



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Participación del nervio genitofemoral
sobre las características seminales y
testiculares en la rata macho

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Rebeca Varela Arzate

Codirectores

Dra. Rosa Angélica Lucio y Dr. José Luis Morán Perales



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Participación del nervio genitofemoral
sobre las características seminales y
testiculares en la rata macho

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Rebeca Varela Arzate

Comité Tutorial

Codirectores de Tesis

Dra. Rosa Angélica Lucio y Dr. José Luis Morán Perales

Tutores

Dra. Margarita Juárez Romero

Dr. René Zempoalteca Ramírez

La presente tesis se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, en el laboratorio de Neurobiología, bajo la dirección de la Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, en codirección del Dr. José Luis Morán Perales.

El trabajo se desarrolló dentro del programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, que se encuentra incorporada al Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional de Calidad. Padrón Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC).

El proyecto contó con el financiamiento del CONAHCyT. Beca de Maestría 1150387 (RVA).



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

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Rebeca Varela Arzate** realiza para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Participación del nervio genitofemoral sobre las características seminales y testiculares en la rata macho”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 20 DE OCTUBRE DEL 2023

DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ

DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO

DRA. MARGARITA JUÁREZ ROMERO

DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

DRA. NICTE XELHUANTZI ARREGUIN



CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COMITÉ ACADÉMICO**

Estimados Miembros del Comité Académico:

Por este medio hago constar que después de la revisión por el Comité de Grado, la Tesis de Maestría **“Participación del nervio genitofemoral sobre las características seminales y testiculares en la rata macho”** se sometió al **Programa Turnitin**. El resultado con fecha 23 de octubre del 2023 evidenció 12% de similitud total, excluyendo la sección de referencias. Se trata de un porcentaje aceptable para este tipo de documentos. De este modo, se confirma que no se incurrió en ninguna práctica no deseable en la escritura de la mencionada Tesis realizada por la **L.Q.C. Rebeca Varela Arzate**.

Sin más por el momento, reciban mis atentos saludos.

CORDIALMENTE
TLAXCALA, TLAX., A 24 DE OCTUBRE DEL 2023

DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO
CO-DIRECTORA DE TESIS



Sistema Institucional de Autogestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis-Rebeca Varela Arzate_ FINAL.docx

RECuento DE PALABRAS

11082 Words

RECuento DE CARACTERES

61406 Characters

RECuento DE PÁGINAS

48 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

13.2MB

FECHA DE ENTREGA

Oct 23, 2023 1:14 PM CST

FECHA DEL INFORME

Oct 23, 2023 1:15 PM CST**● 12% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base

- 11% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 8% Base de datos de trabajos entregados
- 4% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Cross

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado

Agradecimientos

Al Posgrado del CTBC, UATx, por ser mi alma mater desde la licenciatura, una universidad que me ha dado gratas e inolvidables experiencias.

Al CONAHCyt, por el apoyo de beca de maestría (115038), porque esa remuneración económica fue esencial para el desarrollo de mi trabajo de investigación, ya que implica mucha entrega y completa dedicación.

A mi directora de tesis, la Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, por su orientación y rigurosidad que han sido clave para realizar este proyecto de tesis. Por la confianza, la paciencia, por los obstáculos que pasamos juntas, su apoyo fue necesario para culminar con éxito la maestría.

A mi codirector, el Dr. José Luis Morán Perales, por sus valiosas enseñanzas y por permitirme hacer experimentos en su laboratorio de la BUAP.

A los miembros del Comité Tutoral, Dra. Margarita Juárez Romero, Dr. René Zempoalteca Ramírez, Dra. Leticia Nicolás Toledo y Dra. Nicté Xelhuantzi Arreguin, por sus recomendaciones para mejorar el contenido de la presente tesis, así como por su apoyo para presentar mi examen de grado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de neurobiología, quienes estuvieron para brindarme su apoyo y conocimiento: Yoselin Tetlalmatzi Flores, Viridiana Huitzil Juárez, Elmer Ulises Torres Sánchez, Miguel Adrián Domínguez Godoy, Karla de la Rosa Sánchez y Marisel Sánchez Rivera. También a mi gran amigo y colega L. Q. C. Luis Ángel Tuxpan Zacamo, gracias por 8 años de amistad, y compañerismo.

Al próximo Dr. Ricardo Juárez Mirto, por su gran apoyo en este trabajo de tesis, por ser una persona coherente y elocuente, mi admiración por su trayectoria profesional y de vida.

A todos los profesores de la maestría, por su conocimiento y dedicación en el posgrado.

A las personas de administración, biblioteca, recepción y bioterio del CTBC, su trabajo es esencial para el desarrollo de los estudiantes de posgrado.

A la señora Roberta Cruz López, por ser una enorme ayuda para mí y mi familia desde hace 23 años.

A las personas que durante mi estancia en la maestría me enseñaron demasiado sobre inteligencia emocional, por mostrarme que en la vida se necesita carácter para tomar buenas decisiones.

A Dios, por darme fuerza para levantarme después de caer y recuperarme de los obstáculos, a él le ofrendo todos mis logros.

Dedicatoria

A mi madre, porque honro su memoria, sus palabras siguen siendo mi motor. Por los hermosos recuerdos.

A mi padre, por su apoyo incondicional, por su amor, por sus consejos, por ayudarme cuando he sentido que no puedo continuar, porque sin él no lo hubiera logrado.

A mis hermanas, Astrid y Dafne, por su forma admirable de luchar para alcanzar sus sueños.

A mi niña interior, lo estamos logrando.

Resumen

La fisiología reproductiva masculina depende de nervios espinales, entre ellos, el genitofemoral (nGf). En la práctica médica, el nGf puede lesionarse provocando el síndrome de dolor inguinal causado por apendectomía, hernia inguinal o por torsiones pélvicas en los deportistas. Las lesiones del nGf provocan alteraciones en la fertilidad al comprometer la fisiología del cremáster y consecuentemente la testicular. El nGf inerva al músculo cremáster cuya contracción/relajación permiten el ascenso/descenso testicular respectivamente, coadyuvando con la termorregulación del testículo, manteniéndolo a una temperatura óptima de 2-4°C menor que la corporal. Nuestro grupo ha evidenciado que el nGf inerva profusamente al cremáster mediante motoneuronas de los segmentos espinales L1-L2. Además, que su sección bilateral, en machos sexualmente maduros, disminuye progresivamente la fertilidad.

Por lo anterior, la hipótesis del presente trabajo es que, la sección del nGf mantendrá relajado al músculo cremáster, provocando alteraciones progresivas en las características seminales, así como en la morfometría e histología testicular, debido a la falta de termorregulación.

Se utilizaron ratas macho Wistar de 300 g de peso corporal, sometidas a pruebas de entrenamiento copulatorio para adquirir experiencia sexual. A los animales anestesiados se realizó la cirugía simulada (Cx sim) o se seccionó bilateralmente el nGf (nGfx). A los 20, 40 y 60 días postquirúrgicos se analizaron los parámetros espermáticos, mediante espermatobioscopia indirecta, después de la realización de una serie eyaculatoria. Se evaluó la morfometría e histología testicular en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Adicionalmente, se pesaron las glándulas sexuales accesorias: vesículas seminales, glándulas coagulantes y próstata ventral para determinar indirectamente la concentración de andrógenos.

Encontramos que se redujo significativamente la movilidad, viabilidad y cuenta espermáticas, también disminuyó el peso de las glándulas accesorias. Sorprendentemente, no hubo cambios en la histología testicular. Quizás, la reducción en la cuenta espermática no se debe a fallas espermatogénicas sino a la falta de contractilidad del cremáster tras su denervación, dañando así, la cantidad de espermatozoides expelidos durante la eyaculación.

Los espermatozoides testiculares son funcionalmente inmaduros, e.g., son inhábiles para desplazarse progresivamente e incapaces de fertilizar al ovocito. Los gametos masculinos son morfológicamente diferenciados, sin embargo, requieren transitar a lo largo del epidídimo para adquirir la madurez espermática. El epidídimo, igual que el testículo se aloja en la bolsa cremastérica. Así, tras la sección del nGf, testículo y epidídimo pudieron dañarse en su fisiología. El primero, disminuyendo la producción de testosterona como lo constata la reducción del peso de las glándulas accesorias; el segundo, por el descenso tanto en el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, como en el número de espermatozoides vivos.

Investigaciones futuras sobre el papel del nGf con el epidídimo y las glándulas accesorias son necesarias, así como con la actividad electromiográfica del músculo cremáster durante la eyaculación.

ÍNDICE

I.	Introducción.....	1
1.	Generalidades del nervio genitofemoral.....	1
1.1	El músculo cremáster, órgano diana del nervio genitofemoral	2
1.1.1	Inervación del cremáster.....	3
1.1.2	Regulación de la temperatura testicular.....	3
1.1.3	Reflejo cremasteriano por estimulación térmica y mecánica	5
1.1.4	El músculo cremáster y el funcionamiento testicular	7
2.	Anatomía testicular.....	7
2.1	Células de Sertoli y células de Leydig.....	10
2.2	Ciclo espermático y onda espermática	10
3.	Fisiología testicular	12
3.1	Esteroidogénesis	12
3.2	Espermatogénesis	13
4.	Eyaculación y fluido seminal	13
4.1	Emisión seminal	13
4.2	Expulsión seminal	14
4.3	Composición de fluido seminal	14
II.	Antecedentes	15
2.1	Tratamiento térmico testicular afecta las gónadas, la espermatogénesis y la esteroidogénesis.....	15
2.2	Descripción anatómo-electrofisiológica del nervio genitofemoral	15
2.3	El nervio genitofemoral, la cópula y la fertilidad.....	17
III.	Justificación	19
IV.	Hipótesis.....	19
V.	Objetivos.....	19
5.1	General	19
5.2	Específicos.....	19
VI.	Metodología	20

6.1 Animales.....	20
6.2 Pruebas de entrenamiento copulatorio.....	20
6.3 Cirugía (sección bilateral del nervio genitofemoral).....	21
6.4 Obtención del fluido seminal (espermatobioscopía indirecta) y evaluación de los parámetros seminales	22
6.5 Obtención de testículos y evaluación de muestras	23
6.5.1 Morfometría testicular	23
6.5.2 Glándulas sexuales accesorias	23
6.5.3 Histología testicular.....	23
VII. Diseño experimental	26
VIII. Resultados.....	27
8.1 Parámetros seminales	27
8.2 Morfometría testicular y glándulas sexuales accesorias.....	28
8.3 Histología testicular.....	30
IX. Discusión.....	34
X. Conclusiones.....	39
XI. Perspectivas	40
XII. Referencias.....	41
XIII. Anexos	45

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del nervio genitofemoral

Los nervios espinales lumbar 1 y 2 se anastomosan y originan al genitofemoral (Fig. 1). Éste se dispone paralelamente a la aorta descendente y a nivel de la arteria iliaca común se bifurca en la rama femoral que es lateral y en la rama genital que es medial (Zempoalteca y cols. 2002). La rama genital inerva a la piel abdomino-inguinal (Zempoalteca y cols. 2002), y no la rama femoral como se consideraba anteriormente (Greene 1955, Hebel y Stromberg 1986). Así mismo, ambas ramas inervan profusamente a la bolsa cremastérica (Fig. 1; Zempoalteca y cols. 2002) y no solo la rama genital como se había descrito (Greene 1955, Hebel y Stromberg 1986). Los análisis electrofisiológicos indican que la estimulación eléctrica de una u otra rama provoca la contracción de la región rostral, media y caudal de la bolsa cremastérica, aunque la contracción es más fuerte por la estimulación de la rama genital que la femoral (Zempoalteca y cols. 2002). Dependiendo de la frecuencia de estimulación, el testículo no se desplaza o se desplaza hacia la cavidad abdominal (a 50 Hz), o bien, hasta su interior (a 120 Hz). Cuando la estimulación cesa, el testículo desciende hasta su posición original, en la región caudal de la bolsa cremastérica (Zempoalteca y cols. 2002).

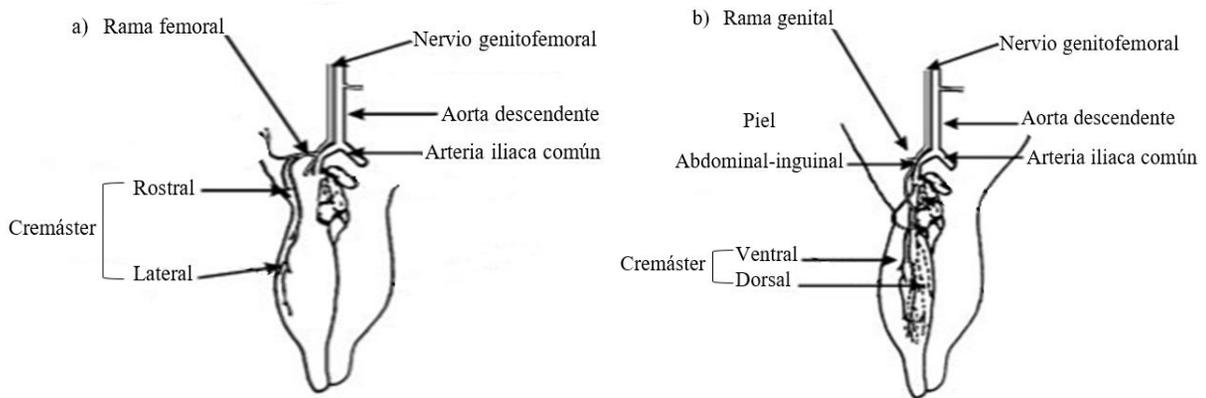


Fig. 1 Distribución del nervio genitofemoral. Paralelo a la aorta descendente y a nivel de la arteria iliaca común se bifurca en a) Rama femoral y b) Rama genital (modificada de Zempoalteca y cols. 2002).

1.1 El músculo cremáster, órgano diana del nervio genitofemoral

En la rata macho, el músculo cremáster se forma por la confluencia de las fibras musculares provenientes del oblicuo interno y abdominal transverso. Esta región de confluencia se denomina zona de transición muscular en la que se distingue el cambio en la dirección de las fibras musculares. Aquellas provenientes del oblicuo interno se disponen circularmente y corresponden a la capa externa (Fig. 2a), mientras que las fibras del abdominal transverso dispuestas longitudinalmente pertenecen a la capa interna (Fig. 2b). Ambas capas constituyen una bolsa muscular en donde se aloja el testículo correspondiente (Zempoalteca y cols. 2002).

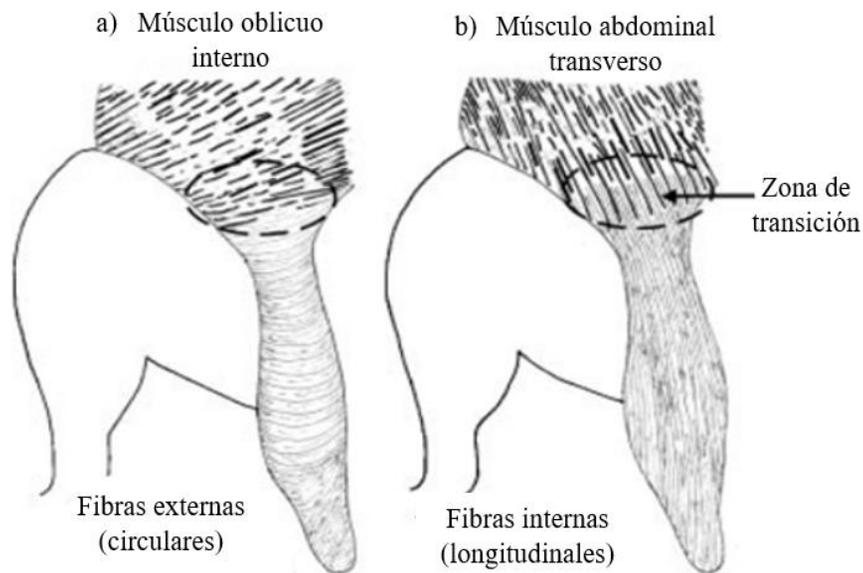


Fig. 2 Músculo cremáster. Arreglo de las fibras musculares de la zona de transición que dan origen a las dos capas que constituyen al cremáster (modificada de Zempoalteca y cols. 2002).

1.1.1 Inervación del cremáster

Las motoneuronas del cremáster se encuentran en la región mediocaudal de L1 y región mediorostral de L2, con mayor porcentaje de neuronas en L2. Además, estas neuronas se localizan en el núcleo ventrolateral de la lámina IX (Zempoalteca y cols. 2002). El núcleo motor del genitofemoral es una estructura sexualmente dimórfica (Larkins y Hutson 1991).

Las neuronas motoras del músculo cremáster están ricamente inervadas por terminales peptidérgicas y serotoninérgicas. Las fibras serotoninérgicas están involucradas en la contracción involuntaria del cremáster (Koyanagi y cols. 2006).

El nervio genitofemoral se bifurca en la rama genital y la rama femoral, la genital inerva la piel abdomino-inguinal, la cual se ve involucrada en el reflejo cremasteriano (Zempoalteca y cols. 2002).

1.1.2 Regulación de la temperatura testicular

Los testículos de muchas especies de mamíferos migran fuera del abdomen, a través del canal inguinal, para finalmente alojarse dentro del escroto.

La pérdida de control de la temperatura corporal puede ser tan dañina para los testículos intraabdominales como para los testículos escrotados. El control de la temperatura corporal tiene relevancia para el mantenimiento de la fertilidad en los machos. Se ha reportado que la temperatura dentro de la túnica vaginal debe estar de 2-4 ° C más fríos que dentro de la cavidad del cuerpo (Moore 1924a).

Existe un equilibrio entre el calor llevado al testículo por la sangre arterial y el calor metabólico que genera, así como la pérdida de calor por el escroto, y con ello se determina la temperatura de los testículos. Aparte de los mecanismos activos disponibles para el escroto para la pérdida de calor, hay otros mecanismos en funcionamiento todo el tiempo. La proximidad de la piel escrotal y subcutánea a la superficie de los testículos tiene una disposición que ejerce una influencia sobre la temperatura de la sangre dentro de las venas testiculares superficiales. Esta sangre, cuando fluye a través del plexo pampiniforme en el cordón espermático (Fig. 3) intercambia calor con la sangre arterial entrante, la pérdida de calor adicional ocurre en la sangre de la arteria testicular a medida que pasa sobre la superficie del testículo, ya que el testículo y el escroto están más fríos que la sangre de la arteria (Waites 1970).

La contracción del músculo dartos reduce el volumen del escroto y acerca más el plexo pampiniforme al tejido inguinal, que está más caliente, disminuyendo así el intercambio de calor en el cordón espermático. Aunque la temperatura de la sangre sólo se ha medido en especies con vasos grandes, podría suponerse que, en todas las especies, la sangre que fluye por la arteria espermática interna se enfría por la diferencia entre la temperatura abdominal y testicular (Waites 1970). Un estudio en carneros merinos de Australia mostró que la piel del escroto puede ser menos arrugada o excesivamente arrugada (Dun 1964). Aquellos con piel demasiado arrugada presentan más disfunción testicular durante el calor de verano que otros con la piel menos arrugada (Dun 1956, Fowler y Dun 1966).

Se sabe que el polo craneal del testículo de rata está ligeramente más caliente que el polo caudal, y la superficie de la túnica albugínea es ligeramente más fría que el tejido testicular (Kormano 1967). Sin embargo, ninguna de estas diferencias es grande, prestando apoyo al concepto de distribución uniforme de calor en los testículos por la sangre arterial.

Se sabe que el escroto está muy vascularizado (Esser 1932) y posee receptores de temperatura que, cuando cambia la temperatura de la piel, inician una serie de reflejos que influyen tanto a nivel local como general, i. e., la termorregulación.

En el hombre, el calentamiento de una región del cuerpo se le llama sudoración, proceso fisiológico fundamental para la termorregulación (Rawson y Randal 1961). En el escroto existen glándulas sudoríparas que también coadyuvan a la termorregulación testicular.

Existe también la participación del músculo cremáster en la termorregulación, como es un músculo estriado, es incapaz de sostener contracciones mostradas por el músculo dartos. Por lo tanto, es de menor importancia como estructura termorreguladora. Se sabe que, la excitación sexual (Masters y Johnson 1987) provoca contracciones del músculo cremáster, esto acerca los testículos al abdomen. Por ello, se especula que tales contracciones en otras circunstancias ayuden al retorno venoso del testículo, por lo que es importante continuar estudiando al cremáster.

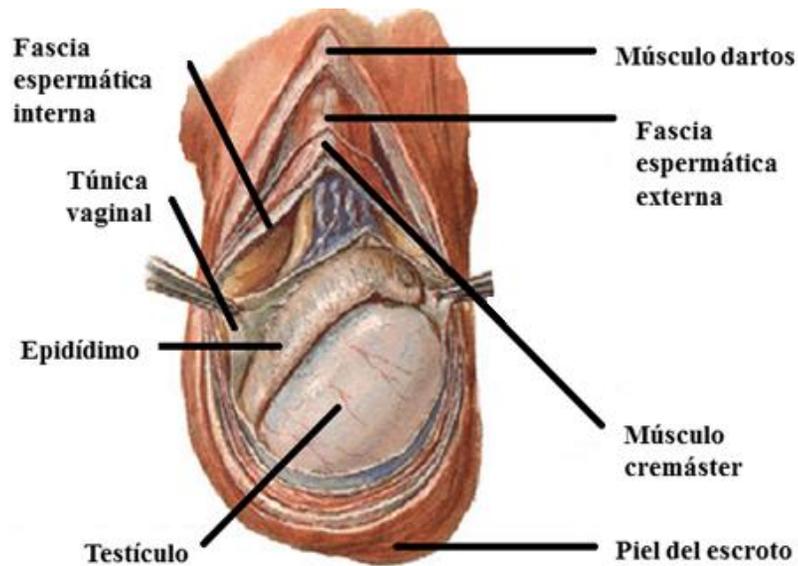


Fig. 3 Bolsa escrotal seccionada. Desde la parte más externa se observa la piel del escroto, músculo dartos, músculo cremáster, fascia espermática externa, fascia espermática interna, túnica vaginal, envolviendo al epidídimo y al testículo (modificada de Frank 2000).

1.1.3 Reflejo cremasteriano por estimulación térmica y mecánica

Es un reflejo de protección y termo-regulación testicular, en el hombre ocurre por la estimulación del tercio superior y anteromedial del muslo. El reflejo corresponde a una contracción de las fibras del cremáster resultando en la elevación de los testículos. El reflejo puede ocurrir por estimulación de la piel o por cambios de temperatura (Schwarz y Hirtler, 2017).

En la rata macho, la estimulación cutánea de la piel inguinal activa a los mecano-receptores (de Paccini, Meissner y Merkel), mientras que los cambios de temperatura activan a los termo-receptores (de Krause-Ruffini). Los mecano-receptores (Fig. 4) al activarse transducen la información mecánica y los termo-receptores se encargan de transducir lo térmico, la información mecánica o térmica viaja por la rama genital (vía aferente). Llega a la médula espinal donde las neuronas sensoriales hacen sinapsis con las neuronas motoras del núcleo ventrolateral de L1 y L2 (centro integrador). Los axones de las neuronas motoras constituyen la rama genital del nervio (vía eferente), que lleva información motora a la cara ventral y dorsal del músculo cremáster (efector) (Zempoalteca 2002, Schwarz y Hirtler 2017).

Así mismo la estimulación cutánea de la piel escrotal inervada por el nervio pudiendo, que se origina en los segmentos L6-S1, activa a los termo-receptores (de Krause-Ruffini) que

transducen la información sensorial, ésta llega a la médula espinal y la información viaja a otro segmento de médula espinal a través de la zona de Waldeyer mediante interneuronas hasta llegar a L1 y L2 para realizar sinapsis con las motoneuronas del núcleo ventrolateral y finalmente, aportar información para el ascenso o descenso del cremáster (schwarz y hirtler 2017).

Al controlar y regular la pérdida de calor a través de la piel, el cremáster mantiene la temperatura para el funcionamiento óptimo de los testículos. El músculo está innervado por la rama genital, que surge en L1 y L2 y está formada mayoritariamente por fibras sensoriales. La rama genital continúa al músculo psoas e ingresa al anillo inguinal interno con el cordón espermático, suministrando fibras motoras al cremáster (Ertekin y cols. 2005).

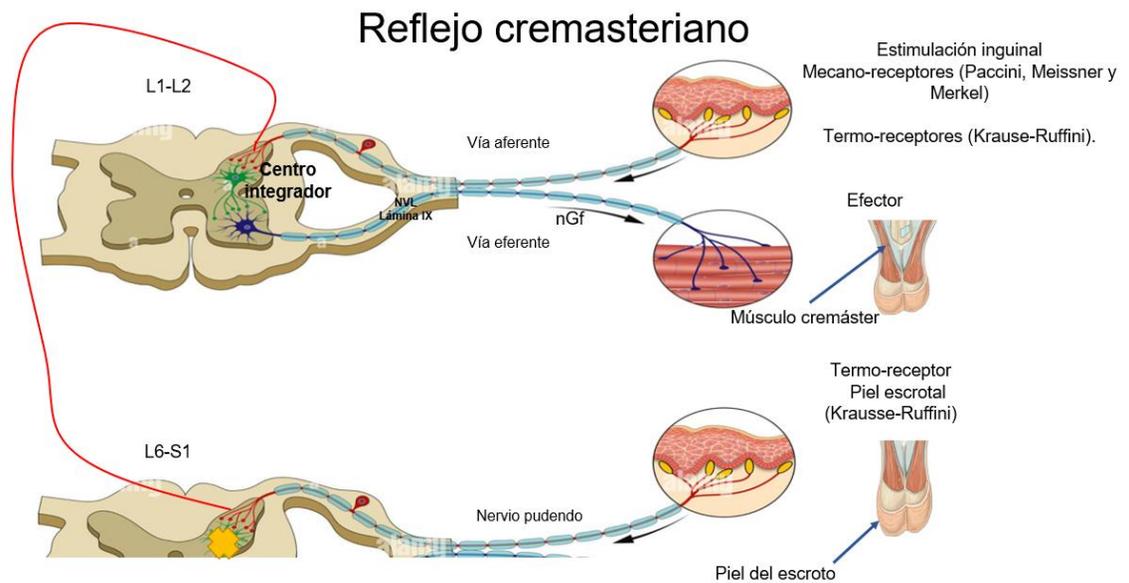


Fig. 4 Reflejo cremasteriano. Los mecano-receptores o los termo-receptores al activarse transducen la información y ésta viaja por la vía aferente. Llega a la médula espinal donde las neuronas sensoriales hacen sinapsis con las neuronas motoras (centro integrador). Los axones de las neuronas motoras constituyen la rama genital del nervio (vía eferente), que lleva información somática a la cara ventral y dorsal del músculo cremáster (efector).

1.1.4 El músculo cremáster y el funcionamiento testicular

En el adecuado funcionamiento de los testículos se requiere conservar una temperatura de 4 a 5 grados Celsius menor que la temperatura corporal, ya que el saco escrotal y el sistema vascular en el testículo coadyuvan como elementos termorreguladores, a través de un proceso de intercambio de calor a la altura del cordón espermático (Setchell y cols. 1994).

Cuando la temperatura escrotal es más alta de lo requerido, como se ha evidenciado en el ratón, se afecta la síntesis de ADN, ARN y proteínas como la dineína y tubulina, que son indispensables para estimular la movilidad espermática, la cual se realiza mediante una acción enzimática sobre el ATP, la cual produce la energía necesaria para el movimiento del axonema, estas proteínas se encuentran dañadas debido al incremento de la temperatura del escroto (Banks y cols. 2005, Huang y cols. 2005). Por otro lado, se sabe que durante la espermatogénesis se requieren muchas proteínas durante la fase proliferativa. Si éstas se alteran, posiblemente se producirán daños en el proceso espermatogénico.

Así, la falta de mantenimiento óptimo de la temperatura testicular resultará en alteraciones de las funciones testiculares, espermatogénesis (producción de células espermáticas) y esteroidogénesis (producción de hormonas sexuales como la testosterona).

2. Anatomía testicular

Se sabe que el órgano masculino primario encargado de la reproducción, es el testículo, éste se encuentra fuera del abdomen, uno por cada lado del saco escrotal. La forma del testículo es ovalada y está rodeado por una capa gruesa de tejido conectivo llamada túnica albugínea. Desde esta túnica se extiende un engrosamiento hacia el interior del órgano, éste se conoce como mediastino testicular. Desde el mediastino se desprenden tabiques radiales de tejido conectivo, denominados tabiques testiculares, que se dirigen hacia la túnica albugínea. Estos tabiques se encuentran dividiendo el tejido glandular en pequeñas estructuras piramidales llamadas lobulillos testiculares. Cada uno de estos lobulillos contiene varios túbulos seminíferos, con trayectos muy tortuosos, que son responsables de la producción de espermatozoides. Los túbulos seminíferos continúan cerca del mediastino en forma de túbulos rectos. Estos túbulos rectos continúan su curso en la rete testis, un sistema de canales laberínticos. La túnica albugínea está

cubierta en su parte externa por una capa de mesotelio, que corresponde a la capa visceral de la túnica vaginal propia del testículo. En su profundidad, la túnica albugínea está en contacto con una capa de tejido conectivo laxo vascular denominada túnica vasculosa del testículo, que se comunica con el tejido conectivo laxo vascular circundante, conocido como el intersticio, que rodea los túbulos seminíferos. En este intersticio se encuentran las células de Leydig, que tienen función endocrina. Los túbulos seminíferos están rodeados por una membrana basal y células mioideas. Delimitados por esta membrana basal (Fig. 5), los túbulos están revestidos por un epitelio estratificado especializado llamado epitelio seminífero, que consta de dos tipos principales de células: las células de Sertoli y las células espermatogénicas, que incluyen espermatogonias, espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios, espermátides y espermatozoides (Fig. 5). Únicamente las células de Sertoli y las espermatogonias están en contacto directo con la membrana basal (Kierszenbaum y cols. 2008).

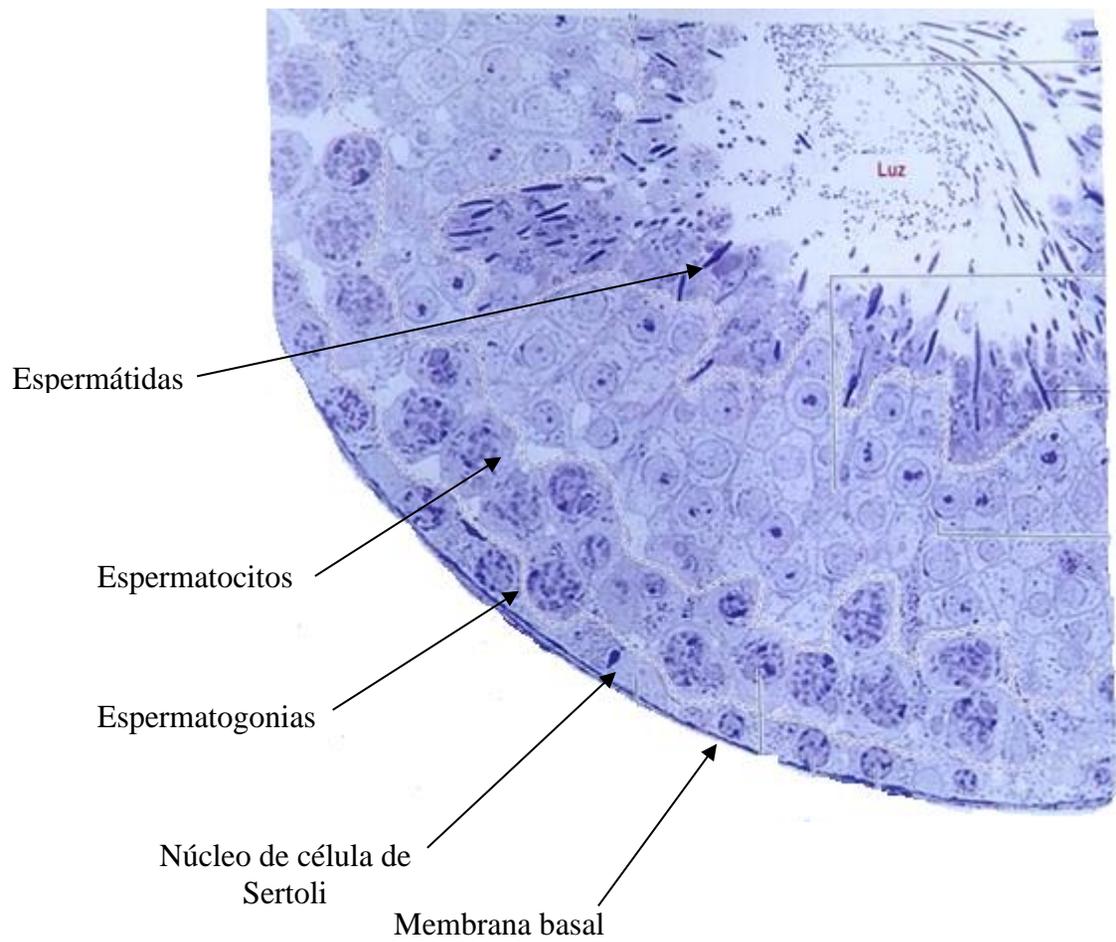


Fig. 5 Corte transversal de testículo. Delimitado por la membrana basal se observa a una célula de Sertoli que contiene a las espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y en la luz del túbulo seminífero se encuentran los espermatozoides (modificada de Kierszenbaum 2008).

2.1 Células de Sertoli y células de Leydig

Las células de Sertoli, son menos numerosas que las células espermatogénicas, éstas se ubican de forma dispersa entre ellas, originalmente con una morfología cilíndrica, ya que se extienden desde la membrana basal hasta la superficie luminal del epitelio. Estas células emiten muchas prolongaciones que se entrelazan entre las células espermatogénicas. No se distinguen los límites del citoplasma en el microscopio óptico, pero se puede detectar el núcleo. Éste puede ser oval, es grande, claro y posee nucléolo muy voluminoso.

Las células de Leydig son las encargadas de secretar testosterona, éstas se localizan fuera de los túbulos en el tejido intersticial. El papel específico de los andrógenos en la espermatogénesis no es claro, pero se sabe que, si no existen niveles adecuados de esta hormona, no se lleva a cabo la formación de espermátides.

2.2 Ciclo espermático y onda espermática

El ciclo espermático (etapas) implica cambios en la asociación celular a lo largo del tiempo en un punto determinado del túbulo seminífero. Estos cambios se producen conforme las estirpes de células espermatogénicas solapadas progresan en su desarrollo. Sería como visualizar cambios de las asociaciones celulares o estadios de un ciclo empleando una cámara con control de tiempo colocado en un lugar determinado del túbulo seminífero (Kierszenbaum y cols. 2008).

La onda espermatogénica provoca cambios a lo largo del túbulo seminífero (distancia). Se podría decir que es una onda que viaja siguiendo la longitud del túbulo seminífero (Kierszenbaum y cols. 2008).

En la rata macho existen 14 etapas (Fig. 6) y tiene una onda espermática de 65 días (Monesi 1982).

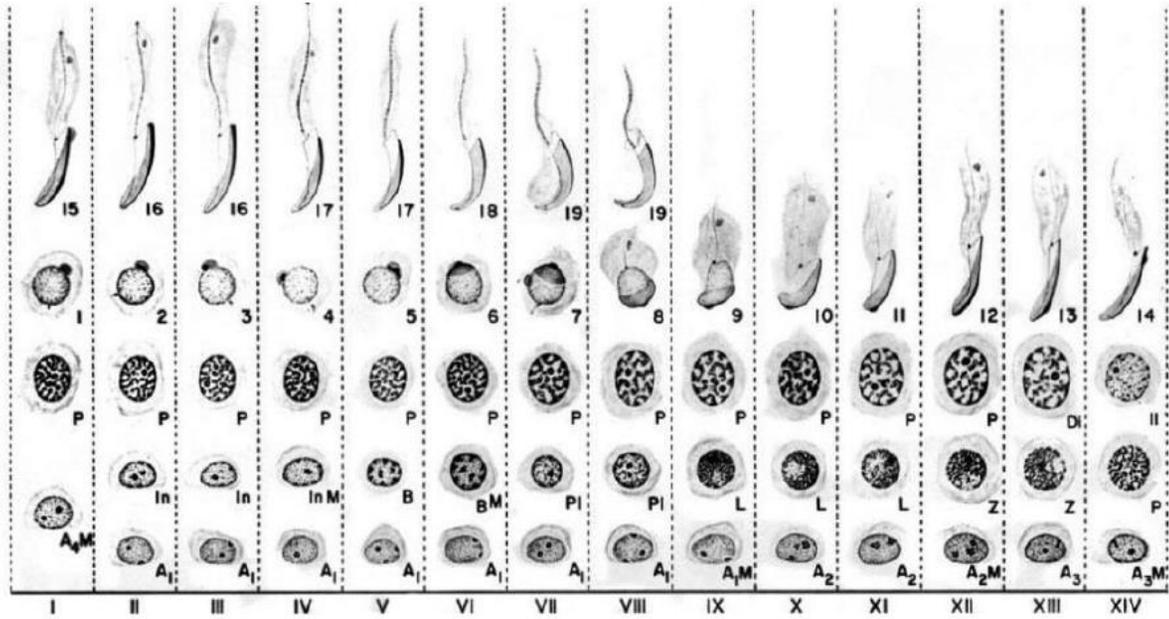


Fig. 6 Etapas del ciclo del epitelio seminífero en ratas. Las etapas se indican con números romanos I-XIV. Las columnas verticales ilustran los diferentes tipos de células presentes en cada uno. Las células ilustradas son espermatogonias de tipos A1-A4 e intermedias (In) y espermatogonias tipo B, así como espermatocitos en preleptoteno (PI), leptoteno (L), cigoteno (Z), paquíteno (P) y diploteno (Di); y finalmente las espermátidas como resultado de la espermiogénesis (modificada de Clermont 1972).

3. Fisiología testicular

El testículo tiene 2 funciones básicas: la biosíntesis y secreción de hormonas (esteroidogénesis) y la producción de células germinales (espermatogénesis).

3.1 Esteroidogénesis

La síntesis de hormonas esteroides es esencial para preservar la función reproductiva. Los testículos producen lípidos llamados esteroides, la testosterona y la 5α -dihidrotestosterona, dos hormonas necesarias para el desarrollo del fenotipo masculino, de los caracteres sexuales secundarios y la espermatogénesis, incluyendo la conducta sexual. Estas hormonas se forman a partir de una molécula de acetato. Los pasos biosintéticos que ocurren desde el colesterol a la pregnenolona son comunes a todas las hormonas esteroides (Austin y Short 1982).

El primer paso esencial implica trasladar el colesterol (27 átomos de carbono) desde las reservas de grasa en las mitocondrias, donde se realiza la hidroxilación y se convierte en pregnenolona (21 átomos de carbono). Esta transformación es mediada por un complejo enzimático conocido como citocromo CYP450 o P450_{scc}. A partir de esto, la pregnenolona puede convertirse en testosterona a través de dos vías de síntesis, denominadas vía Δ^5 o vía Δ^4 . (Fig. 7) (Strauss y cols. 1996).

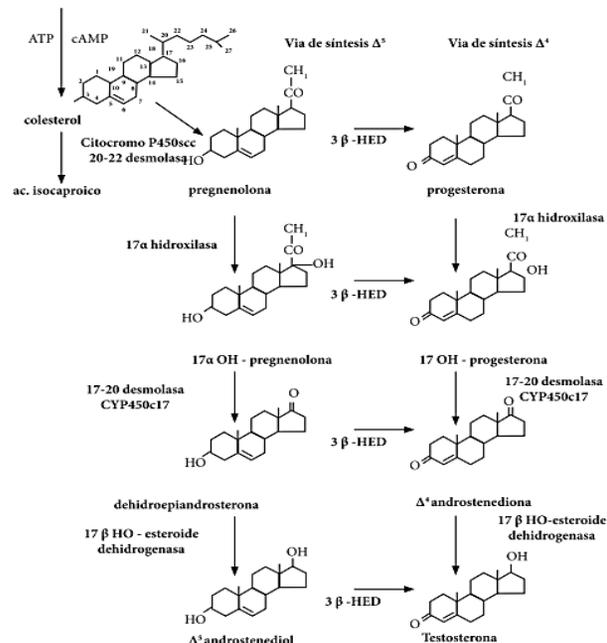


Fig. 7 Síntesis de la testosterona a partir del colesterol. En el testículo se produce la testosterona por la vía llamada Δ^5 o bien, vía Δ^4 (modificada de Strauss y cols. 1996).

3.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis comprende una gran red de procesos que ocurren en los túbulos seminíferos y termina en la producción de gametos maduros. En los túbulos seminíferos las células germinales están asociadas en una estructura altamente organizada y preestablecida. La espermatogénesis consta de tres fases: la primera fase es la mitótica, ésta implica la proliferación de espermatogonias para así aumentar su número y generar a los espermatoцитos primarios. La segunda fase es la de meiosis, en la que los espermatoцитos primarios presentan recombinación genética y se convierten en espermátidas. La tercera fase es espermiogénesis, en la que se involucran procesos de diferenciación que dan como resultado la formación de espermatozoides con la morfología característica de cada especie (Monesi 1982). Estas células son denominadas células de la línea espermatogénica. La espermatogénesis es un proceso demasiado productivo, debido a que una espermatogonia puede producir hasta 4096 espermatozoides maduros en ratas (Russel y cols. 1990). Durante este desarrollo, las células de la línea espermatogénica son sustentadas por las células de Sertoli, que responden a diferentes factores, como la hormona folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y andrógenos (Monesi 1982).

4. Eyaculación y fluido seminal

El fluido seminal es lo que se expele por el meato uretral durante la eyaculación. Ésta consiste de dos fases sucesivas, la emisión y la expulsión (Benson 1988).

4.1 Emisión seminal

La emisión ocurre cuando los espermatozoides de la cauda del epidídimo y las secreciones de las glándulas sexuales accesorias confluyen en la uretra prostática, además del cierre del cuello de la vejiga urinaria (Benson 1988). Durante la emisión se mezclan las secreciones en distintas fracciones: la primera fracción es relativamente pequeña, compuesta de un líquido viscoso claro que procede exclusivamente, de las glándulas bulbouretrales y cuya función es limpiar y lubricar la uretra del macho (Goodman 1974); la segunda fracción se compone de la secreción prostática y de las ámpulas más los espermatozoides; y la fracción final es una secreción mucoide que procede de las vesículas seminales y que proporciona el mayor volumen de plasma seminal (Guyton 1987). En algunas especies, como en la rata, esta fracción se acompaña de material

secretado por las glándulas coagulantes el cual forma un tapón seminal cuyo papel en la fertilización es fundamental (McClintock y Adler 1978).

4.2 Expulsión seminal

La expulsión del fluido seminal usualmente se acompaña de contracciones espasmódicas de los músculos estriados del área perineal: el isquiocavernoso, bulboesponjoso (Meisel y Sachs 1994) y cremáster que acercan al testículo y al epidídimo al cuerpo aumentando así la presión intra-abdominal (Zempoalteca y cols. 2002).

Los centros nerviosos del reflejo de eyaculación se localizan en segmentos espinales (Ganong 2007). Se ha descrito que la expulsión seminal depende del nervio pudendo, hipogástrico y genitofemoral.

4.3 Composición de fluido seminal

El líquido seminal en ratas contiene una variedad de moléculas, producidas principalmente por glándulas accesorias sexuales, y también células distintas de los espermatozoides (por ejemplo, leucocitos) (Poiani 2006). En los mamíferos, la actividad de las glándulas accesorias está bajo control androgénico (testosterona, 5alfa-dihidrotestosterona) y estrogénico, con acciones sinérgicas entre esos dos tipos de esteroides gonadales (Raeside y cols. 1999). La oxitocina secretada por la hipófisis posterior, la prolactina secretada por la pituitaria anterior y tanto las catecolaminas como la hormona del crecimiento también pueden controlar la actividad de las glándulas sexuales accesorias en los mamíferos (Gemmell y Sernia 1989, Kumar y Farooq 1994, González y cols. 1994, Watson y cols. 1999).

La hormona leptina se ha encontrado en el líquido seminal humano y también puede ser secretada por vesículas seminales o la próstata en ratas. La relaxina prostática, que puede estimular la actividad reproductiva femenina, se transmite a las hembras a través del líquido seminal y también puede estar presente en ratas. La 5'-nucleotidasa, enzima que hidroliza los nucleótidos, es secretada por las glándulas accesorias y se encuentra en el líquido seminal de los hombres, y también puede desempeñar un papel en las ratas. La trehalasa, una proteína estructural que puede servir como alimento espermático, puede estar presente en ratas (Poiani 2006).

II. ANTECEDENTES

2.1 Tratamiento térmico testicular afecta las gónadas, la espermatogénesis y la esteroidogénesis.

Se ha evidenciado que el aumento de la temperatura escrotal de 39 ± 0.5 ° C disminuye del 40-60 % el tamaño de los testículos en carneros (Byers y Glover 1984, Sanford y Baker 1990). La disminución del tamaño testicular se debe a la reducción significativa del diámetro del túbulo seminífero y del volumen total del tejido intersticial (Hansen 2009). De esta manera, disminuye la concentración de espermatozoides, a partir de los 14 a 16 días (Setchell 1987, McLaren 1988).

Asimismo, se ha mostrado mayor porcentaje en anomalías espermáticas en la cabeza (50 %) y el flagelo (80 %) por acción del calor. También disminuyen los niveles de testosterona en plasma (Huanca y cols. 2015). Hay escasos estudios referentes a los cambios causados por tratamientos térmicos sobre la secreción de hormonas esteroideas (Byers y Glover 1984).

2.2 Descripción anatómo-electrofisiológica del nervio genitofemoral.

Este estudio se enfocó en investigar la función del nervio genitofemoral en la contracción del músculo cremáster. Se describió la inervación del nervio y se aplicó estimulación eléctrica para medir la fuerza del músculo (Zempoalteca 2002).

El nervio genitofemoral en ratas macho se origina en los nervios espinales lumbares 1 y 2 y se divide en dos ramas que inervan la piel abdominal-inguinal y el músculo cremáster. Se hizo marcaje retrógrado, inyectando el trazador en el músculo cremáster y luego se perfundió a la rata. Se obtuvo la médula espinal y mediante técnicas histológicas fueron procesadas para luego realizar mediciones morfométricas de las neuronas, así como para determinar la extensión de la columna de motoneuronas localizadas en los segmentos espinales L1 y L2, encontrando mayor proporción de neuronas en L2 (Fig. 8). Por otro lado, con la aplicación de estimulación eléctrica, el nervio genitofemoral, a diferentes frecuencias, se determinó cómo se posicionaban los testículos a lo largo del saco del músculo cremáster (Zempoalteca 2002).

La estimulación eléctrica del nervio genitofemoral a frecuencias altas, resultó en la contracción del músculo cremáster y el desplazamiento del testículo hacia la cavidad abdominal (Zempoalteca 2002).

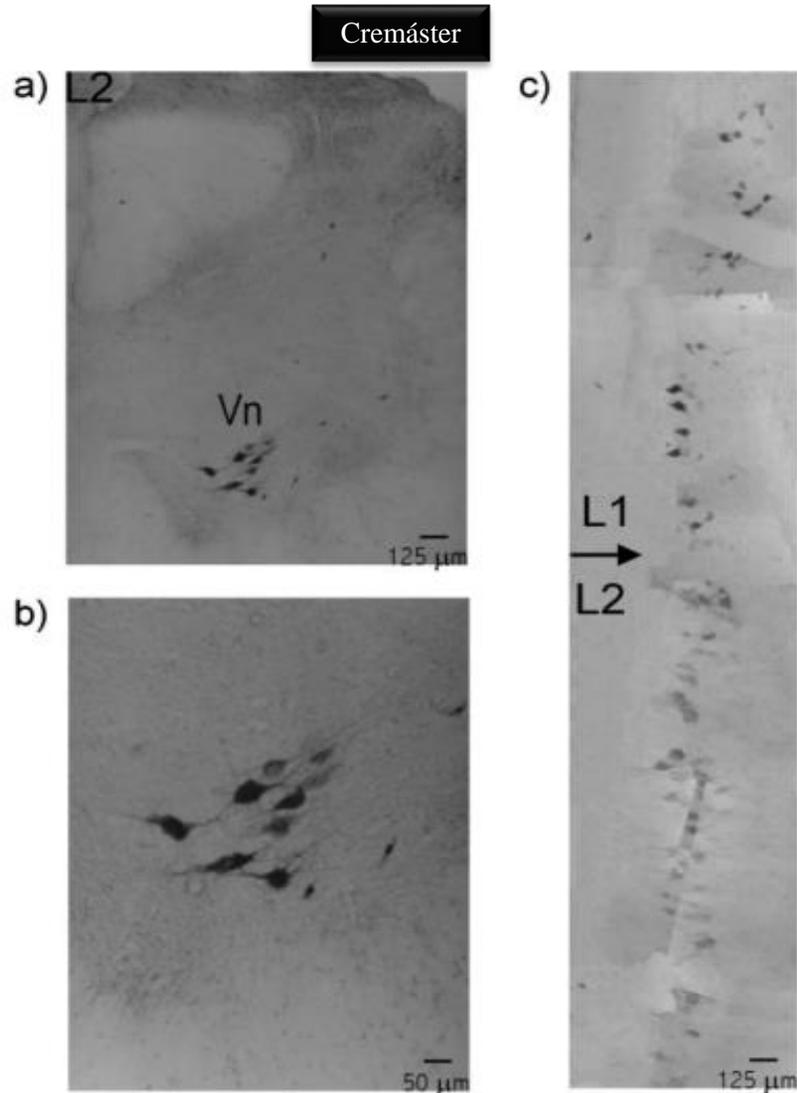


Fig. 8 Fotomicrografías del grupo de motoneuronas marcadas con HRP-WGA que inervan el músculo cremáster en la rata macho. (a) Sección transversal a través del segmento espinal lumbar 2 (L2) muestra la ubicación de neuronas en el núcleo ventral (Vn) de la materia gris. (b) Las mismas neuronas a mayor aumento mostrando orientación dendrítica dorsolateral y dorsomedial a la sustancia gris. (c) Sección longitudinal a través de L1 y L2 que muestran una columna de motoneuronas marcadas, con mayor número de neuronas ubicadas en L2 (Modificado de Zempoalteca 2002).

2.3 El nervio genitofemoral, la cópula y la fertilidad

Los estudios de lesión en los que se realiza la sección bilateral del genitofemoral -incluida una porción de 1 cm del nervio- no tienen efecto en la ejecución de la conducta copulatoria de la rata macho. Los parámetros copulatorios convencionales: latencia de monta, de intromisión y de eyaculación, número de montas y de intromisiones no cambian, incluso hasta los 21 días postquirúrgicos (Lucio y cols. 2001). El 91 % de las hembras presentó tapón seminal tras la eyaculación, cuyo peso fue similar al de los tapones de los machos sham (Lucio y cols. 2001).

La fertilidad probada de dos maneras en ratas con el nervio genitofemoral seccionado disminuyó significativamente. En un grupo de animales a los que se les permitió una sola eyaculación (Fig. 9a) a los 60, 75 ó 90 días después de la sección, preñaron al 40, 30 y 20 % de las hembras respecto al 80 % de las hembras preñadas por los machos sham (Lucio y cols. 2001). Otro grupo de machos de 10, 25 ó 38 días después de la sección nerviosa cohabitaron con tres hembras cada uno, durante 15 días (Fig. 9b). En ese tiempo al menos tres ciclos estrales presentaron las hembras. Los machos controles preñaron al 83 % de las hembras en el primer ciclo, 5 % en el segundo y 11 % no se preñaron. En contraste, los machos con sección del genitofemoral de 38 días postcirugía preñaron solo al 18 % de las hembras en el primer ciclo, 30 % en el segundo, 15 % en el tercero y 37 % no quedaron preñadas. Los machos de 10 y 25 días postquirúrgicos no mostraron cambios significativos comparados con los machos sham (Lucio y cols. 2001). Estos resultados sugieren que la temperatura testicular no es la óptima debido a la falta de contracción del músculo cremáster tras su denervación. El efecto es más evidente conforme transcurren más días después de la sección del genitofemoral.

Es posible que varios factores actúen concurrentemente para producir los deterioros observados de la fertilidad. La sección transversal del nervio genitofemoral podría interferir con la contracción muscular orquestada necesaria para expulsar el fluido seminal durante la eyaculación.

Además, existe la posibilidad de que la contracción del cremáster coadyuve al transporte espermático desde la cauda epididimaria. Esto podrá verificarse mediante el análisis de los parámetros seminales de machos con sección del genitofemoral. Por otro lado, es bien sabido que el desplazamiento testicular, controlado por la actividad del cremáster, coadyuva a la termorregulación para la óptima temperatura testicular y así poder llevar a cabo la

espermatogénesis (Jegou y cols. 1984). Esto podrá verificarse mediante el estudio morfológico e histológico testicular de machos con sección del genitofemoral.

Por lo anterior, es pertinente conocer no solo la anatomía relacionada con el genitofemoral, sino también, su participación en la fisiología sexual para determinar los posibles efectos colaterales de su lesión. Dado que en los estudios se requiere la manipulación invasiva es necesario utilizar animales de laboratorio. Hasta ahora se han logrado numerosos avances en el entendimiento de la fisiología sexual masculina en los que el nervio genitofemoral ha quedado un poco al margen.

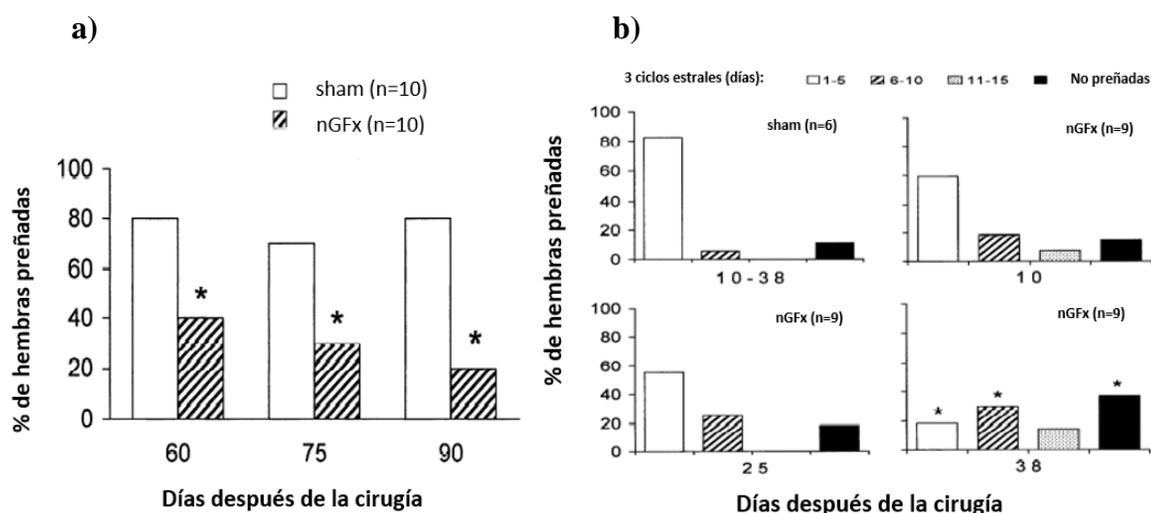


Fig. 9 Porcentaje de hembras preñadas. a) Después de una eyacuación de machos neurectomizados (nGfX) en comparación con machos simulados (sh) a los 60, 75 y 90 días después de la cirugía. b) Después de permanecer durante 15 días con hembras (modificada de Lucio y cols. 2001).

III. JUSTIFICACIÓN

La fisiología sexual masculina involucra distintas estructuras pélvicas y perineales que dependen de nervios espinales, entre ellos, el genitofemoral. Éste inerva al músculo cremáster, que se forma por la confluencia de las fibras musculares provenientes del oblicuo interno y del abdominal transverso. Así se constituye la bolsa cremastérica derecha e izquierda, cada una aloja al testículo y al epidídimo correspondiente.

Por lo anterior, en la práctica médica es posible causar algunos padecimientos durante las cirugías de hernias inguinales y deportivas que pueden lesionar al nervio genitofemoral. Las lesiones de este nervio alteran la fisiología testicular debido a que el ascenso/descenso testicular no ocurre. De este modo, no existe la termorregulación adecuada del testículo para mantener la esteroidogénesis y la espermatogénesis.

IV. HIPÓTESIS

La sección del nervio genitofemoral mantendrá relajado al músculo cremáster, provocando alteraciones progresivas en las características seminales así como en la morfometría e histología testicular en la rata macho adulta.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar el papel del nervio genitofemoral sobre las características seminales y testiculares en la rata macho.

5.2 Específicos

- 1) Analizar los parámetros seminales a los 20, 40 y 60 días después de la sección del nervio genitofemoral.
- 2) Evaluar los cambios testiculares morfométricos e histológicos a los 20, 40 y 60 días después de la sección del nervio genitofemoral.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, machos de 300 g y hembras de 200 g de peso corporal. Se mantuvieron en condiciones estándares de bioterio. El ciclo de luz oscuridad fue invertido 12/12 h, encendido de luces a las 08:00 h, y temperatura controlada 21 ± 2 ° C. El agua y el alimento balanceado (Purina Chow, México) se les proporciono *ad libitum* durante todo el experimento. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico (50 x 30 x 20 cm), 4 machos ó 6 hembras por caja con cama de aserrín.

Los machos fueron inexpertos sexualmente y se entrenaron mediante pruebas copulatorias.

6.2 Pruebas de entrenamiento copulatorio

Se usaron hembras ovariectomizadas con estro inducido mediante la inyección subcutánea secuencial de 10 µg de estradiol y 2 mg de progesterona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), a las 48 y 4 h, respectivamente antes de cada prueba copulatoria, por vía subcutánea.

La arena copulatoria fue un cilindro de acrílico (50 cm altura x 50 cm diámetro) con cama de aserrín. Las pruebas se realizaron durante el segundo tercio de la fase de oscuridad. Antes de iniciar cada prueba copulatoria, a los machos se les permitió permanecer durante 5 min en la arena copulatoria para su habituación. Después se introdujo en la arena de cópula a una hembra con estro inducido, en ese momento inició el registro de los parámetros copulatorios convencionales:

Latencia de monta (LM) es el tiempo que transcurre desde que se introduce la hembra a la arena copulatoria hasta que ocurre la primera monta, se expresa en segundos.

Latencia de intromisión (LI) es el tiempo que transcurre desde que se introduce la hembra a la arena copulatoria hasta que ocurre la primera intromisión, se expresa en segundos.

Latencia de eyaculación (LE) es el tiempo que transcurre desde la primera intromisión hasta que ocurre la eyaculación, se expresa en segundos.

Número de montas (NM) es la cantidad de veces que ocurre el patrón motor de monta.

Número de intromisiones (NI) es la cantidad de veces que ocurre el patrón de intromisión.

El entrenamiento copulatorio constó de 5 pruebas, con intervalo de dos o tres días entre ellas. La prueba duró 15 min cuando el macho únicamente realizó montas o no presentaba los patrones motores de monta o intromisión; 30 min después de haber realizado la primera intromisión, aunque no eyaculara, o bien, cuando el macho presentó el patrón de eyaculación (Lucio y cols. 2023).

Una vez que los machos eyacularon en al menos 4 pruebas seguidas, se les denomina como machos sexualmente expertos y están listos para realizar seccionar bilateralmente el nervio genitofemoral.

6.3 Cirugía (sección bilateral del nervio genitofemoral)

Las ratas macho se anestesiaron con ketamina (15 mg/kg) y xilacina (1 mg/kg), vía IP. Se les rasuró la región abdominal y se les aplicó cloruro de benzalconio. Luego, se realizó una incisión amplia en la piel y musculatura abdominal sobre la línea media de aproximadamente 4 cm. Se localizó la aorta descendente y a nivel de la arteria renal se identificó el nervio genitofemoral derecho, que después de haber sido disecado se seccionó extrayendo una porción de 1 cm. Se realizó el mismo procedimiento para el nervio izquierdo. Posteriormente, se suturó la musculatura abdominal y la piel con hilo seda. Además, algunos animales fueron sometidos a cirugía-sham. Se siguió el mismo protocolo quirúrgico *-vide infra-*, aunque el nervio genitofemoral no fue seccionado. Se aplicó penicilina; vía IM y se permitió la recuperación de los animales de al menos 2 h. Después se llevaron al bioterio para ser alojados en sus respectivas jaulas (Fig. 10).



Fig. 10 Sección del nervio genitofemoral. A: Se pesó al macho, B: Se anestesió, C: Incisión en pared abdominal, D: A nivel de la aorta descendente y paralela a ella se localizó el nervio.

6.4 Obtención del fluido seminal (espermatobioscopia indirecta) y evaluación de los parámetros seminales

Se realizaron las pruebas conductuales a los 20, 40 y 60 días después de la sección del nervio genitofemoral (datos no mostrados) para poder obtener el fluido seminal de las hembras apareadas con dichos machos.

Una vez ocurrida la eyaculación, el macho se retiró de la arena copulatoria y la hembra permaneció ahí por 5 min. Después se llevó al laboratorio para administrarle una dosis letal con pentobarbital sódico (80 mg/kg IP, Pfizer; DF, México). Tras la incisión abdominal, los cuernos uterinos se ligaron proximal y distalmente para extirparlos. Se mantuvieron en una caja Petri con solución salina a 37 °C usando un baño térmico (Felisa 1-80 °C) para mantener la temperatura. Se realizó la limpieza de los cuernos uterinos eliminando grasa y vasos sanguíneos. Una vez limpios se cortó el extremo proximal de cada uno y exprimiendo suavemente se vació el contenido en un tubo de microcentrífuga mantenido a 37 °C. Finalmente, se obtuvieron las muestras del eyaculado para evaluar los parámetros seminales.

La movilidad espermática se distinguió en progresiva, *in situ* e inmóvil en 100 espermatozoides utilizando un contador digital (Conductronic M220), se usó el objetivo de 20x con un microscopio óptico (Optiphot-2 Nikon). El resultado se expresó en porcentaje.

La viabilidad y morfología espermáticas se evaluaron en 100 espermatozoides usando la tinción de eosina-nigrosina. Los espermatozoides teñidos se clasificaron como muertos; los no-teñidos, como vivos. Respecto a la morfología espermática se consideraron espermatozoides normales y anormales. Los normales presentaron la cabeza en forma de hoz y un largo flagelo; los anormales, doble cabeza, doble flagelo, flagelo fragmentado o en zig-zag. Se usó el objetivo de 100x para ambos parámetros y el resultado se expresó en porcentaje.

La cuenta espermática se evaluó utilizando la cámara de Neubauer después de haber sido obtenida la dilución (1:100, 1:200 según correspondiera).

Cabe mencionar que los aumentos totales fueron de 200 para movilidad y cuenta espermática y 1000 para viabilidad y morfología, considerando que el microscopio tiene oculares con aumento de 10x.

Después de la evaluación del fluido seminal se obtuvo quirúrgicamente el tapón seminal de la vagina. Se registró el peso con una balanza analítica (Mettler AE 50) y el tamaño (largo x

ancho) con un vernier digital y se expresaron en miligramos y milímetros, respectivamente.

6.5 Obtención de testículos y evaluación de muestras

Al término de cada prueba postquirúrgica conductual a los 20, 40 y 60 días, a las ratas macho se les administró una dosis letal con pentobarbital sódico (80 mg/kg IP, Pfizer; DF, México). Se les extrajeron ambos testículos y se colocaron en líquido de böuin para su fijación durante 24 h. El testículo derecho de cada animal se fijó y guardó para posteriores estudios, mientras que en el testículo izquierdo se analizaron los cambios morfométricos e histológicos correspondientes.

6.5.1 Morfometría testicular

Se registró el peso y se midió el eje longitudinal y transversal del testículo recién extirpado y se expresó en gramos y centímetros, en 6 ratas.

6.5.2 Glándulas sexuales accesorias

Adicional a la morfometría testicular, se registró el peso de algunas glándulas accesorias (vesícula seminales + glándulas coagulantes y próstata ventral), en 6 ratas.

6.5.3 Histología testicular

Después de haber permanecido en el líquido de Böuin, el testículo izquierdo de 3 ratas por grupo experimental, se mantuvo en alcohol al 70 % hasta el momento del procesamiento histológico para la inclusión en bloques de parafina. Las muestras de tejido se deshidrataron en cambios ascendentes de etanol seguidos de dos cambios a cloroformo, uno de 24 h y el otro de 2 h antes de ingresarlo al horno. Finalmente, las muestras se colocaron en baño de parafina a 65 °C durante 3 h. Los bloques se cortaron transversalmente en tiras seriadas a 5 µm de grosor con microtomo. Se montaron dos tiras de cortes por cada portaobjeto fijado con gelatina al 0.3 %. Las laminillas se dejaron secar por 24 h en una cámara con vapores de formol al 37 %. Después, los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina y montados en resina sintética (Luna 1968). Finalmente, los cortes transversales se observaron con microscopía usando el objetivo 10x para determinar en 30 túbulos seminíferos por grupo experimental de distintos cortes transversales, los siguientes parámetros:

A) Diámetro del túbulo seminífero. B) Área del túbulo seminífero. C) Diámetro del lumen túbulo seminífero. D) Altura del epitelio seminífero (Fig.11).

Se usó un software de medición (AxioVision Rel. 4.8) calibrado en micras.



Fig. 11 Corte transversal de testículo. A: Diámetro del lumen, B: Área del túbulo, C: Diámetro del túbulo, D: Altura del epitelio seminífero (modificada de Kierszenbaum 2008).

Índice histopatológico (Tabla 1). Se analizaron 30 túbulos seminíferos por animal y se les asignó un valor al daño observado usando una escala indicativa del 1 a 6:

- (1) Plegamiento de la lámina basal, escalamiento celular
- (2) Vacuolización epitelial, células multinucleadas y picnosis celular
- (3) Túbulos sin espermatidas
- (4) Túbulos sin espermatocitos
- (5) Túbulos sin espermatogonias
- (6) Ausencia de todo tipo de células

Al final se sumó el puntaje por túbulo obteniendo 21 puntos como máximo, indicando el mayor daño tubular (Vigueras-Villaseñor y cols. 2009).

Adicionalmente, se analizó mediante el índice de Johnsen la categorización de la espermatogénesis en una escala del 1-10 (Tabla 2) en los mismos 30 túbulos seminíferos por animal, de cortes transversales de testículo (Johnsen 1970).

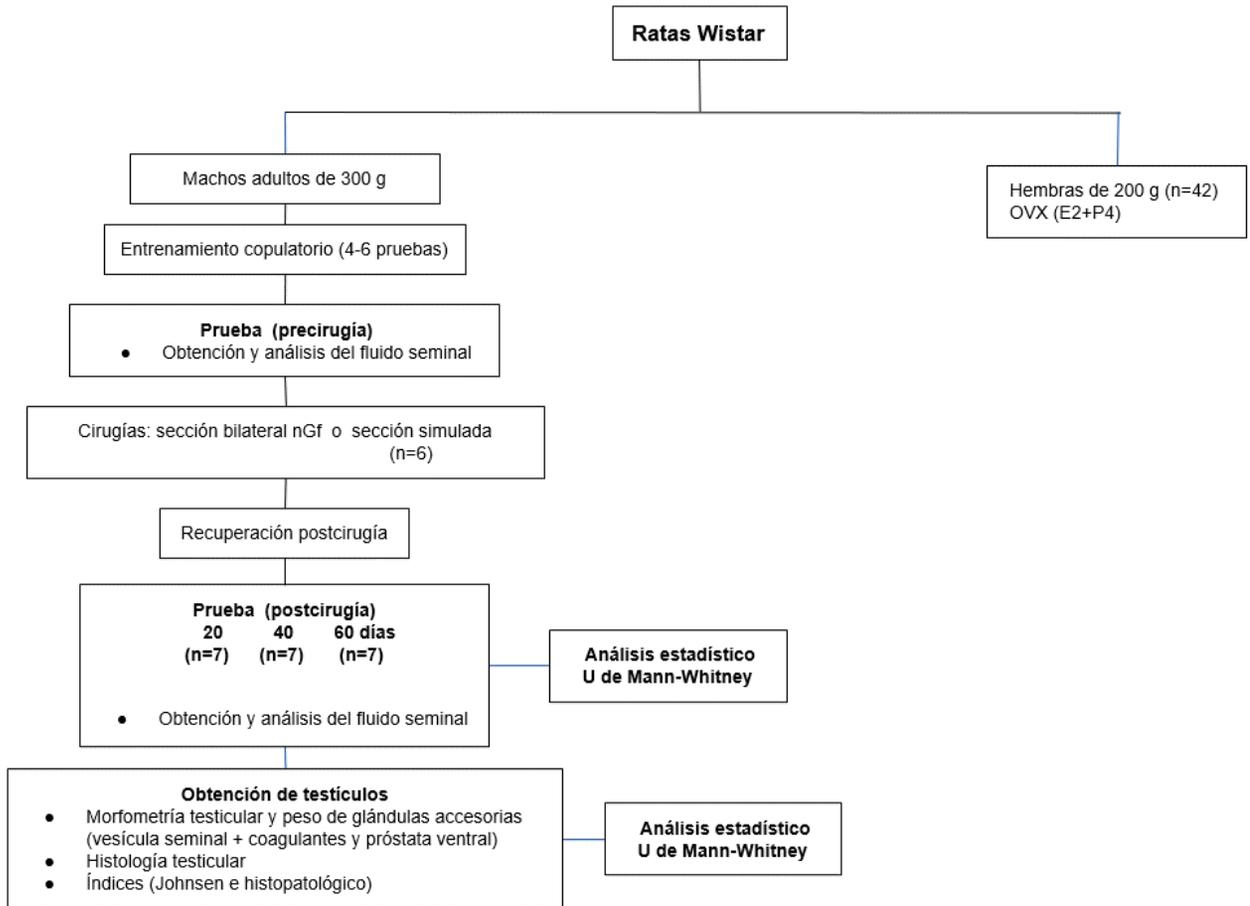
Tabla 1. Índice histopatológico para la evaluación tubular y espermiática.

Nivel de daño	Puntaje
Plegamiento de la lámina basal, escalamiento celular	1
Vacuolización epitelial, células multinucleadas y picnosis celular	2
Túbulos sin espermiáticas	3
Túbulos sin espermatocitos	4
Túbulos sin espermatogonias	5
Ausencia de todo tipo celular	6

Tabla 2. Índice de Johnsen para la evaluación espermatogénica.

Nivel de daño	Puntaje
Espermatogénesis completa con algunos espermatozoides, epitelio germinal organizado, con grosor regular y lumen abierto.	10
Epitelio germinal desorganizado con algunos espermatozoides presentes y con un marcado desprendimiento u obliteración del lumen.	9
Pocos espermatozoides presentes en la sección (<5-10).	8
Sin espermatozoides presentes, pero con algunas espermiáticas presentes.	7
Sin espermatozoides presentes y pocas espermiáticas (<5-10).	6
Sin espermatozoides ni espermiáticas, pero con varios o algunos espermatocitos presentes.	5
Pocos espermatocitos presentes (<5) sin espermiáticas o espermatozoides presentes.	4
Las espermatogonias son las únicas células germinales presentes.	3
Sin células germinales, pero con las células de Sertoli presentes.	2
Sin células presentes en la sección tubular.	1

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL



VIII. RESULTADOS

8.1 Parámetros seminales

Respecto a los parámetros seminales, el porcentaje de espermatozoides con movilidad espermática progresiva disminuyó significativamente a los 40 y 60 días (Fig. 12A; $p \leq 0.01$, $p \leq 0.01$), el porcentaje con movilidad in situ no cambió (Fig. 12B), mientras que el porcentaje de espermatozoides inmóviles aumentó significativamente a los 60 días (Fig. 12C; $p = 0.013$).

El porcentaje de espermatozoides vivos descendió significativamente a los 60 días (Fig. 12D; $p \leq 0.001$). Sin embargo, el porcentaje de los espermatozoides con morfología normal no cambió (Fig. 12E). Finalmente, la cuenta espermática disminuyó significativamente a los 40 y 60 días postsección bilateral del nGf (Fig. 12F; $p \leq 0.001$, $p = 0.009$).

En relación al peso (Fig. 13A), largo (Fig. 13B) y ancho (Fig. 13C) del tapón seminal no hubo cambios significativos ($p > 0.05$).

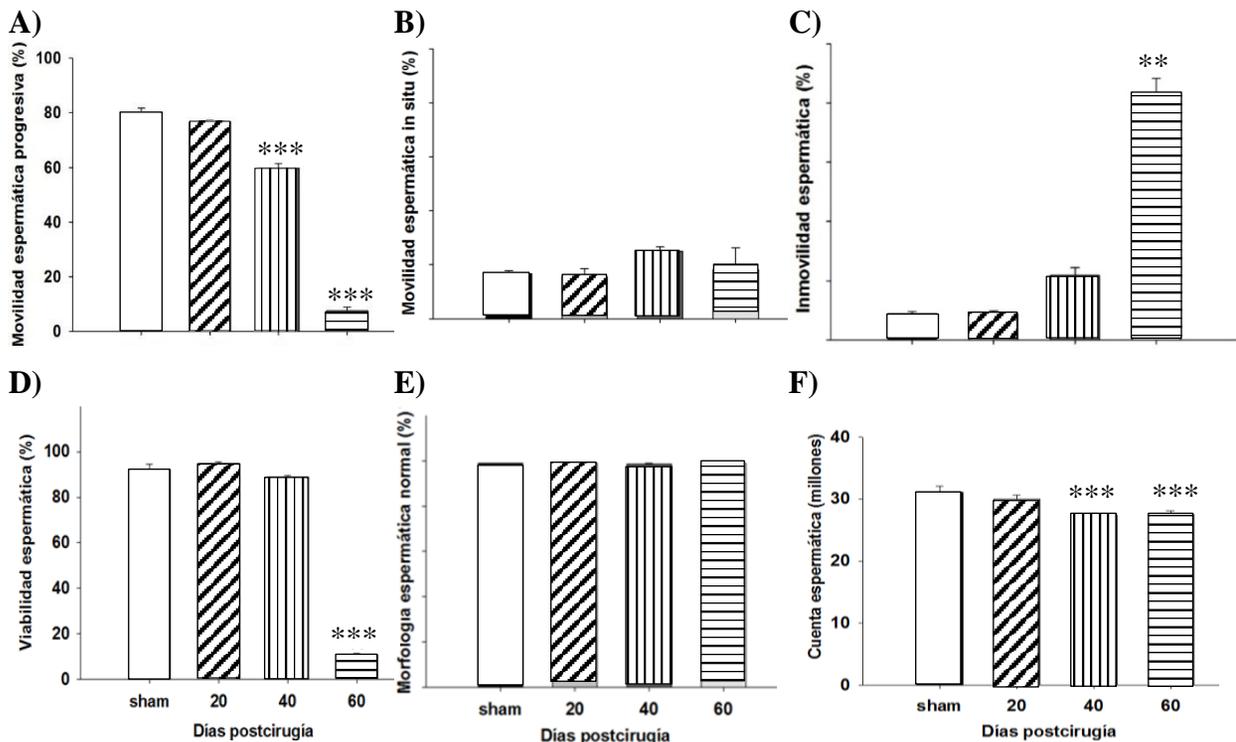


Fig. 12 Parámetros seminales. A) Movilidad espermática progresiva. B) Movilidad espermática in situ. C) Inmovilidad espermática. D) Viabilidad espermática. E) Morfología espermática normal. F) Cuenta espermática. U de Mann-Whitney.

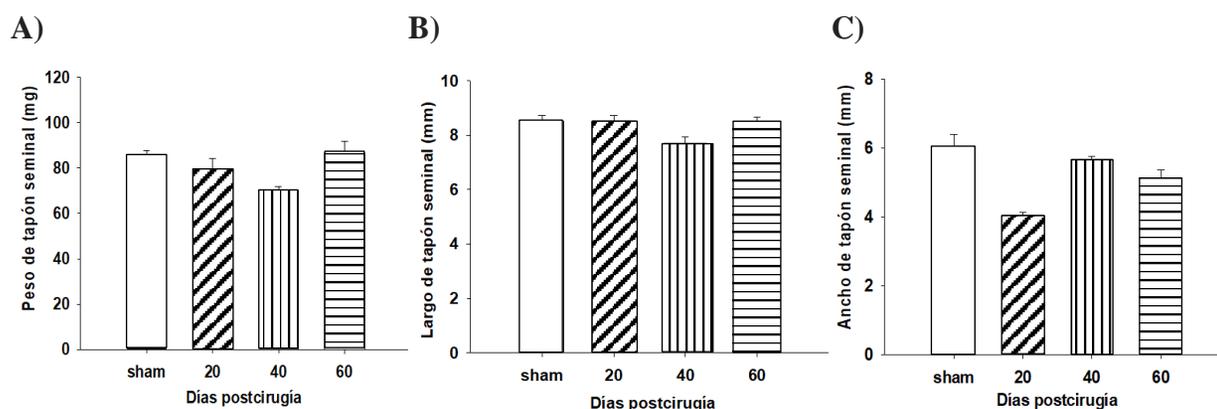


Fig. 13 Tapón seminal. A) Peso. B) Largo. C) Ancho. U de Mann-Whitney.

8.2 Morfometría testicular y glándulas sexuales accesorias

Se pesaron y midieron los testículos de los grupos sham y neurectomizados, adicionalmente, se pesaron algunas glándulas accesorias (vesículas seminales + glándulas coagulantes y próstata ventral) (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis morfométrico de testículo y peso de glándulas accesorias de ratas macho sham y neurectomizadas.

Morfometría testicular y peso de las glándulas accesorias	sham (n=6)	20 días nGfx (n=6)	40 días nGfx (n=6)	60 días nGfx (n=6)
Peso de testículo (g)	2.04±0.06	2±0.04	2.07±0.1	2.01±0.1
Eje transversal testicular (mm)	12.13±0.1	12.14±0.2	12.8±1.2	11.9±0.4
Eje longitudinal testicular (mm)	20.6±0.6	20.39±0.3	20.45±0.4	20.43±0.46
Peso de seminales + coagulantes (g)	1.95±0.07	1.97±0.05	1.59±0.05**	1.47±0.03**
Peso de próstata ventral (g)	1.6±0.06	1.64±0.03	1.48±0.02**	1.35±0.04**

Promedio±error estándar. nGfx=machos neurectomizados del genitofemoral. U de Mann-Whitney, $p \leq 0.01$.

Adicional a los pesos se tomaron fotos de glándulas sexuales accesorias de animales representativos, sham y del grupo de 60 días postcirugía. Se observó la reducción en el tamaño de las seminales + coagulantes y la próstata ventral (Fig. 14).

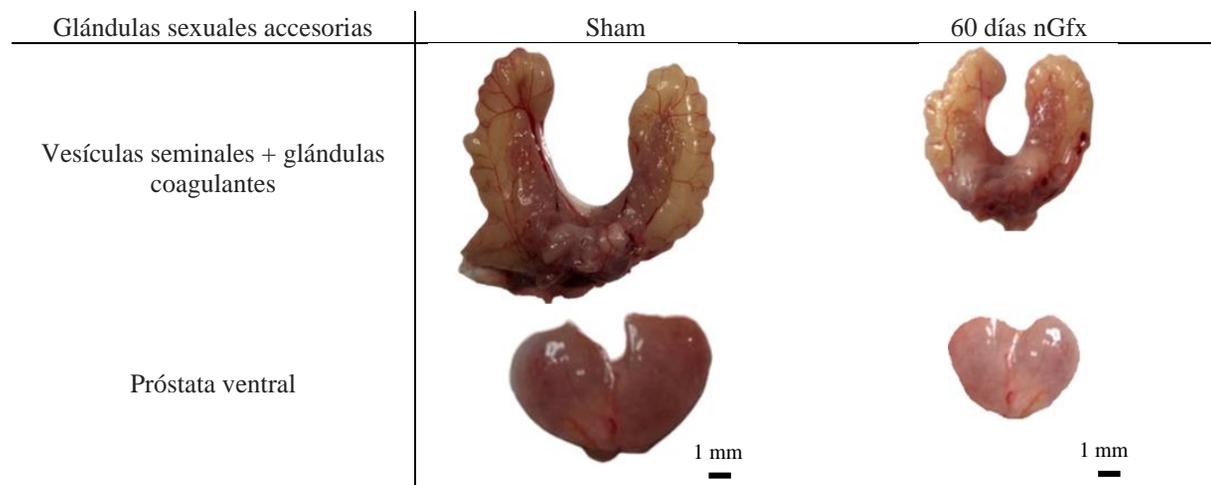


Fig. 14 Glándulas accesorias de ratas macho sham y neurectomizadas del nGf a los 60 días postcirugía.

8.3 Histología testicular

Los cortes histológicos del testículo de animales sham (Fig. 15A, B) comparados contra los testículos de animales a los 20 (Fig. 15C, D), 40 (Fig. 15E, F) y 60 (Fig. 15G, H) días postcirugía no mostraron cambios estructurales significativos. En todos los grupos experimentales se observó el intersticio sin alteraciones morfológicas, la membrana basal intacta e integridad de los túbulos seminíferos mostrando los diferentes estadios de maduración del epitelio germinal (espermatogonias, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátidas y espermatozoides). Sin embargo, algunos túbulos seminíferos de animales sham como experimentales presentaron plegamiento de la lámina basal, a mayor tiempo postcirugía mayor número de animales con mayor cifra de túbulos con este ligero daño.

De acuerdo con el índice histopatológico se evaluaron los túbulos seminíferos de ratas sham y de 20, 40 y 60 días postcirugía, 30 túbulos por animal, es decir, 90 de cada condición. Se determinó el índice por la suma de los puntajes por sección transversal de túbulo seminífero. A las secciones que fueron examinadas se les asignó un valor del daño, utilizando una escala del 1 al 6. La puntuación más alta correspondió al mayor daño tubular que tuvo una puntuación de 21, mientras que el menor fue de cero. En nuestros grupos sham y experimentales, se observó que los túbulos seminíferos tuvieron un valor máximo de 1, debido a que algunos túbulos presentaron plegamiento de la lámina basal, sin alteración del escalamiento celular. No hubo mayor patología tubular (Fig. 16A).

Se analizó también el índice de Johnsen en 30 túbulos por animal, para la evaluación de la espermatogénesis en una escala del 1-10. La puntuación más alta, e. g., cercana a 10 correspondió al menor daño tubular, mientras que el mayor daño obtuvo una puntuación más baja, cercana a 1. En nuestros resultados observamos que escasos túbulos de los grupos sham y experimentales, presentaron una muy ligera desorganización del epitelio germinal a partir de las espermatogonias, en un diminuto fragmento de la circunferencia del túbulo (Fig. 16B).

Ningún índice presentó cambios significativos.

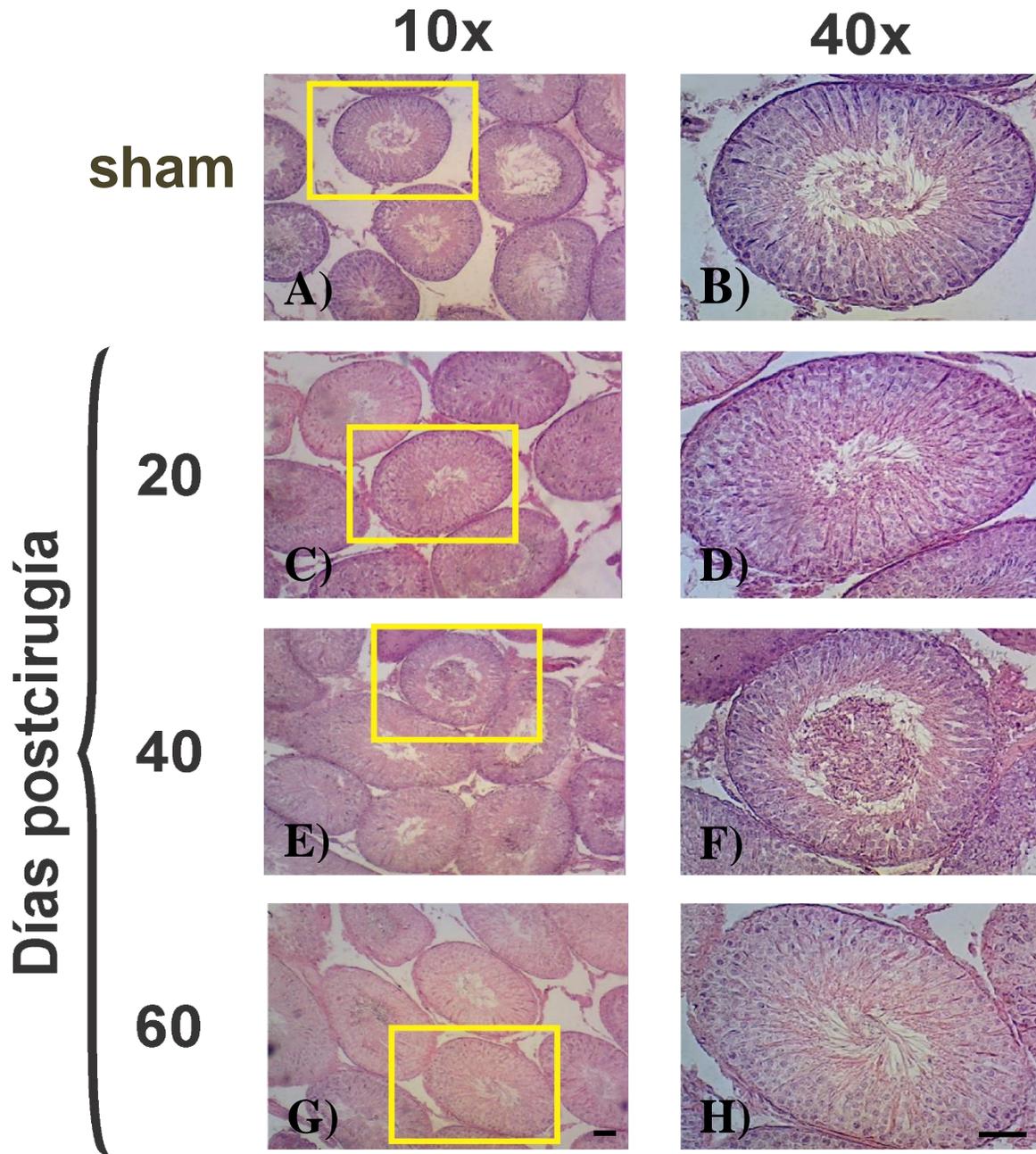
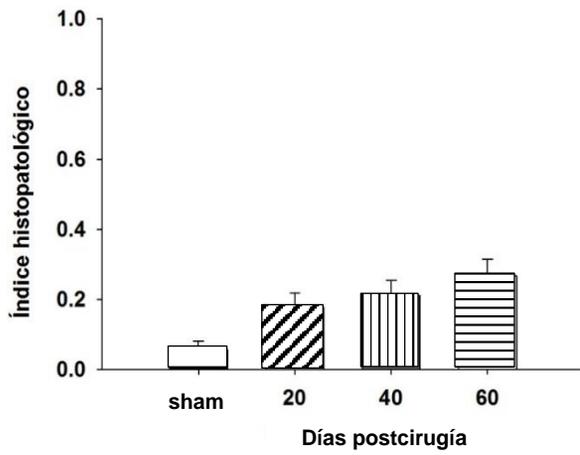


Fig. 15 Fotomicrografías de túbulos seminíferos. A) sham a 10x. B) sham a 40x (túbulo seminífero). C) Neurectomizados de 20 días a 10x. D) Neurectomizados de 20 días a 40x (túbulo seminífero). E) Neurectomizados de 40 días a 10x. F) Neurectomizados de 40 días a 40x (túbulo seminífero). G) Neurectomizados de 60 días a 10x. H) Neurectomizados de 60 días a 40x (túbulo seminífero). Barra equivale a 50 μ m.

A)



B)

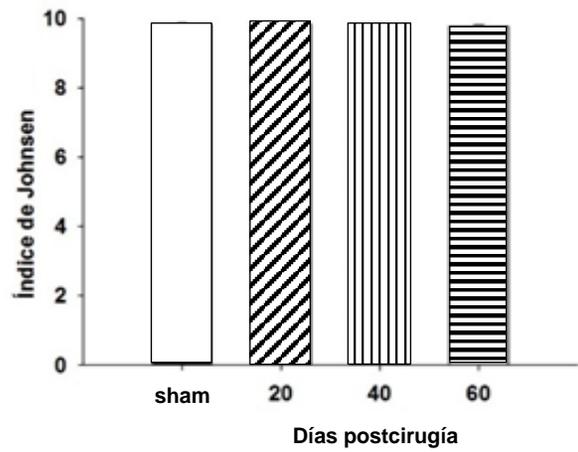


Fig. 16 Índices para evaluar el daño tubular y espermático. A) Índice histopatológico. B) Índice de Johnsen. U de Mann-Whitney.

Adicional a los índices (histopatológico y Johnsen) se midieron algunos parámetros morfométricos histológicos de los túbulos seminíferos: diámetro del túbulo seminífero (Fig. A), lumen del túbulo seminífero (Fig. B), área del túbulo seminífero (Fig. C) y altura del epitelio seminífero (Fig. D). Estos parámetros morfométricos histológicos no evidenciaron cambios significativos.

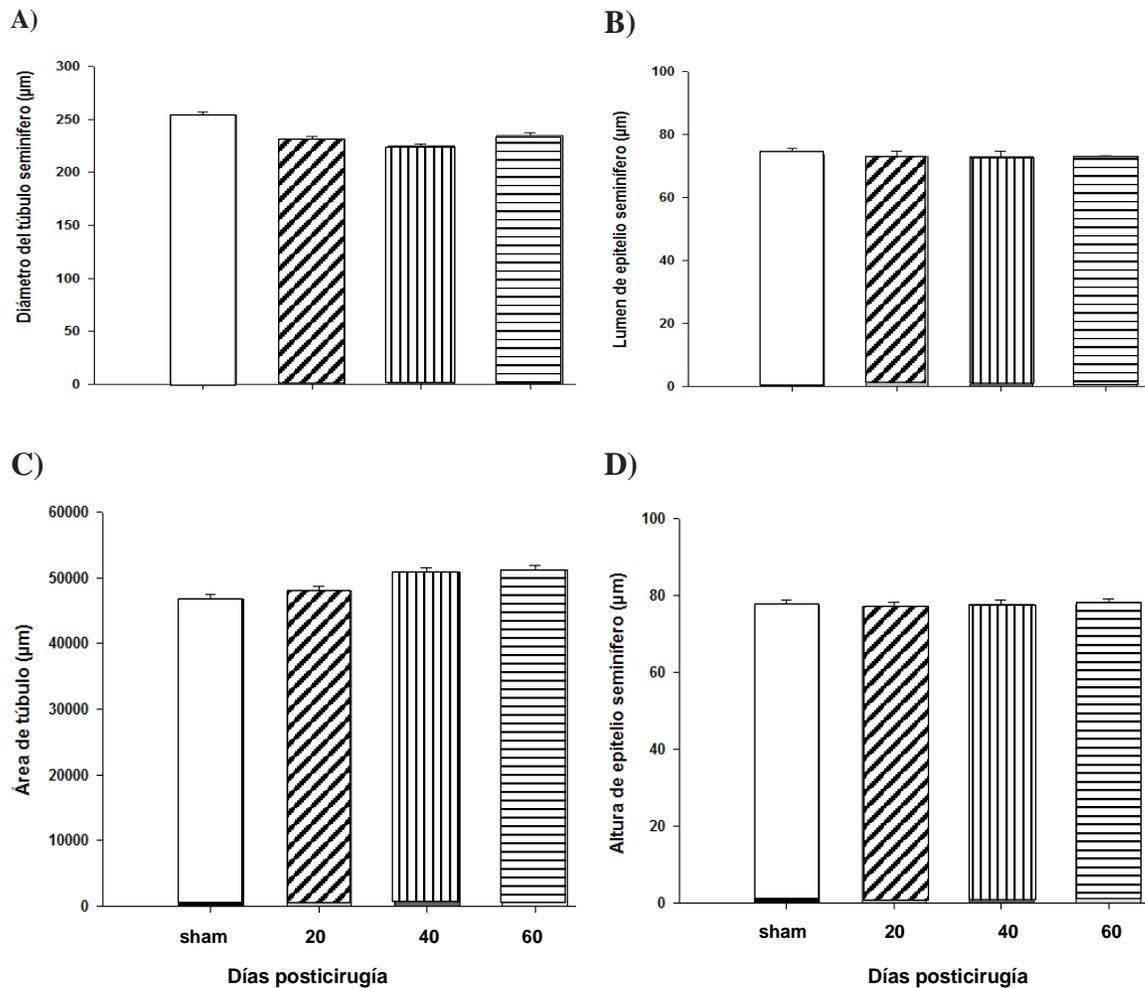


Fig. 17 Mediciones histológicas del túbulo seminífero. A) Diámetro del túbulo seminífero. B) Lumen del epitelio seminífero. C) Área de túbulo seminífero. D) Altura de epitelio seminífero. U de Mann-Whitney.

IX. DISCUSIÓN

Nuestro grupo de trabajo y otros investigadores hemos coincidido en evidenciar que la neurectomía del genitofemoral disminuye de manera significativa la fertilidad masculina (Lucio y cols. 2001, Gutiérrez-Pérez y cols. 2014). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se explicó la causa de tal efecto. En uno de ellos se sugirió que la afectación de la contracción del músculo cremáster influyó en el adecuado proceso de expulsión seminal durante la eyaculación provocando la fertilidad reducida (Gutiérrez-Pérez y cols. 2014). En el otro estudio se propuso que la falta de ascenso/descenso testicular alteraba la regulación térmica de la gónada, lo que a su vez afectaría las funciones testiculares de esteroidogénesis y espermatogénesis (Lucio y cols. 2001). Por lo que, en la presente tesis se exploraron las consecuencias, a largo plazo, de la sección bilateral del nervio genitofemoral sobre las características del eyaculado y la morfología testicular.

Respecto al fluido seminal expelido durante la cópula encontramos cambios en los parámetros seminales analizados mediante la espermatobioscopía indirecta. Disminuyeron la movilidad, viabilidad y la cuenta espermática. Esto explica la fertilidad reducida en los estudios previos, en los que a los animales que se les permitió una sola eyaculación a los 60, 75 ó 90 días, preñaron solo al 20 % de las hembras el día 90, en contraste con el 80 % de las hembras preñadas por el grupo sham. En otro experimento, los grupos de machos de 38 días postcirugía cohabitaron con tres hembras, durante 3 ciclos estrales. Los machos controles preñaron al 83 % de las hembras en el primer ciclo estral versus el 18 % de hembras preñadas por los machos con 38 días postneurectomía (Lucio y cols. 2001). Esto sugiere fuertemente, que la fertilidad por la denervación del cremáster disminuye en ambas condiciones copulatorias (una eyaculación ó 3 ciclos estrales).

Otro grupo de investigación indica no haber encontrado cambios en los parámetros seminales (Gutiérrez-Pérez y cols. 2014). Sin embargo, se enfocaron solamente en la morfología y la cuenta espermática de muestras obtenidas del epidídimo. Cabe mencionar que los parámetros seminales deben obtenerse del eyaculado e incluir también a la viabilidad y movilidad progresiva. Todos estos parámetros constituyen un espermatograma y son utilizados para evaluar la fertilidad masculina.

En el presente trabajo encontramos que solamente el 60 % de los espermatozoides mostraron movilidad progresiva en el día 40 y 10 % en el día 60 postneurectomía, mostrando así diferencias significativas versus el 80 % de los espermatozoides del grupo sham.

Por lo anterior, cabe recordar que los espermatozoides que se localizan en el testículo son inmóviles o presentan solamente un ligero movimiento flagelar. Aquellos espermatozoides de la cabeza del epidídimo muestran un patrón de movimiento circular, mientras que los liberados de la cauda se mueven y se desplazan vigorosa y progresivamente hacia adelante (Robaire y cols. 2006). Consecuentemente, atribuimos nuestros resultados al daño en la fisiología epididimaria.

El fluido de la cauda epididimaria se caracteriza por su abundancia en aminoácidos y glicoproteínas (Barrios 2002). Así como, por la presencia de sustratos metabólicos, como lípidos, glucosa, lactato y glicerol (Jones y cols. 1996). Por otro lado, también es importante mencionar la existencia de mecanismos de autorregulación en el epidídimo tales como baja presión de oxígeno, reducida concentración extracelular de iones H^+ , Ca^{2+} , Na^+ y HCO_3^- que ejercen un efecto inhibitor sobre el metabolismo y la movilidad de los espermatozoides, manteniéndolos, en la cauda epididimaria, en estado de reposo durante el proceso de almacenamiento (Breton y cols. 1996). La producción de lactato, principalmente en la pieza principal del epidídimo contribuye a mantener el pH ácido, evitando así, la activación metabólica de los espermatozoides (Carr y cols. 1985).

Por otro lado, las condiciones en la cauda del epidídimo favorecen la producción de ATP a través de la glucólisis anaeróbica (Storey y Kayne 1978), lo que permite la supervivencia de los espermatozoides ahí almacenados (Beu y cols. 2007). La barrera hemato-epididimaria también ayuda al mantenimiento de la viabilidad espermática debido a que favorece la existencia de un microambiente altamente especializado a lo largo de la luz y mediante la secreción y absorción activa de agua, iones, solutos orgánicos y proteínas (Hinton 1995).

La viabilidad espermática fue el otro parámetro que encontramos drásticamente reducido. De hecho, solo el 15 % de los espermatozoides estaban vivos en el día 60 postneurectomía comparado con el 90 % de espermatozoides vivos de los machos sham. Es posible que este efecto se deba a un daño en el funcionamiento del epidídimo. Este órgano al ser la continuación anatómica del testículo, se encuentra también dentro de la bolsa muscular

cremastérica (Zempoalteca y cols. 2002). Tal musculatura al ser denervada, no realiza la contracción y relajación requerida para llevar a cabo el ascenso/descenso testículo-epididimario. De este modo, no presenta el funcionamiento óptimo para proveer los requerimientos bioquímicos necesarios para propiciar la movilidad y viabilidad de los espermatozoides.

No solo la movilidad progresiva y la viabilidad espermáticas se dañaron, también se afectó negativamente la cuenta espermática a los 40 y 60 días postneurectomía. Podría sugerirse que se debió a una falla en la espermatogénesis. Si esto fuera así, seguramente se hubieran evidenciado alteraciones en la morfología testicular. Sin embargo, no hubo ninguna alteración morfológica con microscopía óptica en el intersticio, en la membrana basal ni en los túbulos seminíferos en los diferentes estadios de maduración del epitelio germinal (espermatogonias, espermocitos primarios, espermocitos secundarios, espermátidas y espermatozoides). Esto se constata con la evaluación del índice histopatológico y el de Johnsen (Vigueras-Villaseñor y cols. 2009, Johnsen 1970). Estos índices evalúan el nivel de daño tubular y espermatogénico en los cortes histológicos de testículo. En el índice histopatológico, la puntuación más cercana a cero corresponde al menor daño tubular. El máximo daño obtenido fue de 0.3 en el día 60 postneurectomía, no mostrando diferencia significativa con el 0.1 del grupo sham. En el índice de Johnsen la puntuación más cercana a 10 correspondió al menor daño tubular. El resultado de todos los grupos experimentales fue cercano a 10. Nuestros resultados coinciden con el estudio de Gutierrez-Pérez y cols. (2014) en el cual tampoco hubo cambios en la evaluación de ambos índices, es decir que, no se causa daño a nivel testicular a los 60 días postneurectomía. La disminución de la cuenta puede deberse a la alteración en la contracción del cremáster debido a la neuropatía, tras su denervación, dañando el proceso mecánico de expulsión de los espermatozoides durante la eyaculación (Ertekin y cols. 2007). Muy pocos estudios consideran que en la expulsión seminal participa el cremáster, más bien, la literatura se refiere solamente a un músculo estriado llamado bulboesponjoso (Allard y cols. 2005, Giuliano y Clement 2005). En efecto, la contracción del bulboesponjoso es crucial para este proceso mecánico de la expulsión seminal. Su actividad electromiográfica ha sido evidenciada tanto en la rata macho (Holmes y cols. 1991) como en el hombre (Gerstenberg y cols. 1990). Toda la atención se ha enfocado al bulboesponjoso dejando al margen al músculo cremáster cuya actividad es involuntaria a pesar de ser un músculo también estriado. Cabe recordar que el cremáster tiene

actividad refleja frente a los cambios de temperatura ambiental y a situaciones de estrés, así como durante la eyaculación en un encuentro sexual (Masters y Johnson 1987).

Nuestros hallazgos respaldan la hipótesis de que la sección del nervio genitofemoral, provoca alteraciones progresivas en las características seminales (movilidad, viabilidad y cuenta espermáticas), ya que la falta de contractilidad/relajación del músculo cremáster influye en los mecanismos subyacentes responsables de la disminución de la fertilidad (Robaire y cols. 2006). Se tiene conocimiento de que el epidídimo es un órgano dependiente de testosterona (O'Hara y cols. 2010). Dado que encontramos disminuidas la movilidad y viabilidadespermáticas, es probable que sus funciones epididimarias estén alteradas por la baja concentración de testosterona en los animales neurectomizados. La testosterona es secretada por las células de Leydig que se encuentran en el testículo. Se han evidenciado con microscopía electrónica y técnicas inmunohistoquímicas alteraciones en tales células debido a cambios en la temperatura testicular (Aktas y cols. 2009). Estas alteraciones incluyen aumento en la cantidad de células degenerativas, disminución en el número de células positivas para testosterona, ensanchamiento del retículo endoplásmico liso, mitocondrias sin crestas e incremento en la cantidad de gotas lipídicas. Estos hallazgos se obtuvieron exponiendo a los testículos a temperaturas disminuyendo la producción de testosterona (Aktas y cols. 2009). En nuestros experimentos no medimos la temperatura testicular después de la neurectomía, sin embargo, los testículos siempre permanecieron en el fondo de la bolsa escrotal, lo que resultó en la desregulación de la temperatura óptima testicular por la ausencia del ascenso/descenso de las gónadas debido a la denervación del cremáster.

A pesar de que no medimos la concentración de testosterona sistémica ni testicular, se puede inferir que la testosterona estaba reducida. Esto se respalda con los resultados del presente estudio, donde evaluamos el peso de algunas glándulas sexuales accesorias. Las vesículas seminales + glándulas coagulantes disminuyeron 24.62 % respecto a las mismas glándulas de los animales sham, mientras que, la próstata ventral disminuyó 15.63 % a los 60 días postneurectomía comparado con el peso prostático de los machos sham. Es relevante señalar que las investigaciones previas han mostrado que las glándulas sexuales accesorias dependen de los andrógenos (Creasy y cols. 2013). Así, su reducido peso se relaciona con una menor

concentración de testosterona, como se ha mostrado en ratas castradas (Brooks 1979). En un estudio donde indujeron farmacológicamente la disminución en la concentración de testosterona en roedores, se encontró que tanto el epidídimo como todas las glándulas sexuales accesorias, tuvieron repercusiones negativas. Estos órganos son mucho más sensibles que los testículos a un estado androgénico reducido y responden rápidamente con pérdida de peso, debido a la atrofia epitelial (adelgazamiento), apoptosis y disminución del contenido secretor que es proporcional al grado de pérdida hormonal (Creasy y cols. 2013). Consecuentemente, en nuestro estudio la reducción en los niveles de testosterona influyó en las disfunciones epididimarias.

Es importante considerar que, tanto el testículo como el epidídimo están rodeados por el músculo cremáster. Por lo tanto, el óptimo funcionamiento del epidídimo también depende de la regulación térmica adecuada, facilitada por la contracción y relajación del músculo cremáster.

X. CONCLUSIONES

La movilidad y viabilidad de los espermatozoides ocurren en el epidídimo, quizás cambios bioquímicos en el mismo produjeron que tales parámetros seminales redujeran sus valores, lo que puede explicar la fertilidad reducida a causa de la neurectomía del genitofemoral. Dado que no se encontraron daños morfológicos en los tubos seminíferos ni en la serie espermática, consideramos que la disminución en la cuenta espermática no puede deberse a fallas en la espermatogénesis. Es probable que se deba a la falta de contractilidad del cremáster tras su denervación, dañando así, la cantidad de espermatozoides expelidos durante la eyaculación. Finalmente, el hecho de que las glándulas accesorias hubieran perdido peso indica que la concentración de testosterona disminuyó, lo que sugiere alguna falla en la esteroidogénesis. Quizás la testosterona disminuida también influya en la cantidad y calidad de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias. De este modo, también afectarían el mantenimiento de la movilidad y viabilidad espermática en el tracto reproductivo de la hembra una vez ocurrida la eyaculación. Todo esto explica el porqué de la disminución en la fertilidad masculina.

XI. PERSPECTIVAS

Los hallazgos de la presente investigación sugieren continuar los efectos de la neurectomía del genitofemoral en un órgano bastante olvidado en los estudios reproductivos, el epidídimo. Analizar la morfología y la fisiología epididimaria será útil para dilucidar como se daña la movilidad y viabilidad de los espermatozoides mientras recorren el tubo epididimario. Es conveniente también determinar la concentración de testosterona en relación con el daño en células de Leydig por cambios de temperatura escrotal. Sin duda, las técnicas electrofisiológicas podrían evidenciar si la contracción del cremáster contribuye de manera sutil, aunque no menos importante, durante la eyaculación y con ello explicar la reducción en la cuenta espermática.

El presente trabajo de investigación pone de manifiesto que no todo está dicho respecto a la fisiología sexual masculina, el músculo cremáster y el epidídimo son estructuras que han sido un poco olvidadas en los estudios reproductivos, representando así un campo de oportunidad para seguir investigando.

XII. REFERENCIAS

- Aktas C y Kanter M (2009) A morphological study on Leydig cells of scrotal hyperthermia applied rats in short-term. *J Mol Histol* 40: 31-39.
- Allard J, Truitt WA, MaKenna KE, Coolen LM (2005) Spinal cord control of ejaculation. *World J Urol* 23:119-126.
- Austin CR y Short RV (1982) Reproducción en los Mamíferos, libro 3: Hormonas Reproductoras, Cambridge University Press: Cambridge.
- Banks S, King SA, Irvine DS y Saunders PT (2005) Impact of a mild- scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 129: 505-514.
- Benson GS (1988) Male sexual function: erection, emission and eyaculate. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill J (eds) New York: Raven Press. Pp 1063-1175.
- Brooks DE (1979) Influence of androgens on the weights of the male accessory reproductive organs and on the activities of mitochondrial enzymes in the epididymis of the rat. *J Endocrinol* 82: 293-303.
- Byers SW, Glover TD (1984) Effect of scrotal insulation on the pituitary-testicular axis of the ram. *J Reprod Fertil* 71: 23-31.
- Carr DW, Usselman MC y Acott TS (1985) Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod* 33: 588-595.
- Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52:198-236.
- Creasy DM y Chapin RE (2013) Male reproductive system. En: Elsevier eBooks. Pp 2493-2598.
- Dun RB (1956) Temporary infertility of rams associated with flooding. *Aus Vet J* 32: 1.
- Dun RB (1964) Skin folds and Merino breeding. 1. The net reproductive rates of flocks selected for and against skin fold. *Aust J Exp Agric Anim Husbandry* 4: 376.
- Ganong C, Uysal H, Bademkiran F y Altay B (2007) Sacrolumbar intersegmental reflex circuit in men and its relation to the ejaculatory process. *Clin Neurophysiol* 118: 2368-2374.
- Ertekin C, Bademkiran F, Yıldız N, Özdedeli K, Altay B, Aydogdu I y Uludag B (2005) Central and peripheral motor conduction to cremasteric muscle. *Muscle Nerve* 31: 349-354.
- Esser PH (1932) About the function and construction of the scrotum. *Z Microsc Anat Forsch* 31: 108.
- Fowler DG, Dun RB (1966) Skin folds and Merino breeding. The susceptibility of rams selected for a high degree of skin wrinkle to heat induced infertility. *Aust J Exp Agric Anim Husbandry* 6: 121.
- Frank H (2000) *Atlas de Anatomía Humana*. 2a edición Porto Alegre: Artmed.
- Gemmell RT, Sernia C (1989) The localization of oxytocin and mesotocin in the reproductive tract of the male marsupial bandicoot *Isodon macrorus*. *Gen Comp Endocrinol* 75: 103-109.
- Gerstenberg TC, Levin RJ y 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.
- Giuliano F y Clement P (2005) Physiology of ejaculation: Emphasis on serotonergic control. *Eur Urol* 48: 408-417.

- Greene EC (ed.) (1955) *Anatomy of the Rat*. New York: Hafner Publishing Co. Pp 31-115.
- González S, Suescun MO, Rulli SB, Estuariz F y Calandra RS (1994) Modulation of ornithine decarboxylase by prolactin in seminal vesicles of the rat. *Int J Androl* 17:143-148
- Goodman MH (1974) *Reproduction*. In: *Medical Physiology*, Vernon MB (ed). Vol II. Mosey Company. Saint Louis, Mo. Pp 1646-1672.
- Gutiérrez-Pérez O, Rojas-Castañeda JC, Chavez-Saldaña M, Reyes G y Viguera-Villaseñor RM (2014) Infertility in rats subjected to genitofemoral nerve section is not associated with testicular damage. *Rev Int Androl* 46: 151-157.
- Guyton CA (1987) *Fisiología Humana*. 6^{ta} edición. Ed. Interamericana S. A. de C. V. México, D. F.
- Hansen P (2009) Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 3341-3350.
- Hebel R, Stromberg MW (eds.) (1986) *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. Germany: Biomedical Verlag Pp 271-280.
- Hinton, BT y Palladino MA (1995) Epitelio del epidídimo: su contribución a la formación de un microambiente fluido luminal. *Microsc. Res. tecnología* 30: 67-81.
- Holmes GM, Chapple WD, Leipheimer RE y Sachs BD (1991) Electromyographic analysis of male rat perineal muscles during copulation and reflexive erections. *Physiol Behav* 49: 1235-1246.
- Huanca LW, Coronado SL y Galloway DB (2015) Efecto de la manipulación de la temperatura escrotal sobre las características clínicas, seminales y endocrinas en Carneros. *Rev Invest Vet (Perú)* 26: 604.
- Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH y Lee MS (2005) Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 84: 130-140.
- Jegou B, Laws AO y de Kretser DM (1984) Changes in testicular function induced by short-term exposure of the rat testis to heat: Further evidence for interaction of germ cells, Sertoli cells and Leydig cells. *Int J Androl* 7: 244-257.
- Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count – a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Horm Res Paediatr* 1: 2-25.
- Jones RC, Holland MK y Doberska C (1998) El epidídimo: aspectos celulares y moleculares. *J Reprod Fertil* 53: 1-292.
- Kierszenbaum A (2008) *Histología y biología celular*. Barcelona: Mosby Elsevier, 575.
- Kormano M (1967) Effect of circulatory disturbance of the testis on the rectumtestis difference in the rat. *Acta Physiol Scand* 69: 209.
- Koyanagi Y, Sawada K, Sakata-Haga H, Jeong YG y Fukui Y (2006) Increased serotonergic innervation of lumbosacral motoneurons of rolling mouse Nagoya in correlation with abnormal hindlimb extension. *Anat Histol Embryol* 35: 387-392.
- Kumar A y Farooq A (1994) Effect of oxytocin on the concentration of fructose in the accessory glands of mouse. *Life Sci* 55: 19-24.
- Larkins SL y Hutson JM (1991) Fluorescent anterograde labelling of the genitofemoral nerve shows that it supplies the scrotal region before migration of the gubernaculum. *Pediatr Surg Int* 6: 167-171.
- Luna LG (1968) *Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of*

- Pathology. New York: McGraw Hill/Medical Pp 52.
- Lucio RA, Flores Rojas G, Aguilar F, Zempoalteca R, Pacheco P y Velázquez-Moctezuma J (2001) Effects of genitofemoral nerve transection on copulatory behavior and fertility in male rats. *Physiol Behav* 73: 487-492.
- Lucio RA, Fuentes-Morales MR y Fernández-Guasti A (2023) Copulation in rats: Analysis of behavioral and seminal parameters. En: *Animal Models of Reproductive Behavior, Neuromethods*. Paredes RG, Portillo W, Bedos M (Eds). Humana Press. New York. 200: 235-264.
- Masters WH, Johnson VE y Kolodny RC (1987) *Fisiología Sexual*. En: *La Sexualidad Humana*. Barcelona: Ediciones Grijalbo. Pp 94-100.
- MacLaren APC (1988) Ram fertility in south-west Scotland. *Br Vet J* 144: 45-54.
- McClintock MK y Adler NT (1978) The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Behavior* 67: 67-96.
- Meisel RL y Sachs BD (1994) The physiology of male sexual behavior. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill JD (eds). Editorial Raven Press. New York. Vol II. Pp 3-105.
- Moore CR (1924a) Properties of gonads as controllers of somatic and psychical characteristics; testicular reactions in experimental cryptorchidism. *Am J Anat* 34: 269-316.
- Monesi V (1982) Espermatogénesis y Espermatozoides. En: *Reproduction in Mammals. Germ Cells and Fertilization*. Austin CR, Short RV (eds.) UK: Cambridge University Press. Pp 49- 88.
- Poiani A (2006) complexity of seminal fluid: a review. *Behav. Ecol. Sociobiol* 60: 289-310.
- Raeside JI, Christie HL y Renaud RL (1999) Metabolism of oestrone and oestradiol-17beta to conjugated steroids by accessory sex glands of the male pig. *J Endocrinol* 163:49-53.
- Rawson RO y Randall WC (1961) Vascular and sweating responses to regional heating of the body surface. *Appl Physiol* 16: 1006.
- Robaire B, Hinton TB, Marie-Claire y Orgebin-Crist (2006) The epididymis. En: *Physiology of Reproduction*. Knobil y Neill (eds). New York Raven Press.
- Russel L, Ettlin R, Hikim A y Clegg E (1990) Mammalian spermatogenesis. In: *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater. Cache River Press.
- Sanford ML, Baker JS (1990) Enhanced testosterone secretion in adult rams after establishment of a high-frequency, low-amplitude pattern of LH pulses in the non-breeding season occurs without changes in the number or binding affinity of testicular LH receptors. *Acta Endocrinol* 122: 55-61.
- Schwarz GM y Hirtler L (2017) The cremasteric reflex and its muscle - A paragon of ongoing scientific discussion: A systematic review. *Clin Anat* 30: 498-507.
- Setchell BP (1987) Spermatogenesis and Spermatozoa. En: *Reproduction in Mammals. Germ Cells and Fertilization*. Austin CR, Short RV (eds.) UK: Cambridge University Press. Pp 63-101.
- Setchell BP, Maddocks S y Brooks DE (1994) Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. En: *Physiology of Reproduction*. Knobil y Neill (eds). New York: Raven Press.
- Strauss JF, Martinez F y Kiriakidou M (1996) Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod* 54: 303-11.

- Viguera-Villaseñor RM, Molina-Ortiz D, Reyes-Torres G, Santamaría del Ángel D, Moreno-Mendoza NA, García-Cruz ME, Cuevas-Alpuche O y Rojas-Castañeda JC (2009) Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta Histochem* 111: 127-137.
- Waites GMH (1970) Regulación de la temperatura y los testículos. En: *El Testículo*. Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (eds.) New York and London: Academic Press. Pp 241-273.
- Watson ED, Nikolakopoulos E, Gilbert C, Goode J (1999) Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. *Theriogenology* 51: 855-865
- Zempoalteca R, Martínez Gómez M, Hudson R, Cruz Y y Lucio RA (2002) An anatomical and electrophysiological study of the genitofemoral nerve and some of its targets in the male rat. *J Anat* 201: 493-505.

XIII. Anexos



Sociedad Mexicana de Ciencias Urogenitales, A.C.

2nd Annual Meeting of Urogenital Sciences

September 28th to October 1st
2022

Hybrid Modality



Centro Cultural Universitario,
Universidad Autónoma de Tlaxcala

<http://www.smcurogenital.org>

Contact: smcucongreso@gmail.com



Tlaxcala, Tlax. 2022



Sociedad Mexicana de
Ciencias Fisiológicas



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS



International Continence Society



*2nd Annual Meeting of Urogenital Science
September 28th-October 1st, 2022*

SHOP-P4-29-2022

Efecto de la neurectomía del genitofemoral sobre el eyaculado de la rata macho

*Rebeca Varela Arzate¹, Marisel Sánchez Rivera², José Luis Morán Perales³, René Zempoalteca Ramírez², Margarita Juárez Romero² y Rosa Angélica Lucio*².*

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala; ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala ³Depto. Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Introducción y objetivos. Algunos padecimientos como las hernias inguinales y las deportivas pueden lesionar al nervio genitofemoral (nGf). Las lesiones de este nervio alteran la fisiología del cremáster y con ello, la testicular. El nGf inerva al músculo cremáster cuya contracción/relajación sirven para el ascenso/descenso testicular, respectivamente. De este modo, coadyuvan con la termorregulación adecuada del testículo para mantener la esteroidogénesis y la espermatogénesis. Hemos evidenciado que el nGf inerva profusamente al cremáster y que, la neurectomía bilateral del Gf, disminuye progresivamente la fertilidad. La hipótesis es que la sección del nGf provoca alteraciones progresivas en el eyaculado. Así, el objetivo es evidenciar el papel del nGf en la fisiología testicular determinando las características del eyaculado en distintos días después de la neurectomía.

Métodos. Se utilizaron ratas-macho Wistar de 300 g, sometidos a pruebas de entrenamiento copulatorio para adquirir experiencia sexual. En animales anestesiados (ketamina 15 mg/kg y xilacina 1 mg/kg, IP) se realizó la cirugía simulada (Cx sim) o se seccionó bilateralmente el nGf. A los 20, 40 y 60 días post-neurectomía se analizó en el eyaculado de una serie eyaculatoria, la cuenta, movilidad, viabilidad y morfología de los espermatozoides, asimismo, el peso y tamaño del tapón seminal.

Resultados. La sección del nGf disminuyó progresivamente la movilidad y viabilidad espermáticas (Tabla 1), el resto de los parámetros no cambiaron.

Conclusión. La neurectomía del Gf provoca la alteración progresiva en la movilidad y viabilidad espermática debido a la reducción del metabolismo del espermatozoide por la temperatura testicular no regulada.

Tabla 1. Parámetros alterados provocados por la sección del nGf en ratas-macho.

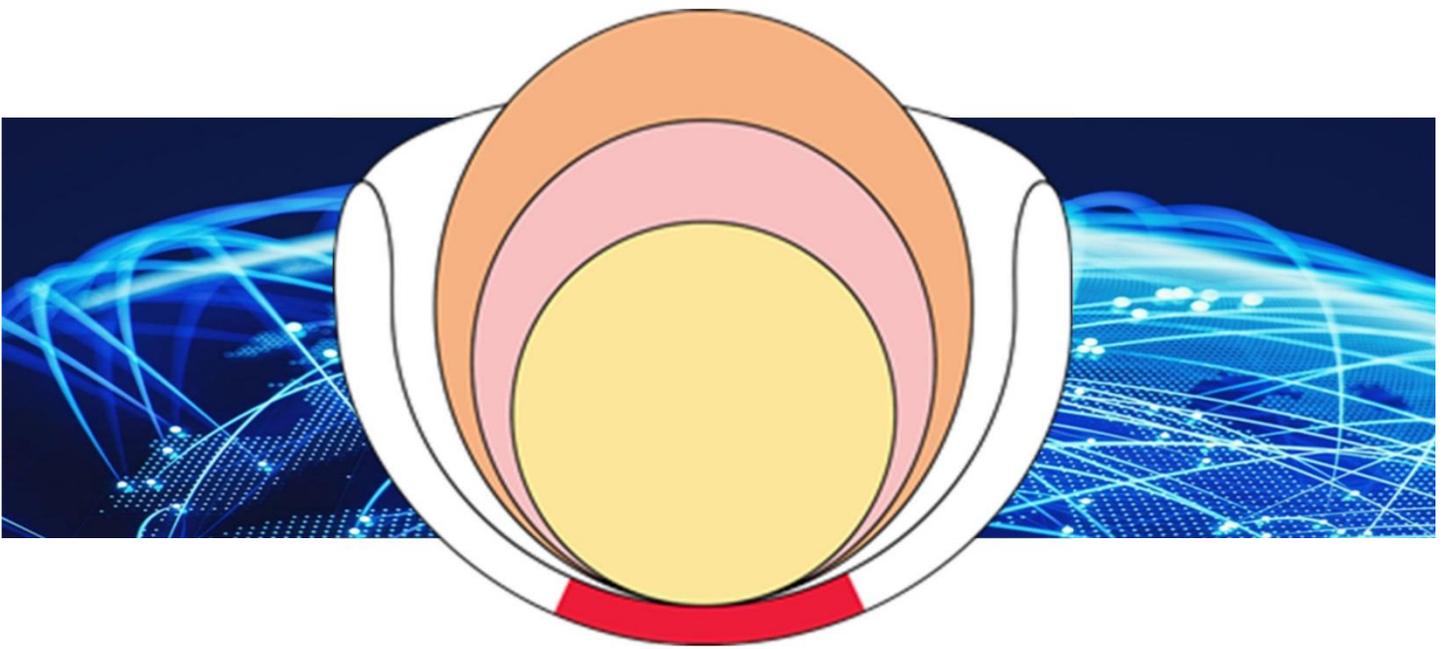
Parámetros del fluido seminal	Cx sim (n=3)	20 DPC (n=4)	40 DPC (n=4)	60 DPC (n=4)
Movilidad espermática (%)	77.6±1.7	76.5±0.91	60.6±4.81	7.0±4.41
Viabilidad espermática (%)	91.33±5.01	93.25±1.67	89.33±1.77	9.6±0.40

DPC=Días post-neurectomía.

Financiamiento. Beca CONACyT 1150387 (RVA).

THE SOCIETY FOR PELVIC RESEARCH

SEVENTH ANNUAL MEETING



MEETING PROGRAM

December 8-10, 2022
Charlotte, NC

#PelvRes22

Thursday, December 8, 2022

Trainee Affairs Committee Workshop

6:00 PM	Moderators: Michael Odom, PhD and Matthew Fraser, PhD	
	Emotional Intelligence: 5 skills to include in your Toolkit	Brittany Knight, PhD
	Career Exploration: Knowing your options and preparing for your next step	Brittany Knight, PhD
8:00 PM	Trainee Social	Michael Odom, PhD

Friday, December 9, 2022

8:00AM	Breakfast	
9:00 AM	Welcome, Day 1 Main Meeting	Kelvin Davies, PhD
	Session 1 Moderators: Molly Alexander and Kelvin Davies	
9:05 AM	Keynote Address - From Bench to Bedside - a 30-year journey	Arnold Melman, MD
9:55 AM	Q & A	
10:05 AM	Lumbosacral spinal proteomic changes during PAR4-induced persistent bladder pain: effect of spinal MIF antagonism.	Ye, Shaojing (Vera)
10:20 AM	Diabetic Bladder Dysfunction in Male Akita Mice Progresses Directly to an Underactive Phenotype in a NLRP3-Independent Manner	Hughes, Monty
10:35 AM	Detrusor contractility via FP receptor activation is increased in diabetic mice with bladder underactivity	Odom, Michael*
10:50 AM	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (Nox)-derived reactive oxygen species (ROS) modulate muscle function in dog bladders	Frara, Nagat
11:05 AM	Expression of nicotinic receptors in the intramural ganglion neurons of dog bladders	Frara, Nagat
11:20 AM	Q & A	
11:30 AM	Lunch	
	Session 2 Moderators: Anissa Cervantes and Margot Damaser	
12:30 PM	State of the Art Speaker / ICS Ambassador - Pragmatic Regenerative Therapies for the Female Pelvic Soft Tissues	Marianna Alperin, MD MS
1:20 PM	Q & A	Q & A
1:30 PM	Cremaster muscle denervation modifies some characteristics of the ejaculate	Varela Arzate, Rebeca
1:45 PM	Iodine supplementation reduces the expression and secretion of cytokines in the pathological prostate cell line stimulated with estrogens or tumor necrosis factor	Alvarez Cardenas, María de Lourdes
2:00 PM	An injection of botulinum toxin type A at the injured site of a spinal cord injury improves lower urinary tract function in female rats	Gandara, Cynthia*
2:15 PM	Non-genomic effect of estradiol on L6 dorsal roots response to glans penis stimulation in rats	Oloarte, Martin
2:30 PM	Transcutaneous electrical stimulation of the dorsal nerve of the clitoris differentially facilitates recovery of tonic and bursting activity of the striated urethral sphincter in	Juarez Mirto, Ricardo+

2:45 PM **Q & A**
2:55 PM **BREAK**

Title: Cremaster muscle denervation modifies some characteristics of the ejaculate.

Authors: Rebeca Varela Arzate*¹, René Zempoalteca Ramírez², and Rosa Angélica Lucio².

Affiliations: ¹Master in Biological Sciences, Autonomous University of Tlaxcala; ²Tlaxcala Center for Behavioral Biology, Autonomous University of Tlaxcala.

Introduction/Objectives: In male rats, the cremaster muscle is a sac-shaped and is constituted by the convergence of the internal oblique and transverse abdominal muscles. Contraction and relaxation of the cremaster allow testicular descent and ascent, respectively, moving the testes away or closer to the abdominal cavity. Such movement results in the testicular temperature regulation 2-4°C lower than the body temperature. Thereby, the cremaster muscle contributes to the appropriate testicular thermoregulation maintaining the physiology of the testes i.e., steroidogenesis and spermatogenesis. The cremaster muscle is richly innervated by both branches of the genitofemoral nerve (Gfn), the femoral (lateral) and the genital one (medial). The Gfn can be damage due to inguinal hernias and sports hernias. Injuries to this nerve, probably change the contractile activity of the cremaster muscle thus the physiology of the testis.

The goal is to demonstrate the relationship between the inactivity of the cremaster muscle and the characteristics of the ejaculate at different days after cremaster muscle denervation.

Methods: Wistar male rats of 300 g of body weight were used. They were sexually trained during at least four copulatory tests. In anesthetized animals (ketamine 15 mg/kg and xylazine 1 mg/kg, IP) a midline abdominal incision was done to identify the descending aorta since parallel to it runs the Gfn. To avoid regeneration, a 1-cm portion of the nerve was dissected and cut bilaterally. Sham-operated male rats were submitted to the same procedure without cutting the nerve. At 20, 40 and 60 days post-neurectomy, the ejaculate of one ejaculatory series was obtained from the uterine horns of the mated female. After the seminal parameters and the seminal plug were analyzed

Results: Gfn transection modified some seminal parameters but not the seminal plug (Table 1). Copulatory behavior did not show statistically significant changes. The postmortem examination of all the neurectomized animals revealed no evidence of regeneration.

Table 1. Altered parameters caused by Gfn in male-rats.

Seminal parameters	Sham (n=3)	20 DPN (n=4)	40 DPN (n=4)	60 DPN (n=4)
Progressive sperm motility (%)	77.6±1.7	76.5±0.91	61.25±4.01*	7.0±3.67**
Sperm viability (%)	91.33±5.01	93.25±1.67	89.25±1.45	9.6±0.35**
Sperm morphology (%)	99±0.1	98.75±0.35	99±0.1	99±0.1
Sperm count (10 ⁶)	31.27±2.28	29.76±1.68	26.93±0.50	26.68±1.46
Seminal plug weight (mg)	80.33±5.30	82±6.95	97.25±12.45	91±9.94

Data are expressed as mean±ee. Statistical comparison was between sham vs 20 DPN or 40 DPN or 60 DPN. DPN=Days post-neurectomy.

Conclusions: Gf neurectomy causes progressive alteration in sperm motility from 40 DPN onwards and sperm viability from 60 DPN. Respect to sperm motility, it is known that it is acquired in the epididymis, but the sperm do not acquire it due to the permanent lack of contractility of the cremaster muscle. Since the sperm cycle lasts 54 days in the testis, and 10 days in the epididymis, the greatest loss of sperm motility is observed at 60 DPN. In addition to the functional epididymal alteration, there is a steroidogenic testicular failure, which results in a decrease in testosterone. This affects the accessory sexual glands, that are androgen dependent for what reduce the quantity and/or the quality of the substances that keep the sperm viable for fertilization.

Funding Source: CONACyT Fellowship 1150387 (RVA).



Cremaster muscle denervation modifies some characteristics of the ejaculate



Rebeca Varela Arzate^{*1}, René Zempoalteca Ramirez²,
and Rosa Angélica Lucio²

¹Master in Biological Sciences, Autonomous University of Tlaxcala;
²Tlaxcala Center for Behavioral Biology, Autonomous University of Tlaxcala

