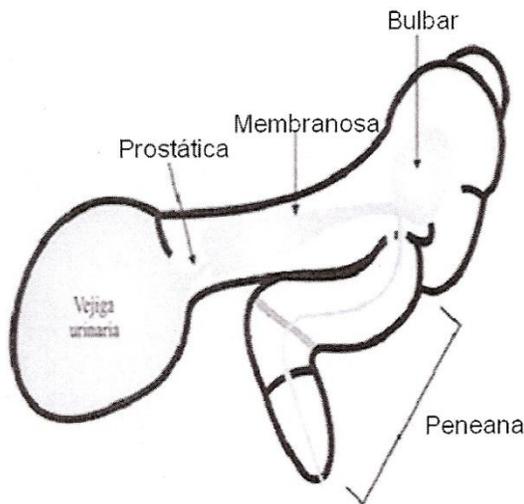


Figura 1. Aparato urinario inferior que muestra las porciones de la uretra.

La eyaculación consta de dos fases, la emisión y la expulsión seminal. Durante la emisión seminal se cierra el cuello de la vejiga urinaria y confluyen, en la uretra prostática, los espermatozoides (provenientes de la cauda del epidídimo) y las secreciones de las distintas glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, glándulas coagulantes y próstata). En la fase de expulsión seminal acontece la salida del semen (secreciones de las glándulas sexuales accesorias y espermatozoides). Cuando el macho eyacula durante el encuentro copulatorio, se observa un tapón seminal en la vagina de la hembra, este tapón está constituido principalmente, de secreciones de las seminales y glándulas coagulantes. Las secreciones de las seminales contribuyen con el mayor volumen del plasma seminal y sus secreciones contienen proteínas (llamadas SI-SVII).

Las secreciones de las glándulas coagulantes contienen una enzima denominada vesiculasa que al unirse con las proteínas secretadas por las seminales forman se coagulan y forman al tapón

seminal. El resto del semen llega a los cuernos uterinos. El tapón seminal se adhiere fuertemente al cérvix y a las paredes vaginales, ejerciendo una presión que impulsa a los espermatozoides depositados en la vagina a cruzar el cérvix y llegar a los cuernos uterinos. El transporte espermático a través del cérvix es dependiente de la formación y adhesión adecuada del tapón seminal. Existe controversia respecto a la formación del tapón seminal, algunos mencionan que la rata macho deposita semen y un coagulado seminal (tapón seminal) en la vagina de la hembra. Otros concuerdan con esta descripción, diciendo que durante la eyaculación un tapón copulatorio es depositado en la vagina de la hembra después de una masa espermática. En cambio, otros consideran que la rata expelle semen líquido y que dentro de la vagina se forma el tapón seminal. En nuestro laboratorio, durante observaciones incipientes hemos revisado en un par de animales que después de 4 intromisiones es posible observar un tapón preformado en la uretra masculina. El objetivo general es evidenciar que la formación del tapón seminal inicia en la uretra masculina y culmina en la vagina durante el encuentro copulatorio y que la preformación del tapón depende de las secreciones de las vesículas seminales y glándulas coagulantes. Se utilizarán ratas de la cepa Wistar, machos sexualmente expertos y hembras ovariectomizadas con estrógeno inducido (10 µg de estradiol y 2 mg de progesterona). Se les proporcionará alimento y agua ad libitum. Los machos serán divididos en tres grupos experimentales: grupo I) machos con cirugía simulada; es decir, se les realizará el procedimiento quirúrgico sin la extirpación de glándulas sexuales accesorias (n=24), grupo II) machos con extirpación bilateral de las vesículas seminales (n=24) y grupo III) machos con extirpación bilateral de las glándulas coagulantes (n=24). Los tres grupos de machos serán sometidos a una de estas tres situaciones: una eyaculación, tres intromisiones o siete intromisiones. Al término los machos serán sacrificados para realizar la verificación del tapón seminal en la vagina de la hembra (en el caso de una eyaculación) o bien, para evaluar el tapón seminal dentro de la uretra (en las tres situaciones) y se realizará la descoagulación de los tapones seminales para verificar la presencia de espermatozoides.



I Congreso FALAN

**55 Congreso Nacional de
Ciencias Fisiológicas**

**Neurociencias y Neurobiología
de México**

Cancún 2012 nov.4-9

TH022 HISTAMINE INTRA-AMYGDALA IMPAIRS EMOTIONAL MEMORY RETRIEVAL IN MICE SUBJECTED TO THE INHIBITORY AVOIDANCE TASK BUT NOT TO THE EPM

DAHER FP(1), and MATTIOLI R(2), (1) Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, Univ. of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; (2) Dept. of Physiotherapy, Federal Univ. of São Carlos, São Carlos, Brazil.

There is evidence that histamine (HA) modulates learning and memory in different types of behavioral tasks, but the exact course of its mechanisms is controversial. It's known that the amygdala plays a role in modulation of emotions and memory. Our goal was to compare HA (0.5 μ g/0.1 μ l) microinjected into the amygdala in modulation of anxiety-related behaviors and emotional memory of mice subjected to elevated plus-maze (EPM) or inhibitory avoidance task (IAT). Sixty one male Swiss mice (25-35g) were bilaterally implanted with guide cannulas. In the first experiment, the animals were microinjected with saline (SAL) or HA before Trial 1 and were exposed to EPM for 5min. Twenty four hours later the same protocol was repeated (Trial 2). The second experiment consisted of four sessions in the IAT: Habituation, Training 1 and 2 (interval of 2min between the two; footshock; 0.5mA/3sec) and Test (24h later; without footshock). Mice were microinjected before Training 1 and Test with SAL or HA. The animals were assigned into four groups for each experiment: SAL-SAL, SAL-HA, HA-SAL and HA-HA. The data were analyzed using two way ANOVA and Duncan's tests. %OAE were reduced between Trials for SAL-HA and HA-SAL ($F(1,30)=23.41$; $p=0.00037$), and %OAT decreased to all groups ($F(1,30)=8.18$; $p<0.0001$). No significant changes were observed in that measures in Trial 1 compared all groups ($p>0.05$), an EPM index of anxiety. In the IAT, the step-through latency increased in SAL-SAL, HA-SAL and HA-HA on the Test relative to Training ($F(2,23)=23.98$; $p<0.0001$), and no statistical differences were observed to SAL-HA ($p>0.05$). Based on our results, the HA intra-amygdala at the dose studied is not involved on the anxiety-like behaviors and mnemonic process in the EPM, but impairs the emotional memory retrieval in the IAT. We suggest that HA is distinctly involved at a pathway that mediates anxiety and fear.

TH024 EARLY EFFECTS OF PERIODIC MATERNAL SEPARATION ARE REVERSED ON ADULT FEMALE RATS DESPITE OF GONADAL HORMONES ABSENCE

Naima Lajud(1), Angélica Roque(1), Mariana Junco(1), Esperanza Meléndez(2), Luz Torner(1), Centro de Investigación Biomédica de Michoacán - (1)Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Mich., Mexico; (2)Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mich., México.

Adverse early life experience is known to exert detrimental effects on brain development and to increase susceptibility to anxiety and depressive disorders in adulthood. Maternal separation (MS) is a widely used early life stress model associated with persistent abnormalities in behavioral and neuroendocrine functions in adult male, but not female rats. In the neonate, MS causes a decrease in dentate gyrus (DG) neurogenesis that could be related to the behavioral alterations observed in adults; however the effect of MS on female pups and its relationship to adult behavior is still unknown. Here, we evaluated the effect of MS on DG neurogenesis of neonate female rats and its long term behavioral consequences under different hormonal conditions. *Sprague Dawley* control (CONT) and MS (3hr daily from PND1-14) female pups were injected with Bromodeoxyuridine (BrdU, 50mg/kg) twice at postnatal day (PND) 5 and sacrificed at PND15 to evaluate the effect of MS on DG neurogenesis. Additional litters were allowed to grow and their behavior on the elevated plus maze and the forced swimming test was evaluated as adults. Groups included rats under normal cycling conditions (diestrus), after adult ovariectomy with estrogen implants (OVX+E2), and after ovariectomy at weaning (OVX PND21) in order to determine the effect of estrogens on MS behavioral consequences. Our results show that MS causes a decrease in total number and density of BrdU/Dcx positive cells that survive in the DG at PND15 ($p<0.05$). Female MS Adults from Diestrus, OVX+E2 and OVX PND21 groups showed no differences in any of the behavioral tests when compared to their control counterparts. In conclusion, MS decreases neonatal hippocampal neurogenesis without affecting adult behavior. We propose that early effects of MS are reversed on adult female rats despite of gonadal hormones absence.

TH023 EARLY MATERNAL SEPARATION: IMPACT ON BEHAVIOR IN MOTHER RATS

AGUGGIA J(1), SUAREZ M(1), and RIVAROLA MA(1), (1)School of Exact, Physical and Natural Sciences- National University of Córdoba, Argentina.

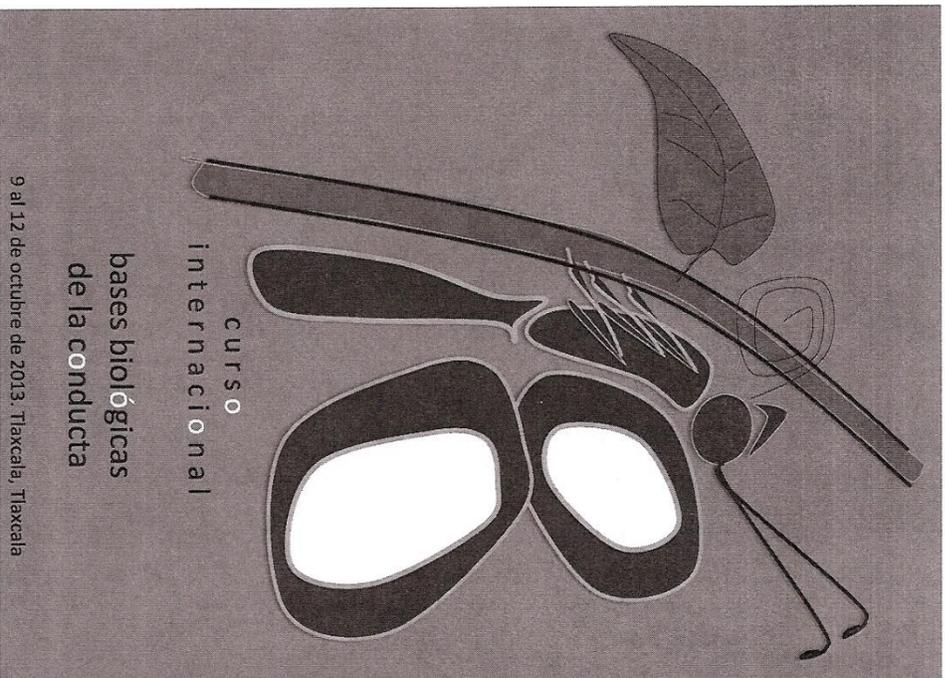
Stress during the postpartum period (such as the disruption of mother-infant relationship) can affect the well-being of both the mother and her offspring. While the consequences of maternal-separation on pups has been well characterized, surprisingly few studies have addressed the effects of such stress in the dam. The aim of this study was to investigate how daily prolonged periods of pup separation during the postpartum affects behavioral profiles of the dam using different behavioral approaches. After delivery, female Wistar rats were subjected to either animal facility rearing (AFR) conditions or daily 4,5 h of maternal separation (MS) from postpartum day (PPD) 1-21. Maternal care (pup retrieval) was evaluated at PPD 3, 6 and 9. After the end of separation period and weaning, anxiety (elevated plus maze) and depression-like behaviors (forced swimming test) were assessed. Finally, memory abilities (one-trial step down inhibitory avoidance) were tested either 1h (short-term memory) or 24h (long-term memory) after training. The results revealed that pup retrieval efficiency was significantly impaired at PPD3 by MS. AFR dams retrieved their pups sooner and engaged in more pup directed activities (nest building and carrying pups) and had a longer latency for self-grooming and rearing than mother rats subjected to maternal separation. MS induced increased anxiety-like behaviors as well as a deleterious effect in the retention performance in both short and long-term memory. There were no differences in depression-related behavior as assessed using the forced swimming test. Together this data indicates that repeated maternal separation in the postpartum reduced maternal care, increased anxiety and induce a reduction in the retention memory, providing further evidence for the detrimental behavioral effects of separation in dams.

TH025 SEXUALLY SATIATED MALE RATS ARE CAPABLE TO DISPLAY COPULATORY MOTOR PATTERNS BUT NOT TO INDUCE PREGNANCY

LUCIO RA (1), RODRÍGUEZ-PIEDRACRUZ V (1), TLACHI-LÓPEZ JL (1), MARTÍNEZ JAIMES MD (2), VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA J (2) AND GARCÍA-LORENZANA M (2). (1) Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala. (2) Área de Neurociencias, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

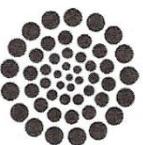
Rats are gregarious and promiscuous and during alternate copulation, males execute mounts, intromissions and finally ejaculate. These copulatory motor patterns are related to genital responses, thus intromission and ejaculation are associated with penile erection and seminal expulsion, respectively. Ejaculate into the vagina coagulates, thus the seminal-plug facilitates transcervical sperm transport. Transport depends on plug's size and vaginal adhesion. After repeated ejaculations, males reach sexual satiety. Nevertheless, the presence of a novel female re-assumes copulation until motor pattern of ejaculation without seminal expulsion. Questions included: During the sexual intercourse is able to prevent the induction of pregnancy of others? When the seminal expulsion is restored? Are there changes in prostate? When can induce pregnancy again? In laboratory conditions we used Wistar rats (sexually experienced males and ovariectomized/intact females with induced/natural estrus). Immediately after sexual satiety, sperm transport disruption and abolition pregnancy of others was evaluated. Assessment at different post-sexual-satiety-days (PSD) included: ejaculate parameters at 5, 10, 15 and prostate histological changes at 15, 21 days; also the induction of pregnancy using fertility units during cohabitation. Results: Satiated males maintained penile erection thus dislodges seminal-plug interrupting sperm transport avoiding pregnancy of others. PSD-5: seminal expulsion was absent. PSD-10: seminal-plug was unadhered to vagina, so sperm transport didn't occur. PSD-15: seminal-plug was attached to vagina but sperm count was decreased and the percentage of sperm with progressive motility was also declined. PSD 15-21: Cytoplasm of prostatic cells present higher acidophilia related to different synthesis activity, and consistent with apocrine secretion. None female was pregnant at first days of cohabitation. Although behavioral copulation is restored immediately after sexual satiety, the activity of prostate is not, requiring at least 21-days to its optimal function. Then after consecutive ejaculations, the male, continues as rival avoiding parenthood during alternate copulations. SEP (Cuerpos-Académicos UAM-UAT-UNAM-2012, Graduate-Fellowship-VRP); CONACYT (Grant-105502-RAL, Fellowship-164340-JLTL).

BIENVENIDOS

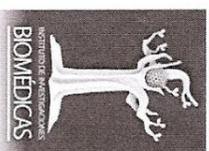


XX Aniversario del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

9 al 12 de octubre de 2013. Tlaxcala, Tlaxcala



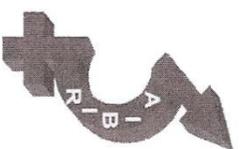
CONACYT



CIC



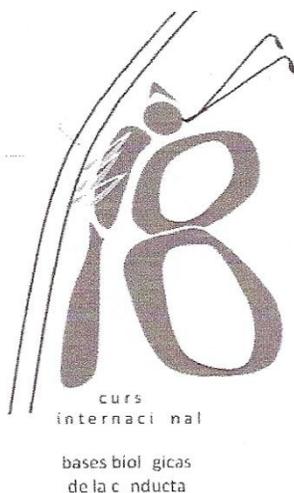
SOCIEDAD MEXICANA DE CONDUCTA Y FISIOLÓGICA, A.C.



¿Cópulas Sin Expulsión Seminal? El Caso De La Rata De Laboratorio Después De La Saciedad Sexual

Verónica Rodríguez Piedracruz¹, José Luis Tlachi-López² y Rosa Angélica Lucio Lucio²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.



La rata macho realiza varias montas e intromisiones antes de eyacular y puede eyacular repetidas veces, con la misma o diferente hembra hasta saciarse. Cuando eyacula, el fluido seminal que contiene espermatozoides y plasma seminal queda depositado en la vagina. La mayor parte de este plasma, proveniente de las glándulas sexuales accesorias, forma el tapón seminal que empuja a los espermatozoides hacia los cuernos uterinos. Esto se llama transporte espermático transcervical y sucede durante los primeros 6 minutos después de la eyaculación. El intervalo posteyaculatorio que dura entre 6 y 10 minutos, evita al macho retirar su propio tapón antes de que ocurra el transporte espermático. El desprendimiento del tapón se debe a las intromisiones durante las inserciones peneanas. Las espinas peneanas al engancharse al tapón con cada intromisión, lo desplazan hacia la entrada vaginal y son suficientes 3 ó 4 para retirarlo de la vagina. Si esto sucede en menos de 6 minutos, el transporte espermático es interrumpido. El macho que realiza varias series eyaculatorias, 7 en promedio, muestra saciedad sexual, ausencia de montas e intromisiones por 30 minutos después de la última eyaculación -criterio de saciedad sexual-. El cambio de pareja (efecto Coolidge) provoca la reanudación copulatoria, se dice que hasta la eyaculación. Interesantemente, se mostró que los machos saciados son incapaces de expeler fluido seminal al reanudar la cópula. Entonces ¿para qué seguir copulando? Así, la pregunta del experimento fue ¿las intromisiones postsaciedad sirven de algo? Se utilizaron ratas Wistar, machos sexualmente expertos y hembras ovariectomizadas: unas con estro inducido y otras con estro inducido y además, recién inseminadas por otros machos *i. e.*, con tapón seminal. A 9 machos se les permitió realizar una serie eyaculatoria con una hembra con estro inducido, al término, fue retirada. Transcurridos 20 minutos se introdujo otra hembra recién inseminada por otro. Se registraron: (a) número de patrones de intromisión para obtener el tapón seminal de la vagina; (b) tiempo para obtener el tapón y (c) tiempo para desplegar el primer patrón de intromisión. Después de una semana se les permitió a los mismos machos copular hasta la saciedad. Se siguió la secuencia anterior utilizando otro grupo de hembras en las mismas condiciones. Se registraron los mismos parámetros. Inmediatamente después de que los machos retiraban los tapones, las hembras eran anestesiadas y tras una incisión abdominal los cuernos uterinos fueron extraídos. En el contenido uterino se evaluó: (a) cuenta espermática (número de espermatozoides

expresado en millones). Antes de la saciedad sexual, todos los machos reanudaron la cópula; y 6 de 9 después de la saciedad. Todos ejecutaron el mismo número de patrones de intromisión para desprender los tapones seminales y el tiempo para retirarlo fue equivalente. Sin embargo, el tiempo para presentar el primer patrón de intromisión, es decir, para realizar la primera inserción vaginal fue 11.8 ± 3.6 antes vs 42.0 ± 9.9 segundos después de la saciedad (Wilcoxon, $P=0.048$). Se encontró que los machos al retirar los tapones de las vaginas afectaron el transporte espermático. Antes de la saciedad 5 de 6 machos impidieron el transporte (no hubo espermatozoides en útero) y 4 de 6 después de la saciedad también lo hicieron. El resto de los machos, 1 antes y 2 después interrumpieron el transporte (disminuyeron la cuenta espermática más del 78% en útero). La mayoría de los espermatozoides no fueron transportados se quedaron sobre la superficie de los tapones. Con estos resultados surgió otra pregunta ¿los pocos espermatozoides transportados al útero son suficientes para fertilizar a las hembras? Esa fue la pregunta del segundo experimento. El diseño fue similar al ya descrito excepto que las hembras inseminadas, por otros, presentaban estro natural. Una vez retirados los tapones de las vaginas, las hembras no fueron sacrificadas sino alojadas en jaulas individuales durante 21 días, esperando el día de parto. Se encontró que la mayoría de los machos afectaron el transporte espermático después de retirar el tapón, tanto antes como después de la saciedad. Consecuentemente, ninguna hembra fue fertilizada, ninguna tuvo crías. La pregunta final fue ¿cuándo los machos saciados recuperan la expulsión seminal óptima que les permita preñar? Esa fue la pregunta del tercer experimento. Se utilizaron tres grupos: machos no-saciados (realizaron una serie eyaculatoria); machos saciados sexualmente y machos descansados, (sometidos a 15 días de abstinencia sexual tras la saciedad); cada grupo de 6 individuos. Con ellos se formaron unidades reproductivas que consistieron en colocar en una jaula a un macho con tres hembras con estro natural. Así cohabitaron durante 15 días lo que representaba que cada hembra presentara tres ciclos estrales. Se determinó el día que inició la gestación contando de manera regresiva 21 días después del parto. Se evaluaron: (a) índice de fertilidad; (b) número de hembras preñadas en cada ciclo; (c) número de crías. Se encontró que los machos no-saciados presentaron índice de fertilidad de 1, porque todas las hembras con las que cohabitaron quedaron preñadas, 14 de 18 en el primer ciclo estral y 4 de 18 en el segundo. El índice de fertilidad de los machos saciados fue 0.27, porque pocas hembras quedaron gestantes 3 de 18 en el segundo y 2 de 18 en el tercero. Los machos descansados tras la saciedad mostraron 0.88 de índice de fertilidad, preñando a 16 de 18 hembras, 9 en el primer ciclo, 5 en el segundo y 2 en el tercero. El número de crías fue 11.2 ± 0.3 , 7.4 ± 1.1 y 10 ± 0.7 de los machos no-saciados, saciados y descansados, respectivamente (U Mann Whitney, $P=0.006$). Conclusión, los machos sexualmente saciados, con efecto Coolidge, se mantienen como competidores copulatorios al interferir con el transporte espermático de otros. Dado que no expelen semen en las cópulas inmediatas a la saciedad, preñan a muy pocas hembras hasta su segundo ciclo estral. Son necesarios 15 días de abstinencia sexual y además dos ciclos estrales para preñar a la mayoría de las hembras. Es claro que los patrones copulatorios se restablecen antes que la respuesta genital de expulsión seminal, que incluye el eyaculado óptimo que permite la preñez.

Financiamiento: SEP BECANET-Superior-Titulación y CONACYT 105502 (RAL).



XVIII CONGRESO PANAMERICANO DE ANATOMÍA
XX REUNIÓN NACIONAL DE MORFOLOGÍA "DR. FERNANDO QUIROZ PAVÍA"
IX SIMPOSIO IBEROLATINOAMERICANO DE TERMINOLOGÍA



La Asociación Panamericana de Anatomía y La Sociedad Mexicana de Anatomía
otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

**García-Lorenzana M, Rodríguez-Piedracruz V, Tachi-López JL,
Martínez-Jaimez MD, Lucio RA**

por la presentación de su **TRABAJO LIBRE**

**Análisis histológico prostático, epididimal y testicular en ratas Wistar saciadas
sexualmente**

XVIII CONGRESO PANAMERICANO DE ANATOMÍA – XX REUNIÓN NACIONAL DE MORFOLOGÍA
"DR. FERNANDO QUIROZ PAVÍA – IX SIMPOSIO IBEROLATINOAMERICANO DE TERMINOLOGÍA,
efectuados del 29 de septiembre al 4 de octubre de 2013 en Huatulco, Edo. de Oaxaca, México
Huatulco, Oaxaca, a 4 de octubre de 2013

Dra. Ma. Isabel García Peláez
Presidenta
Sociedad Mexicana de Anatomía

Dr. Manuel Arteaga Martínez
Presidente
Comité Organizador del Congreso

19 Curso Internacional
Bases Biológicas
De la Conducta



Del 26 al 29 de agosto del 2014
Auditorio General de la Universidad de Guanajuato.

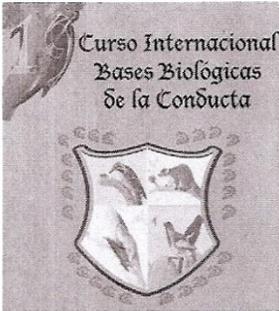
Información:
tel@icb@yaho.com, <http://angr.uoguanajuato.mx>
<http://www.gto.mx/investigacion/biopsicologia/>



Este programa es uno de los acuerdos originales del Consorcio I+D+i, radicado en Guanajuato. Alfredo Diego, quien estudió la fauna mexicana y su psicología.

BIENVENIDOS





Tapones uretrales y tapones vaginales: participación de las vesículas seminales y glándulas coagulantes

Verónica Rodríguez Piedracruz¹ y Rosa Angélica Lucio Lucio².

¹Maestría en Ciencias Biológicas, ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

La rata macho durante el encuentro copulatorio ejecuta varios patrones motores de monta e intromisión intercalados. Después de 8 a 12 intromisiones el macho realiza el patrón motor de eyaculación, que se acompaña de la expulsión del semen por el meato uretral. Para ello, el semen debe recorrer la uretra, que es un conducto con distintas regiones anatómicas llamadas: prostática, membranosa, bulbar y peneana. La eyaculación consta de la emisión y la expulsión seminal. Durante la emisión seminal, el cuello de la vejiga urinaria se cierra, además confluyen en la uretra prostática los espermatozoides provenientes de la cauda epididimaria y las secreciones de las vesículas seminales, glándulas coagulantes y próstata, que forman el plasma seminal. Durante la expulsión seminal acontece la salida del semen (plasma seminal y espermatozoides). Una vez que el macho deposita el semen en la vagina, gran parte del plasma seminal forma un tapón vaginal. La formación del tapón depende principalmente de las secreciones de las vesículas seminales y glándulas coagulantes que, contienen las proteínas SVSI-SVSVII y la vesiculasa, respectivamente. Las proteínas sirven de sustrato al enzima, lo que conlleva a la formación del tapón vaginal, permitiendo el transporte espermático transcervical. Existe controversia respecto a la formación del tapón, algunos autores mencionan que la rata macho deposita semen y un coagulado o tapón seminal en la vagina. En cambio, otros consideran que la rata expele el semen y que dentro de la vagina se forma el tapón. El objetivo del presente trabajo es evidenciar que la formación del tapón ocurre durante el encuentro copulatorio, iniciando en la uretra masculina y culminando en la vagina (tapón uretral y vaginal, respectivamente). Dicha formación depende de las secreciones de las vesículas seminales y glándulas coagulantes. Se utilizaron ratas Wistar, machos sexualmente expertos y hembras ovariectomizadas con estro inducido (10 µg de estradiol y 2 mg de progesterona). Los machos fueron divididos en: grupo I) cirugía simulada (Sim), grupo II) extirpación bilateral de glándulas coagulantes (GCx), grupo III) extirpación bilateral de vesículas seminales (VSx) y grupo IV) extirpación bilateral de coagulantes más seminales (GCx+VSx). A su vez los grupos I, II y III se dividieron en tres subgrupos a los que se les permitió realizar tres o seis intromisiones o una eyaculación. El grupo IV sólo realizó una eyaculación. Al término de las pruebas copulatorias, los machos fueron sacrificados para verificar la presencia o ausencia de tapón uretral. En el caso de una eyaculación, además del tapón uretral, también se verificó la presencia del tapón en la vagina de las hembras. Los parámetros medidos de ambos tapones fueron: tamaño (largo-ancho), peso y consistencia. Asimismo, se obtuvo el fluido uterino para realizar la cuenta espermática. En la prueba de tres intromisiones encontramos tapones uretrales en los

para el nacimiento/eclosión de las crías y así maximizar su sobrevivencia.

Los ciclos estacionales a su vez, se dividen en sincrónicos y asincrónicos. Los sincrónicos (prenupciales o asociados) tienen la característica de que tanto machos como hembras presentan maduración de los gametos, apareamiento y fecundación al mismo tiempo o también a que dentro de la población la reproducción es constante, dado que el macho es reproductor continuo (tiene maduración de gametos constante) y las hembras, pese a tener un ciclo, siempre hay por lo menos una que es fértil. La sincronía reproductiva se ha registrado en los meses de septiembre-diciembre (otoño), como en el caso de *Sceloporus jarrovi*, *S. poinsettii*, *S. grammicus* y *S. torquatus*. Los ciclos asincrónicos (postnupciales) se caracterizan porque los machos presentan la fase de reactivación gonádica y la máxima actividad gonadal de marzo a julio (primavera) mientras que las hembras presentan la vitelogénesis, ovulación y fertilización de septiembre a diciembre (otoño), la asincronía se presenta en *S. malachiticus*, *S. grammicus*, *S. formosus* y *S. mucronatus*. Para la especie de *Sceloporus torquatus*, se ha registrado que son especies con reproducción estacional, reproductores de otoño y que son sincrónicos intersexualmente.

Los objetivos de este trabajo son: en *S. torquatus* 1) describir la presencia de los diferentes elementos germinales gonadales, en hembras y machos, a lo largo del año relacionándolos con el volumen gonadal y 2) determinar la presencia/ausencia de espermatecas en hembras.

Se realizarán salidas mensuales en el municipio de Texcalyacac, Estado de México, en las que se coleccionarán 3 individuos de cada sexo, para ser sacrificadas utilizando ether y fijados en formol al 10%. Los organismos serán sexados en campo mediante la presencia (machos)/ausencia (hembras) de escamas cloacales. A cada individuo se le tomarán medidas morfométricas como longitud hocico-cloaca (LHC), largo, alto y ancho de la cabeza, longitud del fémur, longitud inter-axilar (DIA), largo de la mandíbula y largo de la cola. Para obtener el volumen, con un vernier se tomará el largo y ancho de las gónadas, en el caso de los folículos se tomará el más grande como referencia. Posteriormente se procederá a incluir las gónadas en paraplast para hacer cortes en micrótopo a 8µm y realizar tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómica de Mason. Finalmente se identificarán los elementos germinales por mes.