



Universidad Autónoma de Tlaxcala

División de Ciencias Biológicas
Maestría en Ciencias Biológicas

**“Efecto de la extirpación de las glándulas bulbouretrales y
coagulantes sobre las características del eyaculado
de la rata”**

T e s i s

para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

Biol. Agrop. José Luis Tlachi López

Codirectores de tesis

Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio
M. en C. René Zempoalteca Ramírez



Universidad Autónoma de Tlaxcala

División de Ciencias Biológicas
Maestría en Ciencias Biológicas

**“Efecto de la extirpación de las glándulas bulbouretrales
y coagulantes sobre las características del eyaculado
de la rata”**

Comité Tutorial


Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio
Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Dra. Margarita Martínez Gómez
M. en C. René Zempoalteca Ramírez

**COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
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 el **Biól. Agrop. José Luis Tlachi López** realiza para la obtención del grado de Maestro 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: **"Efecto de la extirpación de las glándulas bulbouretrales y coagulantes sobre las características del eyaculado de la rata"**

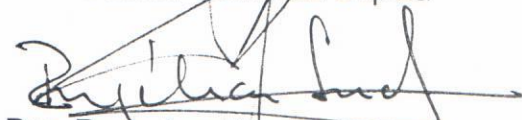
Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
Tlaxcala, Tlax., noviembre 15 de 2007


Dr. Javier Velázquez Moctezuma


Dra. Margarita Martínez Gómez


Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina


Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio



M. en C. René Zempoalteca Ramírez

La presente tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio y el M. en C. René Zempoalteca Ramírez. El proyecto fue realizado 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 fue desarrollado dentro del programa de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, la cual está registrada en el Padrón Nacional de Posgrados.

El proyecto fue financiado parcialmente por CONACYT mediante el convenio 67530 (RAL). Además se otorgó una beca de posgrado 188574 (JLTL) y un apoyo para la asistencia de investigación de la Secretaría de Educación Pública según el convenio AUTLX CA-191 (JLTL).

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, por todo su apoyo y confianza en este tiempo, y sobre todo por haberme permitido ser parte de su equipo de investigación.

Al M. en C. René Zempoalteca Ramírez, por su amistad y sugerencias como codirector para mejorar el trabajo.

A la Dra. Margarita Martínez Gómez, por haberme permitido ser parte del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta.

A los miembros del comité tutorial y de grado: Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, Dra. Margarita Martínez Gómez, Dr. Javier Velázquez Moctezuma, Dr. Gabriel Gutierrez Ospina y M. en C. René Zempoalteca Ramírez, por las numerosas aportaciones, consejos y sugerencias para mejorar el trabajo.

A todos los profesores de la maestría por compartir un poco de su experiencia y conocimiento.

A todas las personas que forman parte del CTBC: laboratorios, administración, coordinación, biblioteca, recepción, servicios y bioterio, por sus atenciones prestadas y en algunos casos por brindarme una gran amistad y confianza.

A mis amigos Aurora, César, Eladio, Dora y Margaritita por compartir inolvidables momentos.

A mis amigos y compañeros de la maestría: Germán, Víctor, Jorge, Martha, Myrna y Marisol, por brindarme su amistad en todo momento.

DEDICATORIAS

A mis padres; *Antonio Tlachi Ipatzi y Martha López Tlachi*, por que sin su gran apoyo incondicional y cariño no lo hubiera logrado.

A mis hermanos: *Antonio, Leticia, Patricia y Gabriela*, por todo su cariño y sobre todo el estar apoyándome en todo momento.

A mi *Juan* por darme un *sobrino* que hace ser parte de sus sueños

A *Elia* por estar siempre a mi lado en todo momento.

RESUMEN

El presente estudio pretende explicar la posible participación de las glándulas sexuales accesorias de la rata macho, en particular las bulbouretrales y coagulantes sobre los parámetros del semen y tapón seminal.

El color, viscosidad y pH fueron los parámetros macroscópicos del semen; la movilidad espermática, concentración espermática, viabilidad espermática y morfología espermática, los microscópicos. Para el tapón seminal la consistencia, peso, volumen y tamaño fueron los parámetros macroscópicos y la composición fue el parámetro microscópico. El análisis del eyaculado se realizó, una vez que se adecuó la técnica para obtener las muestras del eyaculado y evaluar cada uno de los parámetros. La estandarización de la técnica permitió determinar los valores "basales" de los parámetros que se obtuvieron de 45 ratas macho, sexualmente expertas e intactas a las que se les permitió eyacular una vez a diferentes intervalos de tiempo, cada 2, 10 y 15 días, también se consideraron los eyaculados de ratas de las que se desconocía su historial de cópulas.

De este modo, con la técnica implementada y los valores "basales" de todos los parámetros del eyaculado, se extirparon bilateralmente, las glándulas sexuales accesorias: bulbouretrales y/o coagulantes para determinar posibles cambios en los parámetros macroscópicos y/o microscópicos del semen y tapón seminal, en ratas con experiencia sexual. Se consideraron 40 ratas distribuidas en cuatro grupos: 10 machos con cirugía simulada, dicho grupo se consideró como el control (Grupo Ctl); 10 machos con extirpación de bulbouretrales (Grupo Bux); 10 machos con extirpación de coagulantes (Grupo Cox) y 10 machos con extirpación de ambas glándulas (Grupo Bux-Cox). Todos los animales fueron sometidos a una prueba copulatoria antes de la cirugía y cuatro pruebas a los 15, 30 y 45 días después de la cirugía. Para cada prueba copulatoria se utilizó una hembra ovariectomizada con estro inducido, de la que se obtuvo el eyaculado expelido por los machos de los diferentes grupos. Se encontró que el color y la viscosidad del semen de los machos Bux, Cox y Bux-Cox se modificaron. Antes de la cirugía todas las muestras de semen fueron blancas; después de la cirugía hubo muestras incoloras. La viscosidad, es decir la consistencia del semen disminuyó significativamente. La concentración de espermatozoides *in útero* mostró diferencias significativas en los machos Cox y Bux-Cox

encontrando un decremento significativo en las muestras de antes versus después de la cirugía. Los tapones seminales de los machos Bux, Cox y Bux-Cox presentaron cambios en la consistencia. Antes de la cirugía los tapones seminales endurecidos contenían cabezas, flagelos y escasos espermatozoides. Tales espermatozoides rodeados de un medio tan rígido no presentaban movimiento. Después de la extirpación de las glándulas bulbouretrales y/o coagulantes los tapones “no endurecidos” (pared externa endurecida con interior poco coagulado) contenían millones de espermatozoides que movían muy lentamente sus flagelo sin poder desplazarse. Los machos con tapones “no endurecidos” fueron los mismos que presentaron disminuida la concentración espermática en los cuernos uterinos. De esta manera nuestros resultados sugieren que la glándula coagulante es indispensable para la formación del tapón seminal y la glándula bulbouretral si contribuye pero en menor proporción. Así, las glándulas bulbouretrales y coagulantes son necesarias para que el tapón formado en la vagina, inmediatamente después de la eyaculación, adquiera la consistencia requerida para inducir el transporte transcervical de los espermatozoides.

Cabe mencionar que la técnica implementada es una buena herramienta para evaluar todos los parámetros del semen en la rata.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Conducta copulatoria de la rata macho	1
1.1.1. Patrones motores de monta, intromisión y eyaculación.....	1
1.2.1. Tapón seminal.....	3
1.2. Funciones sexuales masculinas	5
1.2.1. Erección peneana.....	5
1.2.2. Eyaculación seminal.....	5
1.3. Glándulas sexuales accesorias de diferentes especies	6
1.4. Glándulas sexuales accesorias en la rata macho	10
1.4.1. Próstata.....	11
1.4.2. Vesículas seminales.....	11
1.4.3. Coagulantes.....	12
1.4.4. Ámpulas.....	12
1.4.5. Bulbouretrales.....	13
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Métodos de obtención del semen	16
2.2. Análisis seminal (espermatobioscopía)	16
2.3. Estudios <i>in vitro</i> para determinar la coagulación del semen	17
2.4. Estudios quirúrgicos para determinar alteraciones en la fertilidad	19
2.5. Estudios conductuales para evaluar los patrones copulatorios	19
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	20

5. OBJETIVO.....	20
6. METODOLOGÍA.....	21
6.1. Protocolo experimental.....	23
6.2. Análisis estadístico.....	24
7. RESULTADOS.....	25
7.1. Parámetros macroscópicos y microscópicos de semen y de tapón seminal.....	25
7.2. Parámetros cualitativos macroscópicos y microscópicos de semen y de tapón seminal.....	45
8. DISCUSIÓN.....	53
9. CONCLUSIONES.....	60
10. REFERENCIAS.....	61
11. ANEXOS	70
A. Aprendizaje de la técnica de análisis de semen.....	70
B. Adecuación de la técnica de análisis de semen de otras especies para la rata.....	72
C. Evaluación de los parámetros del eyaculado de la rata.....	74
D. Valores de referencia de semen y de tapón seminal de rata.....	83
E. Determinación del tiempo óptimo para realizar el análisis seminal en rata.....	86
F. Preparación de sustancias requeridas para el análisis del eyaculado.....	93
12. PUBLICACIONES.....	94
A. Congresos nacionales.....	94
Tlachi-López JL, Velázquez-Moctezuma J, Zempoalteca R y Lucio RA. 2005. Espermatobioscopia indirecta en ratas con diferente frecuencia eyaculatoria. XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Guadalajara, Jal.	

Tlachi-López JL, López AA, Zempoalteca R, Velázquez-Moctezuma J y Lucio RA. 2006. Efecto de la extirpación de las glándulas sexuales accesorias sobre las características del semen y tapón seminal de la rata. XLIX Congreso Nacional e Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Qro.

Lucio RA, **Tlachi-López JL**, Zempoalteca R y Velázquez-Moctezuma J y. 2006. Frecuencia eyaculatoria, secreciones de las glándulas sexuales accesorias y características del eyaculado. XLIX Congreso Nacional e Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Qro.

López-González A, **Tlachi-López JL**, Zempoalteca R y Lucio RA. 2006. Participación de la próstata ventral en la calidad del semen y fertilidad en la rata macho. Onceavo Curso: Bases Biológicas de la Conducta. Tlaxcala, Tlax.

López AA, **Tlachi-López JL**, Zempoalteca R, Velázquez-Moctezuma J y Lucio RA. 2006. Participación de los lóbulos ventrales prostáticos sobre las características del eyaculado y la fertilidad de la rata. L Congreso Nacional e Ciencias Fisiológicas. Puebla, Pub.

Tlachi-López JL, Zempoalteca R y Lucio RA. 2005. Determinación de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen y las características del tapón seminal de rata. Décimo Curso Internacional: Bases Biológicas de la Conducta. Tlaxcala, Tlax.

B. Congresos internacionales..... 107

López A, **Tlachi-López JL**, Zempoalteca R, Velázquez-Moctezuma J y Lucio RA. 2007. Effects of ejaculatory frequency and removal of the bulbourethral and coagulating glands on the characteristic of semen in the rats. 40th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction. San Antonio, Texas.

C. Artículo de divulgación..... 110

Tlachi-López JL. El espermatozoide: un súper héroe enmascarado. ¡Órale! Órgano de Divulgación Científica de la Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala (Aceptado)

D. Capítulo de libro..... 115

Lucio RA, **Tlachi-López JL**, Zempoalteca R y Velázquez-Moctezuma J. 2006. Erección y eyaculación: participación de los músculos perineales estriados y glándulas sexuales accesorias. En: Neurobiología Experimental de la Conducta: Fundamentos y Tópicos Afines. Quintanar Stephano JL (ed). Universidad Autónoma de Aguas calientes. pp. 181-197.

E. Manual de Laboratorio

Tlachi-López JL y Lucio RA. Análisis de la Cópula y Eyaculado de la Rata de Laboratorio (*Rattus Norvergicus*): Manual de Laboratorio. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala. (En revisión)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Conducta copulatoria de la rata macho

En los mamíferos machos, la conducta copulatoria presenta diversos componentes motores que son específicos en cada especie (Dewsbury 1972). El estudio de la conducta sexual de la rata macho, es probablemente uno de los más completos en relación a lo caracterizado para otras especies de mamíferos. La conducta sexual se ha subdividido en precopulatoria, copulatoria y postcopulatoria. Las tres conductas ocurren en una secuencia estereotipada y han sido ampliamente descritas (Larsson 1956, Hliňak 1986).

En la conducta precopulatoria el macho se aproxima a la hembra, le olfatea la región anogenital y emite vocalizaciones ultrasónicas (Beach 1967). Durante la conducta copulatoria el macho despliega sobre la grupa de la hembra movimientos pélvicos que se han caracterizado como patrones de monta, de intromisión y de eyaculación. Después ocurre la conducta postcopulatoria durante la cual ocurre el transporte de los espermatozoides que fueron depositados en la vagina durante la eyaculación, dicho transporte se ha descrito que se debe a la formación del tapón seminal que se adhiere fuertemente a las paredes vaginales (Matthews y Adler 1977).

1.1.1. Patrones motores de monta, intromisión y eyaculación

Monta: Patrón motor que permite al macho y a la hembra establecer contacto corporal. El macho se monta sobre la grupa de la hembra realizando movimientos pélvicos hacia adelante y atrás mientras le palpa los flancos con sus extremidades delanteras (Figura 1A), la hembra despliega la lordosis que se caracteriza por el arqueamiento del dorso, elevación de la cabeza y tren posterior; así como, la desviación de la cola (Pfaff y Modianos 1985). Después, el macho se desmonta y posteriormente se acicala el pene o realiza otra actividad (Larsson 1956).

Intromisión: Patrón motor que ocurre cuando el macho monta e introduce el pene en la vagina, su característica más notable la constituye la desmonta, que se identifica por un movimiento de penetración profundo, seguido por una retirada brusca hacia atrás (Larsson

1956) (Figura 1B). Las intromisiones son contactos genitales breves de 200-400 milisegundos. Después de la intromisión, el macho se acicala el área genital (Pollak y Sachs 1976).

Durante el intervalo entre las intromisiones, de 30-90 segundos, el macho puede realizar otras actividades para mantenerse cerca de la hembra y puede concluir con vocalizaciones ultrasónicas u olfateo de la región anogenital hacia la hembra (Geyer y cols. 1978, Brown 1979, Nyby 1983). Después de la primera monta y/o intromisión inicia un número adicional de montas e intromisiones que suceden regularmente.

Eyaculación: Después de un número de intromisiones (típicamente de 8-12), el macho alcanza el umbral de eyaculación. El patrón de eyaculación se identifica por un movimiento pélvico más profundo y sostenido que el de una intromisión (Figura 1C). Se observa un movimiento lateral de las extremidades anteriores y una elevación de la porción superior del cuerpo (Larsson 1956). Durante la eyaculación ocurren contracciones de la musculatura esquelética, particularmente del área pélvica, extremidades anteriores y posteriores, así como de la musculatura estriada del periné, que incluye a los músculos isquiocavernoso, bulboesponjoso, esfínter externo del ano (Peterson y Stener 1970) y del músculo cremáster (Lucio y cols. 2001, Zempoalteca y cols. 2002).

En la evaluación de los patrones motores se registran los parámetros copulatorios que incluyen: número de montas (número de veces que se presenta este patrón motor en una serie eyaculatoria), número de intromisiones (número de veces que se presenta este patrón motor en una serie eyaculatoria), latencia de monta (intervalo de tiempo que transcurre desde que se introduce a la hembra con el macho hasta que se presenta la primera monta), latencia de intromisión (intervalo de tiempo que transcurre desde la introducción de la hembra con el macho hasta que se presenta el primer patrón de intromisión) y latencia de eyaculación (intervalo de tiempo entre el primer patrón de intromisión y el patrón de eyaculación) (Larsson 1956). También se calcula el potencial eréctil mediante la siguiente fórmula: número de intromisiones sobre el número de montas más el número de intromisiones. El rango de los valores obtenidos es de 0 a 1 (Sachs y Meisel 1988, Lucio y cols. 1994).

1.1.2. Tapón seminal

Una vez ocurrida la eyaculación, parte del semen se endurece y forma un tapón seminal que se adhiere fuertemente a las paredes de la vagina donde permanece hasta que el mismo u otro macho lo remueven con las subsecuentes, 3 a 5, intromisiones. Si la hembra no tiene más actividad copulatoria, el tapón permanece de una a dos horas después de la eyaculación (McClintock y cols. 1982). La presión que ejerce el tapón seminal favorece el transporte de los espermatozoides hacia el sitio de fertilización que ocurre en aproximadamente 5-6 minutos (Matthews y Adler 1977, 1978, Blandau 1945).

El intervalo posteyaculatorio, que dura de 5-10 minutos, evita que el macho remueva su propio tapón seminal. No obstante, si otro macho remueve el tapón seminal, disminuye el transporte espermático del primer macho promoviendo así la competencia espermática (Pound y Gage 2004, Lucio y Gutiérrez-Ospina 2006).

A) Patrón de monta



B) Patrón de intromisión



C) Patrón de eyaculación



Figura 1. Esquema que muestra la conducta copulatoria de la rata macho. **A)** Acercamiento del macho hacia la hembra, palpación de los flancos y movimientos pélvicos sobre la región posterior de la hembra. **B)** Movimientos pélvicos del macho, inserción peneana, desmonta brusca y autoacicalamiento genital. **C)** Movimiento pélvico sostenido con empuje final, elevación de los miembros anteriores y desmonta lenta (tomada de Lucio 1992).

1.2. Funciones sexuales masculinas

Durante la conducta copulatoria se requiere que el macho presente la erección peneana durante las intromisiones y la eyaculación seminal.

1.2.1. Erección peneana

Se define como la rigidez o tumescencia del pene (Benson 1988). Ha sido considerada como el resultado de un proceso hemodinámico, dado que la entrada masiva de sangre al pene juega un papel principal en este mecanismo fisiológico. En estudios en la rata, los músculos perineales (isquiocavernoso y bulboesponjoso) tienen un papel fundamental en la cópula ya que afecta los reflejos penenanos. El músculo isquiocavernoso participa en la ejecución de las flexiones peneanas y su remoción afecta las intromisiones, debido a que el cuerpo peneano no se "estira" lo suficiente para alcanzar la proximidad necesaria al orificio vaginal. El músculo bulboesponjoso participa en las erecciones intensas y su remoción altera el depósito normal del semen expelido durante la eyaculación (Sachs 1982).

1.2.2. Eyaculación seminal

La eyaculación es la expulsión del semen y espermatozoides por el meato urinario y se divide en emisión seminal y eyaculación propiamente dicha. La emisión seminal es el transporte y confluencia en la uretra prostática tanto de los espermatozoides provenientes de la cauda del epidídimo así como de las secreciones provenientes de la próstata, vesículas seminales, glándulas coagulantes, ámpulas y bulbouretrales (Benson 1988). Por lo tanto, la emisión comprende tres fracciones que en rápida sucesión llegan a la uretra prostática. La primera fracción es relativamente pequeña, compuesta de un líquido viscoso claro que procede de las glándulas bulbouretrales, su función podría ser la de limpiar y lubricar la uretra (Goodman 1974). La segunda fracción consiste de espermatozoides, escasas secreciones del epidídimo, de conductos deferentes que se han depositado temporalmente en las ámpulas y de secreciones prostáticas. La fracción final consiste de una secreción mucoide que procede de las vesículas seminales y que proporciona la mayor cantidad de volumen al eyaculado (Guyton 1987). En la

esta fracción se acompaña de material coagulante que forma un tapón seminal, cuyo papel en la fertilización es fundamental (McClintock y Adler 1978).

Durante la eyaculación propiamente dicha, el semen es expulsado por el meato urinario por la contracción del músculo bulbocavernoso; los centros espinales para la expulsión se localizan en los segmentos torácicos, lumbares y sacros de la médula espinal (Ganong 1992).

1.3. Glándulas sexuales accesorias de diferentes especies

En los mamíferos machos ningún otro órgano tiene tanta diversidad anatómica y bioquímica como las glándulas sexuales accesorias. Se llaman sexuales accesorias porque se encuentran asociados anatómicamente y funcionalmente al aparato reproductor y sólo participan durante el proceso de eyaculación (Setchell y cols. 1994). La forma, el tipo y el número de éstas varía dependiendo del mamífero que se trate (Figura 2). Por ejemplo, las vesículas seminales son largas en el hombre, conejo europeo y hámster, pero están ausentes en el perro, gato, oso y ballenas. Las razones evolutivas y fisiológicas de esta variación se deben a la diversidad de ambientes y estrategias reproductivas de los mamíferos (Luke y Coffey 1994). Por ejemplo, en algunas especies el tamaño y la función de los tejidos sexuales accesorios, son regulados rítmicamente para que coincidan con periodos de estro (Luke y Coffey 1994).

Se tiene poco conocimiento de papel de las secreciones que componen al semen, con excepción de aquellas relacionadas con la coagulación del mismo como en los roedores (Luke y Coffey 1994). Con respecto a la fertilización, se ha observado que en mamíferos, los espermatozoides removidos de la cauda del epidídimo son capaces de fertilizar al óvulo (Luke y Coffey 1994), aunque las secreciones pueden optimizar las condiciones para la fertilización incrementando la movilidad y la sobrevivencia espermática, además de promover el transporte espermático en la vagina y el útero. Se menciona que altas concentraciones de azúcares y lípidos en el semen pueden proveer nutrientes o sustratos benéficos para los espermatozoides por lo que puede extenderse su viabilidad y disminuir la muerte prematura en la vagina (Luke y Coffey 1994).

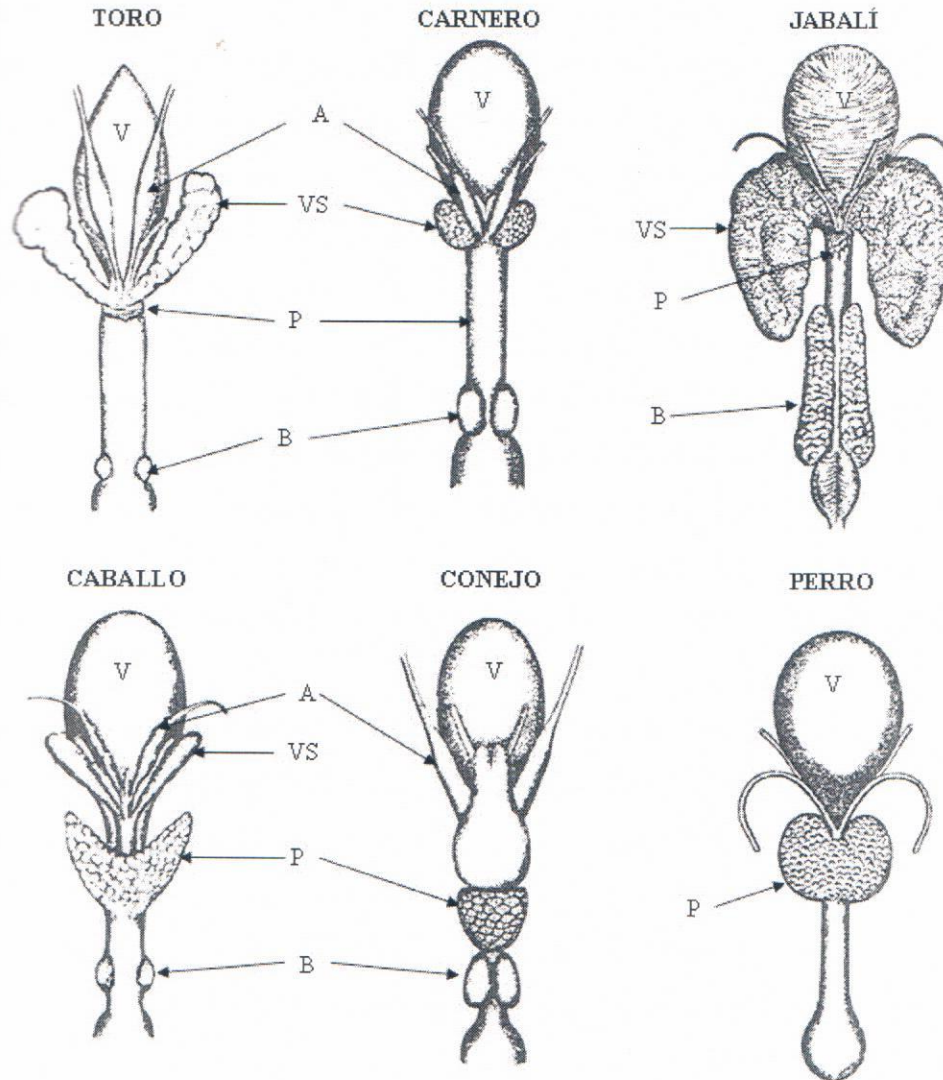


Figura 2. Esquema que muestra la vista dorsal de las glándulas sexuales accesorias en algunas especies. V, vejiga urinaria; A, ámpulas; VS, vesículas seminales; P, próstata; B, glándulas bulbouretrales (tomada de Setchell 1991).

Próstata: Se localiza anterior a la vejiga urinaria e inferior a las vesículas seminales. En el perro, la próstata es la única glándula sexual accesorio presente y a través de muchos conductos vierte su secreción a la uretra prostática (Setchell y cols. 1994). Es una glándula multilobulada. Para su crecimiento, mantenimiento y función secretora depende de la continua presencia de testosterona, que es una pro-hormona que tiene que ser convertida dentro de la

próstata a dihidrotestosterona. Produce secreciones que protegen a la uretra y al sistema reproductor de patógenos que pudieran invadir por vía uretral al organismo. El fluido prostático contiene sustancias biológicas como prostaglandinas e iones como el zinc, calcio, magnesio. Además, es la fuente principal de ácido cítrico y fosfatos del semen, aunque su contenido proteínico es bajo (Luke y Coffey 1994). En el hombre, se ha correlacionado la baja concentración de zinc en el plasma seminal con un decremento en la movilidad espermática (Marmar y cols. 1975, Caldamone y cols. 1980 citados en Nikolaos y cols 1993).

Anatómicamente hay tres tipos de próstata: Tipo I, diseminada o difusa (*pars disseminata prostatae*). Este tipo de próstata está presente en la zarigüeya, carnero y cabra. Tipo II, discreta (*corpus prostatae*), es un cuerpo compacto parauretral y su estructura anatómica general asemeja a una esponja embebida en líquido; esta presente en caballo. Tipo III es la combinación de los tipos I y II, presente en el hombre, perro, rata, toro y cerdo.

Vesículas seminales: Son estructuras pareadas con forma de bolsa. Se localizan posteriores a la vejiga urinaria. Presentan un intrincado sistema de pliegues de forma irregular y anteriormente se consideraban como reservorios de semen, de ahí su nombre (Setchell y cols. 1994). Son largas y prominentes en el hombre y ausentes en el perro y el gato. En la secreción vesicular, predomina el sodio, potasio, citrato y han sido consideradas como las glándulas accesorias responsables de la síntesis de fructosa (Setchell y cols. 1994). Además, su secreción contiene una alta concentración de ácido cítrico que nutre a los espermatozoides y obtienen energía para su movilidad después de haber sido eyaculados (Goodman 1974). También producen secreciones alcalinas como iones (Glezerman y Bartoov 1986 citado en Nikolaos y cols. 1993) que actúan sobre la movilidad espermática (Nikolaos y cols. 1993). Se ha observado en el ratón que la secreción de la vesícula seminal reduce el movimiento de los espermatozoides (Peitz 1988 citado en Setchell y cols. 1994). Histológicamente presentan un epitelio pseudoestratificado cilíndrico, contiene células cilíndricas altas no ciliadas y células aplanadas bajas que están apoyadas sobre una lámina basal (Ross y cols. 2005).

Coagulantes: Son estructuras pareadas adosadas a la pared dorsal de las vesículas seminales y drenan a la uretra de manera independiente (Jesik y cols. 1982). Tienen forma de

pequeños sacos. En los roedores han sido consideradas parte de la próstata por lo que también se conocen como próstata anterior (Setchell y cols. 1994).

Ámpulas: Son estructuras pareadas y se localizan en la porción final de los conductos deferentes (Setchell y cols. 1994). Tienen forma de huso y están desarrolladas en el caballo, vaca, borrego, ciervo rojo, elefante y camello (Aughey 1969, Eckstein y Zuckerman 1956, Elwischky y cols. 1972, Short y cols. 1967 citados en Setchell y cols. 1994). Existen pocos estudios sobre la composición de su secreción por la dificultad de obtenerla pura, sin la contaminación de los fluidos del conducto deferente (sodio, potasio, calcio, magnesio, cloro, fosfatos, bicarbonato; inositol, carnitina, glicerolfosfolina, fosfolina y proteínas) (Brooks 1990, Setchell 1970 citados en Setchell y cols. 1994). Se ha determinado en las ámpulas del vaca una alta concentración de sodio, calcio y magnesio (Cragle y cols. 1972 citado en Setchell y cols. 1994). Los estudios histológicos realizados en las ámpulas de camello se distinguen dos tipos celulares: un epitelio central de pequeñas células columnares alargadas y otro epitelio formado por células globulares u ovals, lo que ha llevado a mencionar que el camello presenta dos tipos de ámpulas (Ali y cols. 1978 citado en Setchell y cols. 1994).

Bulbouretrales: También llamadas glándula de Cowper's. Son estructuras pareadas y se localizan entre los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso y drenan en la uretra por un conducto (Setchell y cols. 1994, Hebel y Stromberg 1986). En algunas especies, como el hombre, tienen forma redonda y son dependientes de testosterona. Están presentes en la mayoría de los mamíferos terrestres pero ausentes en ballenas, hurones, osos y perros (Eckstein y Zuckerman 1956 citado en Setchell y cols. 1994). Usualmente está presente un solo par, pero en los marsupiales hay tres pares (Rodger y Hughes 1973, Setchell 1975). En el hombre, secretan mucoproteínas que neutralizan y revisten la pared uretral antes de que ocurra la eyaculación (Goodman 1974). En el jabalí, son largas y la principal secreción es la sialomucina que es la responsable de la reacción de gelatinización del semen (McKenzie y cols. 1938, Bournnell y Butler 1973, Scholler y cols. 1975, Schulze 1982, Bournnell y cols. 1970 citados en Setchell y cols. 1994). Histológicamente, presentan un epitelio simple cilíndrico, cuya altura varía mucho de acuerdo con estado funcional de la glándula (Ross y cols. 2005).

1.4. Glándulas sexuales accesorias en la rata macho

Los ratones, como la rata macho, tienen todas las glándulas sexuales accesorias descritas: vesículas seminales, glándulas coagulantes, ámpulas y glándulas bulbouretrales (Figura 3).

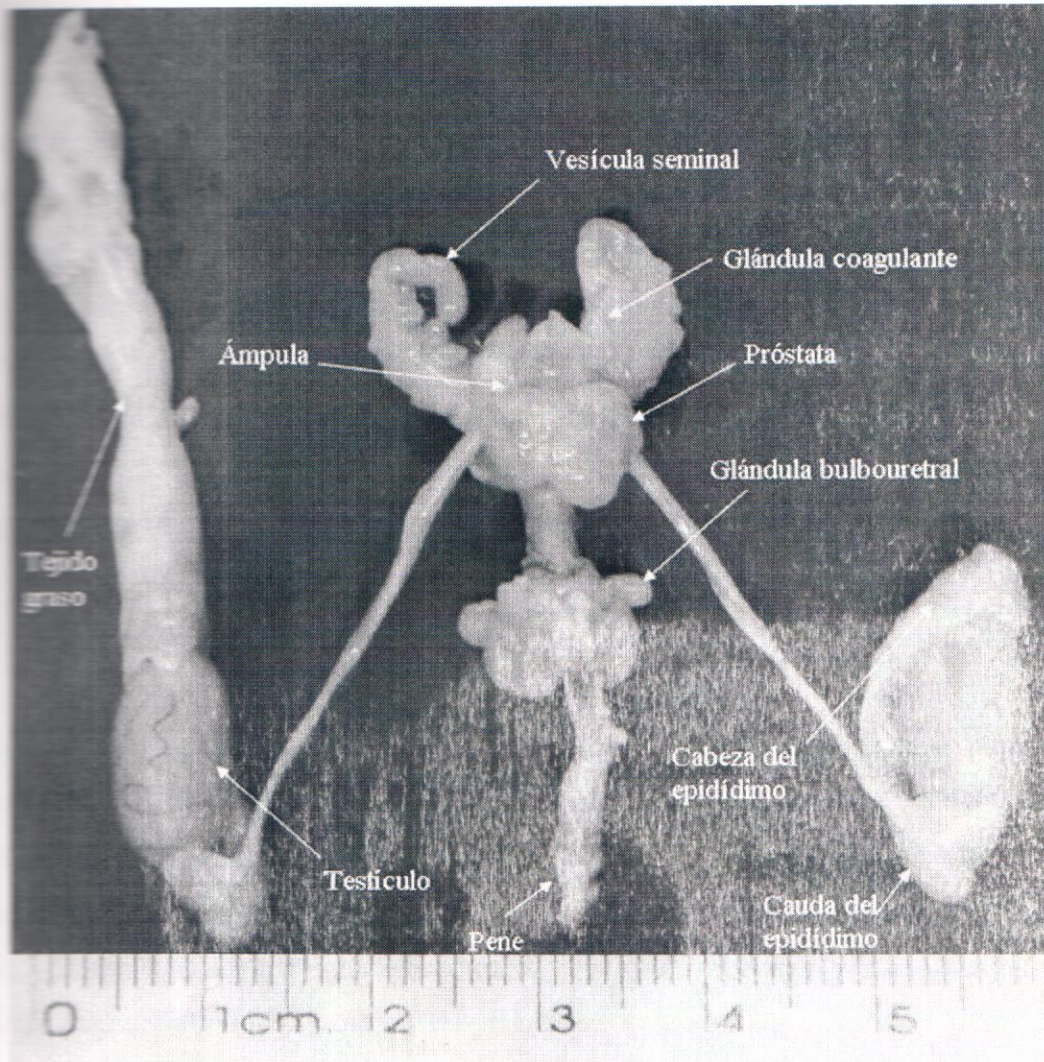


Figura 3. Fotografía que muestra los órganos reproductivos de la rata macho.

1.4.1. Próstata

Se localiza en la base de la vejiga urinaria rodeando la porción proximal de la uretra (Hamuller 1979 citado en Luke y Coffey 1994). Es similar a la próstata humana y está dividida en lóbulos anatómicamente diferentes. Hay controversia sobre la identificación de estos lóbulos; sin embargo, se reconoce la presencia de una próstata ventral, que es bilobulada y está situada medialmente sobre la uretra, la próstata dorsolateral, que comprende dos lóbulos dorsales que se continúan con dos lóbulos laterales.

Cada lóbulo prostático contribuye con diferentes componentes a la secreción prostática y drena a la uretra mediante ductos múltiples (Setchell y cols. 1994). En los fluidos prostáticos hay ácido cítrico (Setchell y cols. 1994), inositol (Melampy y Mason 1957 citado en Setchell y cols. 1994), espermina, espermidina (Harrison 1931, 1933, Pegg y cols. 1970, Rosenthal y Taber 1956 citados en Setchell y cols. 1994), proteínas (Brooks 1990, Setchell 1970) y zinc, siendo la próstata dorsolateral la de mayor concentración de zinc, más específicamente, la parte más lateral, mientras que en la próstata ventral las concentraciones de este ión son escasas (Gunn y cols. 1955 citado en Brandes 1974). Histológicamente, presenta un epitelio pseudoestratificado y células cuboidales formando acinis (Hebel y Stromberg 1986).

1.4.2. Vesículas seminales

Son estructuras pareadas. Se localizan posteriores a la vejiga urinaria. Tienen forma de saco (Setchell y cols. 1994). La secreción de las vesículas seminales contiene proteínas (SVS I – SVS VII) que sirve de sustrato para la enzima secretada por las glándulas coagulantes para formar el tapón seminal (Curry y Atherton 1990). Además, secretan glucosa, fructosa, ácido cítrico, glicerofosfolina, ácido ascórbico, fosfatos (Brooks 1990, Setchell 1970). Histológicamente, el tejido consiste de una capa de células columnares que contiene gránulos secretorios (Hebel y Stromberg 1986).

1.4.3. Coagulantes

Son estructuras pareadas, cada una está adosada a la pared dorsal de las vesículas seminales (Joshi y cols. 1982). Presentan forma cóncava y su secreción contiene la enzima vesicularasa que favorece la coagulación del semen para formar el tapón seminal una vez ocurrida la eyaculación (Walter 1910 citado en Camus y Gley 1998). Las glándulas coagulantes son las responsables de la secreción de fructosa (Bouquet 1971, Humphrey y Mann 1948, 1949, Litswak-Mann y cols. 1949 citados en Setchell y cols. 1994), altas concentraciones de factores de crecimiento (Smith y cols. 1989 citado en Setchell y cols. 1994), así como glucosa, ácido cítrico (Fouquet 1971 citado en Setchell y cols. 1994) y proteínas (Brooks 1990 y Setchell 1970). Histológicamente, consisten de 5 a 6 tubulos cuya superficie parece ondulada. Sus ductos excretores se abren en el ostium eyaculador donde también drenan los colículos seminales. La pared interna de la glándula forma pliegues profundos y septos los cuales subdividen al lumen en numerosos criptas (Hebel y Stromberg 1986).

1.4.4. Ámpulas

Son ensanchamientos de la porción final de los conductos deferentes. Su secreción está compuesta de ácido cítrico (Brooks 1990, Setchell 1970). Histológicamente, la glándula está constituida por acinis de células epiteliales rodeadas por una delgada capa de células de músculo liso y están sostenidas por una membrana de tejido conectivo (Hummel y cols. 1966).

La composición de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias varía dependiendo de la especie (Cuadro 1) y quizás se deba a la estrategia reproductiva utilizada. Sin embargo, la síntesis de secreciones de cada glándula es continua y en la mayoría de las especies depende del grado de actividad sexual (Agmo 1976). Por lo que cada glándula junto con su secreción juegan un papel importante en la fertilización, ya que se ha demostrado que la remoción de una o varias glándulas sexuales accesorias afecta la fertilidad, en jabalíes (Chen y Chow 1988), ratas (Queen y cols. 1981), ratones (Pang y cols. 1979) y hámsters (Chen y Chow 1988).

1.4.5. Bulbouretrales

Las estructuras pareadas, se localizan entre los músculos isquiocavernoso y bulboesponjoso, están conectadas a la uretra por un conducto (Setchell y cols. 1994, Hebel y Stromberg 1986). Tienen forma redonda, miden 11-15 milímetros de largo y 5 milímetros de diámetro aproximadamente y su peso es de 60 a 70 miligramos (Hebel y Stromberg, 1986). Secretan ácido aspártico, glutámico y siálico (Hart y Greenstein 1968). Además, su secreción se ha relacionado con la coagulación del semen (Hart 1970) debido a la presencia de una proteína electroforéticamente diferente del sustrato de la vesiculasa (Hart y Greenstein 1968). Se ha sugerido que las interacciones iónicas entre la secreción de la glándula y el sustrato son el mecanismo por el cual se coagula la secreción de las vesículas seminales (Hart 1968). Histológicamente presentan túbulos alveolares y una delgada capa de células piramidales con gránulos secretorios (Hebel y Stromberg 1986).

Cuadro 1. Productos de las glándulas sexuales accesorias en diferentes especies.

GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS

Secreciones	Próstata	Seminal	Coagulante	Ámpula	Bulbouretral
Vesiculasa			rata		
Transglutaminasa			rata		
Proteínas	rata , hombre, jabalí, perro	rata , jabalí, borrego	rata		jabalí
Espermina	rata				hombre
Semenogelina					hombre
Mucoproteínas					jabalí
Sialomucina					
Espermidina	rata				
Ergoteonidina	jabalí, caballo, asno	rata , hombre, jabalí, caballo, toro, asno, cobayo, puercos espín		caballo, asno	jabalí, puercos espín
Fructosa	rata , hombre, cobayo, elefante	rata , ratón, hámster, hombre, jabalí, caballo, toro, borrego, elefante, cobayo, puercos espín	rata , cobayo	caballo, elefante	conejo, jabalí, elefante, puercos espín
Glucosa	hombre	rata , ratón, hámster, cobayo	rata		
Ácido cítrico	rata , hombre, perro, caballo, asno, elefante	rata , hombre, conejo, jabalí, caballo, toro, asno, elefante, cebra, cobayo, puercos espín	rata , cobayo	rata , caballo, toro, asno, elefante, cebra	jabalí, elefante, puercos espín
Bicarbonato	hombre, perro				

Cuadro 1. (continuación)

Secreciones	GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS				
	Próstata	Seminal	Coagulante	Ampulla	Bulbouretral
Fibroblastos			rata		
Glicerolfosfolina	rata	rata , jabalí, caballo, toro, cobayo		toro	
Inositol Fosfato	rata , hombre perro, hombre	jabalí, toro, cobayo rata , jabalí, hombre, toro, cobayo		caballo, cebra	jabalí jabalí
Calcio	perro, hombre	jabalí, toro, borrego, carnero		toro, carnero	
Magnesio	perro, hombre	jabalí, toro, borrego		toro	
Sodio	perro, hombre	jabalí, toro, borrego, carnero		toro, carnero	jabalí
Potasio	perro, hombre	hombre, jabalí, toro, borrego, carnero		toro, carnero	jabalí
Zinc	rata , hombre				
Cloro	hombre				
Cloruro	perro	hombre, jabalí, caballo		caballo	jabalí
Ácido ascórbico	perro, hombre	rata , hombre, jabalí, toro, cobayo			
Ácido aspártico					rata
Ácido siálico					rata
Ácido glutámico					rata

Tomado de Hart y Greenstein 1968, Setchell, 1970, Goodman 1974, Brooks 1990, Curry y Atherton 1990, Setchell 1991, Nikolaos y cols. 1993, Luke y Coffey 1994, Setchell y cols. 1994.

2. ANTECEDENTES

En la rata, el semen está compuesto de espermatozoides provenientes de la cauda del epidídimo (1 %) y de secreciones de las glándulas sexuales accesorias (99 %) (Setchell y cols. 1994). Para determinar las características del semen se han propuesto parámetros macroscópicos y microscópicos utilizando diferentes métodos de obtención de semen. Además, se han realizado estudios relacionados con las glándulas sexuales accesorias para determinar cuál es su participación en los procesos reproductivos.

2.1. Métodos de obtención del semen

El semen puede obtenerse directa o indirectamente. En la primera el semen es obtenido del macho; por ejemplo, mediante la estimulación mecánica (frotamiento) de la región cloacal en las aves (Howarth 1978), estimulación eléctrica (electroeyaculación) en chivos y cerdos (Fischman y cols. 2003) y estimulación mecánica (masturbación) en perros y hombres (Frank y cols. 1986). En la forma indirecta el semen es obtenido de la hembra recién eyaculada, mediante un "tallado" vaginal después del coito, en la mujer (Organización Mundial de la Salud OMS, 2001) o mediante la succión del contenido uterino en la rata (Blandau y Odor 1949, Austin y Dewsbury 1986, Carballada y Esponda 1997, Pound y Gage 2004).

2.2. Análisis seminal (espermatobioscopía)

La espermatobioscopía es el estudio de laboratorio que consiste en la evaluación macroscópica y microscópica del semen. La primera indica la contribución secretora de las glándulas sexuales accesorias y la segunda refleja la función espermatogénica y esteroidogénica testicular. La OMS propone los parámetros para evaluar el semen, los cuales ha dividido en macroscópicos y microscópicos. Los parámetros macroscópicos son: color, tonalidad que presenta el semen. Volumen (mm), cantidad de semen eyaculado. Viscosidad (mm), consistencia que presenta el semen y pH, acidez o alcalinidad del semen. Los parámetros microscópicos son: movilidad, porcentaje de espermatozoides cuya movilidad es progresiva rápida, progresiva lenta, *in situ* o espermatozoides inmóviles. Concentración ($10^6/ml$),

cantidad de espermatozoides en el semen. Viabilidad, porcentaje de espermatozoides vivos al momento de ser eyaculados y morfología, porcentaje de espermatozoides normales y anormales.

Los valores obtenidos a partir de una espermatobioscopia son indicadores de la fisiología espermatogénica y esteroidogénica. En la literatura solo se han descrito los valores de parámetros seminales de especies de importancia económica (Cuadro 2). Para la rata se ha evaluado la movilidad espermática de muestras obtenidas de la cauda del epidídimo encontrando mediante un programa computarizado (IVOS) el 76% (Syntin y Robaire 2001) y 85% (Goyal y cols. 2001) corresponde a espermatozoides con movilidad progresiva rápida. También se ha evaluado la concentración espermática de muestras obtenidas del útero después de una cópula cuyo resultado fue de 20×10^6 (Austin y Dewsbury 1986). En otros estudios esta concentración varía hasta 79×10^6 en condiciones monándricas en cópulas que duran hasta 4 horas (Pound y Gage 2004). Además, para la morfología espermática se han determinado las anomalías de los espermatozoides, aquellos que presentan defectos de cabeza, pieza intermedia, pieza principal, gota citoplásmica y cabeza separada; sin embargo no se ha dado el valor correspondiente (Goyal y cols. 2001).

2.3. Estudios *in vitro* para determinar la coagulación del semen

En experimentos *in vitro* se ha estudiado la participación de las secreciones de distintas glándulas accesorias de rata, ratón y hámster. Observan que cuando mezclaron las secreciones de las vesículas seminales más bulbouretrales o vesículas seminales más coagulantes producía un coagulado débil, mientras que si se mezclaban las secreciones de las tres glándulas se producía un coágulo fuerte, independientemente de la especie utilizada (Hart y Greenstein 1968). Después se identificó que el agente responsable de iniciar la coagulación del semen provenía de la glándula coagulante (Camus y Gley 1998) y se determinó que se trataba de una enzima a la que se le denominó vesiculasa (Walter 1910 citado en Hart y Greenstein 1968).

En otros experimentos, también *in vitro*, se mezcló la secreción de la próstata con la de las bulbouretrales y de las coagulantes encontrando que el semen se endurecía y se sugirió que la próstata era la responsable de la formación del tapón seminal (Martínez-Reyes y cols. 2004).

Cuadro 3. Valores de los parámetros de semen evaluados de diferentes especies de importancia económica.

Especie	Parámetros macroscópicos				Parámetros microscópicos			
	Color	Volumen (ml)	pH	Movilidad (% de spz móviles)	[spz] (10 ⁶ /ml)	Viabilidad (% de spz vivos)	Morfología (% de spz normales)	
Cabra ^a	Grisáceo	0.5-1.2	5.9-6.8	80	2500-5000	-	90	
Gallo ^a	Crema	0.2-0.8	7.3-7.8	70	0.1-0.5	-	90	
Toro ^a	Opaco	60-70	6.5-6.8	50	500-600	-	80	
Perro ^a	Blanco	1-40	6.3-7.0	70	200-1000	-	80	
Caballo ^a	-	60-70	7.0-8.0	70	150	-	70	
Cerdo ^a	Blanco	240-250	7.3-7.9	60	10-10000	-	60	
Hombre ^a	Grisáceo	2-6	7.2-8.0	60	20-250	60	50	
Borrego ^b	Crema	1-2	5.9-6.8	70	3500-6000	60	84	
Gato ^c	-	0.04	7.4	80	60	-	90	
Llama ^d	Blanco	0.5	-	60-80	0.60-1	81-90	-	
Elefante ^e	Grisáceo	93.3	7.4	80	2400	-	77.5	
Rata ^f	-	-	-	42-76	20	-	-	

^aAllen 2001, Zambrano y cols. 2004; ^bJanett y cols. 1996, Ollero y cols. 1996; ^cSánchez y Alonso 1998; ^dBravo y cols. 2002; ^eFarris 1946, Howard y cols. 1984; ^fSintyn y Robaire 2001, Goyal y cols. 2001.

2.4. Estudios quirúrgicos para determinar alteraciones en la fertilidad

En estudios quirúrgicos se encontró que la remoción de la glándula coagulante en la rata macho disminuía el peso del tapón seminal, aunque los machos eran capaces de preñar a las hembras y el número de crías era similar al de los machos control (Lucio y cols. 2003). También en ratas, se observó que la remoción de la próstata ventral no afectaba la fertilidad, así como la remoción de la próstata dorsolateral que provocó infertilidad (Queen y cols. 1981). La remoción parcial de las vesículas seminales modificó la formación del tapón seminal, así como la concentración espermática y la fertilidad (Carballada y Esponda 1992). Estos resultados dejan al margen el análisis del semen y tapón seminal.

2.5. Estudios conductuales para evaluar los patrones copulatorios

Se ha descrito que el nervio pélvico y el hipogástrico convergen en el ganglio pélvico mayor y de allí se origina la inervación de las glándulas sexuales accesorias. Se encontró que la sección del nervio pélvico alteraba los patrones copulatorios e impedía la ejecución de la intromisión, lo que indicaba deficiencias en la erección peneana por lo que los machos no eyaculaban. Con el tiempo los machos se recuperaron, mostrando los tres patrones copulatorios de monta, intromisión y eyaculación. Esta se constató determinando la presencia del tapón seminal en la vagina de las hembras eyaculadas, utilizando otros machos para extraer el tapón seminal depositado previamente (Lucio y cols. 1994). Sin embargo, no se evaluaron las características del eyaculado de los machos neuroectomizados.

En cuanto a la frecuencia eyaculatoria en la rata, se ha evaluado el efecto de siete eyaculaciones sucesivas en un solo encuentro copulatorio sobre el número de espermatozoides en el tapón seminal, utilizando hembras distintas por serie eyaculatoria. Se observó que el número de espermatozoides, peso y tamaño del tapón seminal se mantuvieron en las primeras cuatro eyaculaciones. A partir de la quinta eyaculación los valores de los parámetros disminuyeron significativamente (Austin y Dewsbury 1986).

3. JUSTIFICACIÓN

El eyaculado de los machos de mamíferos está constituido principalmente por las secreciones de las glándulas sexuales accesorias, de hecho el 99% del eyaculado corresponde a tales secreciones y el 1% restante a los espermatozoides. Han sido distintos pero pocos los estudios en los que se ha determinado la participación de las glándulas sexuales accesorias en las características del eyaculado, particularmente se han centrado en el tapón seminal utilizando métodos *in vitro*. En los estudios en los que se lesiona o extirpa alguna de las glándulas accesorias, más que las características del eyaculado analizan la fertilidad de los machos y en los pocos que analizan el eyaculado sólo se evalúa la concentración espermática del semen de machos intactos. Así, sigue desconociéndose la importancia de las glándulas accesorias en las características del semen y tapón seminal. Dado que el acercamiento más próximo para determinar la importancia de las glándulas accesorias ha sido mezclar las secreciones de las bulbouretrales, vesículas seminales y próstata evaluando el efecto sobre la coagulación del semen, se decidió extirpar a las bulbouretrales y coagulantes para conocer su contribución en los parámetros macroscópicos y microscópicos no solo del semen sino también del tapón seminal.

4. HIPÓTESIS

Las glándulas bulbouretrales y coagulantes contribuyen en la coagulación del tapón y por ello, su ausencia modificará algunos de los parámetros del semen y del tapón *per se*.

5. OBJETIVO

Determinar el efecto de la extirpación de las glándulas bulbouretrales y coagulantes sobre los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen y del tapón seminal.

Para cumplir con el objetivo fue necesario conocer cómo se realiza la evaluación de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen de diferentes especies para después adaptar los procedimientos en el semen de rata; además, fue necesario conocer el tiempo mínimo para realizar la espermatobioscopía (ver los anexos A-F).

6. METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratas adultas de la cepa Wistar de 300 g y 3 meses de edad, mantenidas en condiciones de bioterio con el ciclo invertido de luz-oscuridad, 12 horas luz-12 horas oscuridad (la luz se encendía a las 8:00 hrs). Hembras: ovariectomizadas con estrógeno inducido mediante tratamiento hormonal, 10 µg estradiol y 2 mg progesterona. Se utilizaron machos sexualmente expertos.

Pruebas copulatorias

Se realizaron tres pruebas copulatorias antes y tres pruebas después de la cirugía, con 15 días de intervalo entre ellas. Al finalizar cada prueba pre y postquirúrgica se obtuvo el semen y el tapón seminal (ver más adelante) para la evaluación de los parámetros macro y microscópicos.

Obtención de semen

Al finalizar cada prueba copulatoria, la hembra recién eyaculada fue anestesiada con pentobarbital sódico (26 mg/kg de peso, vía intraperitoneal). Después se realizó una incisión ventral sobre la pared abdominal para extraer los cuernos uterinos. Una vez sin tejido graso y sin sangre, el contenido de los cuernos uterinos se vació en un tubo eppendorf. La muestra así obtenida se mantuvo en un termo-baño (Felisa® FE-371) a 37 ± 1 °C. Después de haber evaluado los parámetros macroscópicos del semen, se obtuvo el tapón seminal.

Obtención del tapón seminal

En la hembra se le fracturó la sínfisis púbica y se hizo una incisión en la pared dorsal de la vagina para desprender el tapón seminal ahí alojado. Este fue depositado y mantenido en tubos eppendorf para evitar su deshidratación.

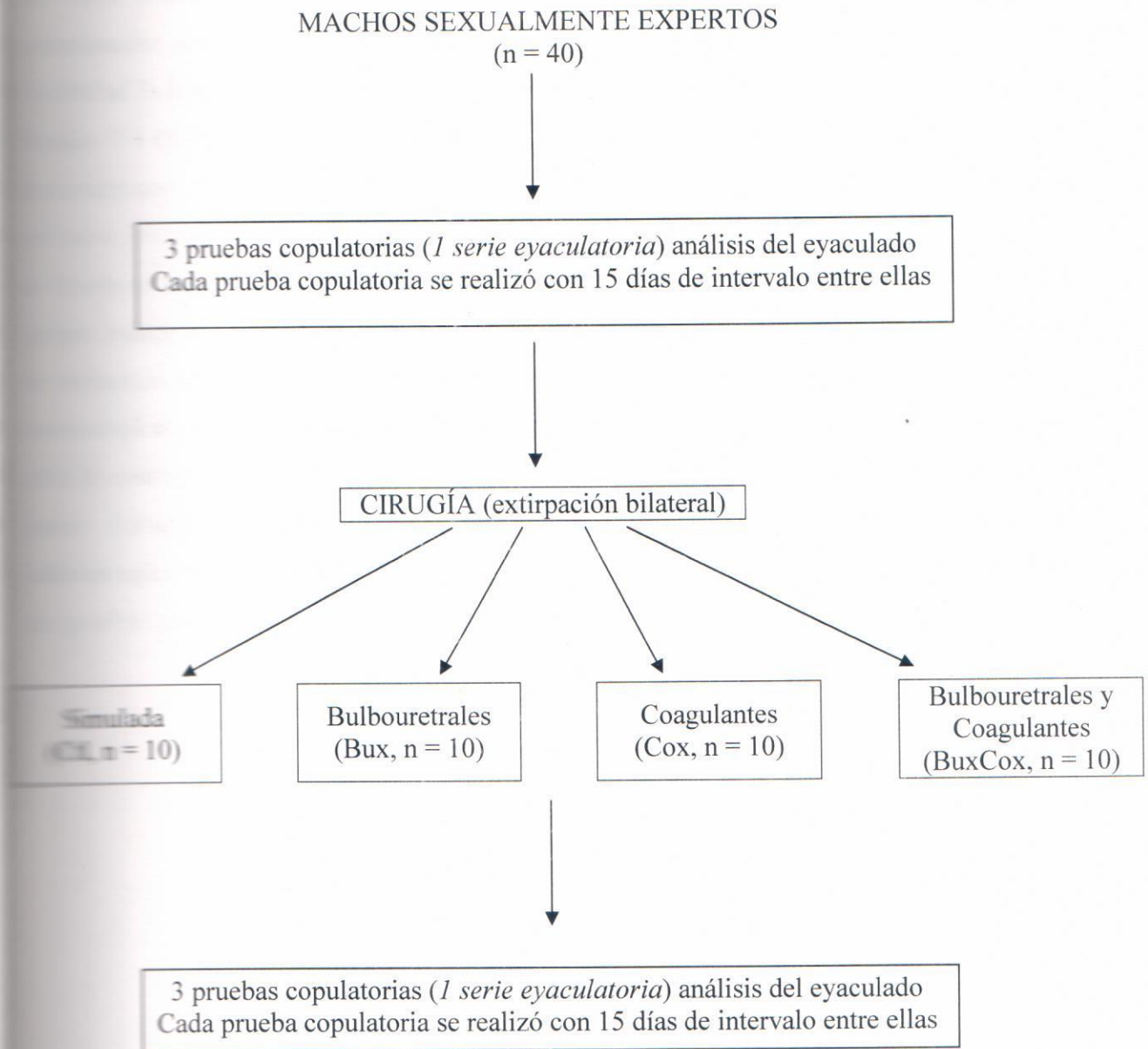
Grupo: extirpación bilateral de las glándulas bulbouretrales y coagulantes

Los machos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (26 mg/kg de peso, vía intraperitoneal). A los machos que se les extirparon las glándulas bulbouretrales se les rasuró la región perineal y se le aplicó benzal para desinfectar la región. Se realizó una incisión en la pared abdominal para visualizar los músculos isquiocavernoso y bulboesponjoso de cada lado y se les localizó y diseccionó las glándulas bulbouretrales, teniendo cuidado de no dañar al conducto deferente. Después de la remoción bilateral de las bulbouretrales se suturó la piel. A los machos que se les extirparon las glándulas coagulantes se le rasuró la región abdominal y se aplicó benzal para desinfectar la región. Se realizó una incisión en la pared abdominal, longitudinalmente sobre la línea media para exponer las vísceras. Se localizaron y diseccionaron las glándulas coagulantes, las cuales se extrajeron cortando el tejido conectivo y conectándolas con cuidado para no dañar las vesículas seminales a las que se encuentran adosadas en su pared dorsal. Finalmente, la pared abdominal fue suturada. Después de la cirugía el macho se colocó en una jaula con una cama de aserrín y una lámpara de calor hasta su recuperación.

Grupo: control (Ctl)

Se siguieron los pasos anteriores pero sin extirpar ninguna glándula sexual accesoria.

4.1. Protocolo experimental



6.2. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los animales sometidos a diferentes frecuencias eyaculatorias y los seleccionados al azar fueron analizados utilizando el programa GraphPad InStat, Versión 3.05 (GraphPad Software Inc). Para las gráficas correspondientes se utilizó el programa Sigma Plot, Versión 7.0 (SPSS Inc). Para los parámetros cuantitativos macroscópicos: viscosidad, pH y microscópicos: movilidad, concentración, viabilidad y morfología espermática en el semen; así como, los macroscópicos: peso, volumen y tamaño del tapón seminal, se utilizó la prueba de Mann-Whitney con el valor de significancia de $p < 0.05$, con base en la naturaleza de los datos (grupos independientes, datos no paramétricos, datos sin distribución normal ni homogeneidad de varianzas) seguida de una prueba post hoc de Dunnett. Para los parámetros cualitativos macroscópicos: color del semen y consistencia del tapón seminal se analizaron mediante una prueba de contingencia y la prueba de X^2 por tratarse de datos discretos (Zar 1999). En todos los grupos (cirugía simulada, Ctl; sin bulbouretrales, Bux; sin coagulantes, Cox o sin bulbouretrales ni coagulantes, Bux-Cox) se comparó la prueba de antes de cirugía contra las pruebas postcirugía.

7. RESULTADOS

7.1 Parámetros macroscópicos y microscópicos de semen y de tapón seminal.

Machos con cirugía simulada (Ctl). La cirugía simulada no afectó los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen entre los eyaculados de antes contra los de después de cirugía simulada a los 15, 30 y 45 días (Cuadro 3). Los valores de los parámetros macroscópicos y microscópicos del tapón seminal tampoco mostraron diferencias significativas (Cuadro 4) al realizar las mismas comparaciones antes *versus* después de cirugía simulada (15, 30 y 45 días).

Machos sin glándulas bulbouretrales (Bux). Para este grupo, en el cuadro 5 se muestran valores de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen de los machos a los que se les extirparon bilateralmente las glándulas bulbouretrales. Los resultados mostraron que la viscosidad del semen fue el único parámetro que se modificó significativamente ($p<0.027$) después de la cirugía. Cambió de 3.0 milímetros antes de cirugía a 1 milímetro a los 15 días, 2 milímetros a los 30 días y 2 milímetros a los 45 días después de la cirugía (Figura 4-A).

En cuanto a los parámetros macroscópicos y microscópicos del tapón seminal, la extirpación de las glándulas bulbouretrales no provocó cambios significativos (Cuadro 6).

Machos sin glándulas coagulantes (Cox). En el cuadro 7 se muestran los valores de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen de los machos a los que se les extirparon las glándulas coagulantes. El resultado fue que la viscosidad disminuyó significativamente después de la cirugía, así como la concentración espermática. La viscosidad antes de cirugía fue de 3.0 milímetros y después de la cirugía fue de 1 milímetro significativamente ($p<0.051$) a los 15 días postcirugía. Dicha disminución se mantuvo a los 30 y 45 días 2 milímetros para cada intervalo de día (Figura 4-B). La concentración espermática disminuyó significativamente ($p<0.032$) antes de cirugía de 20×10^6 a 12×10^6 a los 15 días después de cirugía, esta disminución de la concentración espermática se mantuvo a los 30 (10×10^6) y 45 (5.5×10^6) días postcirugía (Figura 5-A).

En cuanto a los parámetros macroscópicos y microscópicos del tapón seminal, la extirpación de las glándulas coagulantes no provocó cambios significativos en ellos (Cuadro 8).

Machos sin glándulas coagulantes ni bulbouretrales (Bux-Cox). En los machos a los que se les extirparon las glándulas bulbouretrales y las coagulantes. Se observó que los mismos parámetros como en el grupo anterior se modificaron (Cuadro 9). La viscosidad disminuyó significativamente después de la cirugía, así como la concentración espermática. La viscosidad antes de cirugía fue de 3.0 milímetros y después de la cirugía fue de 1 milímetro ($p<0.025$) a los 15 días postcirugía. Dicha disminución se mantuvo a los 30 y 45 días, 2 milímetros para cada intervalo (Figura 4-C). La concentración espermática disminuyó significativamente ($p<0.025$) antes de cirugía de 20×10^6 a 12.5×10^6 a los 15 días después de cirugía, esta disminución de la concentración espermática se mantuvo a los 30 (5.7×10^6) y 45 (4.1×10^6) días postcirugía (Figura 5-B).

Nuevamente, los parámetros macroscópicos y microscópicos del tapón seminal, la extirpación de las glándulas coagulantes no provocó cambios significativos en ellos (Cuadro 8).

Figura 4. Valores de los parámetros del agua de los machos con oruga asociada (n = 10).

	Antes de oruga (días)			Después de oruga (días)			Estadística
	1.5	1.5	3.0	1.5	3.0	4.5	
Macroscópicos							
Viscosidad (mm)							
Mediana	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	NS
Qi-Qs	2.0-4.0	2.0-3.0	1.0-2.0	1.0-2.0	1.0-2.0	2.0-3.0	
Min-Max	1.0-5.0	2.0-4.0	1.0-4.0	1.0-4.0	1.0-4.0	2.0-4.0	
pH							
Mediana	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	NS
Qi-Qs	8.0-8.0	8.0-8.5	8.0-8.0	8.0-8.0	8.0-8.5	8.0-8.5	
Min-Max	7.0-8.5	7.5-8.5	7.5-8.5	7.5-8.5	7.5-8.5	7.5-8.5	
Microscópicos							
Movilidad progresiva rápida (%)							
Mediana	45.0	45.5	45.0	45.5	45.0	45.5	NS
Qi-Qs	41.5-50.5	39.5-53.5	42.5-53.0	42.5-53.0	42.5-53.0	36.5-53.5	
Min-Max	16.5-61.0	37.5-63.5	33.5-60.5	33.5-60.5	33.5-60.5	27.5-53.5	
Movilidad progresiva lenta (%)							
Mediana	33.0	33.5	28.0	33.5	28.0	30.5	NS
Qi-Qs	29.5-34.0	30.0-35.0	24.5-32.0	30.0-35.0	24.5-32.0	28-36.5	
Min-Max	23.0-38.5	19.5-42.0	18.5-39.5	19.5-42.0	18.5-39.5	23.5-38.5	
Movilidad in situ (%)							
Mediana	14.5	12.5	20.5	12.5	20.5	14.0	NS
Qi-Qs	9.5-15.5	11.0-15.5	10.0-21.0	11.0-15.5	10.0-21.0	12.0-17.0	
Min-Max	20.0-35.5	8.0-23.0	6.5-32.5	8.0-23.0	6.5-32.5	6.0-27.5	

Tabla 1. Continuación

	Antes de cirugía (días)			Después de cirugía (días)			Estadística
	15	30	45	15	30	45	
Microscópicos							
Inmovilidad (%)	Mediana Qi-Qs Min-Max	7.0 6.5-9.5 5.5-11.5	6.0 6.0-7.5 5.5-11.0	8.5 7.0-11.0 5.5-13.0	8.0 5.0-9.0 2.5-14.0		NS
Índice de movilidad (0-1)	Mediana Qi-Qs Min-Max	0.8 0.7-0.8 0.6-0.9	0.8 0.8-0.8 0.7-0.9	0.7 0.7-0.8 0.6-0.9	0.8 0.8-0.8 0.5-0.9		NS
Concentración espermática (10 ⁶ /ml)	Mediana Qi-Qs Min-Max	13.0 8.0-18.5 1.5-25.0	13.0 10.0-17.5 2.5-22.0	20.0 11.0-22.0 2.5-32.0	10.5 8.5-20.0 7.5-23.0		NS
Viabilidad (% de spz vivos)	Mediana Qi-Qs Min-Max	61.0 60.0-64.0 55.0-66.5	66.0 63.0-70.5 59.5-80.0	65.0 61.0-70.0 60.0-74.5	65.5 64.0-68.5 61.0-75.5		NS
Morfología (% de spz normales)	Mediana Qi-Qs Min-Max	100 100-100 97.0-100	100 100-100 97.5-100	99.0 98.0-100 97.0-100	100 100-100 99.0-100		NS

Friedman p<0.05. spz, espermatozoide. Qi, cuartil inferior. QS, cuartil superior. Min, mínimos. Max, máximos. NS, no significativo.

Tabla 4. Valores de los parámetros del tipo animal de los machos con cirugía orquiada (0, 15, 30, 45) días.

	Después de cirugía (días)				Estadística
	15	30	45		
Macroscópicos					
Peso (mg)	Mediana	112.5	123.5	119.5	116.5
	Qi-Qs	108.0-122.0	107.0-134.0	113.0-123.0	106.0-126.0
	Min-Max	98.0-136.0	65.0-147.0	82.0-144.0	71.0-136.0
Volumen (mm ³)	Mediana	293.2	256.9	247.0	236.8
	Qi-Qs	212.7-302.9	251.4-261.0	231.8-281.8	203.4-275.6
	Min-Max	156.7-388.5	215.9-300.1	164.0-329.1	125.6-327.7
Tamaño-largo (mm)	Mediana	12.3	11.7	12.3	11.6
	Qi-Qs	11.1-13.3	11.5-14.2	11.2-13.2	10.9-12.8
	Min-Max	10.5-14.4	11.4-14.7	10.8-15.5	9.5-13.8
Tamaño-ancho (mm)	Mediana	5.6	5.1	5.1	5.1
	Qi-Qs	4.6-5.8	4.8-5.3	4.9-5.2	4.7-5.4
	Min-Max	4.3-6.1	4.4-5.4	4.3-5.6	4.1-6.2

Tabla 1. Continuación

	Antes de cirugía (días)			Después de cirugía (días)			Estadística
	15	15	45	15	30	45	
Microscópicos							
Cabezas (%)							
Mediana	68.7	64.7	57.7	50.5			
Qi-Qs	6.0-88.5	63.0-80.5	14.5-72.0	33.5-73.0			NS
Min-Max	0.0-95.5	3.0-96.5	7.5-87.0	6.0-73.0			
Flagelos (%)							
Mediana	8.0	14.2	9.2	5.7			
Qi-Qs	1.5-21.0	6.5-17.0	2.0-16.5	4.5-9.0			NS
Min-Max	0.0-31.0	0.0-31.5	1.0-21.0	0.0-52.5			
Espermatozoides (%)							
Mediana	0.0	1.5	0.0	0.0			
Qi-Qs	0.0-0.0	0.0-4.5	0.0-7.0	0.0-0.0			NS
Min-Max	0.0-0.5	0.0-6.0	0.0-26.0	0.0-5.0			

Friedman $p < 0.05$. Qi, cuartil inferior. Qs, cuartil superior. Min, mínimos. Max, máximos. NS, no significativo.

Tabla 8. Valores de los parámetros del semen de machos sin indorseñados (Bos, n=10)

	Antes de cirugía (días)			Después de cirugía (días)			Estadística
	15	15	30	15	30	45	
Macroscópicos							
Viscosidad (mm)							
Mediana	3.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	p<0.021
Qi-Qs	2.0-3.0	1.0-2.0	2.0-3.0	2.0-3.0	2.0-3.0	2.0-2.0	
Min-Max	1.0-5.0	0.0-3.0	1.0-3.0	1.0-3.0	1.0-3.0	0.0-5.0	
pH							
Mediana	8.0	8.5	8.5	8.5	8.0	8.0	NS
Qi-Qs	8.0-8.5	8.5-9.0	8.0-8.5	8.0-8.5	8.0-8.5	8.0-8.5	
Min-Max	6.0-9.0	8.0-9.0	8.0-9.0	8.0-9.0	8.0-9.0	8.0-8.5	
Microscópicos							
Movilidad progresiva rápida (%)							
Mediana	48.5	41.5	45.5	45.5	31.0	31.0	NS
Qi-Qs	46.5-51.5	36.5-52.0	31.0-49.0	31.0-49.0	29.0-46.0	29.0-46.0	
Min-Max	28.0-58.5	25.0-57.0	22.0-58.0	22.0-58.0	26.5-49.0	26.5-49.0	
Movilidad progresiva lenta (%)							
Mediana	32.7	32.5	35.2	35.2	34.5	34.5	NS
Qi-Qs	28.5-37.0	29.0-35.5	31.5-39.0	31.5-39.0	31.5-37.0	31.5-37.0	
Min-Max	26.5-41.5	27.5-45.0	25.0-41.0	25.0-41.0	31.0-47.5	31.0-47.5	
Movilidad in situ (%)							
Mediana	12.0	15.5	14.5	14.5	19.7	19.7	NS
Qi-Qs	11.0-14.5	10.5-20.0	10.5-18.5	10.5-18.5	12.5-24.0	12.5-24.0	
Min-Max	7.0-17.5	5.5-28.0	8.5-27.0	8.5-27.0	11.0-65.5	11.0-65.5	

Cuadro 6. Valores de los parámetros de los tejidos animales de los machos en laboratorio (Bos, n=10)

	Antes de cirugía (días)			Después de cirugía (días)			Estadística
	15	15	45	15	30	45	
Macroscópicos							
Peso (mg)							
Mediana	112.0	119.0	116.0	107.0			NS
Qi-Qs	96.0-126.0	105.0-128.0	111.0-121.0	88.0-133.0			
Min-Max	72.0-131.0	74.0-161.0	89.0-128.0	54.0-139.0			
Volumen (mm³)							
Mediana	247.6	230.8	239.7	222.5			NS
Qi-Qs	213.3-317.0	215.0-298.0	220.7-270.7	186.6-247.0			
Min-Max	170.2-348.7	206.2-322.6	161.2-315.2	135.9-439.4			
Tamaño-largo (mm)							
Mediana	11.6	12.0	11.4	11.2			NS
Qi-Qs	11.5-12.3	11.1-13.1	10.6-12.4	10.3-12.1			
Min-Max	9.5-18.5	10.1-14.2	9.3-12.8	9.9-13.8			
Tamaño-ancho (mm)							
Mediana	5.2	5.0	5.2	5.0			NS
Qi-Qs	4.9-5.5	4.8-5.6	4.9-5.5	4.9-5.1			
Min-Max	4.4-6.1	4.4-6.1	4.6-5.8	3.9-6.8			

Figura 8. Evolución de los parámetros de la muestra de estudio.

	Antes de cirugía (días)			Después de cirugía (días)			Estadística
	15	15	45	15	30	45	
Microscópicos							
Cabezas (%)							
Mediana	56.0	69.2	69.0	63.5	63.5	69.0	
Qi-Qs	2.0-59.5	41.5-85.0	41.0-85.5	43.3-81.0	43.3-81.0	41.0-85.5	NS
Min-Max	0.5-90.5	24.0-89.0	0.0-92.0	3.5-89.5	3.5-89.5	0.0-92.0	
Flagelos (%)							
Mediana	8.0	13.0	8.0	12.0	12.0	8.0	
Qi-Qs	1.5-10.5	8.2-14.7	3.5-20.5	8.7-15.7	8.7-15.7	3.5-20.5	NS
Min-Max	0.0-21.0	4.5-16.0	0.0-25.0	0.5-21.0	0.5-21.0	0.0-25.0	
Espermatozoides (%)							
Mediana	0.0	0.0	0.0	1.2	1.2	0.0	
Qi-Qs	0.0-0.5	0.0-8.7	0.0-0.5	0.0-6.7	0.0-6.7	0.0-0.5	NS
Min-Max	0.0-2.0	0.0-36.0	0.0-9.0	0.0-55.5	0.0-55.5	0.0-9.0	

Friedman $p < 0.05$. Qi, cuartil inferior. Qs, cuartil superior. Min, mínimos. Max, máximos. NS, no significativo

Tabla 1. Valores de los parámetros del agua de los canales del río Aguayo (km 11.0, 11.5 y 12.0)

	Antes de siembra (días)			Después de siembra (días)			Estadística
	15	18	30	15	30	45	
Macroscópicos							
Viscosidad (mm)							
Mediana	3.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	p<0.051
Qi-Qs	2.0-4.0	1.0-2.5	1.0-2.0	1.0-2.0	1.0-2.0	1.0-2.0	
Min-Max	1.0-5.0	1.0-3.0	1.0-5.0	1.0-5.0	1.0-4.0	1.0-4.0	
pH							
Mediana	8.0	8.0	8.5	8.5	8.0	8.0	NS
Qi-Qs	8.0-8.0	8.0-8.7	8.0-9.0	8.0-9.0	8.0-8.5	8.0-8.5	
Min-Max	7.5-8.5	8.0-9.5	8.0-9.5	8.0-9.5	7.5-9.5	7.5-9.5	
Microscópicos							
Movilidad progresiva rápida (%)							
Mediana	46.5	43.5	24.0	24.0	38.5	38.5	NS
Qi-Qs	33.0-50.0	39.5-48.2	21.0-37.5	21.0-37.5	28.0-46.5	28.0-46.5	
Min-Max	32.0-59.5	37.5-53.0	19.5-46.0	19.5-46.0	18.5-52.0	18.5-52.0	
Movilidad progresiva lenta (%)							
Mediana	30.0	32.2	33.2	33.2	35.0	35.0	NS
Qi-Qs	29.0-35.5	27.0-35.5	29.7-37.5	29.7-37.5	32.0-37.0	32.0-37.0	
Min-Max	8.0-38.5	25.0-37.5	27.0-45.5	27.0-45.5	9.0-58.0	9.0-58.0	
Movilidad in situ (%)							
Mediana	12.0	13.0	24.5	24.5	20.0	20.0	NS
Qi-Qs	9.5-21.0	13.0-17.5	18.5-28.5	18.5-28.5	16.0-22.5	16.0-22.5	
Min-Max	9.5-66.0	9.5-21.0	16.5-33.5	16.5-33.5	8.0-68.0	8.0-68.0	

Tabla 1. Características

	Antes de cirugía (días)			Después de cirugía (días)			Estadística
	15	18	30	15	30	45	
Microscópicos							
Inmovilidad (%)	Mediana	8.0	8.7	15.0	7.5		
	Qi-Qs	5.0-14.5	7.0-10.5	11.5-21.5	6.0-11.0		NS
	Min-Max	2.5-16.0	5.0-11.0	2.5-23.5	3.0-13.0		
Índice de movilidad (0-1)	Mediana	0.8	0.7	0.6	0.7		
	Qi-Qs	0.6-0.8	0.7-0.8	0.5-0.7	0.7-0.8		NS
	Min-Max	0.5-0.9	0.7-0.8	0.5-0.8	0.6-0.9		
Concentración espermática (10 ⁶ /ml)	Mediana	20.0	12.0	13.0	5.5		
	Qi-Qs	13.0-23.5	2.7-13.7	5.0-13.5	4.0-14.5		p<0.032
	Min-Max	12.0-36.5	0.0-20.0	0.0-19.5	1.0-35.0		
Viabilidad (% de spz vivos)	Mediana	63.0	61.5	68.5	65.5		
	Qi-Qs	58.0-67.0	58.5-68.0	62.0-71.0	64.0-66.5		NS
	Min-Max	34.5-72.0	57.5-72.0	57.0-72.5	55.0-75.5		
Morfología (% de spz normales)	Mediana	100	100	100	100		
	Qi-Qs	99.0-100	100-100	100-100	98.0-100		NS
	Min-Max	99.0-100	99.0-100	97.0-100	96.5-100		

Friedman p<0.05. spz, espermatozoide. Qi, cuartil inferior. Qs, cuartil superior. Min, mínimos. Máx, máximos. NS, no significativo.

Tabla 8. Valores de los parámetros de los tejidos conectivos de los miembros del experimento (n = 10)

	Antes de cirugía (días)			Después de cirugía (días)			Estadística
	15	15	45	15	30	45	
Macroscópicos							
Peso (mg)							
Mediana	108.0	113.0	131.0	123.0	131.0	131.0	NS
Qi-Qs	101.0-117.0	95.0-119.0	101.0-145.0	104.0-138.0	101.0-145.0	101.0-145.0	
Min-Max	71.0-144.0	86.0-150.0	86.0-188.0	83.0-176.0	86.0-188.0	86.0-188.0	
Volumen (mm³)							
Mediana	230.7	287.9	311.1	311.1	311.1	238.9	NS
Qi-Qs	209.9-241.6	314.3-280.6	369.5-495.4	369.5-495.4	293.0-296.9	293.0-296.9	
Min-Max	178.0-277.8	56.6-337.2	71.6-567.0	71.6-567.0	114.9-411.9	114.9-411.9	
Tamaño-largo (mm)							
Mediana	12.1	11.5	13.1	13.1	13.1	11.8	NS
Qi-Qs	11.6-12.9	10.3-14.1	11.1-14.7	11.1-14.7	11.1-14.7	9.6-13.8	
Min-Max	11.2-15.2	8.9-14.3	9.5-17.4	9.5-17.4	6.1-14.1	6.1-14.1	
Tamaño-ancho (mm)							
Mediana	4.8	5.2	5.1	5.1	5.1	5.2	NS
Qi-Qs	4.5-5.1	4.7-5.5	4.7-5.5	4.7-5.5	5.1-5.6	5.1-5.6	
Min-Max	4.5-5.3	2.8-5.9	3.1-7.6	3.1-7.6	4.4-6.1	4.4-6.1	

Mediana de cabezas (%)

Antes de cirugía (días) Después de cirugía (días) Estadística

15 30 45

	Antes de cirugía (días)	Después de cirugía (días)	Estadística
Microscópicos			
Cabezas (%)			
Mediana	50.0	60.7	
Qi-Qs	2.0-61.0	37.5-80.5	NS
Min-Max	0.0-94.5	1.0-87.5	
		7.0-85.0	
Flagelos (%)			
Mediana	8.2	9.7	
Qi-Qs	3.0-13.5	3.0-13.0	NS
Min-Max	0.0-26.0	0.5-28.0	
Espermatozoides (%)			
Mediana	0.0	0.2	
Qi-Qs	0.0-0.0	0.0-5.5	NS
Min-Max	0.0-3.5	0.0-6.5	

Friedman $p < 0.05$. Qi, cuartil inferior. Qs cuartil superior. Min, mínimos. Max, máximos. NS, no significativo.

Figura 8. Valores de los parámetros del agua de los canales de los bosques de eucaliptos en comparación (Bos 1 vs. 0 10)

	Antes de siembra (días)			Después de siembra (días)			Estadística
	15	30	45	15	30	45	
Macroscópicos							
Viscosidad (mm)	Mediana	3.0	1.0	2.0	2.0	2.0	p<0.015
	Qi-Qs	2.0-4.0	1.0-2.0	0.5-2.5	0.5-2.5	0.0-2.0	
	Min-Max	1.0-5.0	0.0-2.0	0.0-3.0	0.0-3.0	0.0-4.0	
pH	Mediana	8.0	8.0	8.2	8.0-8.5	8.5	NS
	Qi-Qs	8.0-8.5	8.0-8.5	8.0-8.5	8.0-8.5	8.0-9.0	
	Min-Max	7.5-9.5	8.0-9.5	7.5-9.5	7.5-9.5	7.5-9.0	
Microscópicos							
Movilidad progresiva rápida (%)	Mediana	45.0	41.5	32.5	32.5	34.5	NS
	Qi-Qs	40.5-48.5	28.0-49.0	28.0-45.0	28.0-45.0	19.0-47.0	
	Min-Max	38.0-63.5	23.5-50.5	5.5-46.0	5.5-46.0	8.0-49.5	
Movilidad progresiva lenta (%)	Mediana	32.2	39.0	33.0	33.0	33.5	NS
	Qi-Qs	28.2-36.5	29.5-39.5	28.5-40.5	28.5-40.5	31.5-34.5	
	Min-Max	24.5-47.0	24.0-46.5	27.0-46.0	27.0-46.0	25.5-40.0	
Movilidad in situ (%)	Mediana	16.0	18.5	20.0	20.0	22.0	NS
	Qi-Qs	10.0-21.2	13.5-18.5	18.0-28.0	18.0-28.0	15.0-33.0	
	Min-Max	4.5-26.5	6.0-27.0	17.5-38.0	17.5-38.0	8.5-68.0	

Tabla 3.1 (continuación)

	Antes de cirugía (días)			Después de cirugía (días)			Estadística
	15	15	30	15	30	45	
Microscópicos							
Inmovilidad (%)	Mediana	7.5	9.5	9.0	10.0		
	Qi-Qs	6.5-9.5	6.5-10.5	7.0-12.5	7.0-15.0		NS
	Min-Max	4.5-10.5	5.0-12.0	4.0-16.0	3.5-18.0		
Índice de movilidad (0-1)	Mediana	0.7	0.8	0.7	0.7		
	Qi-Qs	0.7-0.8	0.7-0.8	0.6-0.8	0.5-0.8		NS
	Min-Max	0.6-0.9	0.5-0.9	0.5-0.9	0.4-0.8		
Concentración espermática (10 ⁶ /ml)	Mediana	20.0	12.5	5.7	8.0		
	Qi-Qs	13.0-23.5	6.5-14.0	4.0-12.5	6.5-11.5		p<0.02
	Min-Max	12.0-36.5	6.0-15.0	0.0-16.0	0.0-21.5		
Viabilidad (% de spz vivos)	Mediana	65.5	64.5	70.5	64.5		
	Qi-Qs	61.5-68.5	61.0-67.0	64.2-76.5	62.5-68.5		NS
	Min-Max	58.0-72.5	54.0-78.0	64.0-82.5	57.0-74.5		
Morfología (% de spz normales)	Mediana	100	100	100	100		
	Qi-Qs	99.5-100	99.5-100	99.0-100	99.0-100		NS
	Min-Max	97.5-100	98.5-100	95.4-100	99.0-100		

Friedman p<0.05. spz, espermatozoide. Qi, cuartil inferior. Qs, cuartil superior. Min, mínimos. Max, máximos. NS, no significativo.

Tabla 18. Valores de los parámetros de los jugos obtenidos de los aceites por hidrogenación al ser calentados (MS, P, H)

	Antes de estrujar (días)			Después de estrujar (días)			Estadística
	15	15	30	15	30	45	
Macroscópicos							
Peso (mg)							
Mediana	108.0	129.0	137.5	123.0			
Qi-Qs	102.0-123.0	73.0-151.0	128.5-155	107.0-141.0			NS
Min-Max	88.0-174.0	16.0-171.0	79.0-189.0	71.0-154.0			
Volumen (mm³)							
Mediana	255.8	185.5	285.9	301.1			
Qi-Qs	102.0-123.0	73.0-151.0	128.5-155	107.0-141.0			NS
Min-Max	200.8-379.9	134.6-405.3	138.2-512.3	190.1-387.0			
Tamaño-largo (mm)							
Mediana	13.2	11.7	14.5	13.1			
Qi-Qs	11.6-13.5	10.2-12.6	12.6-17.5	11.4-13.5			NS
Min-Max	8.4-14.2	8.1-14.2	9.1-20.8	10.9-16.9			
Tamaño-ancho (mm)							
Mediana	5.1	4.6	5.1	5.5			
Qi-Qs	4.6-5.4	4.5-5.1	4.5-5.4	5.4-5.8			NS
Min-Max	4.3-6.3	4.4-6.4	4.3-5.6	4.3-6.4			

Tabla 10. (continuación)

	Antes de cirugía (días)			Después de cirugía (días)			Estadística						
	15			30				45					
	Mediana	Qi-Qs	Min-Max	Mediana	Qi-Qs	Min-Max		Mediana	Qi-Qs	Min-Max			
Microscópicos													
Cabezas (%)	54.7	16.5-89.0	1.5-91.5	40.5	3.0-41.5	3.0-41.5	42.2	27.0-42.5	27.0-42.5	51.0	8.0-61.5	8.0-61.5	NS
Flagelos (%)	11.2	5.5-16.3	1.5-21.0	9.7	5.5-14.0	5.5-14.0	7.5	7.0-8.5	7.0-8.5	8.5	1.0-12.5	1.0-12.5	NS
Espermatozoides (%)	0.7	0.0-1.5	0.0-4.0	0.0	0.0-0.0	0.0-0.0	1.5	0.0-12.5	0.0-12.5	0.0	0.0-0.0	0.0-0.0	NS

Friedman $p < 0.05$. Qi, cuartil inferior. Qs, cuartil superior. Min, mínimos. Max, máximos. NS, no significativo.

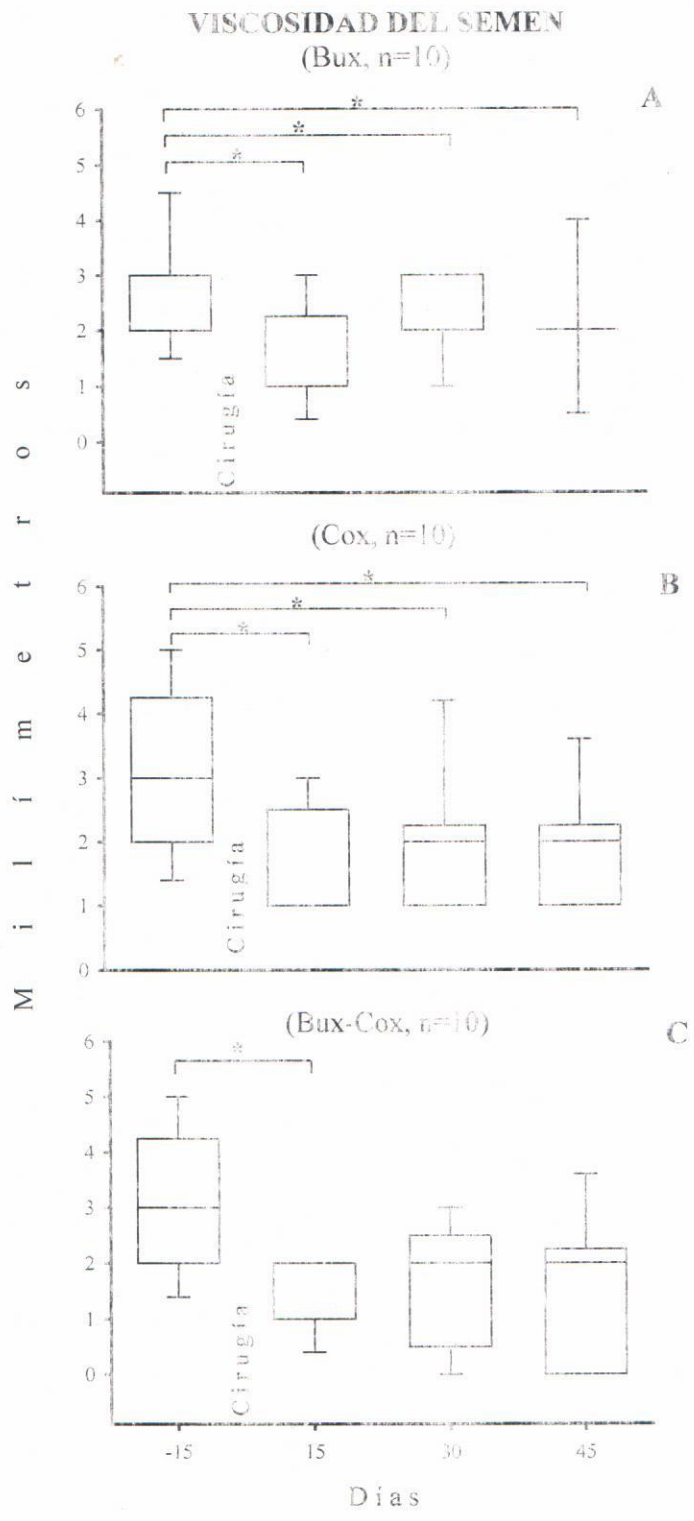
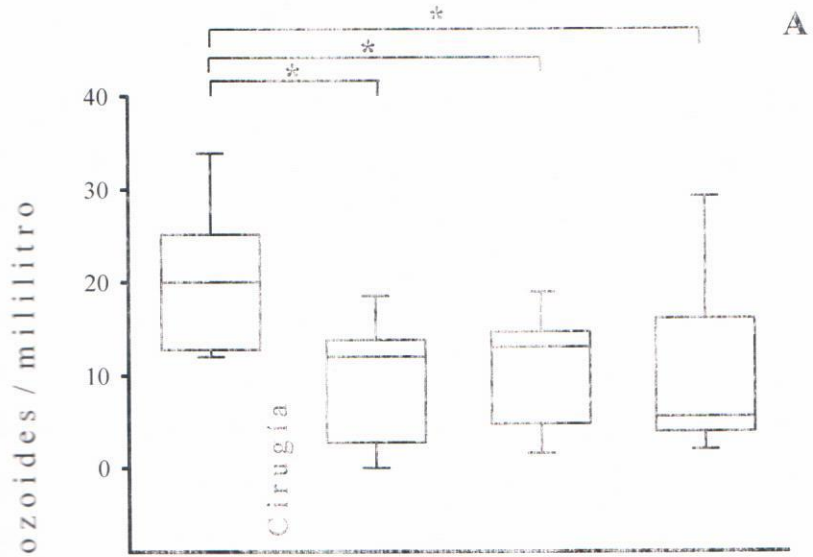


Figura 4. Graficas que muestran la viscosidad del semen antes *versus* después de cirugía A: machos sin glándulas bulbouretrales (Bux). B: machos sin glándulas coagulantes (Cox). C: machos sin glándulas bulbouretrales ni glándulas coagulantes (Bux-Cox). Friedman, *post hoc* Dunnet. * = $p < 0.05$.

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA
(Cox, n=10)



(Bux-Cox, n=10)

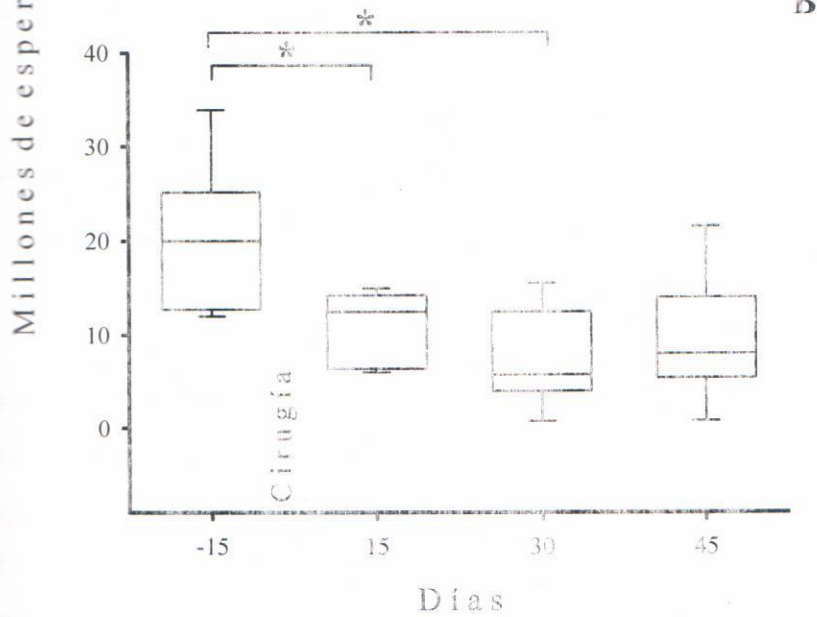


Figura 5. Graficas que muestran la concentración espermática del semen antes *versus* después de cirugía. A: machos sin glándulas coagulantes (Cox). B: machos sin glándulas coagulantes ni glándulas coagulantes (Bux-Cox). Friedman, prueba pos hoc Dunnet. * =

7.2. Parámetros cualitativos macroscópicos y microscópicos de semen y de tapón seminal.

En el cuadro 11 se muestra el número expresado en porcentaje de las muestras de semen que fueron de color blanco. En el cuadro 12 el número expresado en porcentaje de los tapones seminales endurecidos para cada grupo experimental.

Machos con cirugía simulada (Ctl). A los machos a los que se les realizó cirugía simulada no mostraron cambios en el porcentaje de muestras de semen de color blanco, ya que de las 10 muestras obtenidas las 10 fueron de color blanco, antes *versus* después de cirugía. En cuanto al porcentaje de tapones seminales endurecidos, tampoco mostraron cambios significativos después de cirugía a los 15, 30 y 45 días.

Machos sin glándulas bulbouretrales (Bux). En los machos a los que se les extirparon unilateralmente las glándulas bulbouretrales, el porcentaje de muestras de semen de color blanco disminuyó significativamente después de la cirugía a los 15 y 45 días, $X^2=22.401$, $p=0.0001$ (Figura 6-A). El porcentaje de tapones seminales endurecidos disminuyó significativamente después de cirugía a los 15, 30 y 45 días, $X^2=22.143$, $p=0.0001$ (Figura 7-A).

Machos sin glándulas coagulantes (Cox). En los machos a los que se les extirparon unilateralmente las glándulas coagulantes, el porcentaje de muestras de semen de color blanco disminuyó significativamente después de cirugía a los 15, 30 y 45 días, $X^2=31.039$, $p=0.0001$ (Figura 6-B). Además, el porcentaje de tapones seminales endurecidos disminuyó significativamente después de cirugía a los 15, 30 y 45 días, $X^2=99.625$, $p=0.001$ (Figura 7-B).

Machos sin glándulas coagulantes ni bulbouretrales (Bux-Cox). En los machos a los que se les extirparon bilateralmente las glándulas bulbouretrales y coagulantes, el porcentaje de muestras de semen de color blanco disminuyó significativamente después de cirugía a los 15 y 45 días, $X^2=44.016$, $p=0.0001$ (Figura 6-C) y el porcentaje de tapones seminales

...también disminuyó significativamente después de cirugía a los 15, 30 y 45 días,
 $\chi^2=947.091$, $p=0.0001$ (Figura 7-C).

Cuadro 11. Valores de los parámetros del escore de los machos con diferentes manipulaciones experimentales

Grupo experimental	Después de cirugía (días)						Estadística
	15		30		45		
	Antes de cirugía (días)		Blanco		Blanco		
Ctl (n = 10)	#	10	10	10	10	10	NS
	%	100	100	100	100	100	
Bux (n = 10)	#	10	9	10	9	9	X ² = 22.401 p<0.0001
	%	100	90	100	90	90	
Cox (n = 10)	#	10	8	8	8	8	X ² = 310398 p<0.0001
	%	100	80	80	80	80	
Bux-Cox (n = 10)	#	10	10	9	8	8	X ² = 44.016 p<0.0001
	%	100	100	90	80	80	

X², p<0.05. Sham, cirugía simulada. Bux, sin bulbouretrales. Cox, sin coagulantes. Bux-Cox, sin bulbouretrales ni coagulantes. NS, no significativo.

Tabla 14. Valores de los parámetros de los laparotomizados de los machos con diferentes manipulaciones experimentales

Grupo experimental	Después de cirugía (días)						Estadística
	15		30		45		
	Endurecido	Endurecido	Endurecido	Endurecido	Endurecido	Endurecido	
Ctl (n = 10)	#	10	10	10	10	10	NS
	%	100	100	100	100	100	
Bux (n = 10)	#	10	8	8	8	9	X ² = 22.143 p<0.0001
	%	100	80	80	80	90	
Cox (n = 10)	#	10	3	7	7	7	X ² = 99.625 p<0.0001
	%	100	30	70	70	70	
Bux-Cox (n = 10)	#	10	2	4	4	3	X ² = 147.09 p<0.0001
	%	100	20	40	40	30	

X², p<0.05. Ctl, cirugía simulada. Bux, sin bulbouretrales. Cox, sin coagulantes. Bux-Cox, sin bulbouretrales ni coagulantes. NS, no significativo.

COLOR DEL SEMEN
(Bux, n=10)

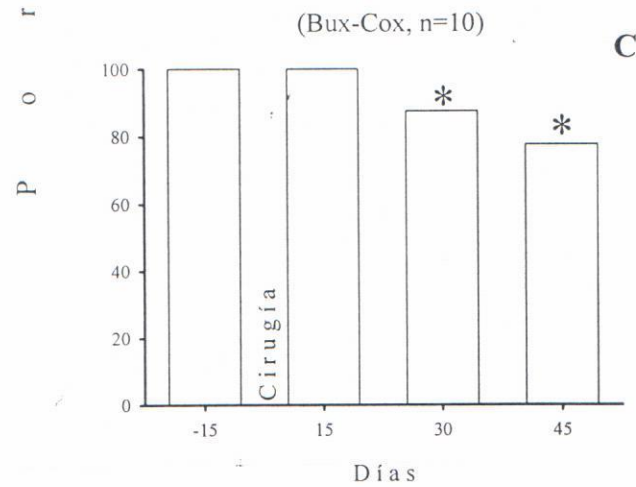
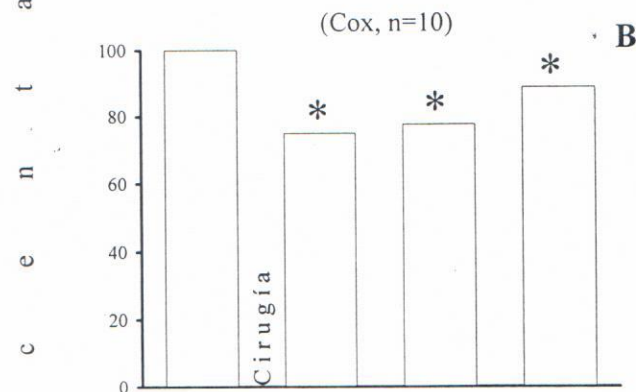
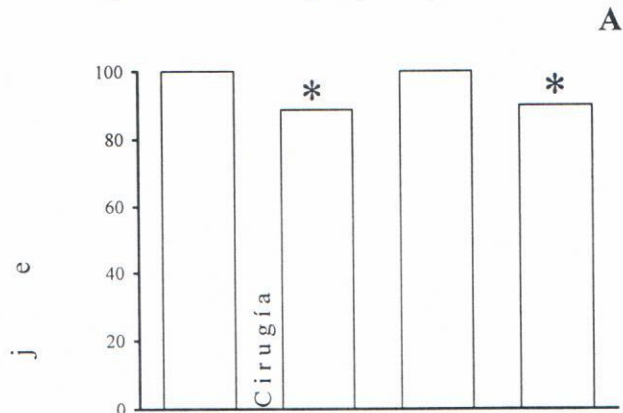


Figura 6. Graficas que muestran el porcentaje de muestras de color blanco antes *versus* después de la cirugía. **A:** machos sin glándulas bulbouretrales. Hubo diferencias significativas ($X^2=12.401$, $p=0.0001$) a los 15 y 45 días postcirugía. **B:** machos sin glándulas coagulantes. Hubo diferencias significativas ($X^2=31.039$, $p=0.0001$) a los 15, 30 y 45 días postcirugía. **C:** machos sin glándulas bulbouretrales y coagulantes. Hubo diferencias significativas ($X^2=14.016$, $p=0.000$) a los 15, 30 y 45 días postcirugía.

CONSISTENCIA DEL TAPÓN SEMINAL

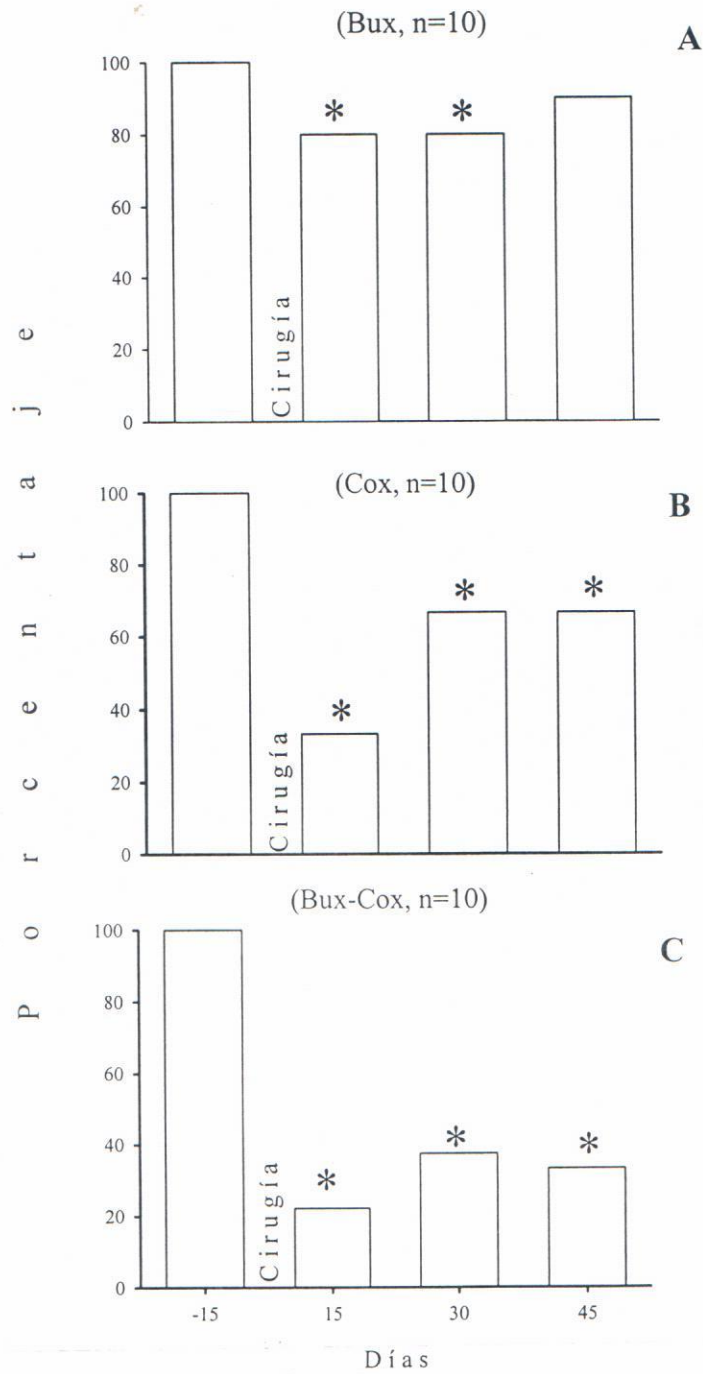


Figura 7. Graficas que muestran el porcentaje de tapones seminales endurecidos antes y después de cirugía. **A:** machos sin glándulas bulbouretrales. Hubo diferencias significativas ($X^2=22.143$, $p=0.0001$) a los 15, 30 y 45 días postcirugía. **B:** machos sin glándulas coagulantes. Hubo diferencias significativas ($X^2=99.625$, $p=0.001$) a los 15, 30 y 45 días postcirugía. **C:** machos sin glándulas bulbouretrales y coagulantes. Hubo diferencias significativas ($X^2=147.09$, $p=0.0001$) a los 15, 30 y 45 días postcirugía.

La composición de un tapón seminal normal (endurecido, figura 8) está formado, no sólo por secreciones de las glándulas sexuales accesorias sino además de una mayor cantidad de cabezas, menor de flagelos y escasos espermatozoides. Sin embargo, cuando se analizó la presencia de tapones seminales endurecidos o no endurecidos, lo que se pudo observar fue que existe un porcentaje significativo de tapones seminales no endurecidos. Dicho efecto se presentó en aquellos animales a los que se les extirparon ambas glándulas (bulbouretrales y coagilantes). Al analizar su composición realizando un frotis de la parte media de dichos tapones lo que se observó fue que el tapón seminal no endurecido en su parte interna estaba constituido por millones de espermatozoides móviles aglutinados, lo que dificultó su realización (Figura 9).

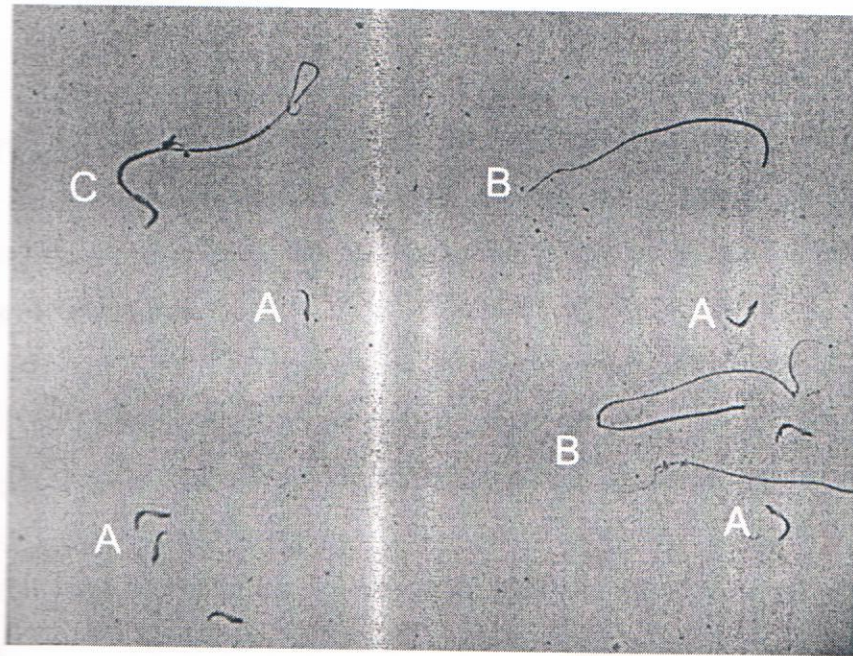


Figura 8. Microfotografía del frotis de la parte media de un tapón seminal endurecido. Se observan: cabezas, A; flagelos, B y espermatozoides, C.

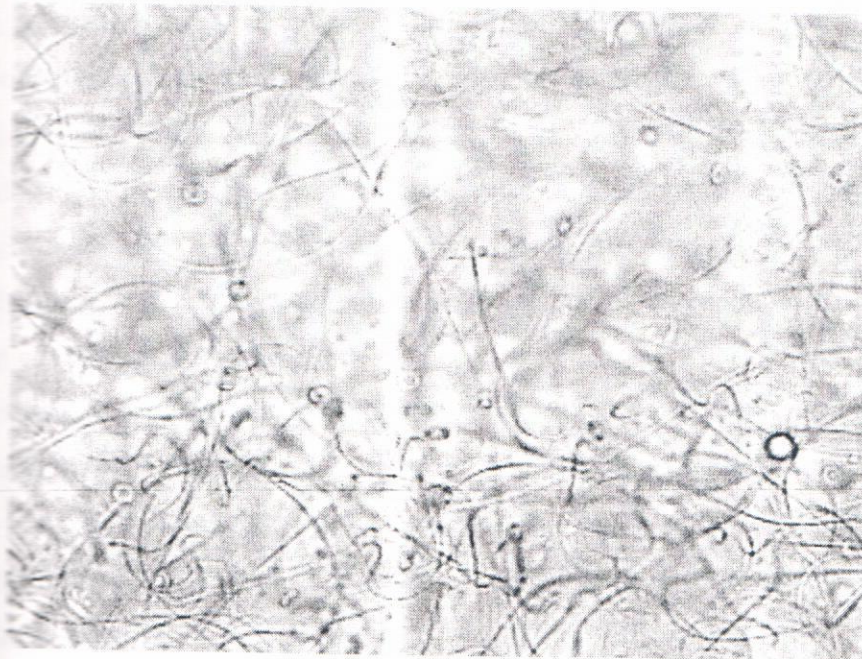


Figura 9. Microfotografía de un frotis de la parte media de un tapón seminal no endurecido. Se observan miles de espermatozoides difíciles de cuantificar.

8. DISCUSIÓN

En la rata no se ha evaluado ninguno de los parámetros macroscópicos (volumen, color, viscosidad y pH) del semen y de los microscópicos, en estudios distintos, se han determinado la movilidad, la concentración y la morfología espermáticas, faltando la viabilidad. Cabe mencionar que tales parámetros microscópicos han sido evaluados luego de distintas manipulaciones a los machos.

En el presente estudio evaluamos los parámetros macroscópicos y microscópicos de eyaculado de animales con experiencia sexual e intactos; es decir, sin haberles realizado ninguna manipulación. El eyaculado constituido por el semen y tapón seminal se obtuvo de las hembras recién eyaculadas. De hecho, la única manera de obtener el tapón seminal es de la vagina porque es ahí donde se forma una vez ocurrida la eyaculación.

Nuestro primer acercamiento, una vez adecuada la técnica para evaluar el mayor número de parámetros macroscópicos y microscópicos del eyaculado, fue determinar los valores "basales" de cada parámetro en animales con experiencia sexual sin considerar peso, edad ni tiempo transcurrido entre la prueba copulatoria que les realizamos y su última eyaculación. Al finalizar la prueba obtuvimos las muestras de semen y tapón y las analizamos. Después intentamos determinar el tiempo recomendable para realizar el análisis del eyaculado, por ello evaluamos el eyaculado cada 2, 10' ó 15 días y no encontramos cambios significativos en los valores de los parámetros macroscópicos ni microscópicos del semen, tampoco los del tapón seminal, entre ellos, ni comparados con los primeros machos que evaluamos. Esto se debió probablemente a que solo se obtuvo una eyaculación para cada intervalo de tiempo corto (cada 2 días) y largo (cada 10 ó 15 días).

En cuanto a los parámetros macroscópicos iniciamos con el volumen del semen respecto que no se evaluó porque se ha descrito que durante el estro de la hembra, única fase del ciclo en el que permite la cópula, presenta fluidos en los cuernos uterinos (Blandau 1965). Las observaciones que hemos realizado en nuestro laboratorio constatan la presencia de estos fluidos, pero más aún, nos percatamos que el volumen de este fluido es muy variable entre las hembras en estro inducido, por lo que es difícil discernir entre el volumen uterino y el volumen seminal. Las hembras con estro natural también presentan variaciones en la cantidad de fluido intrauterino pero además dificulta la observación de los

parámetros microscópicos por la presencia de células cornificadas, otros tipos celulares propios de la hembra.

Respecto al color del semen expelido encontramos que las muestras obtenidas siempre fueron de semen blanco en los animales intactos. Por tal motivo, la manera de evaluar el color era contando el número de muestras con semen blanco, expresándolas en porcentaje. Para la necesidad que determinamos midiendo el largo del filamento de semen no hubo problemas para medirlo utilizando el vernier, aunque, por ejemplo, para el semen de otras especies se utiliza un viscómetro. Y en cuanto al pH fue confiable utilizar las tiras de papel indicador de pH cuyo rango era de 0-14. Cabe mencionar que casi al finalizar el estudio encontramos que existe otro tipo de papel indicador para sustancias viscosas cuyo rango va de 5.5-9.5 de pH. En próximos estudios convendrá utilizar este papel indicador.

En cuanto a los parámetros microscópicos del semen encontramos que la movilidad espermática, se ha evaluado sólo en muestras de epidídimo, no en semen. De manera que nuestros resultados no pueden compararse porque los de nosotros son de semen contenido en cuernos uterinos. Sin embargo, consideramos pertinente mencionar lo que otros han evaluado como movilidad de los espermatozoides en rata. Así por ejemplo, utilizando un sistema de análisis computarizado, Integrated Visual Optical System (IVOS), que permite la identificación de espermatozoides con diferentes tipos de movimiento (progresivo rápido, progresivo lento o *in situ*), encontraron que el 42% de los espermatozoides de la cauda de epidídimo presentan movilidad progresiva rápida a una velocidad de $20\mu\text{m}/\text{seg}$ (Syntin y Robaire 2001). Con otro sistema de evaluación, el Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) se ha cuantificado, en la rata Brown Norway, que el porcentaje de espermatozoides móviles incrementa de la cabeza a la cauda (16 y 76%, respectivamente; Syntin y Robaire 2001). Además, observaron que los espermatozoides de la cabeza del epidídimo presentaron movimientos en círculos y los de la cauda movimientos lineales (Syntin y Robaire 2001). En la ratona albina Sprague-Dawley utilizando el sistema computarizado (IVOS) se encontró que el 42% de los espermatozoides obtenidos de epidídimo tienen movilidad progresiva rápida (Goyal y cols. 2001).

En el presente estudio el 45% de los espermatozoides eyaculados presentaron movilidad progresiva rápida. Nosotros no utilizamos sistemas computarizados sino un contador de células (Conductronic M220). En otras palabras, prácticamente no hay diferencias

entre los espermatozoides que ya están en la cauda del epidídimo, listos para ser eyaculados y los espermatozoides que se eyaculan. El uso del contador de células también permite evaluar los otros tipos de movimiento, de modo que pudimos determinar también el porcentaje de espermatozoides con movimiento lento, in situ y aquellos que no se movían. Para determinar los tipos de movilidad, antes mencionados, consideramos los definidos según el Manual de Laboratorio de la OMS, 2000, que se ha utilizado para evaluar el semen humano (Aitken y cols. 1984, Zinaman y cols. 2000) y de conejo (García y cols. 2002). Con esto sugerimos que nuestra técnica nos permite evaluar los tipos de movilidad espermática mismos que han sido evaluados mediante métodos computarizados. También calculamos un índice de movilidad, sumando el número de espermatozoides con movilidad progresiva rápida más el número de espermatozoides con movilidad progresiva lenta y el valor se dividió entre 100. Este es un índice que no se había considerado para rata. Encontramos que el valor en los animales intactos correspondía a 8. Dado que se trata de un índice podemos decir que el semen de nuestras ratas "es, en teoría" buena capacidad fértil.

En cuanto a la concentración de espermatozoides en muestras obtenidas por electroeyaculación se ha encontrado 63×10^6 (Scott y Dziuk 1959) y $55-60 \times 10^6$ (Mauss y cols. 1970); por eyaculación espontánea de $2-6 \times 10^6$ (Agmo 1976); por punción del epidídimo de 440×10^6 (Robb y cols. 1978) y $152-230 \times 10^6$ (Lamano-Carvalho y Kempinas 1987) y de homogenizado de epidídimo de $110-180 \times 10^6$ (Goyal y cols. 2001). Con métodos indirectos, como es en las hembras recién eyaculadas, también se ha determinado 83×10^6 (Farris 1946) y 85×10^6 (Blandau y Odor 1949) después de la actividad copulatoria. En otro estudio donde se realizaron cópulas repetidas con distintas hembras se determinó 20×10^6 espermatozoides en el semen (Austin y Dewsbury 1986). Además, después de cópulas en condición monándrica encontraron 79×10^6 y en condición poliándrica 118×10^6 (Pound y Gage 2004).

Nosotros determinamos el número de espermatozoides del semen expelido en una serie copulatoria, el valor obtenido fue de $13-18 \times 10^6$, similar al encontrado por Austin y Dewsbury (1986) quienes obtuvieron 20×10^6 en el semen obtenido también de hembras recién eyaculadas. Dicha concentración no disminuyó significativamente en el semen de las cinco primeras series eyaculatorias sucesivas utilizando hembras distintas. La concentración disminuyó casi a cero en la sexta y séptima eyaculación. Esto sugiere que no sólo los métodos de obtención directa (electroeyaculación, masturbación o mediante vaginas artificiales) del

son confiables para la evaluación de los parámetros espermáticos, sino que también el semen obtenido de una hembra recién eyaculada es un método confiable para evaluarlos.

En cuanto a la morfología espermática se han evaluado, con un microscopio de contraste de fases y un sistema computarizado (CASA), muestras de espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo en la rata Brown Norway. La característica evaluada fue la presencia de gota citoplasmática, el resultado fue que el 20% de los espermatozoides presentaron gota citoplásmica (Syntin y Robaire 2001). En otro estudio donde evaluaron el efecto de la administración de dietilestilbestrol (anabólico que promueve el crecimiento de la masa muscular), sobre la morfología espermática obtenida de epidídimo consideraron otras características como el porcentaje de defectos en cabeza, pieza media, pieza principal, gota citoplásmica proximal y distal y cabeza separada. El resultado que obtuvieron fue que el 6% de los espermatozoides presentaron anomalías de la pieza media (Goyal y cols. 2001). Estos resultados tampoco pueden compararse con los de nosotros porque la morfología espermática la evaluaron en espermatozoides de epidídimo, cuando aún están en proceso de maduración y nosotros evaluamos la morfología de espermatozoides eyaculados. No obstante, encontramos que el porcentaje de espermatozoides normales (cabeza en forma de hoz unida al flagelo y flagelo aproximadamente 16 veces más largo que la cabeza) siempre fue cercana al 100%.

Como se mencionó, una característica de la eyaculación de la rata es la presencia del tapón seminal al finalizar el patrón copulatorio. Es importante mencionar que cada vez que el macho desplegó el patrón motor de eyaculación se encontró tapón seminal; es decir, en todas las machas copulatorias realizadas se obtuvo el 100% de tapones seminales. Esto contrasta con el 68% donde los tapones fueron obtenidos quirúrgicamente de las hembras (Austin y Dewsbury 1986) y con el 82% de tapones obtenidos al ser removidos por otros machos (Lucio y cols. 1994). El dato que llama la atención es el de Austin y Dewsbury porque la inspección se realizó en la hembra. ¿Por qué no habrán encontrado más tapones seminales? Acaso los machos desplegaban sólo el patrón copulatorio sin poder expeler semen? En el otro estudio en el que encuentras alrededor del 80% de los tapones y no el 100% como nosotros puede ser que ellos utilizaron a otro macho para obtener el tapón, quizás ahí dependió más de la habilidad del macho. Esto significa que conviene obtener el tapón por métodos quirúrgicos más que utilizando a otro macho. Por lo tanto, la presencia del tapón seminal en la vagina

para verificar si el macho eyaculó además del patrón copulatorio de eyaculación también semen o no, ya en nuestra experiencia a cada eyaculación le corresponde un tapón seminal.

Al tapón seminal se le ha evaluado el peso, encontrándose el valor de 100 mg (Austin y Dewsbury 1986), 140 y 100 mg (Lucio y cols. 1994, 2001; respectivamente). También se ha determinado el tamaño, reportándose valores de: largo 12 mm y ancho 6 mm (Austin y Dewsbury 1986). En la presente tesis se incluyó la consistencia y el volumen como parámetros macroscópicos; así como, la composición del mismo como un parámetro microscópico. Los valores que obtuvimos en cuanto al peso y al tamaño del tapón seminal fueron 126 mg y 12.8 x 5.7 mm, respectivamente; estos valores son semejantes con los ya mencionados. Cabe resaltar que llamó nuestra atención no encontrar solo espermatozoides, pero más nos sorprendimos al encontrar cabezas sueltas, flagelos sueltos; lo interesante fue que el número de cabezas era mayor al de flagelos ¿dónde quedaron los flagelos?, ¿acaso su estructura es más débil que la de la cabeza? Si esto es así ¿Por qué en escasas ocasiones encontramos espermatozoides completos? ¿Cuándo el flagelo permanece unido a la cabeza se protege de alguna forma? ¿Por qué los espermatozoides son tan escasos en un frotis de tapón seminal? Desafortunadamente, estos resultados de la composición del tapón tampoco son comparables con ningún otro estudio ya que cuando se ha evaluado este parámetro el tapón es disuelto con tripsina (Agmo 1976; Agmo y cols. 1978; Austin y Dewsbury 1986). De esta manera, lo que observan son sólo cabezas, encontrando 2×10^6 "espermatozoides" en los tapones resultantes espontáneamente y que pesan 27.9 mg (Agamo 1976). Es preciso mencionar que el resultado lo expresan como número de espermatozoides y no de cabezas que es lo que realmente encuentran (Agmo 2007 comunicación personal). Consideramos que estos valores corresponden a los encontrados en un tapón obtenido de una cópula normal ya que se ha demostrado que para la formación de un tapón seminal se requieren de las secreciones de las vesículas seminales y glándulas coagulantes, así como los fluidos uterinos de la rata (Joshi y cols. 1972, Bradshaw y Wolfe 1977, Williams-Ashman 1984, Fawell y Higgins 1987). Incluso los tapones de eyaculaciones espontáneas seguramente tienen mayor cantidad de "espermatozoides" porque los animales fueron probados durante dos semanas en la que no tenían actividad copulatoria. Dicho de otro modo, los espermatozoides listos para eyacular

localizados en la cauda epididimaria “deben salir” y la manera de hacerlo es mediante las manipulaciones espontáneas.

Una vez que conocíamos los valores “basales” de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen y del tapón seminal, pudimos determinar si había cambios en algunos de ellos al extirpar dos de las glándulas sexuales accesorias: bulbouretrales y coagulantes. Encontramos que la viscosidad del semen disminuyó en los machos sin bulbouretrales ($p < 0.021$), sin coagulantes ($p < 0.05$) y sin ninguna de las dos ($p < 0.015$). La concentración espermática disminuyó en los machos sin coagulantes ($p < 0.032$) y sin ninguna de las dos ($p < 0.02$). Respecto a la consistencia del tapón seminal cambió de tapones endurecidos a tapones endurecidos externamente pero ligeramente coagulados en su interior. El porcentaje de estos “tapones no endurecidos” fue 30 para los machos sin bulbouretrales, 60 para los machos sin coagulantes y 80 para los machos sin ambas glándulas ($p < 0.001$). En los tapones seminales de los machos con las manipulaciones quirúrgicas que presentaron tapones con características normales se encontraron como en los intactos, más cabezas que flagelos y escasos espermatozoides. Sin embargo, en los “tapones no endurecidos” si había cabezas y flagelos no pudo determinarse dado que encontramos millones de espermatozoides aún moviéndose en un medio muy viscoso. ¿Podría decirse si esto es realmente un tapón seminal? Probablemente no, porque aunque serviría para obstaculizar el paso del semen de otros machos, no estaría cumpliendo la función de impulsar a los espermatozoides de la vagina, donde fueron depositados, hacia los cuernos uterinos. En otras palabras, esos “tapones no endurecidos” no estarían facilitando el transporte transcervical espermático. Tan es así que los espermatozoides quedaron en el “tapón” justo en la vagina, disminuyendo considerablemente su presencia en los cuernos uterinos y por lo tanto, disminuyendo también las probabilidades de poder fertilizar a las hembras, claro, en el caso de que éstas hubieran sido intactas.

La falta de endurecimiento del interior del tapón seminal probablemente se relaciona con la ausencia de la vesiculasa, enzima secretada por las coagulantes (Hart 1968) y a la falta de sustrato proveído por las secreciones de las bulbouretrales. Consideramos que es así porque recordamos los experimentos *in vitro*, el coagulado fuerte solo se lograba con al mezclar la secreciones de seminales, bulbouretrales y coagulantes (Hart y Greenstein 1968). Creemos que así el exterior pudo endurecerse porque también se ha propuesto que las secreciones prostáticas pudieran participar en la formación del tapón seminal (Martínez-Reyes 2004),

además, por supuesto de las secreciones vaginales (Joshi y cols. 1972). Podríamos especular que el endurecimiento del semen para formar el tapón iniciaría del exterior hacia el interior, es decir, primero se endurecería el semen que está en contacto con las paredes vaginales, dándole la forma característica, así mismo los fluidos vaginales contribuirían con la consistencia. Al mismo tiempo estaría ocurriendo el endurecimiento de la porción distal a la proximal de la vagina. Si esto es así, los espermatozoides depositados en la vagina serían impulsados hacia los cuernos uterinos dada la presión que poco a poco va ejerciendo el endurecimiento del tapón.

Por otro lado, la disminución en la viscosidad del semen puede estar asociada con la ausencia de las mucoproteínas secretadas por las glándulas bulbouretrales (Goodman 1972), de este modo, el semen es menos viscoso.

Aunque nosotros no evaluamos fertilidad es muy probable que estos animales con "semen no endurecidos" no fueran fértiles. Esto explicaría por qué otros grupos de investigación que han hecho extirpaciones de las glándulas sexuales accesorias hayan encontrado un gran porcentaje de hembras no preñadas o incluso cero por ciento de preñez (Queen y cols. 1981, Carballada y Esponda 1992, 1993).

Finalmente, en lo que concierne al parámetro cualitativo del semen, es decir, el color encontramos en los machos con las manipulaciones quirúrgicas que cuando la muestra del "semen" no era blanca, sino incolora, podía deberse a la falta de semen y/o espermatozoides en los cuernos uterinos de las hembras con las que copularon. Y esto deberse a la ausencia de expulsión seminal durante la eyaculación. En estudios diversos se ha observado que los machos pueden presentar el patrón conductual de eyaculación pero no expeler semen (Meisel y Sachs 1994). Esta explicación no es tan plausible, al menos en nuestro caso porque solamente en una ocasión de más de un centenar de pruebas encontramos fluido incoloro en los cuernos de la hembra recién eyaculada. Consideramos entonces que cuando las muestras de semen eran incoloras era efectivamente la ausencia de semen y/o de espermatozoides ya que constatábamos la presencia del tapón seminal en la vagina.

9. CONCLUSIONES

1. Las glándulas bulbouretrales y coagulantes participan en la formación del tapón seminal en la vagina, siendo mayor la participación de la coagulante.

2. Las glándulas bulbouretrales y coagulantes contribuyen con las características microscópicas del semen, el color y la viscosidad.

3. Las glándulas coagulantes al disminuir el endurecimiento del tapón seminal decremanta una de las características microscópicas del semen, la concentración espermática.

4. La consistencia del tapón seminal depende de las secreciones de las glándulas bulbouretrales y coagulantes ya que su ausencia evita el total endurecimiento del mismo y con esto el deterioro en su función. De esta manera podría disminuir la fertilidad del macho.

10. REFERENCIAS

- Agar A.** 1976. The number of spermatozoa in spontaneous ejaculates in rats. *J. Reprod. Fertil.* 48, 405-407.
- Agar A, Andersson R y Johansson C.** 1978. Effect of oxytocin on sperm numbers in spontaneous rat ejaculates. *Biol. Reprod.* 18, 346-349.
- Allen WE.** 2001. Fertilidad y Obstetricia equina. Editorial ACRIBIA. S.A. México. pp. 210.
- Anderson RJ, Best FS, Warner P y Templeton A.** 1984. A prospective study of the relationship between semen quality and fertility cases of unexplained infertility. *J. Androl.* 5, 297-303.
- Anderson D y Dewsbury DA.** 1986. Reproductive capacity of male laboratory rats. *Physiol. Behav.* 37, 627-632.
- Anderson GS.** 1988. Male sexual function: erection, emission and ejaculation. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Nelly JD (eds). Editorial Raven Press. New York. pp. 1063-1175.
- Beach FA.** 1967. Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior. *Physiol Rev.* 47:289-316.
- Blanton RJ.** 1945. On the factors involved in sperm transport through the cervix uteri of the albino rat. *Am. J. Anat.* 77, 253-272.
- Blanton RJ y Odor DL.** 1949. The total number of spermatozoa reaching various segments of the reproductive tract in the female albino rat at intervals after insemination. *Anat. Rec.* 103, 93-109.

- Brinkley BS y Wolfe HG.** 1977. Coagulation proteins in the seminal vesicle and coagulating gland of the mouse. *Biol. Reprod.* 16:292-297.
- Bravo WP, Flores D y Ordoñez C.** 1997. Effect of repeated collection on semen characteristics of Alpacas. *Biol. Reprod.* 57:520-524.
- Brants D.** 1974. Male Accessory Sex Organs. Structure and Function in mammals. Academic Press. New York, San Francisco, London. pp. 527.
- Brooks DE.** 1990. Biochemistry of the male accessory glands. En: Physiology of Reproduction. Lamming GE (ed). Editorial. Marshall's Edinburgh: Churchill Livingstone. pp. 569-690.
- Brown RE.** 1979. The 22 KHz pre-ejaculatory vocalizations of the male rat. *Physiol. Behav.* 22:483-489.
- Castellada R y Esponda P.** 1992. Role of the fluid from seminal vesicles and coagulating glands in sperm transport into the uterus and fertility in rats. *J. Reprod. Fertil.* 95, 639-648.
- Castellada R y Esponda P.** 1993. Structure of the vaginal plugs generated by normal rats and by rats with partially removed SVs. *J. Exp. Zool.* 265:61-68
- Castellada R y Esponda P.** 1997. Fate and distribution of seminal plasma proteins in the rat female genital tract after natural mating. *J. Reprod. Fertil.* 109, 325-335.
- Clay PT y 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 y Hartung TG.** 1980. Copulatory behaviour and differential reproduction of laboratory rats in a two-male, one-female competitive situation. *Anim. Behav.* 28, 95-102.
- Dowell SE y Higgins SJ.** 1987. Formation of rat copulatory plug: purified seminal vesicle secretory proteins serve as transglutaminase substrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* 53:149-52.
- Ellis EJ.** 1946. Spermatozoa counts in albino rats. *Anat. Rec.* 94, 360-361.
- Fichtman ML, Suhevic J, Rivolta MA y Cisale HO.** 2003. Collection of wild boar semen by electroejaculation. *Vet. Rec.* 153, 365-366.
- Frank J, Confino E, Friberg J, Dudkiewicz AB y Gleicher N.** 1986. Effect of ejaculation frequency on sperm quality. *Arch. Androl.* 16, 203-207.
- Ganong WF.** 1992. Fisiología Médica. Editorial. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México. D.F.
- Garza DA, Torres AMR, Mora RS y Popoca JAM.** 2002. Changes in the quality of rabbit semen in 14 consecutive ejaculates obtained every 15 minutes. *Arch. Androl.* 48, 1-7.
- Geer LA, Barfield RJ y McIntosh TK.** 1978. Influence of gonadal hormones and sexual behavior on ultrasonic vocalization in rats: II. Treatment of males. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92, 447-456.
- Goodman MH.** 1974. Reproducción. En: Fisiología Médica. Vernon MB (ed) Vol II. Mosey Company. Saint Louis, Mo. pp. 1646-1672.

- Gayal HO, Braden TD, Mansour M, Williams CS, Kamaleldin A y Srivastava KK. 2001. Diethylbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biol. Reprod.* 64, 927-934.
- Goyton CA. 1987. Fisiología humana. 6ta ed. Ed. Interamericana S.A. de C.V. México. D.F.
- Har RG y Greenstein JS. 1968. A newly discovered role for Cowper's gland secretion in rodent semen coagulation. *J. Reprod. Fertil.* 17, 87-94.
- Har RG. 1968. The mechanism of action of Cowper's secretion in coagulating rat semen. *J. Reprod. Fertility.* 17, 223-226.
- Har RG. 1970. Cowper's gland secretion in rat semen coagulation. I. Isolation and amino acid analysis of the seminal vesicle substrate. *Biol. Reprod.* 3:347-352.
- Hend R y Stromberg MW. 1986. Anatomy and Embriology of the Laboratory Rat. Editorial. BioMed Verlag. Germany.
- Hlink Z. 1986. Precopulatory behavior of laboratory rat: an ethological approach. *Activ. Nerv. Sup. (Praha).* 28, 108-116.
- Hosworth B. Jr. 1978. Oxidation of [U-14C] palmitic acid by cock spermatozoa. *Poult Sci.* 57, 1751-1754.
- Hummel KP, Richardson FL y Fekete E. 1966. Anatomy. En: Biology of the Laboratory Mouse. Gree EL (ed). Editorial McGraw-Hill. New York. pp. 247-307.
- Hunk CI, Holland JM y Lee C. 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* 3, 81-97.

- Lucio RA, Yaron A y Lindner HR. 1972. Intrauterine gelation of seminal plasma components in the rat after coitus. *J. Reprod. Fertil.* 30, 27-37.
- Lucio RA, Carvalho TL y Kempinas WG. 1987. Determination of spermatozoa concentration in the rat cauda epididymis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20, 429-431.
- Lucio RA. 1956. Conditioning and sexual behavior in the male albino rat. Stockholm: Almqvist and Wiksell. pp. 14-35.
- Lucio RA. 1992. Participación del nervio pélvico en la conducta copulatoria de la rata macho. Tesis de Maestría en Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Lucio RA, Manzo J, Martínez-Gómez M, Sachs BD y Pacheco P. 1994. Participation of pelvic nerve branches in male rat copulatory behavior. *Physiol. Behav.* 55, 241-246.
- Lucio RA, Flores-Rojas G, Aguilar F, Zempoalteca R, Pacheco P y Velásquez-Moctezuma J. 2001. Effects of genitofemoral nerve transection on copulatory behavior and fertility in mice male rats. *Physiol. Behav.* 73, 487-492.
- Lucio RA, Flores-Rojas G y Velásquez-Moctezuma J. 2003. La coagulante: Una glándula sexual accesoria y la fertilidad masculina. En: Fisiología Ecología y comportamiento: Una propuesta multidisciplinaria. Martínez-Gómez M, Cruz Y, Hudson R, Lucio RA (eds). UAT-UNAM. México. pp. 25-33.
- Lucio RA y Gutiérrez-Ospina G. 2006. Competencia espermática: los machos también deciden cuando, cuanto y con quién. *Gaceta de Biomédicas. Órgano Informativo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.* 10:1, 12 y 16.

- Lucio RA, Yaron A y Lindner HR. 1972. Intrauterine gelation of seminal plasma components in the rat after coitus. *J. Reprod. Fertil.* 30, 27-37.
- Lucio RA-Carvalho TL y Kempinas WG. 1987. Determination of spermatozoa concentration in the rat cauda epididymis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20, 429-431.
- Lucio RA K. 1956. Conditioning and sexual behavior in the male albino rat. Stockholm: Almkvist and Wiksell. pp. 14-35.
- Lucio RA. 1992. Participación del nervio pélvico en la conducta copulatoria de la rata macho. Tesis de Maestría en Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Lucio RA, Manzo J, Martínez-Gómez M, Sachs BD y Pacheco P. 1994. Participation of pelvic nerve branches in male rat copulatory behavior. *Physiol. Behav.* 55, 241-246.
- Lucio RA, Flores-Rojas G, Aguilar F, Zempoalteca R, Pacheco P y Velásquez-Moctezuma J. 2001. Effects of genitofemoral nerve transection on copulatory behavior and fertility in mice male rats. *Physiol. Behav.* 73, 487-492.
- Lucio RA, Flores-Rojas G y Velásquez-Moctezuma J. 2003. La coagulante: Una glándula sexual accesoria y la fertilidad masculina. En: *Fisiología Ecología y comportamiento: Una propuesta multidisciplinaria*. Martínez-Gómez M, Cruz Y, Hudson R, Lucio RA (eds). UAT-UNAM. México. pp. 25-33.
- Lucio RA y Gutiérrez-Ospina G. 2006. Competencia espermática: los machos también deciden cuando, cuanto y con quién. *Gaceta de Biomédicas. Órgano Informativo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.* 10:1, 12 y 16.

- Blake MC y Coffey DS. 1994. The male sex accessory tissues. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E y Nelly JD (eds). Editorial Raven Press. New York. pp. 1063-1175.
- Matthews M y Adler NT. 1977. Facilitative and inhibitory influences of reproductive behavior on sperm transport in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91, 727-741.
- Matthews M 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, Anisko JJ y Adler NT. 1982. Group mating among Norway rats II. The social dynamics of copulation: competition, cooperation, and mate choice. *Anim. Behav.* 30, 410-425.
- Nicolaos VS y Miyagawa I. 1993. Endocrinological, biophysical and biochemical parameters of semen collected via masturbation versus sexual intercourse. *J. Androl.* 5:366-373.
- Woby J. 1983. Ultrasonic vocalizations during sex behavior of male house mice (*Mus musculus*): a description. *Behav. Neurol. Biol.* 39, 128-134.
- Olivero M., Muino-Blanco T, López-Pérez MJ y Cebrian-Pérez JA. 1996. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int. J. Androl.* 19, 287-292.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) 2000. Manual de laboratorio para el análisis del semen y la interacción del espermatozoide con el moco cervical. Cambridge University Press.
- Pang SF, Chow PH y Wong TM. 1979. The role of the seminal vesicle, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *J. Reprod. Fert.* 56, 129, 132.

- Beason I y Stener I. 1970. An electromyographic study of the striated urethral sphincter, the striated anal sphincter, and the levator ani muscle during ejaculation. *Electromyography*. 1, 23-44.
- Pfaff DW y Modianos D. 1985. Neural mechanisms of female reproductive behavior. En: Adler NT, Pfaff DW y Goy RW (eds). Hand book of behavioral neurology. Vol. 7. Reproduction. Plenum Press. New York. pp. 423-493.
- Belk EJ y Sachs BD. 1976. Penile movements and the sensory control of copulation in the rat. *Behav. Biol.* 17, 177-186.
- Bond N y Gage MJ. 2004. Prudent sperm allocation in Norway rats, *Rattus norvegicus*: a mammalian model of adaptative ejaculate adjustment. *Anim. Behav.* 68, 819-823.
- Chen K, Dhaduwalla CB y Pierrepoint 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.
- Clark GW, Amann RP y Killian GJ. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54, 103-107.
- Dodger JC y Hughes RL. 1973. Studies of the accessory glands of male marsupials. *Aust. J. Zool.* 21:303-320
- Essa M, Kaye G y Pawlina W. 2005. Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. Editorial Panamericana. México.
- Sachs BD. 1982. Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation and induction of pregnancy in the rat. *J. Reprod. Fertil.* 66:433-443.

- Meisel RL. 1988. The physiology of male sexual behavior. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E y Neill J (eds). Editorial Raven Press. New York. pp. 1393-1485.
- Meisel BP. 1970. The secretion of fluid by the testes of rats, rams, and goats with some observations on the effect of age cryptorchidism and hypophysectomy. *J. Reprod. Fertil.* 23:79-85.
- Meisel BP. 1975. Reproduction in male marsupials. En: The Biology of Marsupials. Stonehouse B y Gilmore D (eds). Editorial London: Macmillan. pp. 411-457.
- Meisel BP, Maddocks S y Brooks DE. 1994. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E y Nelly JD (eds). Editorial Raven Press. New York. pp. 1063-1175.
- Meisel BP. 1991. Male reproductive organs and semen. En: Reproduction in Domestic Animals. Cupps PT (eds). Editorial Raven Press. New York. pp. 221-249.
- Meisel JW y Dziuk PJ. 1959. Evaluation of the electroejaculation technique and the spermatozoa thus obtained from rats, mice and guinea pigs. *Anat. Rec.* 133, 655-664.
- Meisel P y Robaire B. 2001. Sperm structural and motility changes during aging in the brown Norway rat. *J. Androl.* 22, 235-244.
- Williams-Ashman HG. 1984. Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluids. *Mol. Cell. Biochem.* 58:51-61.
- Meisel 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall inc. New Jersey.

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

Wassman MJ, Brown CHC, Selevan SG y Clegg ED. 2000. Semen quality and human fertility: A perspective study with healthy couples. *J. Androl.* 21, 145-153.

11. ANEXOS

Anexo A

APRENDIZAJE DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS DE SEMEN

Debido a la falta de experiencia para evaluar los parámetros del semen se visitaron algunos laboratorios donde se evalúa de forma rutinaria.

Semen de hombre: La muestra se obtuvo mediante masturbación de individuos sexualmente activos y con un periodo de abstinencia de 4 a 6 días. Los parámetros evaluados fueron: volumen, color, viscosidad, pH, movilidad, concentración, viabilidad y morfología espermática. La evaluación fue en el laboratorio de Análisis Clínicos "San Martín de Porres", Texcoco, Tlax. (QFB. Ángeles Atemco). En otro laboratorio, las muestras fueron obtenidas por masturbación de individuos con las mismas condiciones anteriores. Los parámetros evaluados fueron los mismos que en el laboratorio anterior. La evaluación de dichos parámetros se realizó con base en el Manual de Laboratorio para el Análisis del Semen Humano editado por la OMS, 2000. La evaluación fue en el laboratorio de Andrología, Instituto Nacional de Perinatología, México, DF. (QFB. María de los Ángeles Díaz).

Semen de borrego: La muestra se obtuvo de pajillas de semen congelado. Los parámetros evaluados fueron: movilidad y concentración espermática. La evaluación fue en el laboratorio de Reproducción Asistida de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México, DF. (Dra. Carmen Maldonado).

Semen de conejo: La muestra se obtuvo de pajillas de semen congelado. Los parámetros evaluados fueron: volumen, color, movilidad, concentración, viabilidad y morfología espermática. Cabe mencionar que para la movilidad espermática se nos explicó que se deberían considerar dos tipos de movimiento espermático: masal, cuando todos los espermatozoides se mueven en una sola dirección o estrellado, cuando todos los espermatozoides presentan movimientos en diferentes direcciones. La evaluación se realizó en

del área de cunicultura de la Universidad Autónoma de Chapingo. Estado de México (MVZ. Beatriz Mendoza).

Las técnicas de evaluación en las muestras de semen de las tres especies fueron de gran utilidad para adecuar la técnica en el semen de rata.

ADECUACIÓN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS DE SEMEN DE OTRAS ESPECIES PARA LA RATA

Animales: Se utilizaron ratas adultas de la cepa Wistar. Las hembras fueron ovariectomizadas unilateralmente y se les indujo el estro mediante tratamiento hormonal (10 µg de benzoato de estradiol (E₂) 48 horas antes de la prueba copulatoria y 2 mg de progesterona (P₄) 4 horas antes de la misma. Los machos (n = 15) fueron sexualmente expertos y seleccionados al azar de la colonia de nuestro bioterio.

Pruebas copulatorias: Se realizaron durante la fase oscura del ciclo de luz-oscuridad, (12 horas luz-12 horas oscuridad (encendido de luz 20:00 hrs). Se utilizaron arenas de observación de acrílico transparente de 60 cm de diámetro x 60 cm de altura. Las pruebas consistieron en colocar al macho en la arena de observación durante 5 minutos para su habituación, luego se colocó la hembra receptiva, en ese momento inició la prueba copulatoria que terminó cuando el macho desplegó el patrón motor de eyaculación.

Obtención de semen: Al finalizar cada prueba copulatoria, la hembra recién eyaculada fue anestesiada con pentobarbital sódico (26 mg/kg de peso; vía intraperitoneal; Pfizer SA, CV). Se realizó una incisión sobre la línea media de la pared abdominal. Se disecaron los cuernos uterinos (Figura 1), se extrajeron de la cavidad abdominal y mediante una incisión en los extremos proximales se vació el fluido contenido en ellos en un tubo eppendorf (1.5 mL) y se mantuvo en un termo-baño (Felisa® FE-371) a 37±1 °C.

Obtención del tapón seminal: Al finalizar el análisis del semen se obtuvo el tapón seminal. Para ello se fracturó la sínfisis púbica para visualizar el cérvix, posteriormente se hizo una incisión en la pared dorsal de la vagina, exponiendo así el tapón seminal (Figura 2), éste fue desprendido de las paredes vaginales con una espátula y depositado en un tubo eppendorf mantenido en el termo-baño a 37±1 °C.

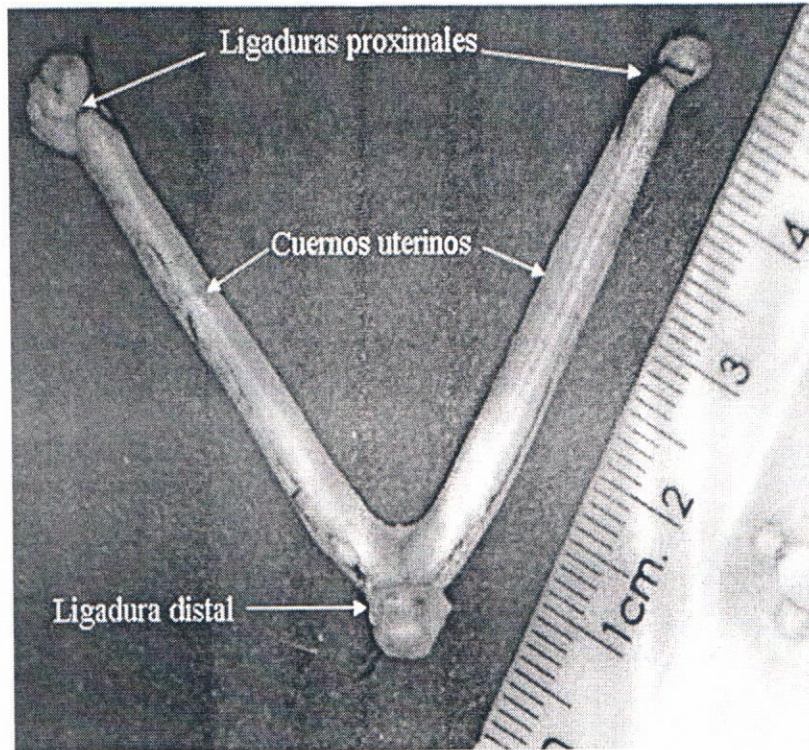


Figura 1. Fotografía que muestra los cuernos uterinos de una rata recién eyaculada.

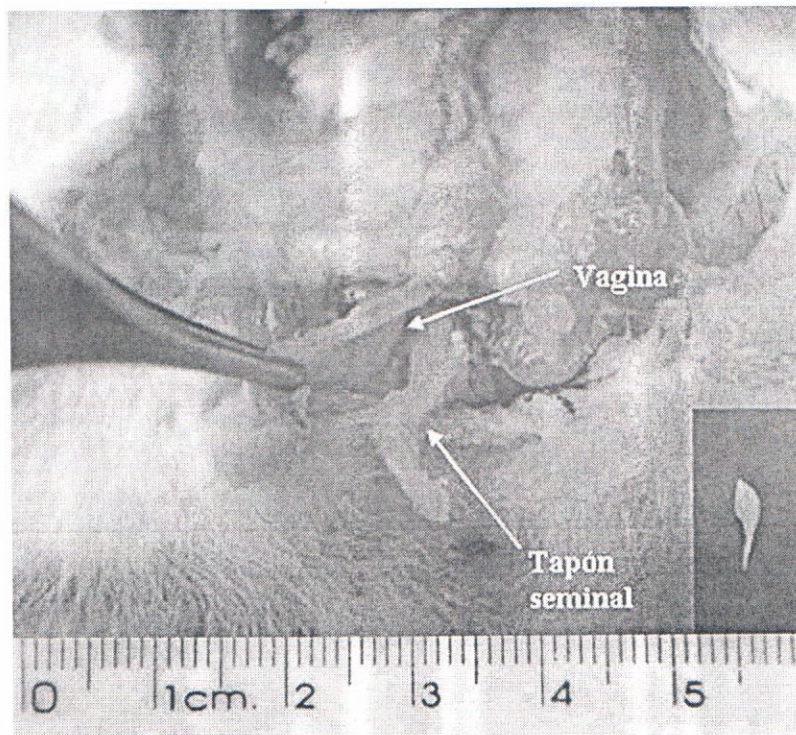
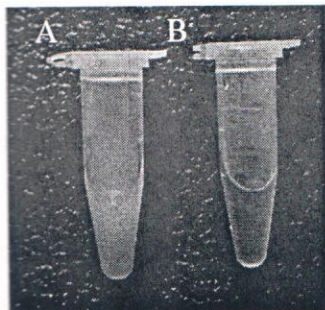


Figura 2. Fotografía que muestra el tapón seminal adherido a las paredes vaginales de una rata recién eyaculada.

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL EYACULADO DE LA RATA

Parámetros macroscópicos del semen



Determinación del color del semen.

A) blanco, B) incoloro.

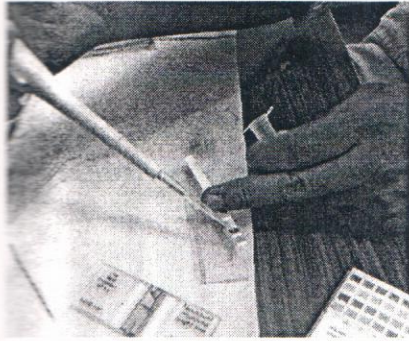
Color del semen (% de muestras de color blanco): Tonalidad que denota indirectamente la concentración de espermatozoides en el eyaculado (blanco, alta concentración de espermatozoides). Se determinó mediante la observación directa.



Evaluación de la viscosidad del semen.

Viscosidad del semen (ml): Consistencia que presenta el semen (filamento de semen menor de 1 mm, disminuida; 2-4 mm, normal; mayor de 5 mm, aumentada).

Con la pipeta de transferencia se succionó una pequeña cantidad de semen. La punta se colocó en el borde del tubo eppendorf y retirando la punta de la pipeta se liberó lentamente gota a gota observando la formación de un filamento de semen cuya longitud se midió con un vernier digital (Mitutoyo MTC700-113).



Evaluación del pH del semen.

pH del semen: Acidez-alcalinidad del semen. Se colocaron 10 μ l del semen sobre papel indicador de pH. Inmediatamente después se comparó el color que adquiere el papel indicador con los colores estándares impresos de la caja (MERKC).

Parámetros microscópicos del semen

Para evaluar los parámetros microscópicos se utilizó un microscopio óptico (Optiphot-2 Nikon) equipado con una video cámara a color (TK-C1380, JVC) y una video grabadora (LG, EC479) conectadas al equipo de cómputo (Compaq Presario, 1.80 GHz, 128 KB).

Movilidad espermática (%): Movimiento individual de los espermatozoides. Se colocaron 10 μ l de semen sobre un portaobjetos de 25 x 75 milímetros y sobre el semen se colocó un cubreobjetos de 22 x 22 milímetros

La muestra se analizó con el microscopio óptico (objetivo 20x). En el campo de observación se trazó una línea imaginaria horizontal y con un contador de células (Conductronic M220) se evaluó el movimiento de 100 espermatozoides (Figura 1). Para la movilidad espermática se consideraron los espermatozoides cercanos a la línea imaginaria. Aquellos que la cruzaron vertical o diagonalmente en menos de 3 segundos fueron identificados como espermatozoides con movilidad progresiva rápida; los que tardaron más de 4 segundos fueron espermatozoides con movilidad progresiva lenta. Aquellos que se movieron sin desplazarse eran espermatozoides con movilidad *in situ*, también se consideraron los espermatozoides sin movimiento.

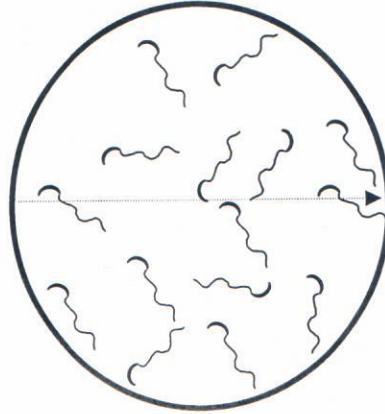


Figura 1. Esquema que muestra la evaluación de la movilidad espermática.

Con los resultados obtenidos de la movilidad espermática se calculó el *índice de movilidad*, sumando el número de espermatozoides con movilidad progresiva rápida más el número de espermatozoides con movilidad progresiva lenta y el resultado se dividió entre 100. El valor fue de 0-1. Esto indicó indirectamente el número de espermatozoides con probable capacidad fértil (Sachs y Meisel 1988, Lucio y cols. 1994).

Concentración espermática ($10^6/ml$): Cantidad de espermatozoides por mililitro de semen. Primero se determinó la densidad espermática para conocer la dilución y posteriormente evaluar la concentración espermática.

Determinación de la densidad y dilución espermática: Se colocaron 10 μl de semen sobre un portaobjetos de 25 x 75 milímetros y sobre el semen se le colocó un cubreobjetos de 25 x 22 milímetros. Se observó con el objetivo 20x. Se contó el número de espermatozoides en tres campos seleccionados al azar. El conteo para cada campo se realizó en zig-zag (Figura 2).

Después se obtuvo el promedio, el cual representa la densidad espermática del semen. Se determinó la dilución con base en el cuadro.

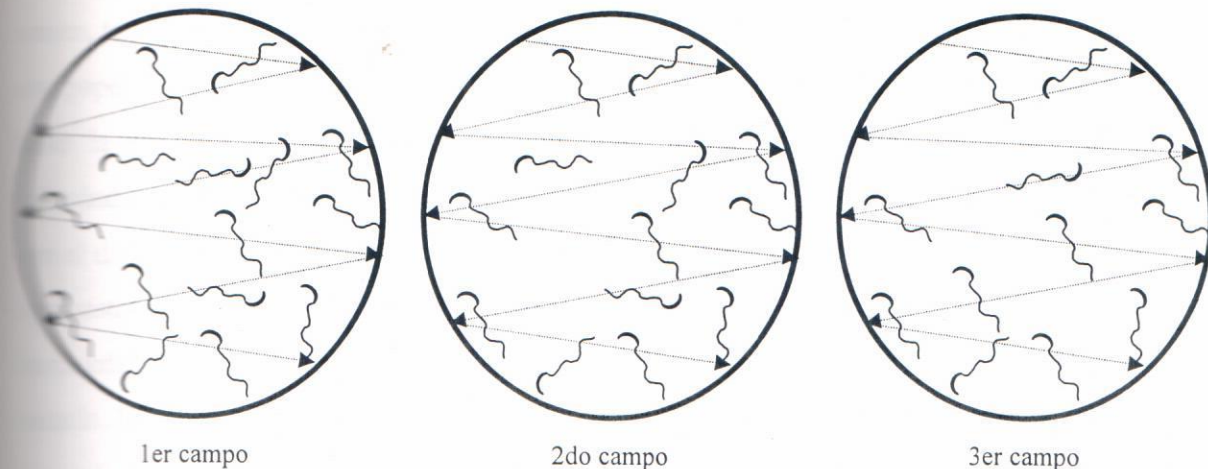


Figura 2. Esquema que muestra la determinación de la densidad espermática.

Cuadro 1. Diluciones del semen con base en la densidad espermática.

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

Cabe mencionar que en todos los animales (n=15, Cuadro 2) el rango de la densidad espermática fue de 61 a 120, por lo que la dilución fue de 1:200.

Cuadro 2. Densidad espermática de los machos (n=15) seleccionados al azar.

Macho	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Densidad espermática	89	95	101	110	60	63	90	105	99	101	120	119	68	72	108

Preparación de la dilución: Se utilizó una pipeta para eritrocitos se conectó en la manguera de succión en el extremo corto. Con la manguera se succionó semen hasta la señal asegurándose que el capilar del interior de la pipeta tuviera una columna continua de

semen, teniendo cuidado de no tener burbujas de aire. La punta de la pipeta de dilución se secó con papel filtro e inmediatamente se succionó el líquido de dilución (formaldehído al 10 %) hasta la señal "101" (el llenado debe ser exacto). La manguera se separó de la pipeta, colocándola horizontalmente. Tapando su extremo libre con el dedo índice y el otro extremo con el dedo pulgar. La pipeta se agitó vigorosa y manualmente durante 2 - 4 minutos hasta que la muestra se observó homogénea. Los movimientos fueron variados y alternados con rotación horizontal. Una "pelotita" de plástico dentro del bulbo de la pipeta de eritrocitos facilitó la mezcla. De ésta manera, el semen estuvo diluido 1:200, el contenido del capilar del extremo largo de la pipeta se desechó (aproximadamente 5 gotas). El semen diluido se vertió en un tubo eppendorf. Posteriormente, se utilizó una cámara de Neubauer para evaluar la concentración espermática.

La cámara de Neubauer tiene dos cuadrículas, cada una consta de nueve regiones, los de las 4 esquinas se identifican con las letras A-D. Los cuadros A y B son los superiores, derecho e izquierdo respectivamente y los cuadros C y D son los inferiores, derecho e izquierdo; el cuadro central se identifica con la letra E. La evaluación del número de espermatozoides se realizó sólo en el cuadro E, el cual está subdividido en 20 cuadros más pequeños (Figura 3).

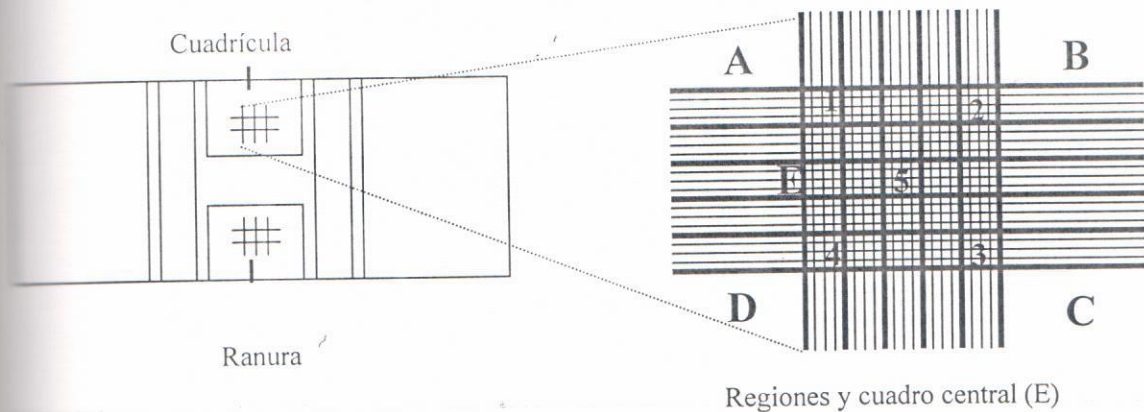


Figura 3. Esquemas que muestran la cámara de Nueubauer.

Conteo de espermatozoides: A la cámara de Neubauer se le colocó un cubreobjetos cuidando de cubrir ambas cuadrículas. Se depositaron en cada ranura 10 μ l del semen diluido, que difundieron por capilaridad. Se dejaron transcurrir de 5-10 minutos para que los espermatozoides sedimentaran. Se contaron los espermatozoides de los subcuadros de las esquinas y del subcuadro de en medio del cuadrante E (E_1, E_2, E_3, E_4, E_5) con el objetivo 20x.

El conteo consiste en considerar las cabezas de los espermatozoides que se encontraron dentro de los subcuadros incluyendo las que se encontraron sobre los límites (superior e izquierdo) de cada subcuadro, formando una "L" invertida (Figura 4). Se sumaron los espermatozoides de los cinco subcuadros y se promediaron. El conteo se realizó en ambas cuadrículas y el resultado se multiplicó por 10^6 .

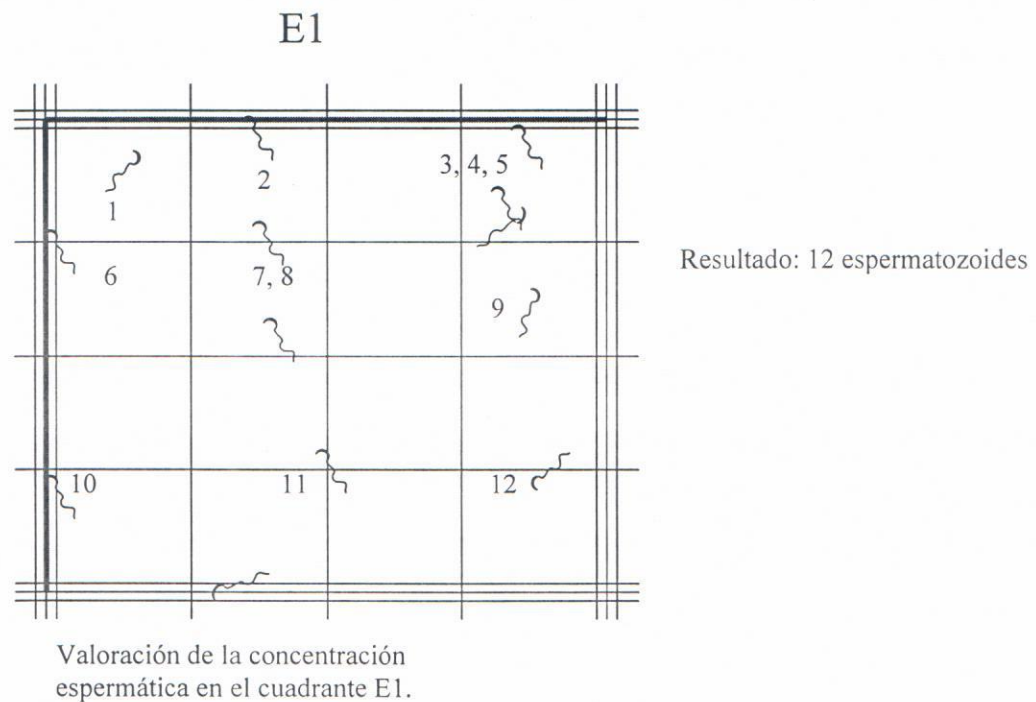
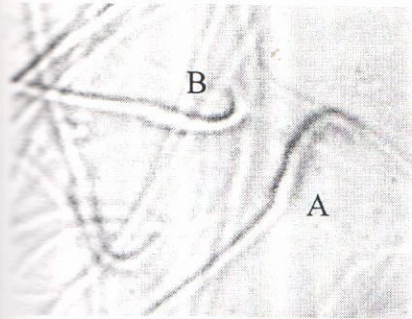
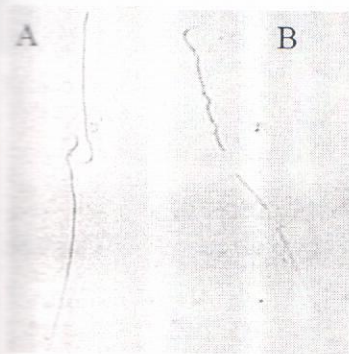


Figura 4. Esquema que muestra la determinación de la concentración espermática.



Evaluación de la viabilidad espermática
 A) muertos (teñidos) B) vivos (no teñidos).

Sobre un cubreobjetos de 25 x 75 milímetros se preparó un frotis en proporción ~~semen-volumen~~ (semen-colorante) colocando 10 μ l de semen y 10 μ l del colorante. Ambas ~~muestras~~ se mezclaron con un palillo de madera hasta que la mezcla fue homogénea. Después, ~~se colocó~~ un cubreobjetos sobre la muestra para analizar la preparación con el objetivo 100x ~~utilizando~~ sobre el cubreobjetos una gota de aceite inmersión). Se contaron 100 ~~espermatozoides~~ al azar en diferentes campos, utilizando un contador de células.



Evaluación de la morfología espermática.
 A) espermatozoides normales,
 B) espermatozoides anormales.

Viabilidad espermática (%):

Cantidad de espermatozoides vivos y muertos al momento de ser eyaculados. Los espermatozoides no teñidos corresponden a los vivos; los teñidos, a los muertos.

Morfología espermática (%):

Cantidad de espermatozoides con morfología normal (cabeza en forma de hoz y flagelo aproximadamente 20 veces más largo que la cabeza) y espermatozoides con morfología anormal (cabeza, flagelo, flagelo fragmentado, flagelo enrollado, flagelo en zig-zag, flagelo doble o doble cabeza).

Para evaluar la morfología espermática se utilizó la misma preparación donde se ~~evaluó~~ la viabilidad espermática. Se contaron 100 espermatozoides en diferentes campos.

Parámetros macroscópicos del tapón seminal



Tapón seminal.

Consistencia del tapón seminal: Solidez del tapón seminal (% de tapones endurecidos).

Se considera la solidez del tapón al tocarlo con los dedos pulgar e índice, la evaluación es inmediata a su obtención. Se distinguió la categoría endurecido.

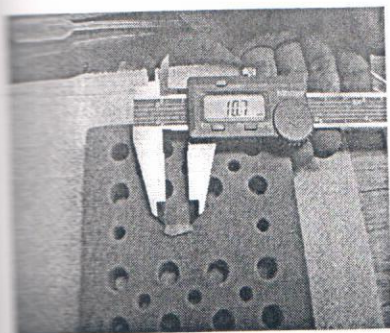


Pesado del tapón seminal.

Peso del tapón seminal (mg): Masa del tapón seminal.

Se determinó el peso del tapón en una balanza analítica (Mettler AE50).

Volumen del tapón seminal (mm^3): Masa del tapón seminal. Se determinó mediante la siguiente fórmula: $(\text{largo}) (\pi) (r^2)$; donde r^2 es el valor del radio al cuadrado.



Medición del tapón seminal.

Tamaño del tapón seminal (mm): Longitud del tapón seminal. Se consideró el largo del tapón, de extremo a extremo, así como el ancho utilizando un vernier digital (Mitutoyo MTC706-113).

Además, se analizó descriptivamente la composición del tapón seminal.



Composición del tapón seminal. A) espermatozoide, B) cabeza, C) flagelo.

Composición del tapón seminal:

Determinación del número de cabezas, flagelos y espermatozoides presentes en la parte media del tapón seminal.

Se hizo un corte del tapón seminal en forma transversal con un bisturí, sosteniéndolo con unas pinzas de precisión. El extremo recién cortado se deslizó horizontalmente de izquierda a derecha en toda la longitud de un portaobjetos de 25 x 75 milímetros.

El deslizamiento se hizo cuatro veces tratando de abarcar todo el portaobjetos tanto en ~~longitud~~ como ancho, teniendo cuidado de no traslapar los barridos. La evaluación del color, ~~visibilidad~~, pH y movilidad espermática se realizó en un tiempo menor a 5 minutos después de ~~obtención~~ del semen. La evaluación del resto de los parámetros espermáticos se realizó ~~separadamente~~. Todos los parámetros se evaluaron por duplicado para reducir errores.

VALORES DE REFERENCIA DE SEMEN Y DE TAPÓN SEMINAL DE RATA

Se analizó el semen y el tapón seminal de los machos ($n = 15$) seleccionados al azar. Los parámetros fueron macroscópicos (viscosidad y pH) y microscópicos (movilidad, concentración, viabilidad y morfología espermática) de semen y macroscópicos (peso, volumen y tamaño) del tapón seminal (Cuadro 1). Además como parámetros cualitativos fueron el color del semen y la consistencia del tapón seminal (Cuadro 2).

Composición del tapón seminal: cabezas, flagelos y espermatozoides presentes.

El número de cabezas presentes es mayor al de flagelos y éste mayor al de los espermatozoides. De un 100% de los componentes, aproximadamente el 60% corresponden a las cabezas, 30% a flagelos y 10% a espermatozoides.

Cuadro 1. Valores de referencia de los parámetros (macroscópicos y microscópicos) del semen de los machos intactos sexualmente expertos, seleccionados al azar (n=15).

PARÁMETROS	VALORES DE REFERENCIA
Macroscópicos del semen	
Viscosidad (mm)	2.2 ± 0.2
tiempo de coagulación (seg)	8.1 ± 0.07
Microscópicos del semen	
Movilidad progresiva rápida (%)	44.9 ± 3.4
Movilidad progresiva lenta (%)	33.2 ± 2.5
Movilidad <i>in situ</i> (%)	12.6 ± 1.2
Imovilidad (%)	9.2 ± 0.7
Índice de movilidad (0-1)	0.7 ± 0.05
Concentración espermática (10 ⁶ /ml)	13.8 ± 1.9
Vitalidad (% espermatozoides vivos)	57.3 ± 4.2
Morfología (% espermatozoides normales)	92.7 ± 6.6
Macroscópicos del tapón seminal	
Peso (mg)	126.8 ± 3.6
Volumen (largo) (π) (r ²) = mm ³	298.1 ± 13.3
Tamaño-largo (mm)	12.8 ± 0.3
Tamaño-ancho (mm)	5.4 ± 0.1
Microscópicos del tapón seminal	
Leucocitos (%)	76.1 ± 5.0
Epitelios (%)	19.5 ± 4.4
Espermatozoides (%)	4.3 ± 3.1

Se expresa la media ± el error estándar.

Cuadro 2. Valores de referencia de los parámetros (macroscópicos) del eyaculado de los machos intactos sexualmente expertos seleccionados al azar (n=15).

PARAMETROS CUALITATIVOS		VALORES DE REFERENCIA
Macroscópicos del semen		
Color		Blanco
	#	15
	%	100
Macroscópicos del tapón seminal		
Consistencia		Endurecido
	#	15
	%	100

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO PARA REALIZAR EL ANÁLISIS SEMINAL EN RATA

Se utilizaron ratas Wistar, mantenidas en condiciones estándar de bioterio. Hembras ovx con estrógeno inducido hormonalmente (10 µg de estradiol y 2 µg de progesterona) y machos inactivos sexualmente.

Los machos adultos inactivos fueron sometidos a tres pruebas copulatorias de entrenamiento sexual, con un intervalo de 3 días entre ellas. La duración de la prueba fue de 15 minutos si el macho no realizaba intromisiones ó de 30 minutos después de la primera intromisión si no ocurría la eyaculación o bien cuando ocurría la eyaculación. Los machos que en las tres pruebas eyacularon entre 10 y 15 minutos fueron seleccionados y se formaron tres grupos los cuales fueron sometidos a tres pruebas copulatorias (1 serie eyaculatoria) con distintos intervalos de tiempo de 2, 10 ó 15 días (n=10), para cada grupo.

Al finalizar cada prueba copulatoria, la hembra recién eyaculada fue anestesiada para obtener el semen contenido en los cuernos uterinos y el tapón seminal de la vagina. De esta manera las pruebas copulatorias y el análisis del eyaculado fueron en el día 2, 4 y 6 para el grupo 1 (intervalo de cada 2 días), 10, 20 y 30 días para el grupo 2 (intervalo de cada 10 días) y 15, 30 y 45 días para el grupo 3 (intervalo de cada 15 días).

Los datos obtenidos de las comparaciones entre los animales sometidos a diferentes intervalos de tiempo y los seleccionados al azar fueron analizados utilizando el programa GraphPad InStat, Versión 3.05 (GraphPad Software Inc).

Para los parámetros: viscosidad, pH, movilidad, concentración, viabilidad y morfología espermática en el semen; así como, el peso, volumen y tamaño del tapón seminal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, con base en la naturaleza de los datos (grupos independientes, datos no paramétricos, datos sin distribución normal ni homogeneidad de varianzas), el valor de significancia fue de $p < 0.05$.

Para los parámetros: color del semen y consistencia del tapón seminal se analizaron mediante una tabla de contingencia y la prueba de X^2 por tratarse de datos discretos (Zar

1999). En todos los casos, sólo se comparó la tercera prueba de cada grupo, ya que es donde se observaría el efecto de la frecuencia copulatoria.

Resultados

Los cuadros 1 y 2 muestran los valores de los parámetros cuantitativos, macroscópicos y microscópicos, de 45 eyaculados que corresponden a los 45 machos sexualmente expertos machos seleccionados al azar $n = 15$ y machos de cada 2, 10 ó 15 días de intervalo de tiempo, $n=10$ para cada grupo). Los parámetros macroscópicos (viscosidad y pH) y microscópicos (movilidad, concentración, viabilidad y morfología) del semen; así como, los del tapón seminal (peso, volumen y tamaño) no mostraron diferencias significativas entre los eyaculados de los machos seleccionados al azar y los eyaculados obtenidos de los machos que eyacularon cada 2, 10 y 15 días.

En cuanto a los parámetros cualitativos, macroscópicos y microscópicos, en el cuadro 3 se muestran los valores del color del semen y la consistencia del tapón seminal. No hubo diferencias estadísticamente significativas, entre los eyaculados de los machos seleccionados al azar y los eyaculados obtenidos de los machos que eyacularon cada 2, 10 y 15 días.

En lo que se refiere a la composición del tapón seminal, no hubo variaciones en la proporción de cabezas de espermatozoides en los machos seleccionados al azar *versus* los que eyacularon cada 2, 10 ó 15 días. Lo mismo sucedió para los flagelos y espermatozoides presentes. Cabe mencionar que siempre se mantuvo una mayor cantidad de cabezas, menor de flagelos y escasos espermatozoides.

El análisis de eyaculado puede realizarse en periodos cortos de cada 2 días o largos de cada 15 días, de semen obtenido de hembras que recibieron una sola eyaculación. En otras palabras, los valores de referencia para semen y tapón seminal serán útiles para evaluar los parámetros de eyaculados de encuentros sexuales de una sola serie eyaculatoria cada 2, 10 ó 15 días.

Tabla 4. Valores de los parámetros del semen obtenidos en diferentes intervalos de tiempo.

	Control (n=15)	Intervalos de tiempo			Estadística
		Cada 2 días (n=10)	Cada 10 días (n=10)	Cada 15 (n=10)	
Macroscópicos					
Viscosidad (mm)					
Mediana	2.0	2.0	2.0	3.0	NS
Qi-Qs	2.0-3.0	1.0-2.0	2.0-3.0	2.0-4.0	
Min-Max	0.0-4.0	0.0-3.0	0.0-5.0	1.0-4.0	
pH					
Mediana	8.0	8.5	8.5	8.0	NS
Qi-Qs	8.0-8.5	8.0-8.5	8.5-9.0	8.0-8.5	
Min-Max	7.5-8.5	8.0-9.5	7.5-9.5	7.0-9.5	
Microscópicos					
Movilidad progresiva rápida (%)					
Mediana	45.5	48.5	41.5	44.5	NS
Qi-Qs	41.0-51.0	38.5-51.5	35.0-45.0	43.5-47.5	
Min-Max	38.0-57.0	22.2-53.0	30.0-56.0	28.5-54.0	
Movilidad progresiva lenta (%)					
Mediana	34.0	33.5	32.0	32.5	NS
Qi-Qs	32.0-36.5	32.5-34.5	30.0-35.0	32.5-38.0	
Min-Max	27.0-43.5	30.5-44.0	23.5-38.5	28.5-44.0	
Movilidad in situ (%)					
Mediana	12.5	10.0	15.0	12.5	NS
Qi-Qs	8.0-15.0	9.0-17.5	13.5-21.0	9.5-14.0	
Min-Max	5.0-17.0	7.5-21.5	11.0-27.5	8.0-16.0	

	Control (n=15)	Intervalo de tiempo			Estadística
		Cada 2 días (n=10)	Cada 10 días (n=10)	Cada 15 (n=10)	
Microscópicos					
Inmovilidad (%)					
Mediana	7.5	8.5	8.5	9.5	
Qi-Qs	6.0-8.5	7.5-9.5	7.5-12.5	6.0-10.0	NS
Min-Max	3.3-12.0	4.0-13.5	6.0-17.5	4.5-13.0	
Índice de movilidad (0-1)					
Mediana	0.8	0.7	0.7	0.8	
Qi-Qs	0.8-0.9	0.6-0.8	0.6-0.8	0.6-0.8	NS
Min-Max	0.7-0.9	0.5-0.9	0.6-0.8	0.6-0.8	
Concentración espermática (10⁶/ml)					
Mediana	16.5	12.7	15.0	9.7	
Qi-Qs	7.5-17.5	10.5-17.5	11.0-21.0	7.5-28.0	NS
Min-Max	0.0-31.5	0.0-25.5	0.0-44.5	4.0-52.5	
Viabilidad (% de spz vivos)					
Mediana	62.5	63.0	72.5	61.7	
Qi-Qs	60.0-63.5	59.5-69.0	65.5-75.0	56.5-67.0	NS
Min-Max	53.0-68.5	54.0-70.5	59.5-81.0	32.0-77.5	
Morfología (% de spz normales)					
Mediana	100	100	100	100	
Qi-Qs	98.5-100	99.0-100	100-100	99.0-100	NS
Min-Max	96.5-100	96.5-100	99.0-100	83.0-100	

Kruskall-Wallis p<0.05. spz, espermatozoide. Qi, cuartil inferior. Qs, cuartil superior. Min, mínimos. Max, máximos. NS, no significativo.

Cuadro 3. Valores de los parámetros de los topones terminales obtenidos en diferentes intervalos de tiempo.

	Control (n=15)	Intervalo de tiempo			Estadística
		Cada 2 días (n=10)	Cada 10 días (n=10)	Cada 15 días (n=10)	
Macroscópicos					
Peso (mg)					
Mediana	126.0	113.0	117.0	115.0	NS
Qi-Qs	115.0-132.0	111.0-135.0	113.0-134.0	107.0-135.0	
Min-Max	10.6-158.0	107.0-169.0	72.0-174.0	71.0-144.0	
Volumen (mm³)					
Mediana	306.1	250.7	283.3	262.6	NS
Qi-Qs	265.7-334.1	216.1-291.1	206.2-324.6	218.4-348.7	
Min-Max	191.8-390.2	184.7-312.6	170.2-379.9	209.9-372.5	
Tamaño-largo (mm)					
Mediana	12.8	12.3	13.1	12.5	NS
Qi-Qs	11.2-13.8	9.8-13.2	11.2-13.8	10.7-13.6	
Min-Max	10.6-15.3	9.4-15.1	8.4-15.9	9.7-18.5	
Tamaño-ancho (mm)					
Mediana	5.7	5.1	5.2	5.3	NS
Qi-Qs	4.9-5.7	4.8-5.3	5.1-5.9	5.1-5.4	
Min-Max	4.8-6.1	4.5-6.1	4.2-6.3	4.8-5.8	

Cuadro 2. Continuación.

	Control (n=15)	Intervalo de tiempo			Estadística
		Cada 2 días (n=10)	Cada 10 días (n=10)	Cada 15 días (n=10)	
Microscópicos					
Cabezas (%)					
Mediana	74.0	77.5	76.0	87.0	NS
Qi-Qs	68.0-92.5	67.5-96.5	63.0-86.0	82.5-93.0	
Min-Max	40.0-100.0	50.0-100	53.0-90.0	0.0-100	
Flagelos (%)					
Mediana	17.0	20.5	19.0	9.0	NS
Qi-Qs	6.5-29.0	13.5-28.5	13.5-37.0	5.0-13.0	
Min-Max	0.0-60.0	0.0-50.0	10.0-44.0	0.0-30.0	
Espermatozoides (%)					
Mediana	0.0	0.0	0.5	0.0	NS
Qi-Qs	0.0-0.5	0.0-2.0	0.0-2.5	0.0-0.5	
Min-Max	0.0-1.0	0.0-9.0	0.0-8.0	0.0-1.0	

Kruskall-Wallis $p < 0.05$. Qi, cuartil inferior. Qs, cuartil superior. Min, mínimos. Max, máximos. NS, no significativo.

Cuadro 3. Valores de los parámetros del semen y tapón seminal obtenidos en diferentes intervalos de tiempo.

Parámetros	Grupo experimental				Estadística
	Control (n = 15)	Cada 2 días (n = 10)	Cada 10 días (n = 10)	Cada 15 días (n = 10)	
Semen Blanco	#	15	10	10	NS
	%	100	100	100	
Tapón seminal Endurecido	#	15	10	10	NS
	%	100	100	100	

Comparaciones de la presencia de muestras de semen de color blanco y tapones seminales endurecidos obtenidos de los machos sometidos a diferentes frecuencias eyaculatorias ($X^2 = 345.09$, $p = 0.578$); NS, no significativo.

PREPARACIÓN DE SUSTANCIAS REQUERIDAS PARA EL ANÁLISIS DEL EYACULADO

Colorante (eosina-nigrosina) para evaluar la viabilidad espermática

A 100 mililitros de agua destilada agregarle 5 gramos de nigrosina, 1 gramo de eosina (ambas solubles en agua) y 2.9 gramos de citrato de sodio. Disolver en un agitador magnético con placa de calentamiento durante 40 minutos, filtrar la solución (papel filtro) y guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución salina al 0.9 % para limpiar los cuernos uterinos recién eyaculados

A 1 litro de agua destilada adicionarle 9 gramos de cloruro de sodio. Disolver con un agitador magnético.

Benzal para esterilizar área de cirugía del animal

A 1 litro de agua destilada agregarle 5 mililitros de benzalconio.

13. PUBLICACIONES

A. Congresos nacionales



Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas

XLVIII Congreso Nacional de
Ciencias Fisiológicas
Guadalajara, Jalisco



4 al 8 de Septiembre de 2005



LA CÓPULA EN EL TRANSPORTE DE OVOCITOS

Cortés Sol A *, Alvarado Olivarez M *, Camacho
 Rojas Romero E *, Pacheco Cabrera P & *Instituto de
 Investigaciones Biomédicas UNAM.

constituye información somato-sensorial importante que
 reacciones neuro-endócrinas, que posiblemente
 en procesos reproductivos como la ovulación y el
 ovocitos. En el presente estudio se analizó el efecto
 el transporte de ovocitos por el oviducto. Método:
 ratas Wistar vírgenes, mantenidas en un foto-período
 Después de tres ciclos estrales, durante la fase oscura se
 tiempo de ovulación, el inicio de la sexta hora de
 o después del "inicio" de la ovulación, las hembras
 machos sexualmente expertos. La estimulación por
 terminó por las montas, intromisiones, patrón
 así como por la presencia o ausencia de tapón
 diferentes tiempos post-cópula, se anestesiaron para
 reproductor. In vitro se registró la localización y el
 ovocitos presentes en los oviductos. Resultados: En
 ovulación, de 10 a 120 min antes de la ovulación, los
 en el segundo segmento del oviducto a las
 éstos se observaron más pequeños y las células
 disgregadas y reducidas en tamaño. En hembras
 de 30 a 160 min post-ovulación, de las 22-29 hrs
 se encontraron ovocitos en el oviducto. Conclusión:
 la estimulación por cópula se aplique antes del
 laboratorio, el transporte de ovocitos se retrasa,
 en el segundo segmento del oviducto. CONACYT a
 (en trámite); CONACYT AM 16400.

BIOSCOPÍA INDIRECTA EN RATAS CON

FRECUENCIA EYACULATORIA Tlachi López JL *,
 Pacheco J &, Zempoalteca Ramírez R *, Lucio Lucio
 Universidad Autónoma de Tlaxcala & Universidad Autónoma
 de Tlaxcala.

compuesto por espermatozoides y secreciones de
 sexuales accesorias. Como muchos otros mamíferos,
 eyacular repetidamente en intervalos de tiempo
 cortos. Sin embargo, no se conoce como se afectan
 macro y microscópicas del semen conforme se
 eyaculaciones. En este estudio se analizaron las
 del semen de ratas con diferentes periodos de
 ratas macho, sexualmente expertos, de la cepa
 (edades de edad) mantenidas en condiciones estándar de
 tomaron tres grupos de machos para permitirles
 eyaculatoria cada 2, 10 ó 15 días. En cada caso,
 después de la eyaculación se obtuvo el semen
 en ambos cuernos uterinos de las hembras. Se
 parámetros macroscópicos: volumen, viscosidad, pH y
 microscópicos: índice de movilidad, concentración
 viabilidad y normalidad. Se siguió la técnica para la
 directa de semen humano con algunas
 No se encontraron variaciones significativas entre
 respecto a: volumen, 2-3 ml; viscosidad, 2-4 mm; pH,
 movilidad, 0.6-0.7; normalidad, 99-100%; viabilidad,
 espermatozoides vivos y 21-38% espermatozoides
 Sin embargo, la concentración espermática disminuyó
 en el grupo de ratas que eyaculaban con la
 repetición más alta. Los valores cambiaron de 10
 para el grupo 1 versus 18-26 millones/ml para los
 En conclusión, estos datos sugieren que el período
 la evaluación del semen tendría que ser con un
 10 a 15 días entre pruebas. Beca CONACYT 188574

O-007 EFECTOS ASIMÉTRICOS DE LA LESIÓN UNILATERAL DE LA

AMÍGDALA BASOLATERAL SOBRE LA OVULACIÓN EN LA
 RATA Sánchez Ramos MA *, Cortés Encarnación R *, Sánchez
 Calderón L * Universidad Autónoma de Querétaro.

La amígdala es una estructura del sistema límbico que participa en
 múltiples funciones relacionadas con la regulación neuroendocrina y
 la conducta. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la
 amígdala medial presenta asimetría en los mecanismos
 relacionados con la ovulación y con la secreción de estradiol y
 progesterona, pero no se ha reportado que la amígdala central y la
 basolateral presenten asimetría. El objetivo fue medir los efectos de
 la lesión unilateral de la amígdala central y basolateral sobre la
 ovulación de la rata. Se utilizaron ratas hembras de la cepa wistar
 obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UAQ,
 mantenidas en un cuarto con ciclo de luz-oscuridad 14-12, con
 acceso libre al agua y al alimento. Todos los animales fueron
 lesionados en el día del diestro 1 y sacrificados en el estro después
 de que recuperaron dos ciclos estrales consecutivos. Se contaron
 los ovocitos liberados por cada ovario y los datos fueron analizados
 con la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos muestran que la lesión
 derecha de la amígdala basolateral provoca la disminución
 significativa de la ovulación. Podemos discutir que: 1) La amígdala
 basolateral juega un papel en el proceso de la ovulación. Es
 probable que la amígdala basolateral module de manera indirecta la
 ovulación, a través de la conexión que establece con la amígdala
 medial 2) Hay un efecto asimétrico en esta modulación. La amígdala
 basolateral derecha parece estar relacionada con el efecto sobre la
 ovulación, similar a lo que ocurre con la lesión de la amígdala
 medial que se ha reportado anteriormente, lo que confirma la idea
 de que el lado derecho de la amígdala de la rata tiene mayor
 participación que el izquierdo en el proceso de la ovulación.

O-008 LESIONES ELECTROLÍTICAS BILATERALES DEL CAMPO

TEGMENTAL CENTRAL (CTC), INHIBEN POR COMPLETO LA
CONDUCTA SEXUAL MASCULINA, SIN AFECTAR LA
MOTIVACIÓN HACIA UN INCENTIVO SEXUAL (MIS) Hurtazo
 HA *, Romero Carbente JC , Rojas Hernández J , Paredes RG
 *Instituto de Neurobiología-UNAM.

Estudios previos han demostrado que lesiones bilaterales del
 campo tegmental central (CTC) inhiben completamente la conducta
 sexual masculina. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si una
 lesión electrolítica bilateral del CTC que afecta la conducta sexual,
 afecta también la motivación hacia un incentivo sexual (MIS) en la
 rata macho. Solo aquellos animales que eyaculaban en tres pruebas
 de conducta sexual fueron usadas para las pruebas de MIS. Esta
 prueba se evaluó en una arena, donde los animales incentivos (una
 hembra sexualmente receptiva y un macho sexualmente activo) se
 localizaban diagonalmente en las esquinas opuestas de la caja,
 detrás de una malla de alambre. Los parámetros registrados fueron
 el tiempo y la frecuencia en la cual el macho experimental estaba
 dentro de un área adyacente a los animales incentivos. Después de
 las pruebas conductuales se realizaron las lesiones electrolíticas
 bilaterales. Una semana después de la cirugía se realizaron
 nuevamente las pruebas conductuales. El lugar y extensión de la
 lesión se verificó con técnicas histológicas habituales. Los animales
 con lesión bilateral del CTC mostraron una clara inhibición de la
 conducta sexual masculina, sin embargo no se observaron cambios
 en la MIS. Todos los animales incluyendo aquellos con lesión del
 CTC prefieren a la hembra receptiva en lugar de los machos
 sexualmente expertos antes y después de la lesión. El presente
 estudio confirma que la conducta sexual masculina puede ser
 interrumpida por lesiones electrolíticas bilaterales de CTC sin
 afectar la motivación hacia un incentivo sexual. Asistencia técnica
 de Francisco Camacho. Con apoyo de CONACYT V40286M y
 DGAPA IN227402.

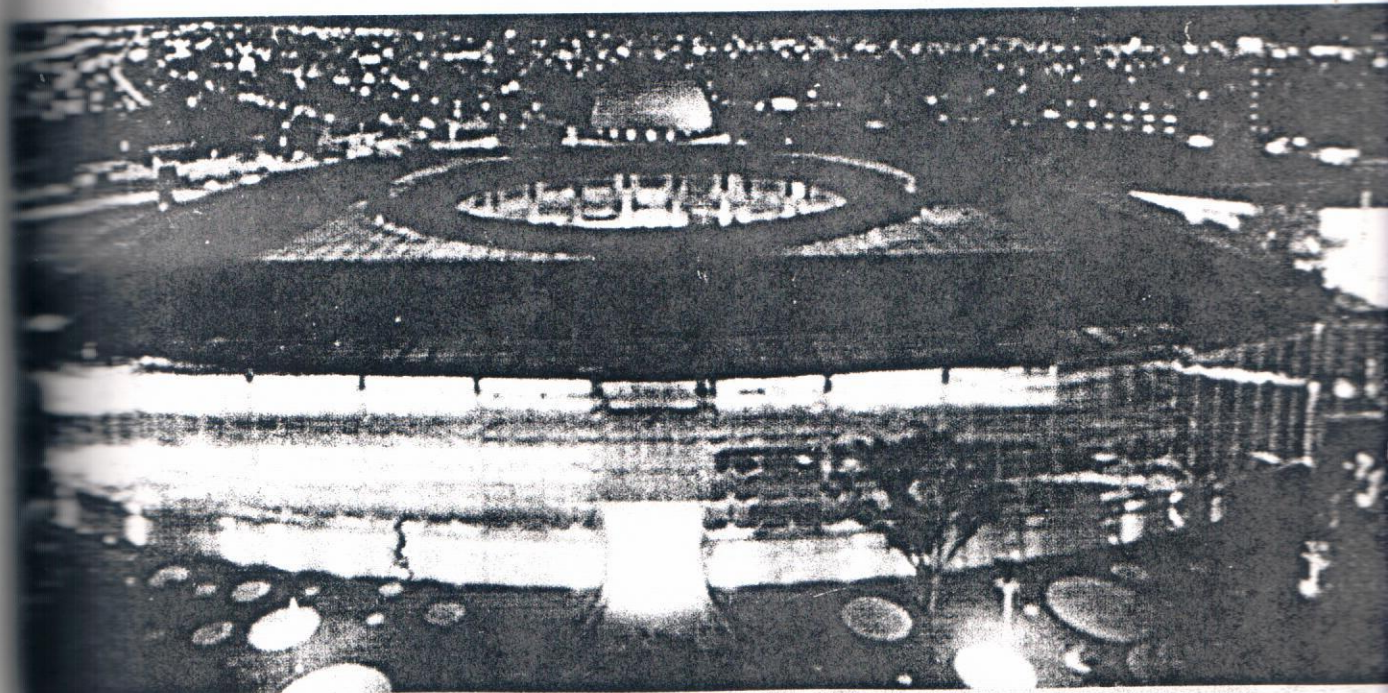


Septiembre 4 al 8 2006

QUERÉTARO

Congreso Nacional

Ciencias Fisiológicas



La eyaculación de la rata consiste en la expulsión de semen y la formación de un tapón seminal. El eyaculado se compone de espermatozoides y secreciones de las glándulas sexuales accesorias cuya importancia sobre el eyaculado, ha sido poco estudiada. Así, el objetivo del trabajo fue determinar la participación de algunas glándulas sexuales accesorias en las características macro- y microscópicas del semen y del tapón seminal. Se utilizaron ratas *Mistar* sexualmente expertas (4 meses de edad) mantenidas en condiciones estándar de bioterio. Los machos realizaron seis pruebas copulatorias de una serie eyaculatoria, (tres pre- y tres postquirúrgicas), con 15 días de intervalo entre ellas. Inmediatamente después de cada eyaculación, las hembras eran anestesiadas (pentobarbital sódico 26 mg/kg peso; ip) para obtener el semen de los cuernos uterinos y el tapón seminal de la vagina. A los machos les fueron extirpadas las bulbouretrales (Bux; n=6), coagulantes (Cox; n=6) o bulbouretrales y coagulantes (Bux-Cox; n=6). A los machos control se les realizó una cirugía sin extirpación de glándulas (Ctl; n=6). Se analizaron parámetros macro- y microscópicos en el semen: volumen, viscosidad, pH, índice de movilidad, concentración espermática, viabilidad y normalidad; en el tapón seminal: consistencia, volumen, peso, tamaño, espermatozoides móviles o inmóviles. En el semen no hubo diferencias entre grupos respecto al volumen, 0.4 ± 0.02 ml; pH, 8.2 ± 0.1 ; índice de movilidad, 0.7 ± 0.02 y normalidad, 98 ± 0.8 %. Sin embargo, la viscosidad fue 1.5 ± 0.2 mm en Bux-Cox vs 2.4 ± 0.2 mm en Ctl. La concentración espermática fue $12.7 \pm 2.9 \times 10^6$ /ml en Cox y Bux-Cox vs $16.2 \pm 1.9 \times 10^6$ /ml en Ctl. La viabilidad fue 59.5 ± 4.8 % en Bux vs 66.5 ± 1.1 % en Ctl. En el tapón seminal no hubo diferencias en volumen 0.1 ± 0.007 mm³; ni tamaño $12.2 \pm 0.2 \times 5 \pm 0.07$ mm (largo x ancho). El tapón fue semicoagulado con espermatozoides móviles en Bux-Cox vs coagulado con espermatozoides inmóviles en Ctl. Por lo tanto, las secreciones de las bulbouretrales y coagulantes contribuyen con la viscosidad y viabilidad de los espermatozoides del semen, así como con la coagulación del tapón seminal, características requeridas para la fertilidad de la rata macho.

Beca CONACYT 188574 (TLJL), 198782 (LAA); PROMEP 10.3/04/2849-UA TLAX-CA26.

Durante la conducta copulatoria, la rata macho realiza varias montas e intromisiones antes de expeler el semen que deposita en la vagina. Una fracción del semen forma un tapón que favorece la llegada de los espermatozoides a los cuernos uterinos. En otras especies, particularmente las de importancia económica, además de la cópula se han evaluado las características del eyaculado, constituido por espermatozoides y secreciones de las glándulas accesorias del sistema reproductor. Para la rata, uno de los modelos más utilizados en la fisiología reproductiva no se ha desarrollado la técnica para analizar el semen, menos aún, se han establecido los valores de los parámetros del eyaculado. Se desconoce incluso, la contribución de las glándulas accesorias coagulante y bulbouretral, sobre las características del semen y tapón seminal. Por ello, se consideró: 1) Establecer la técnica para el análisis del semen y tapón seminal y los parámetros macro- y microscópicos. 2) Determinar dependiendo de la frecuencia eyaculatoria, los valores de tales parámetros. 3) Analizar en el eyaculado, los efectos de la extirpación de la frecuencia eyaculatoria, los valores de los cuernos uterinos y el tapón fue removido de la vagina una vez que el macho había eyaculado en una serie eyaculatoria. Los parámetros determinados para evaluar el semen fueron: color, volumen, viscosidad, pH, índice de movilidad, concentración espermática, viabilidad y normalidad; para el tapón seminal: consistencia, volumen, peso, tamaño, número de cabezas o flagelos y número de espermatozoides móviles e inmóviles. En general, los valores más altos de los parámetros de semen y tapón seminal correspondieron a los machos que eyacularon cada 15 días versus los machos que lo hicieron cada 2 ó 10 días. La extirpación de las coagulantes, bulbouretrales o ambas disminuyó la viscosidad, concentración espermática, viabilidad y en el semen y la consistencia en el tapón, de modo que no hubo cabezas ni flagelos separados, sino espermatozoides móviles. Así, el eyaculado de rata puede analizarse indirectamente al obtenerlo de los conductos femeninos. Los resultados nos muestran que a menor frecuencia eyaculatoria se incrementan los parámetros del semen y que la remoción de las glándulas coagulantes, bulbouretrales o ambas modifica algunos de los parámetros espermáticos y del tapón seminal, todos ellos relacionados con la fertilidad por lo que sugerimos que las glándulas antes mencionadas participan en la fertilidad del macho.

PROMEP 10.3/04/2849-UATLAX-CA26

CARTEL 18. PARTICIPACIÓN DE LA PRÓSTATA VENTRAL EN LA CALIDAD DEL SEMEN Y LA FERTILIDAD EN LA RATA MACHO

Aurora A. López González¹, José Luis Tlachi López¹, René Zempoalteca² y Rosa Angélica Lucio²

¹Maestría en Ciencias Biológicas y ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala-UNAM

La próstata es una glándula sexual accesoria que presentan todos los mamíferos. La secreción prostática más las secreciones de las otras glándulas (ámpulas, coagulantes, vesículas seminales y bulbouretrales) proporcionan el medio adecuado para la sobrevivencia de los espermatozoides una vez eyaculados en los conductos reproductivos femeninos. Se ha descrito que las secreciones prostáticas contienen zinc, importante para la movilidad espermática. En individuos astenozoospermicos, es decir, que sus espermatozoides presentan bajo índice de movilidad, la concentración de zinc del plasma seminal es considerablemente menor que en aquellos normales. En la rata, la próstata es un complejo de lóbulos que se identifican como ventrales y dorsolaterales (Fig. 1). Dado que en estudios previos de laboratorio determinamos los valores de referencia de los parámetros de semen y tapón seminal, nuestro objetivo es determinar si los valores de los parámetros se modifican por efecto de la ablación de los lóbulos ventrales prostáticos. No se ha considerado la extirpación de los lóbulos dorsolaterales porque es difícil distinguir su delimitación anatómica; además, adosado a éstos se localiza el ganglio pélvico mayor, de donde se origina la inervación a las estructuras reproductivas.

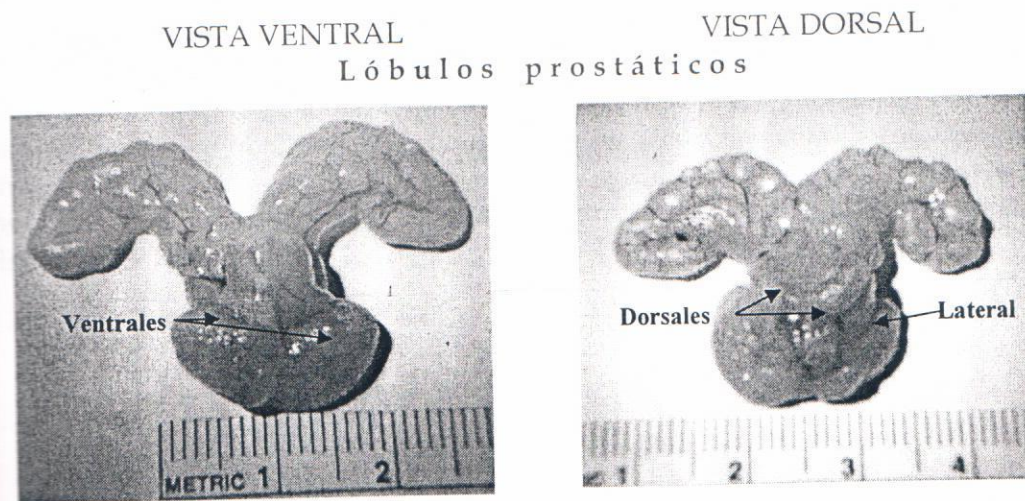


Fig 1. Próstata de la rata.

Se utilizaron machos sexualmente expertos sometidos a una prueba copulatoria antes de la cirugía y tres después de la misma, con 15 días de intervalo entre ellas. Se evaluaron los parámetros: número de montas y de intromisiones, latencia de monta, de intromisión y de eyaculación, de una serie eyaculatoria. Mediante espermotobioscopia indirecta se evaluaron en el semen: color, volumen, viscosidad, pH, índice de movilidad, concentración, viabilidad y morfología; y en el tapón seminal: color, consistencia, peso, volumen, tamaño, número de cabezas, de flagelos y de espermatozoides inmóviles. Además, se obtuvo el porcentaje de hembras preñadas antes y después de la cirugía (simulada, n=4; extirpación bilateral de los lóbulos ventrales prostáticos, n=9).

Resultados preliminares. Por el momento sólo se tienen los datos de 2 machos con cirugía simulada y 5 con ablación bilateral de los lóbulos ventrales prostáticos. La mayoría de los parámetros macro y microscópicos del semen fueron similares antes *versus* después de cirugía, sin embargo la viscosidad, viabilidad del semen, así como el volumen del tapón seminal mostraron una tendencia a disminuir en los machos con ablación de los lóbulos ventrales prostáticos. El porcentaje de hembras preñadas por machos con cirugía simulada y con extirpación de los lóbulos ventrales prostáticos fue similar.

Conclusión preliminar. Se ha descrito que el contenido bioquímico de los lóbulos prostáticos es distinto, así como su participación en la composición del eyaculado. Es por ello que, nuestro primer acercamiento fue determinar el efecto de la remoción de los lóbulos ventrales de la próstata encontrando que no influyen de manera determinante sobre la calidad del semen, específicamente en la movilidad espermática; tampoco en la fertilidad. En estudios realizados en nuestro laboratorio se obtuvieron los valores de referencia de los parámetros espermáticos en pruebas realizadas con intervalos de 15 días, por lo que se utilizó el mismo intervalo en este trabajo ya que se pretende determinar el efecto, a largo plazo, de la extirpación de los lóbulos ventrales prostáticos, puesto que se ha observado que en la remoción de glándulas bulbouretrales, coagulantes y del complejo bulbouretrales-coagulantes el efecto continúa aún después de 45 días de la cirugía. El número de animales deberá completarse para constatar los resultados.

No obstante, falta determinar el efecto de los lóbulos dorsolaterales, pero debido a la dificultad para extirparlos y el daño que causaría a los tejidos adyacentes, se ha considerado utilizar una sustancia quelante para dañar la mayor superficie prostática posible, evadiendo al ganglio pélvico mayor. Con esto se podrían obtener resultados sobre el efecto de la ausencia de la glándula prostática en la calidad espermática y la fertilidad de la rata macho.

Financiamiento: CONACYT 198752 AALG



**L CONGRESO NACIONAL
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS**
Puebla 2007

9 - 13 DE SEPTIEMBRE 2007



ANIVERSARIO



¹Maestría en Ciencias Biológicas y ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala. ³Departamento de Neurociencias, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Correo Electrónico: ushuaia2404@hotmail.com

La próstata es una glándula sexual accesoria presente en todos los mamíferos. Sus secreciones constituyen el 15% del fluido seminal. En la rata, la próstata es una estructura compuesta por lóbulos ventrales, laterales y dorsales, todos ellos difieren en su composición bioquímica, su respuesta a los andrógenos y en su función secretora, aunque se desconoce su participación sobre el eyaculado. En el presente trabajo se estudió la participación de los lóbulos ventrales (por ser los más prominentes) en las características del eyaculado. El semen de ratas macho sexualmente expertas se obtuvo de los cuernos uterinos, de hembras que recibieron una eyaculación, para analizar los parámetros macro (color, viscosidad, pH) y microscópicos (concentración, movilidad, viabilidad y morfología de los espermatozoides). También se evaluaron parámetros macro (consistencia, peso, volumen y tamaño) y microscópicos (porcentaje de cabezas, flagelos y espermatozoides) del tapón seminal. Posteriormente, los machos (n=7) fueron intervenidos quirúrgicamente para extirparles ambos lóbulos ventrales prostáticos, a otros (n=3) se les realizó la cirugía simulada. A los 15, 30 y 45 días después de la cirugía, se les realizaron pruebas copulatorias y sólo en la primera y última se analizaron los parámetros de semen y tapón seminal. Con estos mismos machos también se formaron unidades reproductivas (un macho y tres hembras adultas intactas cohabitando en una jaula durante 15 días) antes y después de la cirugía. Se determinó el día de preñez, el número de crías al nacimiento y el potencial fértil. En el análisis del eyaculado, los parámetros macro y microscópicos del semen y del tapón seminal antes y después de la cirugía no mostraron diferencias significativas (Friedman $p < 0.05$). Las pruebas de fertilidad tampoco mostraron cambios significativos. Por lo anterior, sugerimos que la próstata ventral no contribuye de manera importante ni en las características del eyaculado, ni sobre la fertilidad del macho. En estudios posteriores se analizará la participación de los lóbulos laterales y dorsales ya que así como difieren en su anatomía y función secretora, es plausible que también difieran en su importancia sobre los parámetros del semen, tapón seminal y fertilidad.

Agradecimientos: CONACYT Beca 198782 (AALG) y 188574 (JLTL) y Proyecto 52744 (RAL).

L Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas; Puebla, Pue.
Septiembre 9-13, 2007



Dé ci MO

curso

Bases Biológicas de la Conducta

9 al 12 de junio Tlaxcala, Tlax. México.

Maestría en Ciencias Biológicas
División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y
Tecnología

D doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Instituto de Ecología
Coordinación de la Investigación Científica



INSTITUTO DE
ECOLOGÍA AC

DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS MACROSCÓPICOS Y MICROSCÓPICOS DEL SEMEN Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL TAPÓN SEMINAL DE RATA

José Luis Tlachi-López¹, René Zempoalteca² y Rosa Angélica Lucio²

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

En la eyaculación se expelen el semen constituido por espermatozoides y secreciones diversas de las glándulas sexuales accesorias. Tales secreciones proporcionan condiciones favorables a los espermatozoides durante su recorrido, por el tracto femenino, hasta el sitio de fertilización y participan en la coagulación del semen para formar el tapón seminal. A pesar de que la rata ha sido uno de los modelos de laboratorio más utilizados en la fisiología reproductiva, no están descritos sus parámetros espermáticos. Así mismo, se desconoce cómo los parámetros, macro- y microscópicos, dependen de la contribución de cada una de las secreciones de las glándulas accesorias. Es posible que esa falta de información se deba a la dificultad de inducir la eyaculación y obtener el semen fuera del tracto femenino. Dado lo anterior, se pretende como primera aproximación, analizar macroscópicamente y microscópicamente el semen de rata mediante espermatobioscopia indirecta.

Inicialmente se determinó el intervalo de tiempo para tener al menos tres muestras de semen de una primera serie eyaculatoria obtenidas en diferentes días. Se encontró que el período óptimo para analizar el semen es de 10-15 días entre pruebas copulatorias.

Utilizamos ratas Wistar (3-4 meses de edad) mantenidas en condiciones estándar de bioterio. Se hicieron tres pruebas de conducta copulatoria con intervalo de 15 días entre ellas. A seis machos sexualmente expertos se les permitió realizar una serie eyaculatoria con hembras a las que se les indujo el estro con estradiol y progesterona. Inmediatamente después de la eyaculación se obtuvo el semen depositado en ambos cuernos uterinos para determinar los parámetros macroscópicos (volumen, color, viscosidad, pH) y microscópicos (índice de movilidad, concentración espermática, viabilidad y normalidad). Además se obtuvo el tapón seminal para evaluar sus características (consistencia, peso, volumen, tamaño). Se siguió la técnica empleada para analizar el semen humano con las modificaciones convenientes para semen de rata.

Se determinó que los parámetros espermáticos de rata intacta son: parámetros macroscópicos: volumen, 2-3 ml; color, blanco-amarillento; viscosidad, 2-4 mm; pH, 8.4 y los parámetros microscópicos: índice de movilidad, 0.6-0.7; concentración espermática $18-26 \times 10^6$ /ml; normalidad, 99-100%; viabilidad, 61-76% espermatozoides vivos. Las características del tapón seminal fueron: coagulado, 0.110-0.120 mg, 0.1-0.3 ml, 15x7 mm. Consideramos que estos resultados podrán utilizarse como referencia para evaluar el semen de rata intacta o con alguna manipulación. Incluso para determinar la importancia de las glándulas sexuales accesorias en la constitución del semen.

CONACYT 188574 (TLJL), PROMEP 10.3/04/2849-UATLAX-CA26

B. Congresos internacionales

SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION

40th Annual Meeting

July 21 – July 25, 2007

Marriott Rivercenter • San Antonio, Texas

University of Texas at San Antonio

University of Texas Health Science Center at San Antonio

increased the incidence of germ cell apoptosis and caused a decrease in spermatogenesis. Spermatogonia, arising from stem cell apoptosis and were unable to re-populate the testis germ cells or that damage occurs to Sertoli cells to create a supportive microenvironment to support the differentiation of the various germ cell subtypes. Here we show a significant decrease of mRNA expression of the Sertoli cell lines TM4 or ASC-17D to the transporter ATP7B within 6 hours of treatment. However, mRNA expression of influx transporter Ctr1 were not affected by treatment. By ELISA, no changes in inhibin B or testosterone levels were measured in media of TM4 or ASC-17D mice. After long-term exposure of 2.5 mg/kg cisplatin treatment. After long-term exposure of 2.5 mg/kg cisplatin treatment, Ctr1+/- mice showed a significant decrease of testis/body weight ratio compared with non-treated mice, whereas C57/BV6J wild-type mice showed a significant decrease of testis/body weight ratio after cisplatin treatment (reduced testis/body weight ratio after cisplatin showed no significant difference, Ctr1+/- mice treated with cisplatin showed no significant difference). TUNEL-positive germ cell numbers, indicating that cisplatin uptake correlated with the sensitivity of testis injury. These observations demonstrate the copper transporter's important roles in cisplatin-stimulated testicular injury and recovery.

EFFECTS OF NUTRIENT RESTRICTION DURING PREGNANCY ON POSTNATAL GROWTH, CARCASS AND COMPOSITION OF BEEF STEERS. Nathan Long, Monica Prado-Lorenzo, Gabriel, Robert Wettemann. Oklahoma State University.

Heifers were used to evaluate the effect of prenatal nutrition on postnatal growth and development. Fifteen heifers were inseminated with semen from an Angus bull. At insemination, pregnancy was verified and heifers were allotted to low (L, 1/3 of NRC 1996 requirements) or moderate nutrition (M, 2/3 of NRC 1996 requirements). After 83 d of treatment (115 d of pregnancy) heifers were comingled and received a common diet in excess of requirements. Male calves were castrated at birth and weaned at 20 d of age. Calves were maintained as a group after weaning. At 200 d of age, L (n=5) and M (n=5) steers were fed a high plane of nutrition to gain 2.3 kg/d to a body weight of 550 kg. Steers were then slaughtered and weights of the empty body, heart, lungs and trachea, liver, pancreas, and the gastrointestinal tract were recorded. The heart and muscle (Complexus) were stored at -20°C. Muscle tissue was quantified using Hoechst H33258 dye. All data were analyzed with the GLM procedure of SAS and amount of muscle was analyzed with the PROC MIXED procedure of SAS. BCS were similar for L and M heifers at treatment (L: 7 kg; 5.0 ± 0.1 BCS). At the end of treatment, L heifers (7 kg; 5.5 ± 0.1 BCS) and had less BCS (4.3 ± 0.01) compared with M heifers (7 kg; 5.5 ± 0.1 BCS). Length of gestation was 274 ± 2 d for L and 278 ± 2 d (P = 0.05) for M heifers. Treatment did not affect weight or growth of steer calves until harvest. Lungs and heart were exposed to L prenatal nutrition weighed less (P = 0.05, 0.01) compared with M steers (6.35 ± 0.78 kg); weights of other organs were not influenced by treatment. Weight of carcass and amount of subcutaneous fat were not influenced by treatment. Muscle from L steers (P = 0.04) DNA per gram of tissue than M steers (0.58 mg/g, respectively). DNA concentrations and content were not influenced by treatment. Nutritional restriction during early gestation did not alter postnatal growth rate: DNA concentrations of DNA in muscle tissue at maturity were greater in L animals.

EFFECTS OF EJACULATORY FREQUENCY AND REMOVAL OF THE BULBOURETHRAL AND COAGULATING GLANDS ON THE CHARACTERISTICS OF SEMEN IN THE RAT. Jose Tlachi-Lopez, Rene Zempoalteca, Javier Velazquez, Rosa Angelica Lucio. Universidad Autonoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico; Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico DF, Mexico

Semen is composed of spermatozoa whose survival and transport depend on the secretions of the accessory sexual glands. The characteristics of these secretions have been evaluated in different species. In rats, the number of spermatozoa has been determined in semen after the removal of the seminal vesicles. In vitro studies suggest a role of the bulbourethral and coagulating glands on the formation of the seminal plug. In this study we established the values of semen parameters (pH, motility, number of spermatozoa, viability and volume) and seminal plug parameters (consistency, weight, volume, number of heads, flagella and spermatozoa). In addition, we

determined the effect of the coagulating and bulbourethral ablation on those parameters. Adult sexually experienced Wistar rats in vivarium standard conditions were used. They were allowed to display one ejaculation three times, each one every 2, 10 or 15 days; for each frequency 10 males were used. In addition, bulbourethral, coagulating, and both glands were bilaterally removed, also a sham group was considered. For each condition, 10 males were used. The semen and seminal plug evaluation was performed every 15 days, one before and three times after surgery by indirect spermatobioscopy. Concerning the effects of ejaculatory frequency, there were not significant differences in any of the macroscopic and microscopic parameters (Kruskal-Wallis, seminal plug among the ejaculatory frequencies (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$) neither within the individuals in each frequency group (Friedman, $p > 0.05$). Regarding the microscopic characteristics of the seminal plug showed a large amount of spermatozoa heads, a little bit less of flagella and scanty immotile spermatozoa. The removal of the bulbourethral gland caused statistically significant differences in the viscosity (Chi-square, $p < 0.05$); and the removal of the coagulating gland caused significant differences in the viscosity, motility and in the number of spermatozoa (Chi-square, $p < 0.05$). No semen changes were detected after removal of both glands; nevertheless 70% of seminal plugs were semicoagulated and contained a noteworthy amount of motile spermatozoa. The sexual intercourses every 2, 10 or 15 days did not affect semen quality. In conclusion, ejaculatory frequencies has no effect on spermatic characteristics, bulbourethral glands seems to influence the viscosity and the secretions of the coagulating glands contribute not only to the formation of the seminal plug, as traditionally was mentioned, but also participate in the optimal semen composition that enhance fertilization. Partially supported by PROMEP 10.3/04/2849-AUTLAX-CA26 and CONACyT 52744-Q (RAL) grants; and fellowships by CONACyT to 198782 (AALG) and 188574 (JLTL).

341. EXAMINATION OF METABOLIC HORMONES AND BLOOD GLUCOSE CONCENTRATIONS IN FEMALE MICE ON DIETS THAT FAVOR PRONOUNCED CHANGES IN SEX RATIOS OF PUPS BORN. Jiude Mao, Andrei Alexenko, Emily Fountain, Jeffrey Whyte, Kristie Grimm, R. Michael Roberts, Cheryl Rosenfeld. University of Missouri-Columbia, Columbia, MO

Changing environmental conditions govern adaptive skewing of offspring sex ratio in birds, insects, and in some mammalian species. However, the causes of sex ratio skewing and significance are not well understood. Female mice fed a very high fat (VHF) diet, for example, produce litters that are skewed towards males, while restricting access to this diet to 7 h/day (VHF-R) reduces the fraction of males. Conversely, mice fed a nutritionally balanced but low fat/high carbohydrate (LF) diet produce more daughters than sons. Sex ratio deviation from the expected 0.5 value was not related to the dam weight and no difference in litter size was observed among the dietary groups. Here, we tested whether these diets influence certain metabolic hormones (IGF1, corticosterone, and leptin), and glucose concentrations, thereby possibly altering conditions that might favor either the conception or development of one sex over the other. Experiment 1 used 5-week old mice that were placed permanently on one of three diets: VHF diet (caloric density 5.2 kcal/g; 54% from lard ad libitum (VHF, n=11); a restricted VHF diet (VHF-R, n=9) in which the mice had only 7 h access to food during their night; and Purina 5015 (caloric density 4.4 kcal/g; 26% from fat) ad libitum (5015 Control, n=12), which produces approximately 0.5 offspring sex ratio. After three pregnancies (at 45-48 weeks of age), the mice were sacrificed and serum collected. Experiment 2 consisted of two groups of mice fed continuously from 5 to 17 weeks of age on either the VHF (n=13) or LF (caloric density 3.9 kcal/g; 10% from fat) (n=11) diets. These mice were then sacrificed and serum collected. In the third experiment, mice were fed ad libitum on the VHF (n=6), LF (n=6), or Control (n=4) diets for fifteen weeks beginning at 5 weeks of age. After 5 weeks on the experimental diets, blood glucose concentrations were determined at biweekly intervals over a period of 10 weeks. No differences were detected in serum IGF1 concentrations among the dietary groups in Experiment 1 (636.4 ± 44.3, 642.6 ± 49.0, and 615.6 ± 42.5 ng/ml for VHF, VHF-R, and 5015, respectively) and Experiment 2 (706.2 ± 25.6 and 659.8 ± 27.8 ng/ml for VHF and LF, respectively). Serum corticosterone concentrations were not different between the VHF and VHF-R groups (43.6 ± 6.6 vs 29.8 ± 7.7 ng/ml), but were higher than the controls (9.1 ± 7.7 ng/ml) in Experiment 1. No difference existed between the VHF and LF groups (36.3 ± 11.6 vs 61.6 ± 13.4 ng/ml) in Experiment 2. Leptin concentrations did not differ between the VHF and VHF-R groups (20.7 ± 3.8 vs 24.6 ± 4.9 ng/ml), but were higher than the 5015 and LF groups (9.8 ± 3.5 and 3.2 ± 3.2 ng/ml, respectively). VHF mothers show sex ratio skewing towards males. In contrast, the VHF-R females produce more daughters than sons. Thus, leptin seems unlikely to play a role in offspring sex selection. A significant interaction existed between time and diet (P < 0.05) for both blood glucose concentrations and body weight. The overall glucose concentrations, however, did not differ among the three groups suggesting that maternal blood glucose does not

C. Artículo de divulgación

El espermatozoide: un súper héroe enmascarado

Seguramente has oído sobre los súper héroes que poseen habilidades extraordinarias, como aquéllos que pueden trepar grandes edificios con ayuda de telarañas o aquél que puede alcanzar velocidades superiores a la de la luz consiguiendo así darle varias vueltas al planeta tierra en apenas unos segundos. También nos cuentan sobre los que pueden salvar al mundo de grandes mentes malignas como el despiadado "Magneto". Pero ¿sabías que también existe un súper héroe de escasas micras de tamaño?. Su única arma es un pequeño capuchón que cubre aproximadamente dos tercios de su cabeza y un flagelo o cola que le sirve para poder desplazarse a través de una intrincada red de tubos. Para complicar la aventura, el pequeño héroe cuenta con reservas energéticas que pueden acabarse en cuestión de segundos. Se trata del espermatozoide, un súper héroe enmascarado.

-- Insertar figura --

El espermatozoide tiene una forma característica de acuerdo con la especie a la que pertenezca: por ejemplo, un espermatozoide humano tiene la cabeza en forma de espátula, mientras que el de una rata tendrá cabeza en forma de gancho, un sapo tendrá espermatozoides con cabezas en forma de lanza y los de la langosta parecen pequeñas arañas. Sin embargo, independientemente de la especie que se trate, se distinguen tres partes morfológicas para todos los espermatozoides:

1) Una cabeza, en la cual se encuentra un núcleo que contiene la información genética proveniente del padre (ácido desoxirribonucleico o ADN). Rodeando y cubriendo al núcleo en sus dos tercios anteriores, se encuentra una vesícula llamada acrosoma. El acrosoma es una capa de forma cónica o capuchón que guarda sustancias denominadas enzimas y son liberadas durante el proceso de fertilización para provocar o acelerar reacciones bioquímicas; además, para brindarle protección, el acrosoma cubre la cabeza del espermatozoide como si fuera un casco de bombero.

2) Un cuello, que se define como un segmento muy corto que sirve de unión entre la cabeza y el resto del cuerpo.

3) Un flagelo o cola que se divide en tres partes: en la primera parte o pieza principal, el flagelo contiene un gran número de mitocondrias, que son unas pequeñas estructuras celulares encargadas de proporcionar la energía que el espermatozoide necesita para moverse; el resto del flagelo se divide en la parte media y la parte final, cuyo objetivo es dar velocidad y dirección al movimiento del espermatozoide. El tamaño del flagelo varía considerablemente de acuerdo con la especie (190 μm de largo en el ratón y solo 40 μm de largo en el hombre).

-- Insertar fotos --

Un viaje heroico para llegar al óvulo

Nuestro pequeño héroe, el espermatozoide, nace en las llamadas células de Leydig localizadas en los testículos; después de su nacimiento viaja por un sistema de tubos llamados túbulos seminíferos. Todos estos túbulos se unen y forman un solo conducto, que recibe el nombre de la rete testis. Después de pasar por la rete testis el espermatozoide llega al epidídimo, lugar donde el pequeño héroe termina su maduración y adquiere capacidad fértil; en otras palabras, un espermatozoide inmaduro (que no es capaz de fertilizar) se convierte en un espermatozoide maduro que adquiere la capacidad de fertilizar al óvulo. El epidídimo es un órgano sexual que se localiza en la pared testicular y se divide en tres partes: cabeza, cuerpo y cauda o cola.

El espermatozoide entra a la cabeza del epidídimo. Después, se estaciona en el cuerpo del mismo y aquí termina su maduración. Un espermatozoide maduro es aquel que tiene la capacidad de fertilizar. Por último, nuestro pequeño héroe llega a la cauda o cola del epidídimo y se almacena junto con millones como él, esperando el momento de la eyaculación para ser expulsados. Las cantidades de espermatozoides que salen en cada eyaculación es impresionante. En un hombre saludable, la cantidad varía entre 20 y 250 millones de espermatozoides en cada eyaculación. Animales pequeños, como la rata macho, también liberan muchos (entre 13 y 20 millones de espermatozoides). Imaginemos entonces la terrible competencia que se establece entre los espermatozoides, ya que todos compiten por el mismo premio: fecundar al óvulo.

Y comienza la carrera...

De la cauda o cola del epidídimo sale nuestro súper héroe a gran velocidad (5-25 *micrómetros / segundo*) pasando por el conducto deferente para llegar a un nuevo conducto llamado uretra prostática. Durante este trayecto, él y los demás espermatozoides son bañados con secreciones provenientes de las glándulas sexuales accesorias (ámpulas, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales, glándulas coagulantes y próstata) presentes y específicas para cada especie. El objetivo de este “baño” es proveer las condiciones y medios favorables que el espermatozoide necesitará para sobrevivir durante el desplazamiento en ambientes que le puedan ser hostiles, como: los cambios de pH, la presencia de cuerpos extraños (anticuerpos, virus o bacterias) o la competencia con individuos semejantes a él (espermatozoides kamikase) que le van a impedir el paso en busca del óvulo para fertilizarlo, pero nuestro súper héroe lucha en contra de todo. Los espermatozoides kamikase son espermatozoides que pueden ser anormales o inmaduros. También son expulsados durante la eyaculación y su función pareciera ser el obstaculizar el paso a aquellos espermatozoides que sí son capaces de fertilizar.

-- insertar fotos --

Cuando nuestro súper héroe llega a la vagina, que es un nuevo territorio, sufre nuevos cambios bioquímicos y fisiológicos. Por ejemplo, la entrada masiva del ión calcio en su cabeza le provoca “hinchamiento” de la región acrosomal. Estos aparentes ataques iónicos hacia nuestro héroe tienen en realidad un sentido necesario, pues el hinchamiento funciona para que las enzimas encapsuladas en el acrosoma sean liberadas y se dirijan hacia al óvulo.

Después del hinchamiento que sufre su acrosoma, el espermatozoide recibe señales químicas que le indican el camino a seguir para llegar a la meta, que es el útero donde se localiza el óvulo. Para llegar al útero nuestro súper héroe avanza por un conducto que varía en su longitud dependiendo de la especie. En este punto, sólo el 60% de los espermatozoides que fueron liberados durante la eyaculación sobreviven.

Ahora tienen que avanzar por el cervix, que es un conducto más estrecho que representa más obstáculos y peligros que nuestro héroe debe librar. Ahí, algunas sustancias

y moléculas, como los anticuerpos, los reciben provocando la muerte de varios espermatozoides que acompañaban a nuestro súper héroe al intentar pasar. El cervix o también llamado cuello uterino es una porción fibromuscular localizada en parte inferior del útero y su función es impedir la entrada de cualquier cuerpo extraño. Los anticuerpos son pequeñas moléculas, cuya función es identificar a las sustancias extrañas o microorganismos que invaden nuestro cuerpo para eliminarlas.

Se establece así una batalla entre anticuerpos y espermatozoides, de donde no todos saldrán bien librados. Aproximadamente la mitad de los sobrevivientes llegará al conducto final llamado útero donde se aloja el óvulo y sólo uno de los millones de espermatozoides que viajan por los "conductos femeninos" se unirá con él y lo fertilizará.

Después de la gran carrera nuestro súper héroe enmascarado, el espermatozoide, se encuentra con el óvulo, su gran premio. Ambas células germinales (el espermatozoide y el óvulo) se reconocen mutuamente mediante señales químicas. El espermatozoide comienza a rodear al óvulo, lo toca con su cabeza como si buscara una entrada, como si en medio de la oscuridad tratáramos de abrir una puerta y comenzamos a tocar para reconocer la chapa hasta que encontramos la cerradura e introducimos la llave para abrir.

Finalmente, cuando el espermatozoide encuentra el lugar idóneo en el óvulo ambos se unen. Poco a poco el espermatozoide va perdiendo su cuello y flagelo, pues ambas estructuras han cumplido con su propósito, el desplazamiento del pequeño héroe. Así, sólo la cabeza (que es donde viaja la información genética del padre) queda unida al óvulo. Ambas células germinales mezclan su contenido genético y se forma una sola célula que después de varios procesos fisiológicos dará origen a un nuevo organismo que nacerá, crecerá y si es niño será capaz en un futuro de producir nuevos millones de súper héroes, pero "esa es otra historia".

¡Increíble! ¿no?

D. Capítulo de libro

**Erección y eyaculación:
participación de los músculos
perineales estriados y
glándulas sexuales accesorias**

Rosa Angélica Lucio
José Luis Tlachi
René Zempoalteca
Javier Velázquez Moctezuma

La erección peneana y la eyaculación seminal son funciones sexuales masculinas que implican la participación coordinada de la musculatura lisa del tejido eréctil, de los vasos sanguíneos, y de la musculatura estriada del periné. Para estudiar estas funciones sexuales se han utilizado enfoques multidisciplinarios y técnicas diversas en distintos machos de mamíferos, entre ellos, el hombre. En este capítulo se mencionarán brevemente algunos de nuestros hallazgos anatómicos, histológicos, electrofisiológicos y conductuales, así como de análisis seminal en los dos modelos animales que utilizamos, la rata (*Rattus norvegicus*) y el conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*).

Antes de hablar de erección conviene mencionar que la condición normal del pene es la flacidez, mantenida por la contracción tónica de la musculatura lisa de los cuerpos eréctiles y sus arterias del pene. Los estímulos psicogénicos o táctiles pueden producir su erección. Estos últimos activan a los mecanorreceptores que se encuentran en el pene y el escroto, transformándose en actividad eléctrica que se propaga por las fibras sensoriales hacia la médula espinal lumbosacra, y mediante sinapsis inhiben a unos músculos y excitan a otros. En un ambiente hormonal normal y en ausencia de enfermedades nerviosas, vasculares, congénitas o de anomalías estructurales, el proceso hemodinámico de la erección peneana es muy similar al observado en cualquier otro tejido vascular; es decir, la relajación de la musculatura lisa incrementa el flujo sanguíneo y la presión intracavernosa, permitiendo la compresión de las venas y la oclusión del flujo sanguíneo. El funcionamiento de este mecanismo de oclusión venoso es un prerequisite para presentar la respuesta eréctil normal.

como vascular tiene dos porciones: la raíz, que fusiona con la región urogenital; y el cuerpo, que cuelga libremente. La raíz tiene tres cilindros de tejido eréctil; dos que en conjunto se denominan crura (crus en singular) y uno llamado bulbo. El tejido eréctil de la raíz se continúa por el cuerpo del pene, cada crus constituye un cuerpo cavernoso; el bulbo continúa al cuerpo esponjoso. La crus derecha e izquierda se adosan al pubis, y el bulbo que se sitúa entre ellos contiene la porción proximal de la uretra. Cada crus se envuelve por el isquiocavernoso, que es un músculo estriado cuya contracción ayuda a mantener la erección, tal como se ha mostrado en diversas especies como la cabra (Beckett *et al.*, 1972), el caballo (Beckett *et al.*, 1973), la rata (Hart y Melesse de Hospital, 1983; Holmes *et al.*, 1991; Sachs, 1982) y el hombre (Gerstenberg *et al.*, 1990). El bulbo peneano está rodeado por otro par de músculos conocidos como bulboesponjosos, que además de ayudar a mantener la erección, favorecen la expulsión de semen por la uretra en el momento de la eyaculación. De este modo, la actividad contráctil de los músculos estriados que rodean a los reservorios vasculares (crura y bulbo del pene) incrementan la presión de sangre dentro de los cuerpos cavernosos aumentando así su rigidez. La erección se acompaña de pequeñas cantidades de secreción de las glándulas bulbouretrales que sirven para lubricar la uretra del macho, favoreciendo el transporte de los espermatozoides a lo largo de la uretra. Las estructuras que participan en la erección están bajo control tónico inhibitorio de estructuras supraespinales (núcleo paragigantocelularis de la médula oblonga) (Marson y McKenna, 1992).

En efecto, la lesión de la médula espinal en modelos animales o en el hombre, a causa de un accidente, produce priapismo, que es la erección constante. En pacientes parapléjicos se observa erección refleja si la lesión de la médula espinal es superior al segmento espinal torácico doce. En los pacientes que presentan erecciones psicógenicas, se observa incremento en la longitud y en el diámetro del pene, sin suficiente rigidez para permitir la intromisión vaginal.

La eyaculación comprende dos procesos; el primero es la emisión seminal, que es el transporte y reunión de los espermatozoides provenientes del epidídimo con las distintas secreciones de las ampullas del deferente, vesículas seminales y lobulillos prostáticos en la porción proximal de la uretra. El segundo es la expulsión, se refiere a la salida del líquido seminal hacia el exterior por el meato urinario y

la cara interna de la piel que constituye al escroto) y del cremaster (capa de músculo estriado). Al contraerse el dartos y el cremaster, los testículos se acercan al cuerpo y a la musculatura lisa que rodea al epidídimo y vaso deferente, impulsando a los espermatozoides hacia la uretra. Luego siguen las contracciones de la musculatura estriada, del isquiocavernoso y bulboesponjoso para contraer los divertículos uretrales. Estas contracciones expulsan a los espermatozoides y al fluido seminal por el meato urinario.

En algunas especies, los machos depositan el semen en la vagina, y otros en el útero. El semen de algunas especies contiene enzimas que lo coagulan en la entrada vaginal, de modo que se forma un tapón seminal que facilita el transporte espermático transcervical hacia el útero para llegar al sitio de fertilización al ejercer presión sobre el semen. El tapón también tiene la función de dificultar que otro macho copule con la hembra recién eyaculada; finalmente, se pierde a los pocos días de haberse formado. Los machos suelen retirar su propio tapón o el depositado por otro al realizar intromisiones posteriores. Así, el tapón seminal tiene un papel muy importante para inducir la preñez (Mathews y Adler, 1977; McClintock *et al.*, 1982).

En estudios de anatomía masculina se han utilizado técnicas quirúrgicas con estereomicroscopios para describir la forma, origen e inserción de los músculos del periné y los nervios que se insertan en ellos, determinando su origen en la médula espinal. Nos guiamos con las anatomías generales para rata (Hebel y Stromberg, 1985) y conejo (Barone *et al.*, 1973; Popesko *et al.*, 1992). En la rata se han descrito los nervios periféricos (pélvico, pudiendo, genitofemoral e hipogástrico) que se originan en la médula lumbosacra, y del conejo se ha hecho la descripción de los músculos isquiocavernoso y bulboesponjoso. Se mencionará sólo la descripción de los músculos de interés en este capítulo. En el conejo se identifica al isquiocavernoso como un músculo par (derecho e izquierdo), con forma de lámina triangular a cada lado de la porción proximal del pene. Sus fibras tienen origen carnoso en el borde caudal del arco isquiático y presentan aponeurosis. Las fibras se disponen lateromedialmente de manera oblicua y se insertan sin tendón sobre la crus derecha e izquierda del pene (Lucio *et al.*, en preparación) (Figura 1.1). El bulboesponjoso también es un músculo par (derecho e izquierdo) que tiene forma de huso situado sobre la línea media del dorso proximal del pene. Cada músculo tiene origen carnoso en el borde medial del arco isquiático y

al lado del tubo convergen y se insertan en un tendón común que se une al ligamento suspensorio del pene (Lucio *et al.*, en preparación) (Figura 11.1). En estudios preliminares, la estimulación eléctrica de estos músculos produce la compresión del tejido vascular del pene, lo que sugiere su participación durante la erección y eyaculación, que en el conejo es de escasos segundos.

Figura 11.1



Figura 11.1 Disposición anatómica de los músculos perineales estriados isquiocavernoso (IC) y bulboesponjoso (BC) sobre el dorso del pene del conejo adulto.

Debido a la complejidad de la trayectoria de las fibras nerviosas que controlan estos músculos, se han utilizado trazadores de transporte retrógrado, como la peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés: horseradish peroxidase) para determinar la localización específica de sus motoneuronas espinales. Las motoneuronas se localizan en el asta ventral derecha e izquierda de la sustancia gris de la médula espinal. Rexed, en 1952 (citado en López Antúñez, 1997) basándose en sus estudios citoarquitectónicos en la médula espinal de gato, propuso que la sustancia gris espinal está constituida por diez láminas celulares, orientadas en sentido dorsoventral. Las motoneuronas se encuentran en la lámina IX, cuyas agrupaciones forman núcleos motores (López Antúñez, 1997).

que participan en las funciones sexuales, marcando en sujetos vivos la mortem tinción de Nissl o violeta de cresilo, o en sujetos vivos HRP. Para el hombre, se ha descrito que las motoneuronas que inervan el músculo bulboesponjoso se encuentran en los segmentos sacro 1 y sacro 2 formando el núcleo de Onuf. En el conejo están en los segmentos lumbar 7 y sacro 1, formando un grupo de neuronas en posición dorsomedial, y en la rata macho los somas de las neuronas se encuentran en los segmentos lumbar 5 y lumbar 6 de la médula espinal, formando el núcleo del bulboesponjoso (Figura 11.2).

Figura 11.2

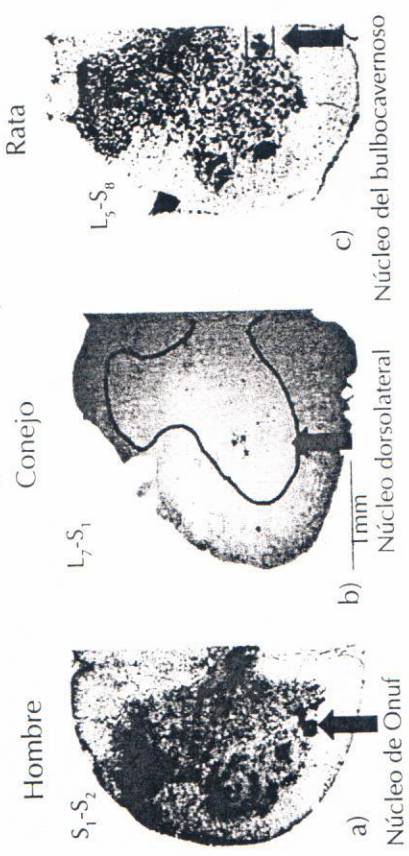


Figura 11.2 Segmentos transversales de médula espinal lumbar (L) y sacra (S) de distintas especies, que muestran las motoneuronas que inervan al bulboesponjoso. a) Teñidas con Nissl (Forger y Breedlove, 1986). b) Marcadas con HRP-WGA (Lucio y Xicohtencatl, 2004). c) Teñidas con Nissl (Breedlove y Arnold, 1980).

En el laboratorio se utilizó HRP sola, conjugada con lectinas como la aglutinina de germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés: wheat germ agglutinin) para determinar la conectividad nerviosa. Una vez inyectada en el músculo es endocitada por las terminales nerviosas y transportada a lo largo del axón hasta llegar al soma e incluso a las dendritas de las motoneuronas que inervan ese músculo. Después de ocurrido el transporte, aproximadamente en 48 horas, el animal es perfundido intracardialmente con paraformaldehído y glutaraldehído. La solución de perfusión coagula las proteínas y, de esta

somas neuronales que contienen HRP-WGA destacan de las otras neuronas por la coloración contenida en su interior. Los cortes son montados en portaobjetos gelatinizados, luego, deshidratados en etanol y aclarados en xilol (Mesulam, 1982); finalmente, se cubren con un medio de montaje y se dejan secar para ser observados con un microscopio de luz conectado a una cámara de video y al analizador de imágenes. Las imágenes de las motoneuronas se transfieren a una computadora para dibujar y analizar las marcadas con el trazador; se examinan aquellas cuyos somas y longitud de sus dendritas primarias se diferencian claramente de los somas y dendritas de las motoneuronas circundantes. El área del soma se mide dibujando una línea sobre el contorno del soma de la motoneurona marcada. La longitud de las dendritas primarias se mide trazando una línea a lo largo de cada una de ellas. Para medir el área del árbol dendrítico primario se traza una línea que una los extremos distales de las dendritas primarias marcadas y luego se calcula en la figura cerrada el área correspondiente (Lucio *et al.*, en preparación).

En el conejo, las motoneuronas que inervan al bulboespongioso se encontraron en la mitad caudal del segmento lumbar 7, y en el tercio rostral del segmento sacro 1, ipsilaterales al músculo inyectado; se localizaron formando una columna de aproximadamente 6.36 mm de longitud, con mayor número de somas marcados en el segmento lumbar 7. Las motoneuronas se encontraron en posición dorsomedial en sacro 1. En promedio se encontraron 35.5 ± 2.7 motoneuronas marcadas por animal y, aplicando un factor de corrección (Abercrombie, 1946), 29.65 ± 2.45 somas. A 118 neuronas se les midió área de soma, longitud de dendritas primarias y extensión del árbol dendrítico. Tales somas presentaron en promedio 1142.19 ± 185.2 micras² de área de soma; 51.4 ± 5.25 micras de longitud de sus dendritas primarias, y 8126.57 ± 289.6 micras² de extensión de sus árboles dendríticos (Lucio *et al.*, en preparación).

Mediante técnicas electrofisiológicas de registro y estimulación se ha descrito la actividad de algunos músculos y nervios relacionados con las funciones sexuales masculinas. Por ejemplo, se han colocado al nervio genitofemoral sobre electrodos bipolares de plata para estimularlo eléctricamente mediante pulsos cuadrados de dis-

tracción tetanizante en la punta. Tales electrodos se conectan a un amplificador a su vez conectado a un osciloscopio y una computadora. Se utiliza un software de transferencia de ondas para guardar, visualizar e imprimir los registros (Zempoalteca *et al.*, 2002). Con esta preparación, la estimulación eléctrica (1.5 umbral) al genitofemoral produjo sacudidas simples del cremáster causando el movimiento del testículo, sin desplazarlo. El incremento del estímulo a 50 hertz y dos veces umbral desplazó al testículo, lo que implicó el ascenso parcial del mismo. Dicha estimulación a 100 hertz desplazó al testículo al interior de la cavidad abdominal, de modo que el ascenso fue total (Figura 11.3). El testículo regresó a su posición inicial al cesar la estimulación (Zempoalteca *et al.*, 2002).

Figura 11.3

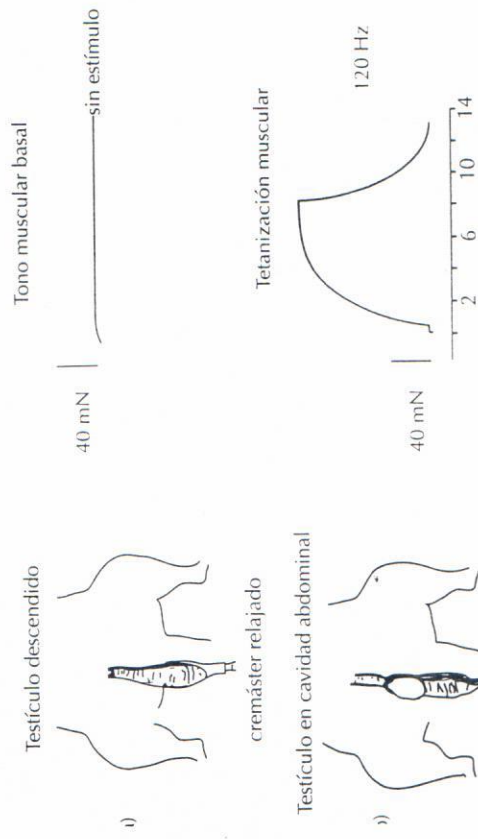


Figura 11.3 Actividad del músculo cremáster. a) Testículo descendido durante el tono muscular basal, sin estímulo. b) Testículo dentro de la cavidad abdominal durante la contracción muscular por estimulación continua (120 Hz; Zempoalteca *et al.*, 2002).

Con técnicas histológicas y con la administración de HRP-WGA, las motoneuronas que inervan al músculo cremáster se localizan en los dos esclavos sacrosomatos lumbares, constituyendo el núcleo ven-

Los testículos producen que contribuyen más con una o otra de las caras laterales del semen) también falta considerar la importancia de cada una de ellas sobre la fertilidad del macho. En este sentido, la rata macho es el modelo más propicio para llevar a cabo estos estudios, ya que tiene mayor número de glándulas sexuales accesorias (ámpulas, vesículas seminales, coagulantes, bulbouretrales y próstata) (Figura 11.4). La rata no tiene ciclos estacionales de reproducción, y los machos compiten por las hembras no mediante enfrentamientos agresivos sino a través de la competencia espermática. Debe recordarse que cada vez que un macho eyacula se forma un tapón seminal en la entrada vaginal que promueve por presión el transporte de los espermatozoides.

Figura 11.4

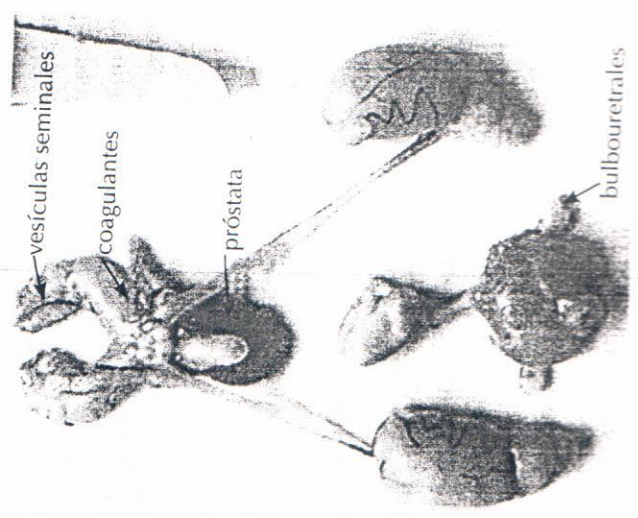


Figura 11.4 Glándulas sexuales accesorias del sistema reproductor de la rata.

con eyaculación (Figura 11.5) porque no existe un conducto para el semen directamente del macho. La técnica que utilizamos es la espermatobioscopia indirecta.

Figura 11.5

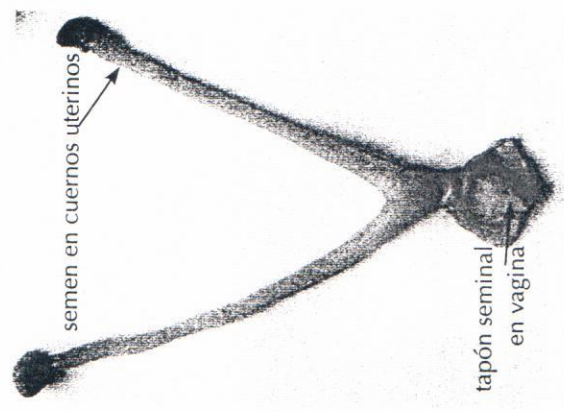


Figura 11.5 Sistema reproductor de rata recién eyaculada.

La espermatobioscopia es el análisis de las características del semen y espermatozoides; puede ser de dos formas: directa e indirecta. La primera es el análisis del semen obtenido del macho y la segunda es el análisis del semen obtenido de la hembra.

Una vez estandarizada la técnica para evaluar el semen y tapón seminal de rata, hemos determinado cuatro parámetros macroscópicos del semen: el *color*, que indica indirectamente la concentración de espermatozoides y puede ser blanco, amarillento o incoloro; el *volumen*, que es medido en mililitros; la *viscosidad*, que señala la consistencia del semen y se determina en milímetros, y el *pH*. Los parámetros microscópicos también son cuatro: el *índice de movili-*

que se expresa en el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (Figura 11.6); y finalmente la *morfología*, que se expresa también en el porcentaje de espermatozoides completos y sin alteraciones morfológicas (Tlachi López *et al.*, 2005).

Figura 11.6



Figura 11.6 Tinción con eosina-nigrosina. Espermatozoides de rata muertos (teñidos) y vivos (translúcidos).

Para el tapón seminal se han determinado también cuatro parámetros macroscópicos: la *consistencia* del tapón para indicar si está coagulado o no; el *peso*, expresado en miligramos; el *volumen*, en milímetros cúbicos; y el *tamaño* (largo y ancho), en milímetros. Microscópicamente hemos observado que en el frotis de un tapón seminal coagulado se observan escasos espermatozoides completos muertos y muchas cabezas separadas de sus flagelos (Tlachi López *et al.*, 2005).

En modelos animales, e incluso en el hombre, se ha descrito que en la erección y eyaculación la participación de la musculatura lisa es fundamental, aunque la contracción coordinada de los músculos perineales isquiocavernoso, bulboesponjoso y cremáster también es requerida, tal como se ha mostrado con registros de actividad electromiográfica durante la actividad copulatoria.

Las motoneuronas que controlan la actividad de los músculos isquiocavernoso, bulboesponjoso y cremáster, independientemente de la especie estudiada, se encuentran en segmentos lumbares y/o sacros de la médula espinal. Tales motoneuronas forman núcleos fácilmente identificables con tinciones como la de Nissl o con trazados de marcaje retrógrado.

Las glándulas sexuales accesorias, además de contribuir en la calidad óptima del semen, mantienen la integridad de los espermatozoides durante su trayecto en la uretra antes de ser expulsados y después en su recorrido por los conductos femeninos hasta el sitio de fertilización.

Agradecimientos

Agradecemos a CONACYT 188574 (JLT); a PROMEP 10.3/04/2849-AUTLAX-CA26; a Carolina Rojas y a Laura García por su asistencia técnica.

Bibliografía

- Abercrombie, M., (1946), "Estimation of nuclear population from microtome sections", *Anat. Rec.*, 94:239-247.
- Barone, R., Pavaux, C., Blin, P.C., Cuq, P., (1973), *Atlas d'Anatomie du Lapin*, Massin et Cie, France.
- Beckett, S.D., Hudson, R.S., Walker, D.F., Vachon, R.I., "Reynolds, T.M., (1972), Corpus cavernosum penis pressure and external penile muscle activity during erection in the goat", *Biol. Reprod.*, 7:354-359.

- Breedlove, S.M., Arnold, A.P., (1980), "Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus in the rat spinal cord", *Science*, 210:564-566.
- Forger, N.G., Breedlove, S.M., (1986), *Sexual dimorphism in human and canine spinal cord: role of early androgen*, Proceedings of the National Academy of Sciences, EUA, 83:7527-7531.
- Gerstenberg, T.C., Levin, R.J., Wagner, G., (1990), "Erection and ejaculation in man. Assessment of the electromyography activity of the bulbocavernosus and ischiocavernosus muscles", *Br. J. Urol.*, 65:395-402.
- Hart, B.L., Melesse d' Hospital P.Y., (1983), "Penile mechanisms and role of striated penile muscles in penile reflexes", *Physiol. Behav.*, 31:807-803
- Hebel, R., Stromberg, M.W., (1985), *Anatomic And embryology of the laboratory rat*, Biomed Verlag, New York.
- Holmes, G.M., Chapple, W.D., Leipheimer, R.E., Sachs, B.D., (1991), "Electromyographic analysis of male rat perineal muscles during copulation and reflexive erections", *Physiol. Behav.*, 49:1235-1246.
- López Antúnez L., (1997), *Anatomía funcional del sistema nervioso*, Uteha Noriega Editores, México.
- Lucio, R.A., Flores Rojas, G., Aguilar, F., Zempoalteca, R., Pacheco, P., Velázquez Moctezuma, J., (2001), "Effects of genitofemoral nerve transection on copulatory behavior and fertility in male rats", *Physiol. Behav.*, 73:487-492.
- Lucio, R.A., Xicohténcatl, V., (2004), "Motoneuronas espinales y músculo bulboesponjoso: estudios con peroxidasa de rábano", En: Velázquez Moctezuma, J., (Ed.), *Temas Selectos de Neurociencias III*, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.
- Lucio, R.A., Xicohténcatl, V., Hudson, R., Rodríguez, J., Cruz, Y., Martínez Gómez, M., (2005), *Perineal muscles and its motoneurons in intact and castrated male rabbits*, (en preparación).
- Luke, M.C., Coffey, D.S., (1994), "The male sex accessory tissues. Structure, androgen action, and physiology", En: Knobil, E., Neill, J.D. (Ed), *The physiology of reproduction*, Second Edition, Raven Press, New York.
- Matthews, M., Adler, N.T., (1977), "Facilitative and inhibitory influences of reproductive behavior on sperm transport in rats", *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 91:727-741.
- McClintock, M.K., Anisko, J.J., Adler, N.T., (1982), "Group mating among Norway rats II. The social dynamics of copulation: competition, cooperation, and mate choice", *Anim. Behav.*, 30:410-425.
- Mesulam, M.M., (1982), *Tracing neuronal connections with horseradish peroxidase*, John Wiley and Sons Ltd., New York.
- Popesko, P., Rajtova, V., Horák, J., (1992), *A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals*, Wolf Publishing, London.
- Sachs, B.D., (1982), "Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation and induction of pregnancy in the rat", *J. Reprod. Fertil.*, 66:433-443.
- Tlachi López, J.L., Velázquez Moctezuma, J., Zempoalteca Ramírez, R., Lucio Lucio, R.A., (2005), *Espermatobioscopía indirecta en ratas con diferente frecuencia eyaculatoria*, XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Guadaluajara, Jal. Res. O-006.
- Zempoalteca, R., Martínez Gómez, M., Hudson, R., Cruz, Y., Lucio, R.A., (2002), "An anatomical and electrophysiological study of the genitofemoral nerve and some of its targets in the male rat", *J. Anat.*, 201:493-505.
- Autores de este capítulo:
Rosa Angélica Lucio y René Zempoalteca, Centro Ixtaccalca de Biología de la Conducta Universidad Autónoma de Ixtaccalca
José Luis Tlachi, Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Ixtaccalca.
Javier Velázquez Moctezuma, Departamento de Neurociencias, Universidad Au-