



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**



UNIDAD IZTAPALAPA

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

Influencia de la restricción crónica de sueño MOR sobre las características del eyaculado e histomorfología de las glándulas sexuales accesorias

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA:

**Biól. Exp. Ana Karen León Olguín**

DIRECTORA

**Dra. Anabel Jiménez Anguiano**

ASESORA

**Dra. Irma Jiménez Morales**

ASESOR

**Dr. Mario García Lorenzana**

CIUDAD DE MÉXICO, 2 DE MARZO DE 2018

## **Miembros del comité tutorial**

### **Directora**

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Área de Neurociencias. Depto. Biología de la Reproducción,

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

[aja@xanum.uam.mx](mailto:aja@xanum.uam.mx)

### **Asesores**

Dra. Irma Jiménez Morales

Área de Biología Celular y Molecular. Depto. Ciencias de la Salud,

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

[jimi@xanum.uam.mx](mailto:jimi@xanum.uam.mx)

Dr. Mario García Lorenzana

Área de Neurociencias. Depto. Biología de la Reproducción Animal,

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

[mglo@xanum.uam.mx](mailto:mglo@xanum.uam.mx)

## **Jurado**

Dra. Irma Jiménez Morales

Depto. Ciencias de la Salud. Área de Biología Celular y Molecular.

Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

[jimi@xanum.uam.mx](mailto:jimi@xanum.uam.mx)

Dr. Mario García Lorenzana

Área de Neurociencias. Depto. Biología de la Reproducción Animal,

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

[mglo@xanum.uam.mx](mailto:mglo@xanum.uam.mx)

Dr. José Luis Tlachi López

Área de Neurociencias. Depto. Biología de la Reproducción Animal,

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

[tlachijl@yahoo.com](mailto:tlachijl@yahoo.com)

Dr. Marcos García Juárez.

Centro de Investigación en Reproducción Animal. CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala.

[garcia\\_juarez\\_marcos@yahoo.com.mx](mailto:garcia_juarez_marcos@yahoo.com.mx)

## **Agradecimiento a**

El programa de la Maestría de Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT con número de registro 003797.

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 593024.

**El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neuroquímica del Sueño y con apoyo del equipo de Microscopía del Área de Neurociencias del Depto. de Biología de la Reproducción, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Iztapalapa**

## **Agradecimientos a:**

La Maestría de Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana por el apoyo para la asistencia al LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas del 13 al 17 de agosto del 2017, celebrado en la Ciudad de Monterrey, Nuevo León.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Influencia de la restricción crónica de sueño sobre las características del eyaculado e histomorfología de las glándulas sexuales accesorias” con fecha 2 de marzo de 2018.

## **JURADO**

### **PRESIDENTE**

**Dra. Irma Jiménez Morales**

---

### **SECRETARIO**

**Dr. Mario García Lorenzana**

---

### **VOCALES**

**Dr. José Luis Tlachi López**

---

**Dr. Marcos García Juárez**

---

*Somos del mismo material del que se tejen los sueños,  
nuestra pequeña vida está rodeada de sueños.*

*William Shakespeare*



## Dedicatorias

A mis queridos padres, Lidia y Arturo

Por quererme y sobre todo por sus ejemplos, que fueron el pilar de lo que soy ahora.

A mis hermanos, Vale y Luis

Por enseñarme a compartir y por alegrar mi vida con su llegada.

A mi amado esposo, David

Por ser parte de mis desvelos y por tu constante apoyo para superarnos, te amo.

A mi hija, Miranda

Para que veas en mí un ejemplo a seguir.

## Agradecimientos

A la Dra. Anabel por su apoyo. Por ser mí guía en esta etapa de mi vida académica, por el tiempo y dedicación que me brindó. Gracias.

A mis asesores, Dra. Irma y Dr. Mario, por sus oportunos comentarios y por compartir conmigo sus conocimientos.

A mis compañeras del laboratorio, Aylin y Mariana, pronto se convirtieron en amigas y confidentes, gracias por su apoyo.

A Nat, por toda la ayuda que nos brindaste, a Miranda y a mí.

A mis amigos Itzel, Pepe, Charly, Anabel y Omar, que con su amistad lograron hacerme menos difícil esta etapa de mi vida.

A todos los que me apoyaron y cuidaron, cuando Miranda ya estaba presente.

## Índice General

Abreviaturas .....	12
Índice de figuras .....	13
Índice de tablas .....	17
Resumen .....	18
Abstract .....	20
1. Introducción: .....	22
1.1. Ciclo sueño-vigilia .....	22
1.1.1. Modelos de Privación y Restricción de sueño MOR .....	24
1.2. Conducta Sexual .....	25
1.3. Formación del eyaculado .....	27
1.4. Características del fluido seminal de ratas .....	28
1.5. Histología de las glándulas sexuales accesorias .....	30
1.6. Sueño y reproducción .....	33
2. Antecedentes: .....	34
3. Justificación .....	36
4. Planteamiento del problema .....	37
5. Pregunta de investigación: .....	38
6. Hipótesis: .....	38
7. Objetivos: .....	38
7.1. Objetivo general .....	38
7.2. Objetivos particulares: .....	38
8. Diseño experimental: .....	39
8.1. Animales: .....	39

8.2.	Preparación de las ratas hembra para la evaluación de la CSM:.....	39
8.2.1.	Ovariectomías:.....	39
8.3.	Evaluación de la Conducta Sexual Masculina:.....	40
8.3.1.	Pruebas de entrenamiento copulatorio: .....	40
8.4.	Restricción Crónica de Sueño MOR.....	40
8.5.	Análisis del eyaculado de la rata:.....	41
8.5.1.	Obtención del semen en los cuernos uterinos:.....	41
8.5.2.	Análisis de los parámetros macroscópicos del eyaculado:.....	41
8.5.3.	Análisis de los parámetros microscópicos: .....	41
8.5.4.	Obtención del tapón seminal: .....	42
8.5.5.	Análisis macroscópicos del tapón seminal: .....	42
8.6.	Técnica histológica.....	43
9.	Estadística .....	44
10.	Diagrama de actividades .....	44
11.	Resultados.....	45
11.1.	Peso corporal y consumo de alimento y agua de las ratas .....	45
11.2.	Conducta Sexual Masculina.....	54
11.3.	Espermatobioscopía: .....	59
11.4.	Análisis histológico de las Vesículas Seminales .....	68
12.	Discusión de resultados .....	74
13.	Conclusiones:.....	82
14.	Perspectivas .....	83
15.	Referencias .....	84

## Abreviaturas

CSM	Conducta Sexual Masculina
DHT	Dihidrotestosterona
E <sub>2</sub>	Estradiol
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EOG	Electrooculograma
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
HE	Hematoxilina-Eosina
II	Índice de Intromisión
LH	Hormona Luteinizante
MOR	Movimientos Oculares Rápidos
MPOA	Área Preóptica Media
OVX	Ovariectomía
P	Progesterona
PS	Privación de Sueño
PSMOR	Privación de Sueño MOR
RCSMOR	Restricción Crónica de Sueño MOR
REC	Recuperación
S	Secreción
SCN	Núcleo Supraquiasmático
SHGB	Globulinas de Unión a Células Sexuales
SOL	Sueño de Ondas Lentas
T	Testosterona
TE	Tejido Epitelial
TM	Tejido Muscular
VLPO	Núcleo Preóptico Ventrolateral

## Índice de figuras

Figura 1. Ontogenia del sueño. Mostrando la disminución de la cantidad de sueño REM a lo largo de la vida de un ser humano. Tomado de: <a href="http://psicologia-fisiologica-roiel.blogspot.mx/2010/03/caracteristicas-conductuales-y.html">http://psicologia-fisiologica-roiel.blogspot.mx/2010/03/caracteristicas-conductuales-y.html</a> .....	22
Figura 2. Hipnograma. Ejemplo de la variación en las etapas de sueño que presenta un humano a lo largo de un periodo de sueño de 8 horas. Tomada de: <a href="https://www.sleepresolutions.com/blog/what-is-sleep-architecture-stages-and-cycles">https://www.sleepresolutions.com/blog/what-is-sleep-architecture-stages-and-cycles</a> .....	23
Figura 3. Cámara de privación de sueño, adaptada para la técnica de plataformas múltiples modificada.....	24
Figura 4. Conducta copulatoria de la rata, diferenciando entre monta, intromisión y eyaculación. (Tomado de Guevara-Pérez et al., 2011) .....	26
Figura 5. Comparación de las glándulas sexuales accesorias entre mamíferos que contribuyen a la formación del plasma seminal. Amarillo, glándulas ampulares; rojo, vesículas seminales; verde, próstata; magenta, glándulas bulbouretrales; naranja, glándula prepuccial) .....	30
Figura 6. Esquema que muestra la localización de las glándulas sexuales accesorias de rata, con respecto a la vejiga urinaria. a) Dorsal y b) Ventral. (Barra 1 cm) (Modificado de Tlachi-López et al., 2011).....	31
Figura 7. Esquema de las muestras obtenidas, fijadas y analizadas histológicamente. ....	43
Figura 8. Diseño experimental.....	44
Figura 9. Cambio en el peso de las ratas al término de las 20 horas de vigilia (A) y al término del periodo de sueño (B) durante la RCSMOR y en el periodo de REC (C). El grupo RCSMOR muestra disminución en el peso durante la restricción y el periodo de recuperación. ( $X \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ); * $p < 0.05$ , diferente contra el control.	49
Figura 10. Consumo de alimento durante el periodo de sueño a lo largo de la RCSMOR (A) y REC (B). El grupo RCSMOR muestra la disminución en el consumo de alimento durante el periodo de restricción, aumentando en la	

recuperación en comparación al grupo control. ( $X \pm E.E.$ ) $n = 4$ ; * $p < 0.05$ , diferente contra el control).....	51
Figura 11. Consumo de agua en el periodo de sueño durante la RCSMOR (A) y REC (B). Durante la restricción el grupo RCSMOR consume menos agua comparado con el control. ( $X \pm E.E.$ ) $n = 4$ ; * $p < 0.05$ , diferente contra el control. .	53
Figura 12. Latencia a Monta (A), Intromisión (B) y Eyaculación (C) de una serie eyaculatoria a lo largo del periodo de RCSMOR y REC. ( $X \pm E.E.$ ) ( $n=4$ ) * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , diferente contra el control. ....	56
Figura 13. Número de Montas (A) e Intromisiones (B) de una serie eyaculatoria a lo largo de la RCSMOR y en el periodo de recuperación. ( $X \pm E.E.$ ) ( $n=4$ ). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas.....	57
Figura 14. La duración de la serie eyaculatoria (A) muestra una tendencia a disminuir a lo largo de la RCSMOR y REC, lo que indica que les llevó menos tiempo alcanzar el umbral eyaculatorio. En cuanto al Índice de intromisión solo se ve afectado durante la RCSMOR, mejorando durante la REC. ( $X \pm E.E.$ ) ( $n=4$ ). El análisis estadístico no mostró cambios significativos.....	58
Figura 15. La concentración espermática (A) expresada en $10^6/ml$ , disminuye a partir de los 7 días de RCSMOR y se mantiene baja a pesar de que los animales estén en el periodo de REC. El Color del eyaculado (B) vario a los 7 y 21 días de RCSMOR, siendo en este último donde se mostró un 100% de muestras transparentes, coincidiendo en A con la ausencia de espermatozoides en la muestra. ( $X \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ) * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ diferente contra el control.....	61
Figura 16. A lo largo de la RCSMOR y REC la viabilidad (A) de los espermatozoides disminuye considerablemente y la mortalidad (B) de manera complementaria aumenta. ( $X \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ). * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , diferente contra el control; ¥ diferente contra REC7d $p < 0.05$ ). ....	62
Figura 17. El análisis de la movilidad espermática muestra la disminución en el porcentaje progresiva (A) e insitu (B) durante la RCSMOR y REC, mientras los espermatozoides inmóviles (C) incrementaron ( $X \pm E.E.$ ) $n = 4$ . * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ diferente contra el control; ¥ diferente contra REC7d $p < 0.05$ ). ....	63

Figura 18. El análisis cuantitativo del tapón mostró la disminución del largo (A), ancho (B) y peso (C) a los 7 días de RCSMOR. ( $X \pm E.E.$ )  $n = 4$ . \* $p < 0.05$  diferente contra el control; £ diferente contra RCSMOR 7 d  $p < 0.05$ ). ..... 65

Figura 19. Características cualitativas del tapón seminal a lo largo de la RCSMOR y la REC. Consistencia (A) y Adhesión (B). ( $X \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ) ..... 67

Figura 20. Fotomicrografías de la histología de las Vesículas seminales de la rata. Se observan cambios importantes en la estructura de la mucosa (punta de flecha) y secreción (S) durante el periodo de RCSMOR en comparación con el control. A los 7 días de RCSMOR se observó la disminución de la secreción dentro de las criptas de la mucosa (flecha). A los 14 días de RCSMOR se observó un incremento en la secreción en el lumen (recuadro superior derecho), sin embargo, se mostró una disminución en los pliegues de la mucosa. A partir de los 7 y 14 días de recuperación se observaron cambios en la estructura de la mucosa y la cantidad de secreción en las criptas. (HE, Barra 100  $\mu\text{m}$ , aumento original X50; recuadros superiores derechos aumento original X12.50, Barra 400  $\mu\text{m}$ ). Tejido muscular (TM). ..... 70

Figura 21. Fotomicrografías que destacan la altura del epitelio de vesículas seminales de rata. Se observó en el control la composición del epitelio (\*), con un núcleo (flecha) alargado y ubicado de manera basal, con un citoplasma ocupado con vesículas secretoras (\*\*) y abundante secreción (S) en las criptas. Se notan cambios ocasionados por las RCSMOR a los 14 días, con disminución de la altura y de las vesículas de secreción; de igual manera disminuyó la secreción observada en las criptas. (HE, Barra 10  $\mu\text{m}$ , aumento original X400). ..... 71

Figura 22. Gráficas del análisis cuantitativo de la histología de vesículas seminales. (A) área total de la glándula, (B) área de secreción y (C) altura del epitelio. Comparación entre el control y los días de RCSMOR y recuperación. ( $X \pm E.E.$ )  $n = 4$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  diferente al control; £ diferente a RCSMOR 7 días  $p < 0.05$ ; § diferente a RCSMOR 7 d  $p < 0.01$ ; & diferente a RCSMOR 14 d  $p < 0.05$ ) ..... 73

Figura 23. Modelo propuesto del efecto de la RCSMOR sobre el eje H-H-G. Se propone que las alteraciones ocasionadas sobre las vesículas seminales y calidad



espermática pueden estar dadas por el incremento de ghrelina o de glucocorticoides, influyendo para que incremente Kiss, afectando el eje HHG con la inhibición de GnRH y LH. .... 81

## Índice de tablas

Tabla 1. Dilución del semen según la densidad espermática <sup>12</sup> .....	42
Tabla 2. Peso corporal (g) de las ratas a lo largo de la RCSMOR a las 08:00 am.	46
Tabla 3. Peso corporal (g) al término del periodo de sueño (12:00 pm) a lo largo de la RCSMOR.....	47
Tabla 4. Peso corporal (g) de las ratas a lo largo de la REC. ....	48
Tabla 5. Consumo de alimento (g) después de las 4 h de sueño, a lo largo de la RCSMOR y durante la REC. ....	50
Tabla 6. Consumo de agua (ml) a lo largo de la RCSMOR y en la REC, después de las 4 h de sueño .....	52
Tabla 7. Parámetros evaluados en la CSM a lo largo de la RCSMOR y en el periodo de REC.....	55
Tabla 8. Análisis microscópico del eyaculado de rata. ....	60
Tabla 9. Análisis cuantitativo del tapón seminal .....	64
Tabla 10. Análisis cualitativo del tapón seminal. (X) .....	66
Tabla 11. Área del epitelio secretor, área de secreción y altura del epitelio de las vesículas seminales a lo largo de la RCSMOR y recuperación.....	72

## Resumen

El sueño es un proceso fisiológico de vital importancia para la salud integral de los organismos y es fundamental para el desempeño óptimo de las diversas actividades diarias. Durante el sueño se ha mostrado que ocurren los mayores picos de liberación de diversas hormonas involucradas en la reproducción. En el sueño de ondas lentas ocurre la liberación de la Hormona Luteinizante (LH) y en el primer episodio de sueño MOR, se libera la Testosterona (T). Asimismo, se ha evidenciado que la supresión o reducción de sueño promueve la aparición de diferentes alteraciones reproductivas, tales como: cambios en la Conducta Sexual Masculina (CSM), daño en órganos andrógeno dependientes y cambios histomorfológicos del testículo y de la próstata ventral. Sin embargo, aún no ha sido descrito el efecto temporal de la restricción crónica de sueño MOR (RCSMOR), sobre la CSM, análisis del eyaculado e histomorfolología de las vesículas seminales, así como durante el periodo de recuperación (REC). Por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la RCSMOR sobre la CSM, calidad espermática e histomorfolología de las vesículas seminales, durante la RCSMOR y en el periodo de REC. Se utilizaron 24 ratas macho, las cuales fueron colocadas de manera aleatoria en los siguientes grupos (n=4): 1) Control, 2) RCSMOR 7 días, 3) RCSMOR 14 días, 4) RCSMOR 21 días, 5) REC 7 días y 6) REC 14 días. La RCSMOR se realizó mediante la técnica de plataformas múltiples modificadas, los animales se mantuvieron con una vigilia prolongada de 20 h, permitiéndoles dormir sólo 4 h al día. Al final de la RCSMOR a los grupos 5 y 6 se les permitió recuperarse por 7 y 14 días, respectivamente. Se evaluó la CSM de todos los grupos, considerando los siguientes parámetros: latencias a monta, intromisión y eyaculación, número de montas e intromisiones, duración de la serie eyaculatoria e índice de intromisión. La obtención de muestras del eyaculado y de las vesículas seminales, se hicieron cada 7 días durante el periodo de RCSMOR y REC. El análisis del eyaculado se realizó el mismo día de las pruebas de CSM. Los órganos disectados fueron fijados en Bouin para su posterior procesamiento siguiendo la técnica histológica estándar para microscopia de luz, los cortes

obtenidos (7 $\mu$ m) fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) para su análisis cualitativo y cuantitativo en el software Axio Vision Rel 4.8. Los resultados mostraron que la RCMOR disminuyó la calidad del eyaculado desde la primera semana de RCMOR, afectando la concentración, movilidad y viabilidad espermática, aunque no modificó la CSM. En cuanto a la morfología de la vesícula seminal, la RCMOR a partir de los 7 días alteró la morfología del epitelio secretor, con una disminución de los pliegues sinuosos y de la secreción en criptas de la mucosa y lumen; así como el área total y altura del epitelio. Con estos resultados, concluimos que la RCMOR alteró la histomorfología de las vesículas seminales produciendo una disminución de las secreciones que conllevaron a una reducción de la calidad y transporte espermático, aunado a la modificación del tapón seminal.

## Abstract

The sleep is a physiological process of vital importance for the integral health of the organisms and is fundamental for the optimal performance of the diverse daily activities. During the sleep it has been shown that occur the greatest peaks of release of various hormones involved in the reproduction. In slow waves sleep, occurs the release of Luteinizing Hormone (LH) and on the first episode of rapid-eyes movements sleep (REM), Testosterone (T) release. Likewise, it has been shown that suppression or reduction of sleep produces the appearance of different reproductive alterations, such as: changes in Male Sexual Behavior (MSB), damage in organs androgen-dependent and histomorphology changes of the testicle and in the ventral prostate. However, it has not been described the temporal effect of the chronic REM sleep restriction (REMSR), on the MSB, analysis of the ejaculate and histomorphology of the seminal vesicles, as well as during the recovery period (REC). Therefore, the aim of the work was to evaluate the effect of the REMSR on the MSB, the spermatic quality and histomorphology of the seminal vesicles, during the REMSR and in the REC period. Twenty-four male rats were used, which were randomly placed in the following groups (n = 4): 1) Control, 2) REMSR 7 days, 3) REMSR 14 days, 4) REMSR 21 days, 5) REC 7 days and 6) REC 14 days. The REMSR was performed by a modified multiple platform method, the animals were kept with a prolonged wake of 20 h, allowing them to sleep only 4 h per day. At the end of the REMSR, groups 5 and 6 recovered for 7 and 14 days, respectively. The MSB of all the groups was evaluated, considering the following parameters: mounts, intromission and ejaculation latencies, number of mounts and intromissions, duration of the ejaculatory series and copulation rate. Obtaining samples of the ejaculate and the seminal vesicles was done every 7 days during the period of REMSR and REC. The analysis of the ejaculate was done on the same day as the MSB tests. The organs dissected were fixed in Bouin for later processing them following the standard histological technique for light microscopy, the sections obtained (7  $\mu$ m) were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) for qualitative and quantitative analysis

in the Axio Vision Rel software. 4.8. The results showed that the REMSR decreased the quality of the ejaculate from the first week of REMSR, affecting the concentration, motility and sperm viability, although it did not modify the MSB. Regarding the seminal vesicle morphology, the REMSR after 7 days altered the morphology of the secretory epithelium, with a decrease in the sinuous folds and secretion in the crypts of the mucosa and luminal region; as well as total area and height of the epithelium. With these results, we concluded that the REMSR altered the histomorphology of the seminal vesicles, producing a decrease in the secretions that led to a reduction in the quality and sperm transport, joined with the modification of the seminal plug.

# 1. Introducción:

## 1.1. Ciclo sueño-vigilia

El ciclo sueño-vigilia ha sido estudiado con gran interés desde el siglo pasado. Constituye uno de los eventos neurobiológicos más complejos y de gran importancia en la historia evolutiva de los organismos, en especial de los mamíferos. El sueño es considerado un proceso fisiológico de vital importancia para la salud integral de los seres humanos<sup>1</sup>, ocupa un enorme espacio temporal en la vida de los organismos<sup>2</sup> y es fundamental para el desempeño óptimo de las actividades diarias<sup>3</sup> (Fig. 1).

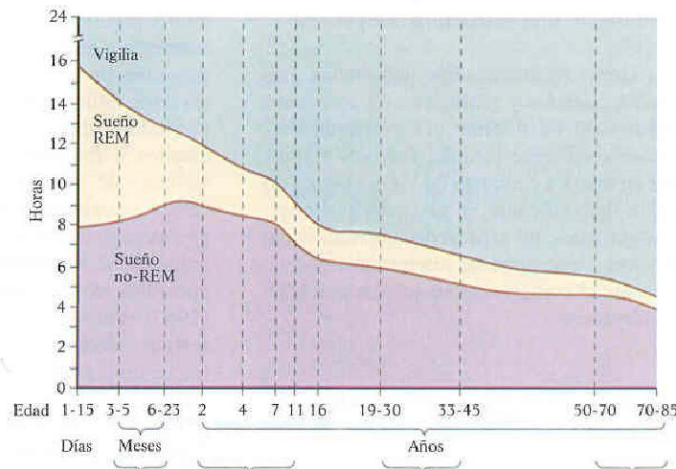


Figura 1. Ontogenia del sueño. Mostrando la disminución de la cantidad de sueño REM a lo largo de la vida de un ser humano. Tomado de: <http://psicologia-fisiologica-roiel.blogspot.mx/2010/03/caracteristicas-conductuales-y.html>

Para poder entender qué es el sueño, como se genera y sus implicaciones fisiológicas, se ha logrado el desarrollo de la instrumentación necesaria para su estudio. A principios del siglo XX, gracias al advenimiento del electroencefalograma (EEG), fue posible iniciar el estudio científico de lo que ocurría en el cerebro durante este periodo. Las bandas del EEG, junto con la información generada por la actividad muscular (EMG) y con la de los movimientos de los ojos captada por el electrooculograma (EOG)<sup>4</sup>, son ampliamente aceptadas y usadas con un excelente grado de confiabilidad para la realización de registros polisomnográficos, permitiendo el registro simultáneo de diversas variables

fisiológicas en humanos y en otros mamíferos <sup>5,6</sup>. El sueño en humanos, suele dividirse en dos fases que, de forma normal, ocurren siempre en la misma sucesión: todo episodio de sueño comienza con el llamado sueño sin Movimientos Oculares Rápidos (no MOR), que se subdivide en varias fases (N1, N2 y N3), y después se presenta el sueño con Movimientos Oculares Rápidos (Sueño MOR)<sup>1</sup>.

En los laboratorios de investigación de sueño, los animales más utilizados son las ratas y gatos, en ellos se distingue también el sueño no MOR, pero éste se subdivide en: Sueño de Ondas Lentas I y II (SOL I y II), y la última etapa es la de Sueño MOR, en la que al igual que en el humano ocurre la pérdida del tono muscular y la presencia de movimientos oculares rápidos. En el humano, se ha descrito la aparición de cuatro a seis ciclos de sueño MOR en intervalos de 90 min aproximadamente, los cuales son más largos y frecuentes en la segunda mitad de la noche (Fig. 2).

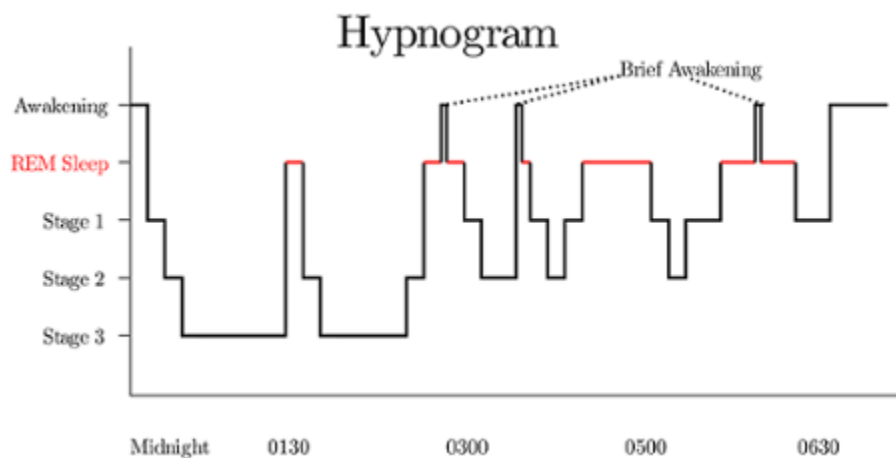


Figura 2. Hipnograma. Ejemplo de la variación en las etapas de sueño que presenta un humano a lo largo de un periodo de sueño de 8 horas. Tomada de: <https://www.sleepresolutions.com/blog/what-is-sleep-architecture-stages-and-cycles>

Por otra parte, se ha evidenciado que la vigilia es mantenida por la actividad de neuronas del hipotálamo lateral, el inicio y mantenimiento del SOL por neuronas del núcleo preóptico ventrolateral (cuyas siglas en inglés son VLPO) y el sueño MOR por las neuronas glutamatérgicas y colinérgicas del núcleo pedúnculo



pontino<sup>7</sup>. El ciclo sueño-vigilia es un ritmo circadiano regulado por el núcleo supraquiasmático (SCN). Se ha descrito que la señal lumínica es captada por la retina y se proyectará indirectamente a la zona paraventricular, hipotálamo dorsomedial y área preóptica media; y se extiende directamente al VLPO. Aunque la secreción de testosterona no es circadiana, requiere del inicio del sueño para comenzar su síntesis y secreción.

#### 1.1.1. Modelos de Privación y Restricción de sueño MOR

Si por alguna razón, un sujeto adulto permanece despierto más de 16 h, fenómeno conocido como Privación de Sueño (PS), gradualmente le será más difícil permanecer despierto<sup>4</sup>. En modelos animales (Fig. 3), se describe a la privación selectiva de sueño MOR (PSMOR) como una vigilia prolongada, regularmente desde 24 hasta 96 horas. Diversos reportes han descrito que posterior al periodo de PSMOR, durante el periodo de recuperación, ocurre un incremento en la cantidad de sueño MOR, asociado con una disminución en la latencia al primer periodo, por lo que se denomina rebote de sueño<sup>8</sup>.



Figura 3. Cámara de privación de sueño, adaptada para la técnica de plataformas múltiples modificada.

La PSMOR en modelos animales ofrece la ventaja de elucidar las funciones del sueño en el organismo. En este sentido, se ha evidenciado que la PSMOR disminuye los procesos de memoria y aprendizaje, la resistencia a infecciones<sup>5</sup>, la concentración de las hormonas tiroideas y de la testosterona, y promueve alteraciones de los órganos reproductores y en el despliegue de la conducta sexual<sup>9</sup>. Sin embargo, no puede extrapolarse completamente al humano ya que es una condición sumamente drástica, por lo que el esquema de PSMOR se ha modificado por el de Restricción Crónica de Sueño MOR (RCSMOR). En este modelo, el animal se somete a periodos

prolongados de vigilia, permitiéndole dormir sólo de 4 a 6 horas, simulando la reducción de horas de sueño que el humano registra en la época actual.

## 1.2. Conducta Sexual.

La conducta sexual es la expresión de una función muy importante en la fisiología reproductiva de un organismo. Esto puede conllevar a la unión de los gametos, masculino y femenino, de una pareja de individuos de la misma especie<sup>10</sup>, permitiendo que la información genética de estos sea transmitida a la siguiente generación. La expresión del comportamiento sexual en los mamíferos depende de la interacción de al menos dos mecanismos: 1) Motivacional, el cual lleva al individuo a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja. En éste, se puede evaluar el deseo de copular, a través de la determinación de las latencias de monta e intromisión, es decir, el tiempo que tarda el macho en realizar la primera monta e intromisión<sup>11</sup>. 2) Consumatorio, el cual permite llevar a cabo dicha interacción, se asocia a su ejecución y se evalúa registrando las frecuencias: de monta y de intromisión, así como la eficiencia copulatoria<sup>11</sup>. Sobre estos dos actúa un mecanismo modulador (principalmente mediado por receptores andrógenos sin excluir la participación de un mecanismo estrógeno) que puede inhibir la expresión del comportamiento sexual bajo condiciones inapropiadas, por ejemplo aquellos que pongan en riesgo la seguridad de la pareja<sup>10</sup>.

La Conducta Sexual Masculina (CSM) de la rata es una de las mejor descritas en comparación con otros mamíferos. Se pueden distinguir actividades que se identifican como precopulatorias, copulatorias y postcopulatorias<sup>12</sup>:

*Conducta Precopulatoria.* El macho y la hembra se olfatean la región anogenital, rozan sus cuerpos entre sí y emiten vocalizaciones ultrasónicas. De este modo ambos reciben estimulación olfativa, táctil y auditiva. Además, la hembra estimula visualmente al macho al realizar conductas que se conocen como proceptivas, las cuales consisten en mover rápidamente las orejas, correr en zig-zag o dar

pequeños saltos. La duración de esta conducta es variable, puede ser extremadamente corta (escasos segundos) o larga (algunos minutos).

*Conducta copulatoria.* La cual consiste en la ejecución de diversas posturas y movimientos que permiten la inserción peneana y la expulsión de líquido seminal. En esta conducta se distinguen

tres patrones en el macho: 1) Monta, el macho sujeta a la hembra y palpa sus flancos y la desmonta de manera lenta; 2) Intromisión, la cual implica la monta más la inserción del pene en la vagina mediante movimientos pélvicos y 3) Eyaculación, en ésta, el macho monta a la hembra y despliega el último de los movimientos pélvicos, se caracteriza por ser más profundo y duradero que

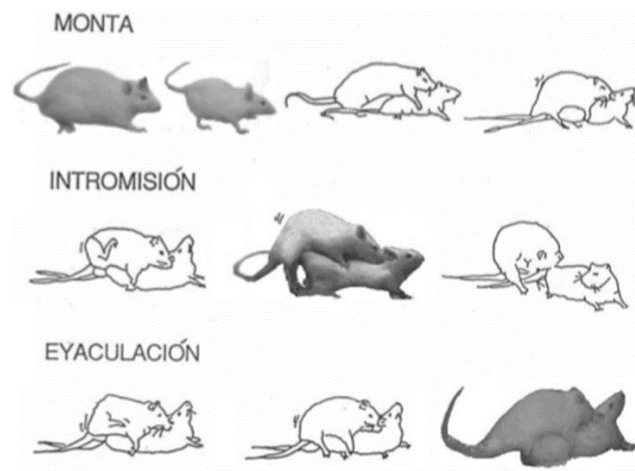


Figura 4. Conducta copulatoria de la rata, diferenciando entre monta, intromisión y eyaculación. (Tomado de Guevara-Pérez et al., 2011)

una intromisión, lo que permite depositar el semen en la vagina (Fig. 4).

*Conducta postcopulatoria.* Comprende dos periodos: 1) El refractario absoluto, en el cual el macho presenta muy poca locomoción, además de que es insensible a cualquier estímulo sexual o del ambiente. 2) El periodo refractario relativo, en el cual el macho comienza a responder a los estímulos de cualquier tipo y usualmente emite vocalizaciones ultrasónicas<sup>12</sup>.

A partir de la información descrita se puede evidenciar que la CSM de la rata puede utilizarse como un modelo bien caracterizado que nos permite estudiar la influencia de diversos factores que pueden alterarla.

### 1.3. Formación del eyaculado

Un adecuado despliegue de la CSM conlleva a la expulsión y depósito del eyaculado en el orificio vaginal de la hembra. El fluido seminal es un líquido que contiene a los espermatozoides, la producción de estos ocurre en dos etapas, la espermatogénesis y la espermiogénesis; en la primera las células descendientes de las espermatogonias se despegan de la lámina basal comienza el proceso de división mitótica originando espermatogonias tipo A y tipo B, estas últimas siguen un proceso de meiosis pasando así por las etapas de espermatocito I, espermatocito II, espermatíde y finalmente se lleva a cabo la espermiogénesis, donde la espermatíde reduce el citoplasma, el núcleo se alarga y queda en la cabeza, las mitocondrias se colocan en el cuello y los centriolos originan un flagelo, para tener así la formación completa de un espermatozoide<sup>13</sup>. En los mamíferos se lleva a cabo en los túbulos seminíferos a lo largo de la vida reproductiva del macho.

Los espermatozoides formados son transportados del lumen de los túbulos seminíferos hacia los conductos eferentes, uniéndose en un solo conducto altamente enrollado, el epidídimo; el cual se ocupa del transporte, concentración, protección y almacenamiento de los espermatozoides. El epidídimo se divide en cuatro partes principales: 1) Segmento inicial, 2) cabeza (*caput*), 3) cuerpo (*corpus*) y 4) cola (*cauda*)<sup>48</sup>. El epidídimo de los mamíferos consta de un conducto único contorneado sobre sí mismo, lo que en la histología refleja múltiples túbulos separados por un delgado estroma altamente vascularizado y cubierto por una túnica albugínea compuesta de fibras de colágeno y elásticas. A lo largo del lumen del epidídimo, se forma un microambiente altamente especializado debido a la absorción de agua, iones, solutos orgánicos y proteínas; su papel protector se debe principalmente a la síntesis y secreción de enzimas antioxidantes<sup>48</sup>.

En la formación del eyaculado de la rata participan diferentes componentes del aparato reproductor masculino, como son las glándulas sexuales accesorias

(glándulas ampulares, vesículas seminales, glándulas coagulantes, próstata (con sus lóbulos ventrales y dorsales)).

Para formar el eyaculado, los espermatozoides provenientes de la cauda del epidídimo llegan a la uretra donde son embebidos en las secreciones de las glándulas ampulares y lóbulos prostáticos, estas secreciones son ricas en zinc, ácido cítrico y proteínas cuya función es promover la movilidad de los espermatozoides; por último, se libera secreción de las vesículas seminales, que sirve como fuente de energía por su alto contenido de fructuosa y al mismo tiempo, ocurre la secreción de las glándulas coagulantes cuyas enzimas coagulan el fluido seminal para la formación del tapón seminal. Así, la secreción de cada glándula proporciona volumen al fluido seminal<sup>12</sup>.

Cuando el fluido seminal es depositado en la vagina, parte de este fluido atraviesa el cérvix para llegar a los cuernos uterinos a esta porción se le considera como semen, el resto del fluido se queda depositado en la vagina, para endurecerse y formar el tapón seminal; ambos (semen y tapón seminal) constituyen el eyaculado de la rata.<sup>12</sup>

#### **1.4. Características del fluido seminal de ratas**

El líquido seminal se puede analizar considerando parámetros macroscópicos y microscópicos. Los parámetros macroscópicos que se pueden analizar en el semen son: a) Volumen, es la cantidad de semen expelido el cual se expresa en ml, aunque por el método de obtención (directamente de los cuernos uterinos de la hembra inseminada) es difícil determinarlo ya que tanto los fluidos de la hembra y del macho se combinan; b) Color, es la tonalidad del semen y normalmente se caracteriza por ser de color blanco, la ausencia de color indica la carencia de espermatozoides; c) Viscosidad, hace referencia a la consistencia del fluido seminal, es expresado en mm con un rango entre 2 a 3 y d) pH, va a indicar la alcalinidad o acidez del fluido seminal, con un rango entre 5.5 y 9.0. Los parámetros microscópicos del fluido seminal se dividen en: a) Movilidad espermática, es el movimiento individual de los espermatozoides expresado en

porcentaje, considerándolos con movimiento progresivo rápido (42-51%) o lento (28-36%), *in situ*, es decir que no se desplazan (12-16%) e inmóviles (6-10%); b) Concentración espermática, es la estimación del número de espermatozoides contenidos en el semen en relación a 1 ml, con un rango entre 12.50 a 19.50 x10<sup>6</sup> cel/ml; c) Viabilidad, es la estimación del número de espermatozoides, expresado en porcentaje, vivos (61-67%) o muertos en la muestra de semen y d) Morfología espermática, es la estimación de los espermatozoides con morfología normal (cabeza en forma de hoz y flagelo largo que termina en punta, 170 µm de largo), se diferencian entre normales y anormales<sup>12</sup>.

El tapón seminal presenta algunas características como: a) Consistencia, es la solidez del tapón seminal y se refiere como una consistencia endurecida; b) Peso, presenta un rango entre 104.66 a 126 mg; c) Tamaño, es la medida del largo (11.40-13.26 mm) y ancho (4.96-5.7 mm) del tapón seminal; d) Volumen, es la medida del espacio que ocupa el tapón y se expresa en milímetros cúbicos con un rango entre 75.77 a 96.30 mm<sup>3</sup>; y e) Elementos citológicos, expresados en porcentaje son las cabezas solas (64-85%), flagelos solos (11-25%) y espermatozoides contenidos en el tapón (inmóviles 0-3%)<sup>12</sup>.

## 1.5. Histología de las glándulas sexuales accesorias

En mamíferos las glándulas sexuales accesorias están constituidas por: los lóbulos prostáticos, vesículas seminales, glándulas coagulantes, las glándulas ampulares y bulbouretrales. Las cuales presentan diferencias (Fig. 5) en cuanto a su número, localización, forma y tamaño entre las diferentes especies de mamíferos<sup>49</sup>.

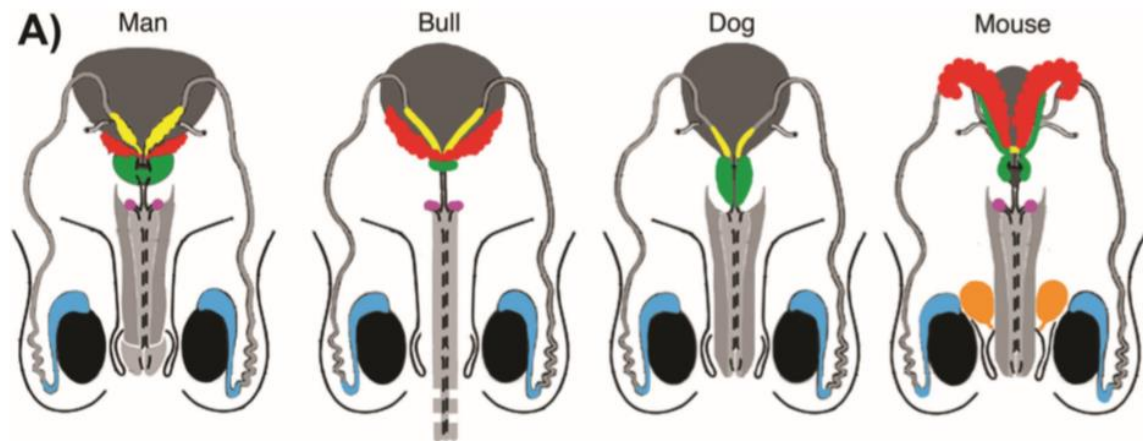


Figura 5. Comparación de las glándulas sexuales accesorias entre mamíferos que contribuyen a la formación del plasma seminal. Amarillo, glándulas ampulares; rojo, vesículas seminales; verde, próstata; magenta, glándulas bulbouretrales; naranja, glándula prepucial)

En la rata, la próstata está constituida por tres lóbulos distintos: a) ventral, b) dorsal y c) lateral (Figura 6). Los adenómeros son de tipo túbulo alveolar, con un revestimiento de epitelio simple cúbico a columnar. Cada adenómero está rodeado por una capa simple de músculo liso y un estroma constituido por tejido conectivo de tipo laxo areolar.

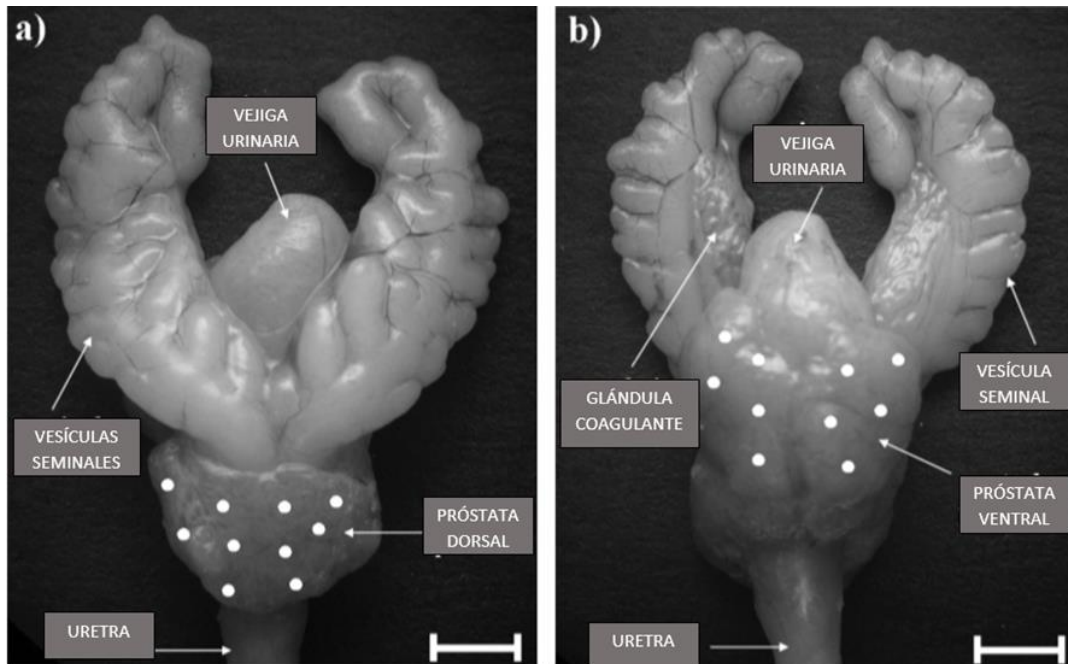


Figura 6. Esquema que muestra la localización de las glándulas sexuales accesorias de rata, con respecto a la vejiga urinaria. a) Dorsal y b) Ventral. (Barra 1 cm) (Modificado de Tlachi-López et al., 2011)

La próstata ventral presenta dos lóbulos que se encuentran unidos a la uretra por tejido conectivo y por una serie de ductos lineados constituidos principalmente por epitelio cuboidal que desembocan en la uretra. Los acinos de los lóbulos ventrales están altamente plegados, particularmente los acinos periféricos son más pequeños y ondulados. El epitelio de estos acinos es basófilo y principalmente columnar, con células cuboidales con núcleo localizado basalmente y con un área supranuclear prominente que corresponde al aparato de Golgi. Las secreciones de estos acinos son eosinofilas<sup>13</sup>.

El lóbulo dorsal está separado de los lóbulos laterales y está ligado a la uretra por tejido conectivo y algunos ductos. Los acinos del lóbulo dorsal son bastantes grandes y poco plegados, y están laxamente distribuidos dentro del tejido estromal. Los lóbulos están delineados por células cuboidales, con un núcleo central y área supranuclear. En tanto que los lóbulos laterales están igualmente unidos a la uretra con tejido conectivo y una serie de ductos. Los acinos son generalmente grandes, con un tamaño variable. Las paredes están altamente



plegadas y dispuestas libremente dentro del estroma de soporte. Los acinos se componen de epitelio lineal cuboidal o columnar, el núcleo se localiza de manera central; sus secreciones son eosinofilas<sup>13</sup>.

Las vesículas seminales y sus conductos son identificadas por su localización<sup>49</sup>, su epitelio es cuboidal y tiene una muy intensa eosinofilia asociado por sus secreciones<sup>13</sup>. La actividad secretora de las vesículas seminales está regulada por neuronas adrenérgicas y colinérgicas del sistema nervioso<sup>50</sup>. Los estímulos colinérgicos incrementan la producción de óxido nítrico, lo que favorece la secreción de fructuosa<sup>38</sup>. Otros de los productos que se producen es el componente que coagula el eyaculado, como semenogelina I; productos que son estimulantes de la movilidad, como son el potasio, el bicarbonato, magnesio, la 19 OH prostaglandinas y la prolactina; productos antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa/reductasa, ácido ascórbico, ácido úrico y tioles. Por lo tanto, la secreción de las vesículas seminales es de gran importancia para la fertilidad<sup>38</sup>. Se ha demostrado la participación de la proteína de secreción de vesículas seminales 2 (SVS2) en la formación del tapón seminal y protección de los espermatozoides del ambiente espermicida del útero, animales carentes de esta proteína mostraron infertilidad<sup>46</sup>.

Asociadas a las vesículas seminales se encuentran las glándulas coagulantes y sus ductos, presentan un epitelio es cuboidal lineal y contiene menos secreción eosinofila<sup>13</sup>.

## 1.6. Sueño y reproducción

Los tres esteroides más importantes para la función reproductiva en el macho son: Testosterona (T), Dihidrotestosterona (DHT) y Estradiol (E<sub>2</sub>), recientemente se demostró la participación de la Dehidroepiandrosterona<sup>14</sup>. La secreción de testosterona tiene variaciones durante el día, no depende directamente del ritmo circadiano, pero sí de la cantidad de sueño<sup>7</sup>. La testosterona se produce por medio del proceso conocido como esteroidogénesis en las células intersticiales (Células de Leydig), siendo el colesterol el precursor. Su regulación está mediada por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la que a su vez estimula a la pituitaria anterior para producir la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH), las cuales pasarán al flujo sanguíneo y llegarán a las gónadas. Así, la FSH estimula a las células de Sertoli para llevar a cabo la espermatogénesis y la LH a las células de Leydig para la síntesis de Testosterona, que también participará en la espermatogénesis. Esta puede circular de manera libre o unida a globulinas, como la albúmina (cerca del 1-2% de la concentración total) o a globulinas de unión a hormonas sexuales (SHBG) (98-99% de la concentración total)<sup>15</sup>. La Testosterona además de ejercer influencia en la espermatogénesis también se relaciona con la conducta sexual. En humanos se ha evidenciado que juega un papel en el deseo y la actividad sexual, también se ha demostrado su participación en la conducta copulatoria de la rata<sup>14</sup>. La conducta sexual está dirigida por una sofisticada interacción de hormonas esteroideas en el cerebro, específicamente en el hipotálamo. Ahí se expresan enzimas que transforman la testosterona en componentes que amplifican (DHT) o diferencian (estrógenos) sus acciones, como 5 $\alpha$ -reductasa y aromatasas, respectivamente. La testosterona que participa en la conducta copulatoria es secretada por las células de Leydig, se ha mostrado que ratas castradas disminuyen su actividad copulatoria<sup>14</sup>.

Existe una marcada relación entre T y el sueño. El sueño ocupa cerca de una tercera parte de tiempo en la vida del humano, es un proceso dinámico que permite la modulación del metabolismo, de los sistemas endocrino y cardiovascular. El SOL incrementa la secreción de LH, así al aparecer la primera etapa de sueño MOR comienza el inicio de la secreción de T, por lo que el sueño constituye un papel crítico en la regulación de la misma<sup>14</sup>. El sueño tiende a disminuir su duración de forma más drástica en el último tercio de la vida. Por lo que existe una relación directa entre la reducción de sueño y los niveles de T, lo cual también ha sido descrito en ratas<sup>16</sup>.

## **2. Antecedentes:**

La función reproductiva ha tomado un reciente interés debido a que cada vez son más las parejas que no pueden concebir un hijo, después de un año de tener relaciones regulares. La infertilidad es uno de los principales problemas de salud y se estima un porcentaje del 15-20% a nivel mundial<sup>17</sup> lo cual se encuentra asociado con diferentes causas fisiológicas relacionados en ocasiones con el estilo de vida. En este sentido, se ha asociado la disminución de los niveles de Testosterona en pacientes con apnea obstructiva de sueño, así como una disminución del número de erecciones durante el sueño en hombres con hipogonadismo<sup>18</sup>; esta alteración fue revertida con el aporte de testosterona. Por lo que un patrón de sueño alterado puede afectar los niveles de Testosterona, contribuyendo a la disfunción erectil<sup>19</sup>.

Para estudiar el efecto de una mala calidad del sueño sobre la fisiología del ser humano es común recurrir a modelos animales. Una de las estrategias experimentales consiste en la privación o restricción de sueño.

El pionero en estos modelos fue el grupo de Jouvett en 1964, desarrollando la técnica del florero invertido para gatos<sup>21</sup>. La cual consistió en colocar al animal sobre una plataforma dentro de un contenedor rodeada de agua. Una de las características del sueño MOR es la pérdida del tono muscular, por lo que

entonces el animal al entrar a esta etapa y presentar esta atonía muscular, caía al agua despertándose de manera inmediata. Más tarde este modelo fue adaptado para ratas por Cohen y Dement, en 1965<sup>21</sup>. Sin embargo, este método puede llegar a confundir las variables de la PSMOR con el de aislamiento, restricción de movimiento, humedad y fatiga muscular. Por lo cual, Van Hulzen y Coenen en 1981, introdujeron el método de las plataformas múltiples<sup>22</sup>, en el cual un animal era colocado dentro de un tanque con agua que contenía siete plataformas, con lo que eliminaban la restricción de movimiento. Aun así, esta técnica no lograba eliminar el componente inherente de estrés<sup>23</sup>. Recientemente se mostró que animales privados en grupos pequeños dentro del mismo tanque, pueden disminuir el efecto de estrés, sobre todo en grupos estables; esta técnica se conoce con el nombre de plataformas múltiples modificadas y ha sido ampliamente aceptada para estudios de PSMOR y RCSMOR<sup>22, 25</sup>. La diferencia entre ambos procedimientos radica en que la PSMOR elimina los periodos de sueño MOR, en tanto que la RCSMOR reduce las horas de sueño, semejando el actual estilo de vida que presentan los humanos. Con este tipo de métodos se ha logrado evidenciar algunas alteraciones hormonales, como es la disminución de la concentración sérica de T<sup>14, 19</sup>.

Velázquez-Moctezuma y cols., en 1989 evidenciaron que la administración de T a animales gonadectomizados y sometidos a PSMOR incrementó la CSM mientras que, en animales intactos, la PS produjo una disminución de Testosterona y de la CSM<sup>26</sup>. Este mismo grupo, mostró que la PSMOR tanto por 24 y 16 h, aumentaba las latencias de monta y eyaculación.

La relación entre la eficiencia de sueño con la calidad espermática ha sido poco estudiada. En este sentido, Jensen y cols., en 2013 reportaron que, sujetos con mala calidad de sueño (evaluada a través del cuestionario Karolinska, con una puntuación >50), también mostraban niveles bajos en la concentración espermática<sup>27</sup>.

Además, se ha mostrado que la PSMOR y la RCSMOR producen alteraciones diferenciales en la CS<sup>28</sup>, niveles hormonales (Testosterona, Progesterona, LH y

FSH), parámetros espermáticos y expresión de genes NO (óxido nítrico) en testículo relacionados con apoptosis, encontrando un efecto mayor con la PSMOR<sup>29</sup>, en relación con la RCSMOR<sup>30</sup>.

El efecto de la PSMOR por 96 h y de la RCSMOR por 21 días, se ha evaluado sobre la morfología de la próstata ventral de rata, mostrando alteraciones importantes en el epitelio y estroma, además de menor tamaño de la glándula asociado con atrofia glandular; presentando en suero niveles bajos de T y altos de Corticosterona en ambas condiciones, similares a los obtenidos por la castración<sup>9</sup>. Otro órgano reproductor del que se ha reportado una alteración por PSMOR es el testículo, encontrando morfología anormal en los túbulos seminíferos con retención de espermátidas. Además, evaluaron las características de los espermatozoides en la cola del epidídimo, sin cambios significativos comparados con el control.<sup>31</sup>

A partir de las evidencias descritas, se muestra que los estudios de PSMOR y RCSMOR sobre los parámetros reproductivos masculinos sólo se han realizado al término de ambas condiciones. Además, el modelo de la RCSMOR ha sido poco explorado y aún se desconocen en gran medida los efectos sobre la calidad espermática y la morfología de otras glándulas sexuales accesorias involucradas, a lo largo de la RCSMOR y durante el periodo de recuperación.

### **3. Justificación**

El sueño implica un evento fundamental para el control neuroendocrinológico. Los estudios previamente descritos han mostrado la relación entre el sueño y la función reproductiva, destacando su relación con la testosterona, la cual participa en el mantenimiento y desarrollo de los órganos reproductivos. Sin embargo, el impacto de la RCSMOR sobre la capacidad reproductiva aún no ha sido completamente estudiada ya que como se mencionó, sólo pocos reportes han mostrado atrofia en los tejidos de la próstata<sup>9</sup> o testículo<sup>31</sup> sin un efecto importante

en las concentraciones espermáticas<sup>30</sup>, además se desconoce el efecto de la RCSMOR a nivel histológico sobre las vesículas seminales en diferentes periodos de RCSMOR y recuperación. Por lo que resulta relevante evaluar las características del eyaculado y compararlo con el análisis histológico de las vesículas seminales que participan en su formación, para establecer las posibles correlaciones.

Como hemos descrito, existe una estrecha relación del sueño con el sistema neuroendocrino. En la sociedad actual, el humano reduce cada vez más las horas de sueño debido a sus múltiples actividades, por lo que es relevante evaluar el impacto de la disminución crónica de sueño sobre diversos aspectos reproductivos.

#### **4. Planteamiento del problema**

El ciclo sueño-vigilia es de vital importancia para los organismos, las alteraciones de este ciclo repercuten de forma importante en la vida cotidiana y la salud. En la actualidad, los seres humanos duermen cada vez menos o no logran completar un sueño reparador como tal, al tener una vida con múltiples ocupaciones, implicando serias consecuencias sobre el organismo, entre las que sobresalen la somnolencia diurna, fatiga, así como en la reproducción. Así mismo, se ha mostrado que la CSM y la PSMOR, incrementan el SOL II y el sueño MOR, respectivamente.

Diversos reportes han mostrado los picos de liberación más altos de diversas hormonas sexuales durante el sueño, entre ellas la Testosterona, la cual como ya se ha mencionado cumple un papel primordial en la función reproductiva. Por lo que, si los niveles de testosterona sérica se alteran, contribuirán al desbalance del sistema, provocando cambios notables en su correcto funcionamiento. Se han mostrado alteraciones ocasionadas por la PSMOR y la RCSMOR en la CSM, en los parámetros espermato-bioscópicas, en la histología de la próstata y testículo en rata, viéndose afectados por una disminución de la T. No obstante, aún se

desconoce el efecto temporal de la RCSMOR sobre la composición del eyaculado, la histología de las vesículas seminales y durante el periodo de recuperación.

## **5. Pregunta de investigación:**

¿Qué efecto tendrá la RCSMOR sobre la conducta sexual, calidad del eyaculado e histomorfología de las vesículas seminales en ratas macho Wistar?

## **6. Hipótesis:**

Si la RCSMOR provoca alteración en los ejes de regulación neuroendocrina, entonces se ocasionarán cambios en la conducta sexual, calidad espermática e histomorfología de las vesículas seminales.

## **7. Objetivos:**

### **7.1. Objetivo general**

- Determinar el efecto de la RCSMOR en la calidad espermática e histomorfología de las vesículas seminales en ratas macho Wistar.

### **7.2. Objetivos particulares:**

- Evaluar la CSM antes de la RCSMOR, durante la RCSMOR (7, 14 y 21 días) y en el periodo de recuperación (7 y 14 días después de los 21 días de RCSMOR).
- Evaluar las características del eyaculado (fluido y tapón seminal) antes de la RCSMOR, durante la RCSMOR (7, 14 y 21 días) y en el periodo de recuperación (7 y 14 días después de los 21 días de RCSMOR).
- Analizar la histomorfología de las vesículas seminales, antes y durante la RCSMOR, y en el periodo de recuperación.

## **8. Diseño experimental:**

### **8.1. Animales:**

Se utilizaron 32 ratas macho y 28 hembras de la cepa Wistar, con pesos de 200-250 y 300-350 g, respectivamente. Obtenidas del Bioterio de la UAM-Iztapalapa. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio, ciclo luz-oscuridad (12:12 h) la luz se apagaba a las 12:00 pm, temperatura controlada de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , agua y alimento *ad libitum*. Los cuidados y manejo de los animales de laboratorio se realizaron de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

Las hembras después de las ovariectomías (sección 8.2.1) se colocaron en jaulas individuales para su recuperación. Después de una semana, se colocaron en grupos de 4 animales por jaula.

De manera aleatoria, los machos se asignaron en 6 grupos (n=4), de la siguiente forma:

1) Intactos, 2) RCMOR 7 días, 3) RCMOR 14 días, 4) RCMOR 21 días, 5) Recuperación de sueño 7 días, 6) Recuperación de sueño 14 días.

Se realizaron análisis espermatozoides (sección 8.7) y obtención de vesículas seminales (sección 8.8) en los días 0, 7, 14, 21 (Grupos del 1 al 4) restringidos de sueño y a los 7 y 14 días de recuperación (Grupos 5 y 6).

### **8.2. Preparación de las ratas hembra para la evaluación de la CSM:**

#### **8.2.1. Ovariectomías:**

Las ovariectomías (OVX) se llevaron a cabo cuando las hembras obtuvieron un peso entre 200 a 250 g. Después de la cirugía los ejemplares se dejaron en recuperación en una caja separada de las demás hembras, hasta que cierre por completo la incisión (15 días aproximadamente).



### **8.3. Evaluación de la Conducta Sexual Masculina:**

El estro se indujo mediante la administración subcutánea de hormonas sintéticas a las hembras ovariectomizadas. La primera administración fue de Estradiol ( $E_2$ ) (10  $\mu\text{g}$  en 0.1 ml de aceite) 48 h antes de la prueba copulatoria y la segunda de Progesterona ( $P_4$ ) (2 mg en 0.1ml de aceite) 4 h antes de iniciar la prueba copulatoria.

La evaluación de la conducta sexual se realizó en el segundo tercio de la fase de oscuridad. Se colocó al macho en el redondel de observación 5 min para habituación, y después se incorporó a la hembra en estro. La prueba tuvo una duración de 30 min. Obteniendo los parámetros copulatorios como: Latencia y número de montas, intromisiones y eyaculaciones; para poder calcular: la duración de la serie eyaculatoria e índice de intromisión (II).

#### **8.3.1. Pruebas de entrenamiento copulatorio:**

El entrenamiento se calendarizó de acuerdo con el Manual de Conducta Sexual<sup>12</sup> para la obtención de machos sexualmente expertos, es decir, que obtengan una eyaculación entre los 8 y 15 minutos, después de la introducción de la hembra en el redondel.

Los grupos experimentales fueron evaluados solo con la primera serie eyaculatoria.

### **8.4. Restricción Crónica de Sueño MOR**

Se llevó a cabo con base a la técnica de plataformas múltiples modificado<sup>6</sup>. La RCSMOR fue realizada por 20 h, permitiéndoles dormir 4 h. La vigilia prolongada inició a las 12 pm y terminó a las 8 am del día siguiente, de manera consecutiva por 21 días. Se eligió este esquema porque es el tiempo en el que la presión de sueño es mayor, y en los cuales se registran los mayores picos hormonales, que se asocian con los parámetros espermáticos e histológicos<sup>9, 30</sup>.

Los grupos experimentales fueron evaluados para tener una  $n=4$ . Se realizó el registro de peso, alimento y agua durante la RCSMOR, al inicio y término del periodo de sueño (8:00 am y 12:00 pm, respectivamente).

### **8.5. Análisis del eyaculado de la rata:**

El análisis se realizó los días: 0, 7, 14 y 21 de la RCSMOR y durante el periodo de recuperación en los días 7 y 14.

#### **8.5.1. Obtención del semen en los cuernos uterinos:**

Después de la eyaculación, se dejaron transcurrir 10 min para permitir el transporte espermático<sup>12</sup>. La hembra anestesiada se colocó en posición supina sobre la mesa de cirugía, los cuernos uterinos fueron extraídos de la cavidad abdominal y colocados dentro de una caja Petri conteniendo solución salina al 0.9% a  $36 \pm 1$  °C para evitar el shock térmico a los espermatozoides. El fluido contenido en los cuernos se vertió dentro de un tubo eppendorf y se mantuvo en un termo-baño a  $36 \pm 1$  °C.

#### **8.5.2. Análisis de los parámetros macroscópicos del eyaculado:**

- El color del fluido seminal se determinó mediante observación directa, discriminando entre los tonos blanco, crema o transparente.

#### **8.5.3. Análisis de los parámetros microscópicos:**

- *Movilidad espermática*. Se evaluó con base a 100 espermatozoides, con un contador digital distinguiendo el tipo de movimiento de cada uno de ellos, se clasificaron como movilidad progresiva, movilidad *in situ* o inmóviles.
- *Concentración espermática*. Es la estimación del número de espermatozoides contenidos en el eyaculado y se expresó en relación con 1 ml.
- *Densidad espermática*. Se tomaron 10  $\mu$ l del semen colectado y se contaron los espermatozoides en tres diferentes campos, obteniendo el promedio que corresponderá a la densidad espermática. Conociendo la densidad se puede determinar la dilución del semen (Tabla 1).

Tabla 1. Dilución del semen según la densidad espermática<sup>12</sup>.

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

- *Viabilidad espermática.* Se realizó mediante la tinción de Eosina-Nigrosina, se colocaron 10 µL de semen y 10 µL del colorante sobre un portaobjetos, los cuales se mezclaron con un palillo de madera, fijando la muestra extendida en un portaobjetos. Se contabilizaron 100 espermatozoides al azar en diferentes campos, espermatozoides teñidos se consideraron como muertos y los no teñidos como vivos. El resultado se expresa en porcentaje.

#### 8.5.4. Obtención del tapón seminal:

El tapón fue obtenido quirúrgicamente de la misma hembra de la cual se obtuvieron los cuernos uterinos. Con una espátula delgada se desprendió el tapón de la pared vaginal y se depositó en un tubo eppendorf manteniéndolo en un termo-baño a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

#### 8.5.5. Análisis macroscópicos del tapón seminal:

- Consistencia es la solidez del tapón seminal, es dura y se determinó verificando que no cambie su firmeza al presionarlo.
- Peso es la masa del tapón seminal, se determinó utilizando una balanza analítica expresándolo en miligramos.
- Tamaño se evaluó midiendo el largo y ancho, su medida se expresó en milímetros.

## 8.6. Técnica histológica

Los animales de todos los grupos: Control, RCMOR y de REC fueron sacrificados inmediatamente después del término de su condición mediante la administración de pentobarbital sódico. Se disectaron las vesículas seminales y se fijaron en Bouin. Después de 24 horas de haber sido colocadas en el fijador, se inició con lavados de OH 70°, para eliminar el exceso de ácido pícrico. El procesamiento de tejidos se realizó mediante el uso de un Histoquinet, iniciando con lavados graduales de OH 80°, OH 90° y OH absoluto, para posteriormente ser aclarados con Xileno e incluidos con Paraplast Xtra. Los bloques obtenidos se cortaron con un grosor de 7 µm. Se tiñeron con HE y las laminillas se montaron con el uso de Entellan<sup>53</sup>. Para el análisis de las imágenes se utilizó el software Axio Vision Rel 4.8. Se tomaron medidas de área del epitelio (X12.5), área de secreción (X12.5) y altura del epitelio (X400).

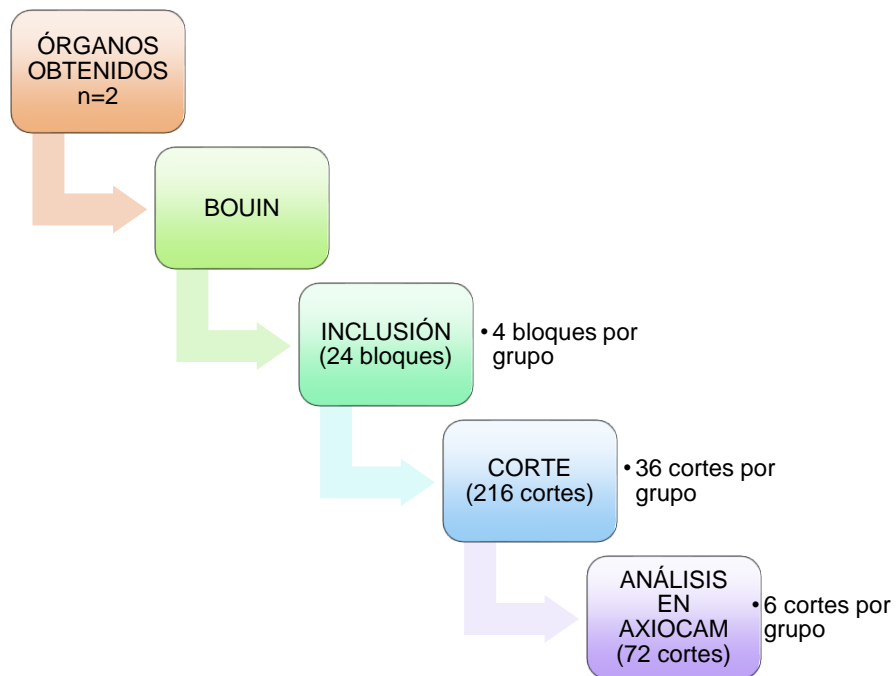


Figura 7. Esquema de las muestras obtenidas, fijadas y analizadas histológicamente.

## 9. Estadística

Los resultados de las diferentes pruebas se analizaron mediante el programa NCSS. Los datos del eyaculado y conducta sexual se analizaron mediante las pruebas de residuos de Omnibus, Kurtosis y Levene para la normalidad. Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía, seguida de Tukey Kramer (datos con normalidad) y Kruskal Wallis (datos sin normalidad) para comparaciones múltiples. Para los datos de peso, consumo de agua y alimento se utilizó T de student para datos independientes. El nivel de significancia fue de  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , los resultados se expresaron como  $\bar{x} \pm E.E.$

## 10. Diagrama de actividades

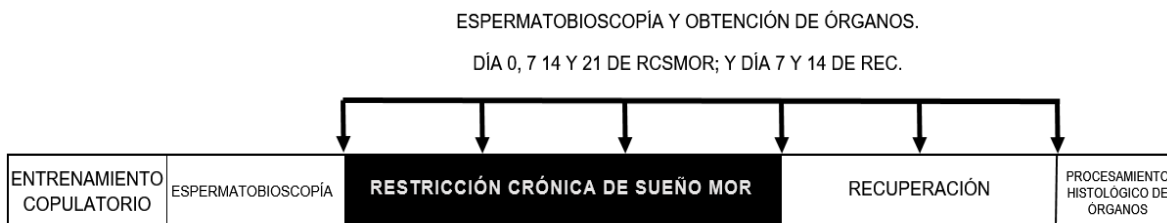


Figura 8. Diseño experimental

## 11. Resultados

### 11.1. Peso corporal y consumo de alimento y agua de las ratas

Los resultados obtenidos mostraron que el peso corporal de las ratas disminuyó de manera significativa a partir del sexto día de RCMOR ( $357.83 \pm 8.65$  g,  $p < 0.05$ ) comparado con el grupo control ( $388.32 \pm 7.82$  g), manteniéndose esta disminución durante todo el periodo de RCMOR (Fig. 8A, Tabla 2). Esta reducción de peso se conservó en las dos mediciones realizadas por día, al término de la vigilia prolongada (20 h, Fig. 8A, Tabla 2) y al finalizar el periodo de sueño (4 h, Fig. 8B, Tabla 3), ambas medidas se realizaron con el propósito de evaluar el impacto que tendría la RCMOR sobre el peso de los animales y si se mantenía después de que estas fueran puestas a dormir. En el periodo de REC, la disminución del peso ocasionado por la RCMOR se mantuvo, aunque se mostró una ligera ganancia de peso, esta no alcanzó los valores del grupo control (Fig. 8C, Tabla 4,  $p < 0.05$ ).

En cuanto a la ingesta de alimento evaluada al final de las 4 h de sueño, los resultados mostraron que hubo una disminución desde los primeros días en las ratas RCMOR en comparación con el control, (Fig. 9A, Tabla 5,  $p < 0.05$ ), lo que sugiere que los animales prefieren dormir en ese lapso que consumir alimento. Durante el periodo de REC, la ingesta de alimento incrementó comparada con el grupo control (Fig. 9B, Tabla 5,  $p < 0.05$ ). Los resultados muestran que la RCMOR ocasiona la pérdida de peso, no solo debido a que durante la restricción consumen menos alimento, ya que en el periodo de recuperación consumen más y su ganancia en peso no es igual comparada con el control.

Los resultados de la ingesta de agua mostraron un patrón similar al consumo de alimento, disminuyeron durante la RCMOR y mostraron una tendencia a incrementar durante el periodo de REC (Fig. 10, Tabla 6). Lo cual posría indicar que debido a que en este periodo duermen su consumo es menor y se llevaría a

cabo un mayor consumo durante su estancia en la cámara de restricción de sueño.

Tabla 2. Peso corporal (g) de las ratas a lo largo de la RCSMOR a las 08:00 am.

DÍAS DE RCSMOR	CONTROL	RCSMOR
1	382.96 ± 8.15	377.46 ± 11.11
2	384.08 ± 7.69	374.43 ± 13.67
3	386.2 ± 7.73	366.90 ± 12.54
4	386.98 ± 7.85	364.26 ± 9.62
5	387.32 ± 8.36	361.13 ± 8.96
6	388.32 ± 7.82	357.83 ± 8.65*
7	389.3 ± 6.86	359.83 ± 10.16*
8	392.48 ± 7.52	356.53 ± 8.8*
9	392.82 ± 8.72	355.26 ± 8.72*
10	398.98 ± 8.04	353.33 ± 10.9*
11	393.46 ± 6.97	358.96 ± 10.26*
12	398.74 ± 8.48	356.23 ± 9.77*
13	398.16 ± 9.09	356.33 ± 8.70
14	400.28 ± 8.59	357.20 ± 9.94*
15	399.66 ± 8.67	351.16 ± 8.01*
16	400.88 ± 8.68	342.1 ± 5.48*
17	401.74 ± 7.66	356.7 ± 8.19*
18	401.86 ± 7.94	356.53 ± 8.47*
19	398.7 ± 9.72	357.76 ± 9.63*
20	402.02 ± 8.26	361.56 ± 9.83*
21	403.7 ± 9.38	361.0 ± 11.38*

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ( $\bar{X} \pm E. E.$ )(n=4)

\*Diferencia significativa contra el control ( $p < 0.05$ )

Tabla 3. Peso corporal (g) al término del periodo de sueño (12:00 pm) a lo largo de la RCSMOR.

Días DE RCSMOR	CONTROL	RCSMOR
1	383.3 ± 7.44	372.86 ± 12.65
2	383.66 ± 7.46	366.96 ± 13.19
3	389.68 ± 7.52	364.53 ± 12.97
4	386.68 ± 8.33	361.26 ± 10.36
5	387.88 ± 7.001	359.9 ± 10.82
6	391.52 ± 7.92	358.33 ± 11.48*
7	393.6 ± 7.95	359.66 ± 11.38*
8	393.06 ± 7.49	354.43 ± 9.72*
9	392.8 ± 7.71	353 ± 9.64*
10	388.12 ± 9.68	352.6 ± 11.13*
11	396.82 ± 11.14	353.73 ± 9.31*
12	399.2 ± 8.92	355.33 ± 9.01*
13	400.08 ± 8.6	355.13 ± 8.96*
14	400.76 ± 7.69	340.2 ± 20.74*
15	402.24 ± 9.12	351.33 ± 8.77*
16	406.92 ± 8.2	359.36 ± 7.15*
17	402.4 ± 8.39	353.73 ± 8.47*
18	405.7 ± 7.9	356.23 ± 8.11*
19	402.38 ± 8.21	355.7 ± 8.79*
20	404.34 ± 9.06	358.43 ± 8.49*
21	404.84 ± 9.23	357.83 ± 9.84*

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) (n=4)

\*Diferencia significativa contra el control ( $p < 0.05$ )



Tabla 4. Peso corporal (g) de las ratas a lo largo de la REC.

DÍAS DE REC	CONTROL	RCSMOR
1	396.8 ± 9.42	353.06 ± 11.28*
2	402.32 ± 9.74	352.23 ± 10.87*
3	403.38 ± 9.81	357.7 ± 11.01*
4	398.22 ± 9.49	358.966 ± 9.2*
5	407.5 ± 8.64	362.933 ± 9.09*
6	407.5 ± 8.64	362.933 ± 9.09*
7	422.55 ± 4.83	363.2 ± 11.94*
8	402.98 ± 11.31	345.4
9	412.62 ± 9.2	359.7
10	409.74 ± 10.29	354.6
11	410.2 ± 9.94	357.8
12	390.6 ± 21.03	359.4
13	417.46 ± 10.93	375.8
14	408.02 ± 11.62	375.9

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) (n=4)

\*Diferencia significativa contra el control ( $p < 0.05$ )

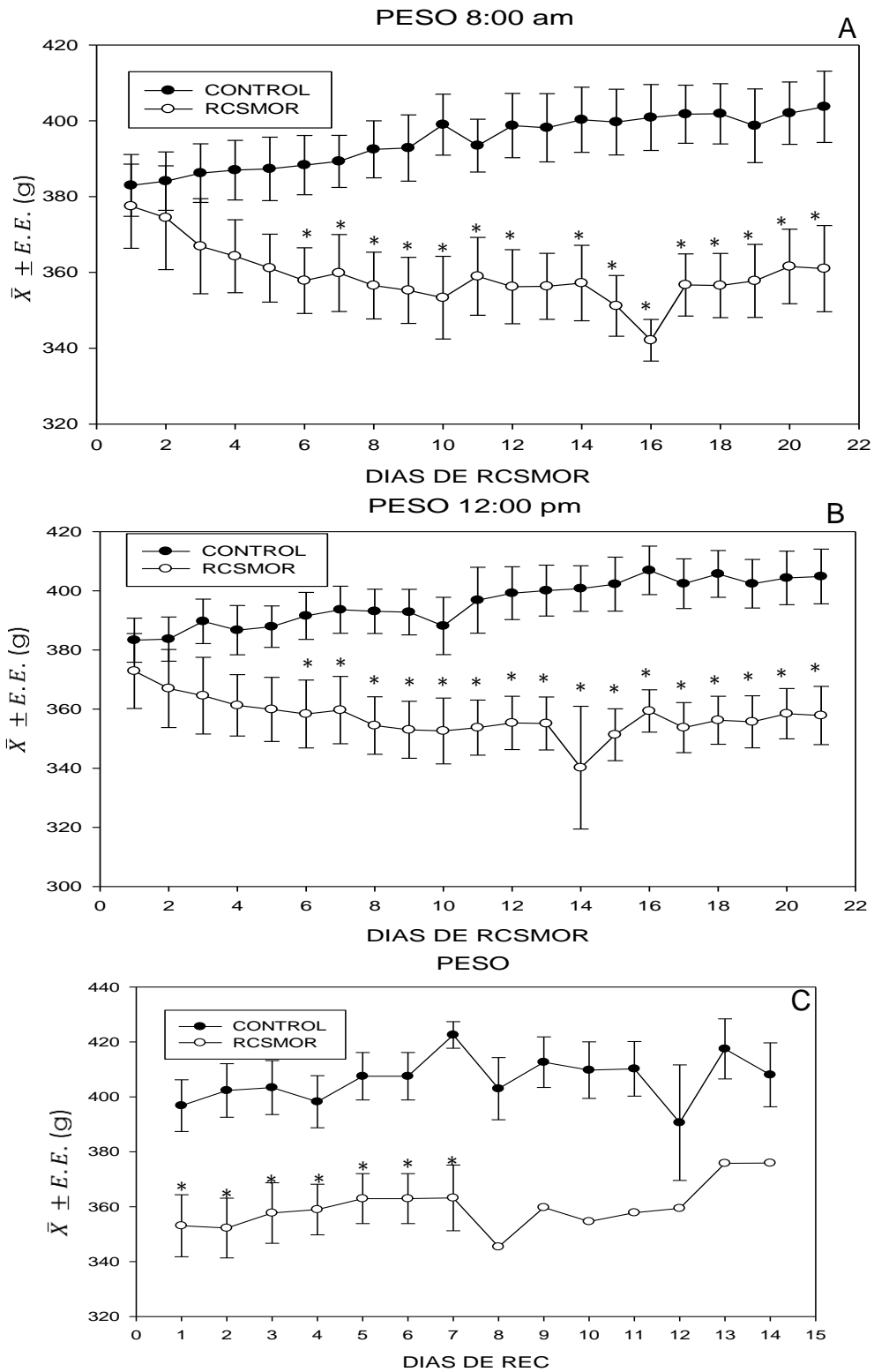


Figura 9. Cambio en el peso de las ratas al término de las 20 horas de vigilia (A) y al término del periodo de sueño (B) durante la RCSMOR y en el periodo de REC (C). El grupo RCSMOR muestra disminución en el peso durante la restricción y el periodo de recuperación. ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ); \* $p < 0.05$ , diferente contra el control.

Tabla 5. Consumo de alimento (g) después de las 4 h de sueño, a lo largo de la RCSMOR y durante la REC.

	DÍAS	CONTROL	RCSMOR
RCSMOR	1	3.52 ± 0.40	1.56 ± 1.41
	2	4.84 ± 1.27	0.20 ± 0.1*
	3	4.64 ± 0.38	3.06 ± 1.26
	4	4.18 ± 0.58	1.06 ± 0.96
	5	4.22 ± 0.47	0.70 ± 0.7*
	6	5.10 ± 0.48	0.96 ± 0.76*
	7	6.62 ± 2.92	1.03 ± 0.58
	8	7.94 ± 3.27	0.7 ± 0.35
	9	4.12 ± 0.50	2.1 ± 1.05
	10	4.78 ± 0.54	1.91 ± 1.1*
	11	4.78 ± 0.77	1.2 ± 0.56*
	12	3.14 ± 0.84	1.03 ± 0.08
	13	4.14 ± 0.52	3.5 ± 1.86
	14	4.24 ± 1.09	2.26 ± 0.85
	15	4.98 ± 0.80	1.5 ± 0.64*
	16	6.20 ± 0.33	4.43 ± 0.74
	17	3.46 ± 0.39	2.80 ± 0.6
	18	4.70 ± 0.42	1.73 ± 0.38*
	19	2.48 ± 0.63	0.90 ± 0.62
	20	3.46 ± 0.95	0.76 ± 0.62*
	21	3.30 ± 0.58	1.16 ± 0.87
REC	1	18.32 ± 0.63	16.5 ± 1.58
	2	21.44 ± 1.49	21.5 ± 2.65
	3	20.08 ± 0.65	23.53 ± 0.08*
	4	18.22 ± 1.66	22.76 ± 1.34*
	5	23.16 ± 1.36	27.13 ± 1.62
	6	20.94 ± 1.27	24.4 ± 2.85
	7	20.76 ± 3.36	27.3 ± 3.64
	8	20.22 ± 1.01	27.8
	9	24.76 ± 1.95	36.3
	10	18.30 ± 1.79	22.6
	11	22.56 ± 0.77	31.5
	12	21.44 ± 1.12	23.4
	13	26.44 ± 0.8	35.9
	14	14.28 ± 1.53	25

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ( $\bar{X} \pm E. E.$ )(n=4)

\*Diferencia significativa contra el control (p<0.05)

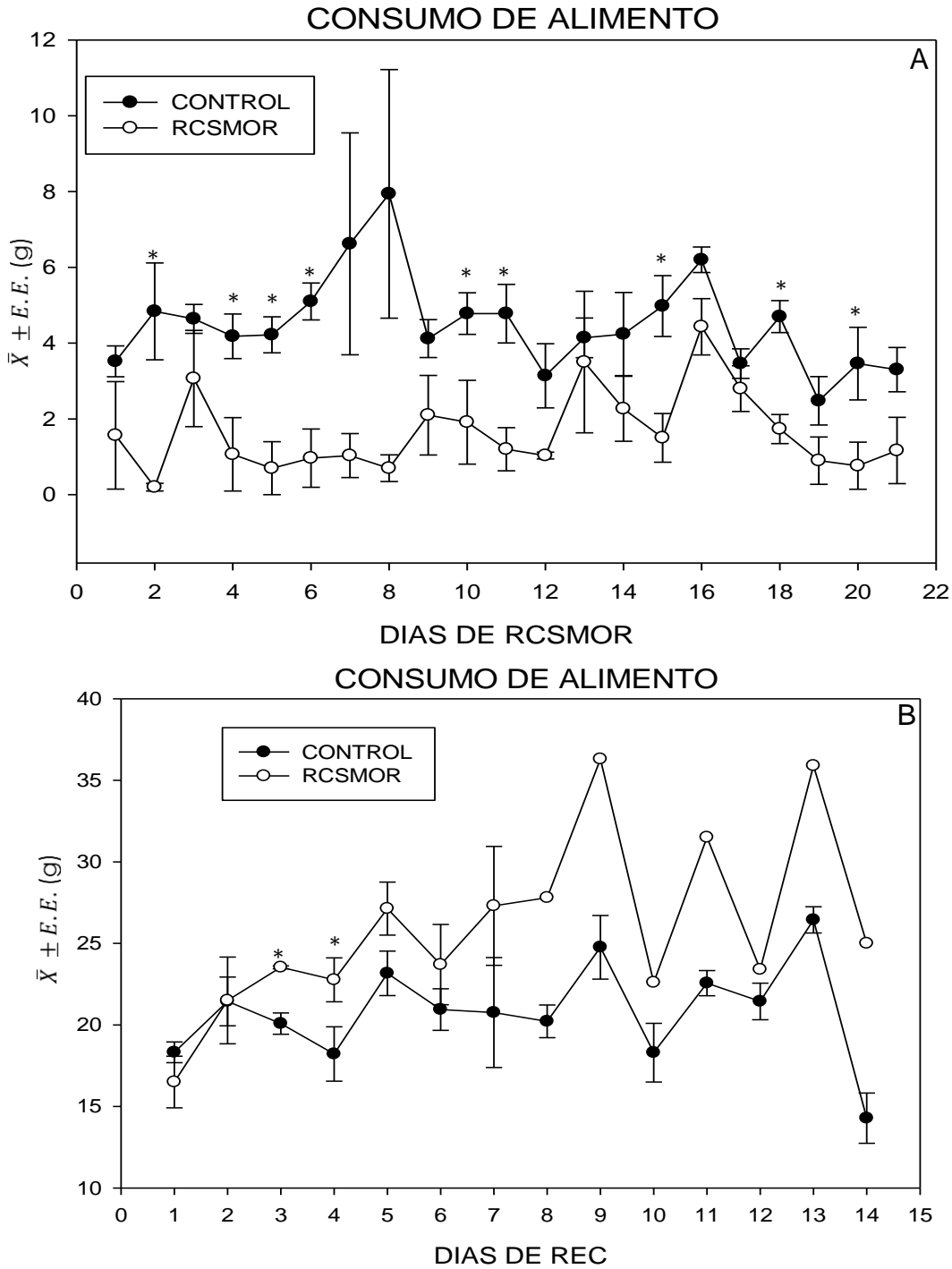


Figura 10. Consumo de alimento durante el periodo de sueño a lo largo de la RCSMOR (A) y REC (B). El grupo RCSMOR muestra la disminución en el consumo de alimento durante el periodo de restricción, aumentando en la recuperación en comparación al grupo control. ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ); \* $p < 0.05$ , diferente contra el control).

Tabla 6. Consumo de agua (ml) a lo largo de la RCSMOR y en la REC, después de las 4 h de sueño

	DÍAS	CONTROL	RCSMOR
RCSMOR	1	9 ± 1.8	2.33 ± 2.33*
	2	8 ± 3.0	4.0 ± 2.08
	3	19 ± 6.50	0.33 ± 0.33*
	4	8 ± 2.0	7.33 ± 3.38
	5	7 ± 3.74	3.66 ± 1.85
	6	14 ± 2.9	8.33 ± 1.66
	7	14 ± 1.0	8.33 ± 1.66*
	8	10 ± 1.58	1.66 ± 1.66*
	9	8 ± 1.66	6.66 ± 1.22
	10	7 ± 2.54	1.66 ± 1.66
	11	9 ± 2.91	3.33 ± 3.33
	12	10.8 ± 3.4	8.33 ± 6.09
	13	9.2 ± 2.47	10.0 ± 7.63
	14	9 ± 2.44	6.66 ± 1.66
	15	13.6 ± 1.86	8.33 ± 1.66
	16	23 ± 7.68	8.33 ± 1.66
	17	10 ± 2.73	13.33 ± 6.09
	18	37 ± 9.02	15.0 ± 5.0
	19	7 ± 4.89	3.33 ± 1.66
	20	9 ± 3.67	6.66 ± 1.66
	21	6 ± 2.44	3.33 ± 1.66
REC	1	27 ± 7.34	36.66 ± 3.33
	2	44 ± 12.28	58.33 ± 4.4
	3	52 ± 9.69	55.0 ± 7.63
	4	37.2 ± 2.41	43.33 ± 1.66
	5	46.8 ± 7.72	60.0 ± 10.4
	6	54 ± 7.48	63.33 ± 8.33
	7	53 ± 10.44	48.33 ± 4.4
	8	42.4 ± 13.88	35
	9	33 ± 10.31	50
	10	38 ± 8.15	40
	11	36 ± 7.31	45
	12	50.6 ± 5.55	50
	13	52 ± 7.516	60
	14	25 ± 5.477	30

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) (n=4)

\*Diferencia significativa contra el control (p<0.05)

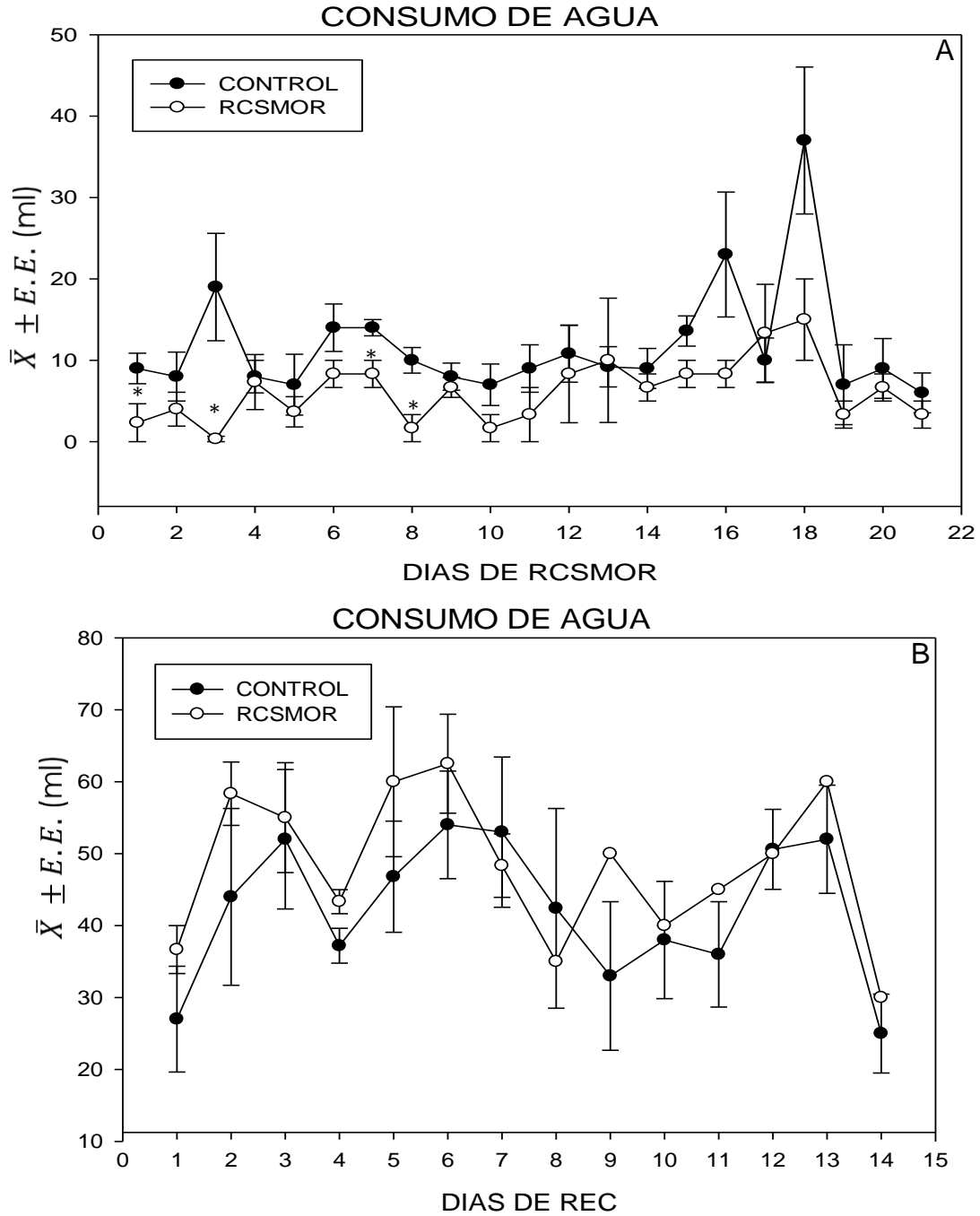


Figura 11. Consumo de agua en el periodo de sueño durante la RCSMOR (A) y REC (B). Durante la restricción el grupo RCSMOR consume menos agua comparado con el control. ( $\bar{X} \pm E.E.$ )( $n = 4$ ); \* $p < 0.05$ , diferente contra el control.

## 11.2. Conducta Sexual Masculina

Los resultados obtenidos de la evaluación del patrón conductual sexual durante la RCSMOR y en el periodo de recuperación, mostraron una tendencia a disminuir las latencias de monta, intromisión y eyaculación durante el periodo de RCSMOR y REC (Fig. 11, Tabla 7). El número de montas tuvo la tendencia a disminuir a los 7 días de RCSMOR y durante la REC. Por el contrario, el número de intromisiones mostró una tendencia a aumentar a partir de los 7 días de RCSMOR, lo que sugiere que los machos requirieron más intromisiones para alcanzar el umbral eyaculatorio (Fig.12, Tabla 7). La duración de la serie eyaculatoria tuvo una tendencia a disminuir, desde el inicio de la RCSMOR hasta el día 14 de REC. El índice de intromisión tiende a disminuir durante la RCSMOR en relación con el grupo control (Fig. 13, Tabla 7), el cual resulta útil para evaluar de manera indirecta, la erección peneana y la capacidad fértil del macho entre más cercano se encuentre al número uno, se observa una mejora notable en los primeros 7 días de recuperación.

Tabla 7. Parámetros evaluados en la CSM a lo largo de la RCSMOR y en el periodo de REC.

	CONTROL	RCSMOR 7 Días	RCSMOR 14 Días	RCSMOR 21 Días	REC 7 Días	REC 14 DIAS
<b>Latencia a monta (seg)</b>	131 ± 20.04	5.25 ± 2.64**	11.5 ± 2.68	10.5 ± 1.79	13 ± 3.23	18 ± 15.41
<b>Latencia a intromisión (seg)</b>	123.25 ± 46.65	27.75 ± 16.50	33.5 ± 15.77	36 ± 22.12	31.75 ± 10.50	8.25 ± 0.72*
<b>Latencia a eyacuación (seg)</b>	604.7 ± 107.28	379.2 ± 118.14	448 ± 28.05	325.75 ± 38.17	359.25 ± 14.05	386.75 ± 89.5
<b>Número de montas</b>	13.25 ± 2.07	6 ± 1.24	9.25 ± 4.38	11 ± 1.69	3.25 ± 0.98	6 ± 2.49
<b>Numero de intromisiones</b>	7 ± 0.81	8 ± 0.81	7 ± 1.05	9.25 ± 1.72	11.25 ± 0.86	9 ± 3.12
<b>Duración de la serie (seg)</b>	728 ± 112.72	407 ± 113.31	481.5 ± 24.96	361.75 ± 56.73	388.5 ± 23.82	395 ± 88.94
<b>Índice de intromisión</b>	0.62 ± 0.09	0.58 ± 0.04	0.46 ± 0.13	0.45 ± 0.06	0.76 ± 0.07	0.6 ± 0.09

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) (n=4)

\*Diferencia significativa contra el control (p<0.05)

\*\*Diferencia significativa contra el control (p<0.01)



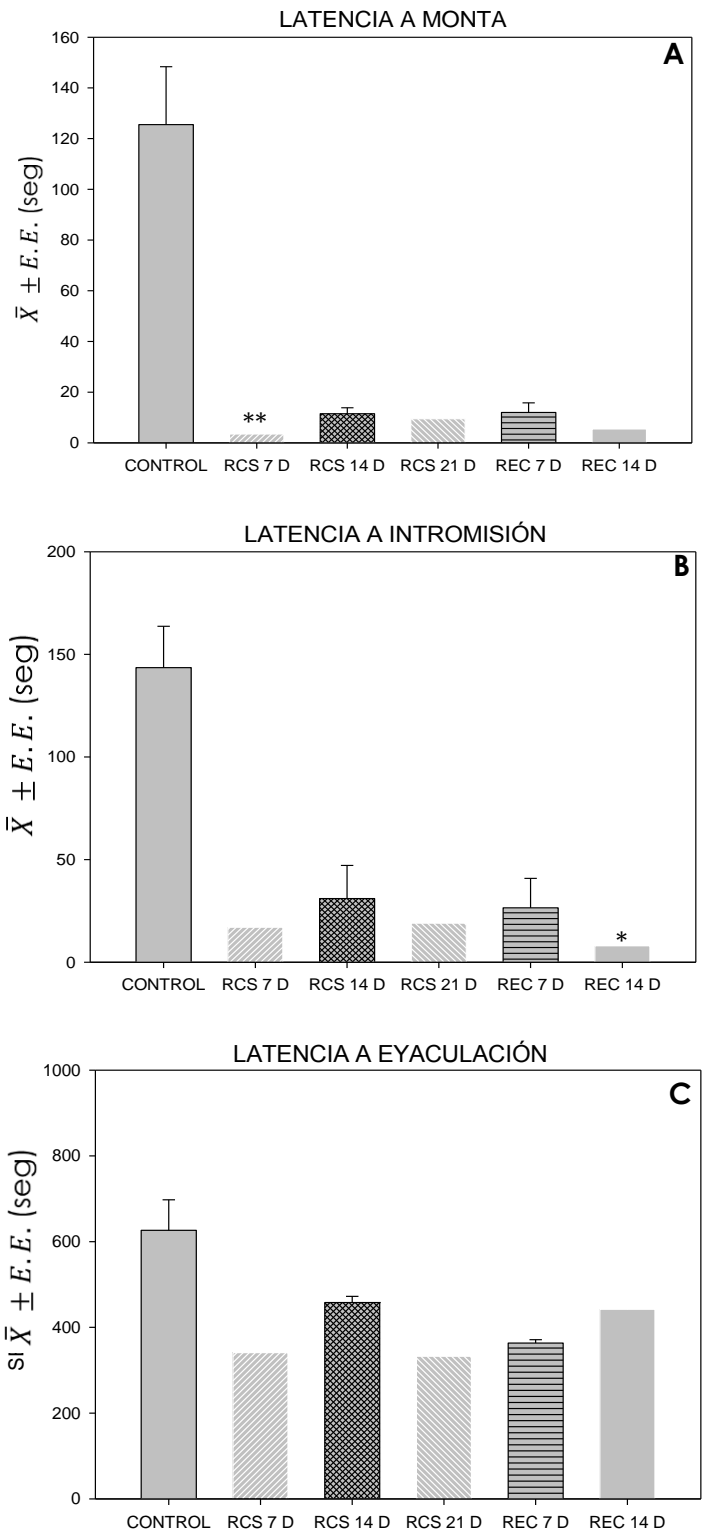


Figura 12. Latencia a Monta (A), Intromisión (B) y Eyaculación (C) de una serie eyaculatoria a lo largo del periodo de RCSMOR y REC. ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) (n=4) \*p<0.05, \*\*p<0.01, diferente contra el control.

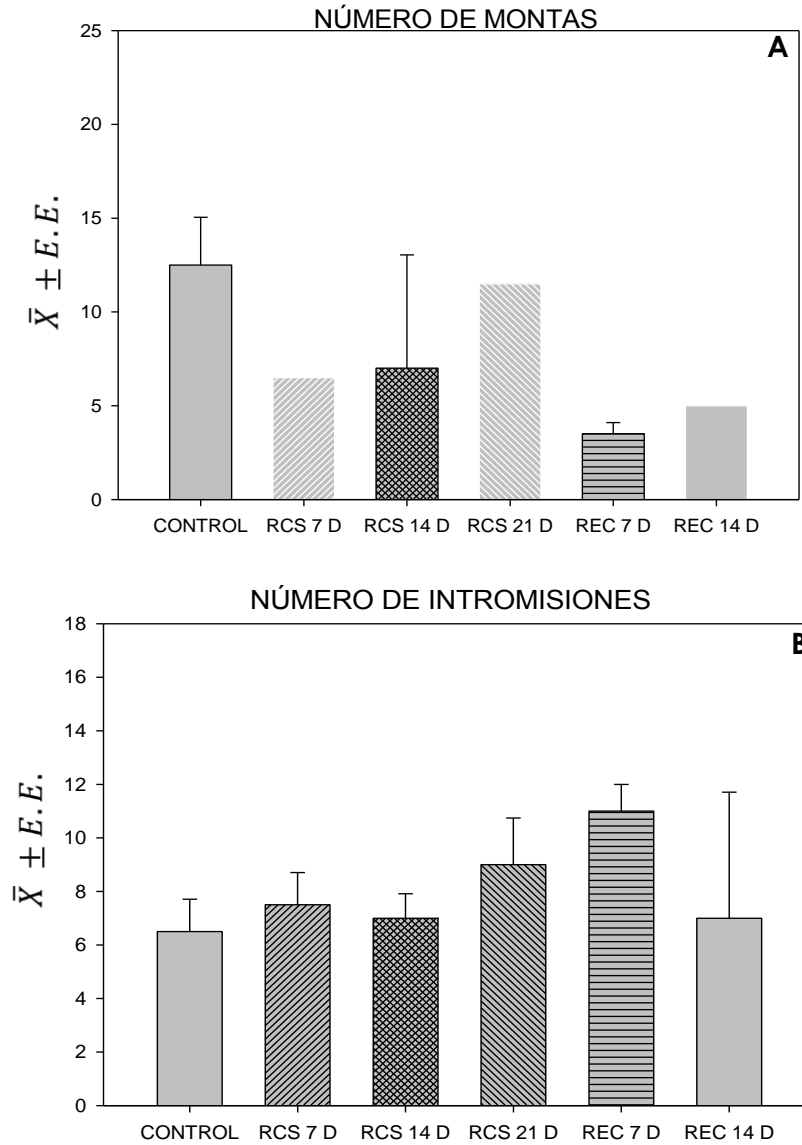


Figura 13. Número de Montas (A) e Intromisiones (B) de una serie eyaculatoria a lo largo de la RCSMOR y en el periodo de recuperación. ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) (n=4). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas.

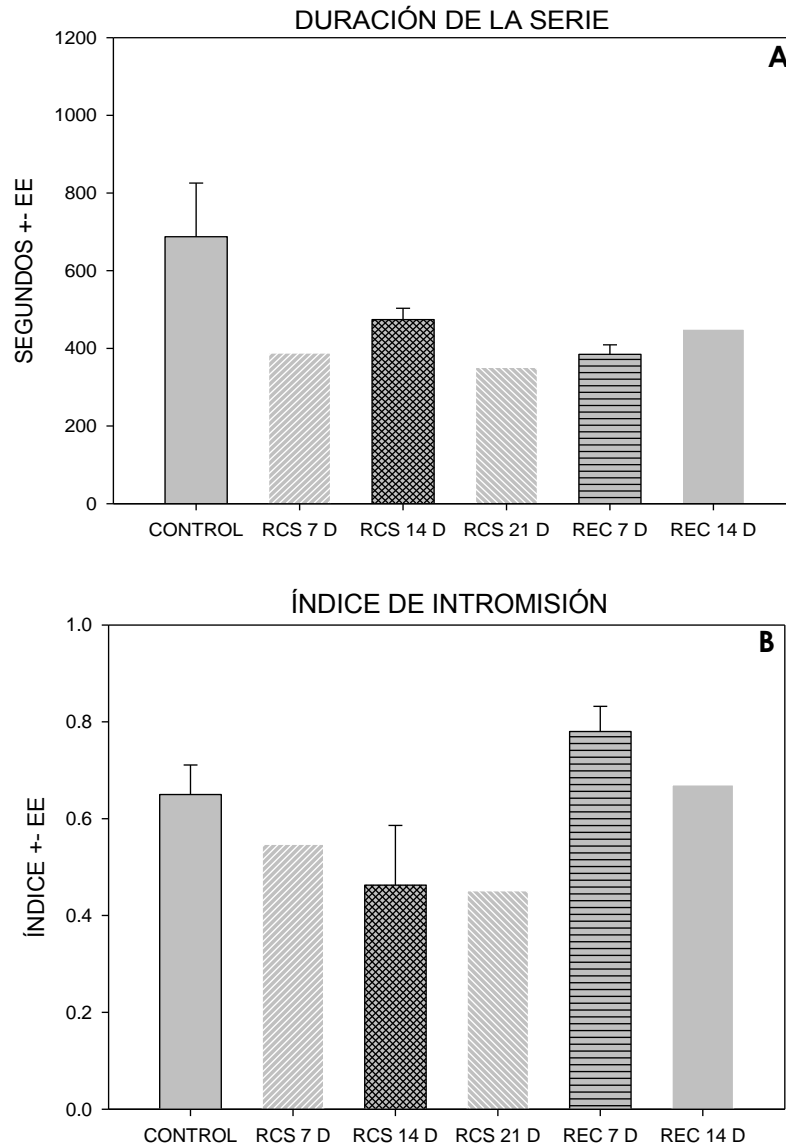


Figura 14. La duración de la serie eyaculatoria (A) muestra una tendencia a disminuir a lo largo de la RCSMOR y REC, lo que indica que les llevó menos tiempo alcanzar el umbral eyaculatorio. En cuanto al Índice de intromisión solo se ve afectado durante la RCSMOR, mejorando durante la REC. ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) (n=4). El análisis estadístico no mostró cambios significativos.

### 11.3. Espermatobioscopía:

#### Análisis macroscópico y microscópico del eyaculado

En la evaluación macroscópica la primera observación que se realiza en las muestras del eyaculado es la diferenciación del color, el cual es un indicador indirecto de la presencia o ausencia de espermatozoides.

Se evaluaron las muestras de 4 ratas a lo largo de la RCSMOR y REC, tomando sus valores iniciales como valores control. Los resultados mostraron que a los 7 días de RCSMOR el 50% de las muestras fueron de color transparente, lo que indicó la ausencia de espermatozoides, y al día 21 de RCSMOR fue del 100% (Fig. 14). El análisis de la concentración espermática confirmó que la apariencia del color del eyaculado esta en relación con la concentración espermática. El grupo control presenta  $17.25 \pm 2.47$  millones/ml, esta concentración disminuye a  $2.25 \pm 1.51$  millones/ml a lo largo de la restricción. Durante el periodo de recuperación la concentración aumentó a  $5.5 \pm 0.62$  millones/ml, sin alcanzar los valores controles (Fig. 14A, Tabla 8). Los resultados de viabilidad mostraron daño en los espermatozoides durante la RCSMOR y en el periodo de recuperación, ya que el porcentaje de espermatozoides vivos disminuye significativamente respecto al grupo control (Fig. 15A, Tabla 8,  $p < 0.01$ ); con un incremento en el porcentaje de espermatozoides muertos a partir de los 7 días de RCSMOR (Fig. 15B, Tabla 8); con excepción a los 21 días de RCSMOR, debido a la ausencia de espermatozoides en las muestras. Se observa una tendencia a disminuir la movilidad progresiva, sin embargo, sólo fue significativo a los 14 días de REC (Fig. 16A, Tabla 8,  $p < 0.05$ ). En cambio, la movilidad *in situ*, disminuyó a partir de los 7 días de RCSMOR (Fig. 16B, Tabla 8;  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ ); al verse disminuida tanto la movilidad progresiva e *insitu*, se incrementó el porcentaje de espermatozoides inmóviles (Fig. 16C).

## Evaluación del tapón seminal

El análisis macroscópico del tapón seminal, corresponde a evaluar el peso, largo, ancho y consistencia, (Tabla 9). Los resultados mostraron una disminución significativa en estos tres parámetros (peso, largo y ancho) a los 7 días de RCSMOR (Fig. 17, Tabla 9;  $p < 0.05$ ). Se observaron cambios en la consistencia del tapón, a los 7 días de RCSMOR aumentaron las muestras que carecían de tapón y los que se pudieron obtener fueron blandos (Fig. 18A, Tabla 10); la adhesión disminuyó a partir de los 7 días de RCSMOR (Fig. 18A, Tabla 10), lo cual afecta el transporte espermático y contribuye a la ausencia del fluido espermático en los cuernos.

Tabla 8. Análisis microscópico del eyaculado de rata.

	CONTROL	RCSMOR 7 días	RCSMOR 14 días	RCSMOR 21 días	REC 7 días	REC 14 días
<b>Concentración espermática (<math>10^6</math>)</b>	17.25±2.47	1.5±1.10**	2.25±1.51**	0	5.5±0.62**	3.75±1.42**
<b>Vivos (%)</b>	70.62 ± 5.05	30 ± 8.1**	28.5 ± 8.57**	0	44.87±12.12	16.37±6.43**
<b>Muertos (%)</b>	29.37 ± 5.05 <sup>¥</sup>	70 ± 8.16 <sup>¥</sup>	71.5±8.57	0	55.12±12.12	83.62±6.43
<b>Movilidad progresiva (%)</b>	36.12±4.36	9.25±10.68	11.62±10.10	0	22.25±6.52	5.87±3.23*
<b>Movilidad in situ (%)</b>	31.25±2.73	8.25 ± 9.52	3.12±2.73**	0	10.62±2.89*	6.25±2.76**
<b>Inmóviles (%)</b>	35.12±4.48	32.5±27.23	35.25±23.96	0	67.12±7.98	81.62±7.46

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ( $X \pm E.E.$ )

\*Diferencia significativa contra el control ( $p < 0.05$ )

\*\*Diferencia significativa contra el control ( $p < 0.01$ )

¥ Diferente contra REC 7 d ( $p < 0.05$ )

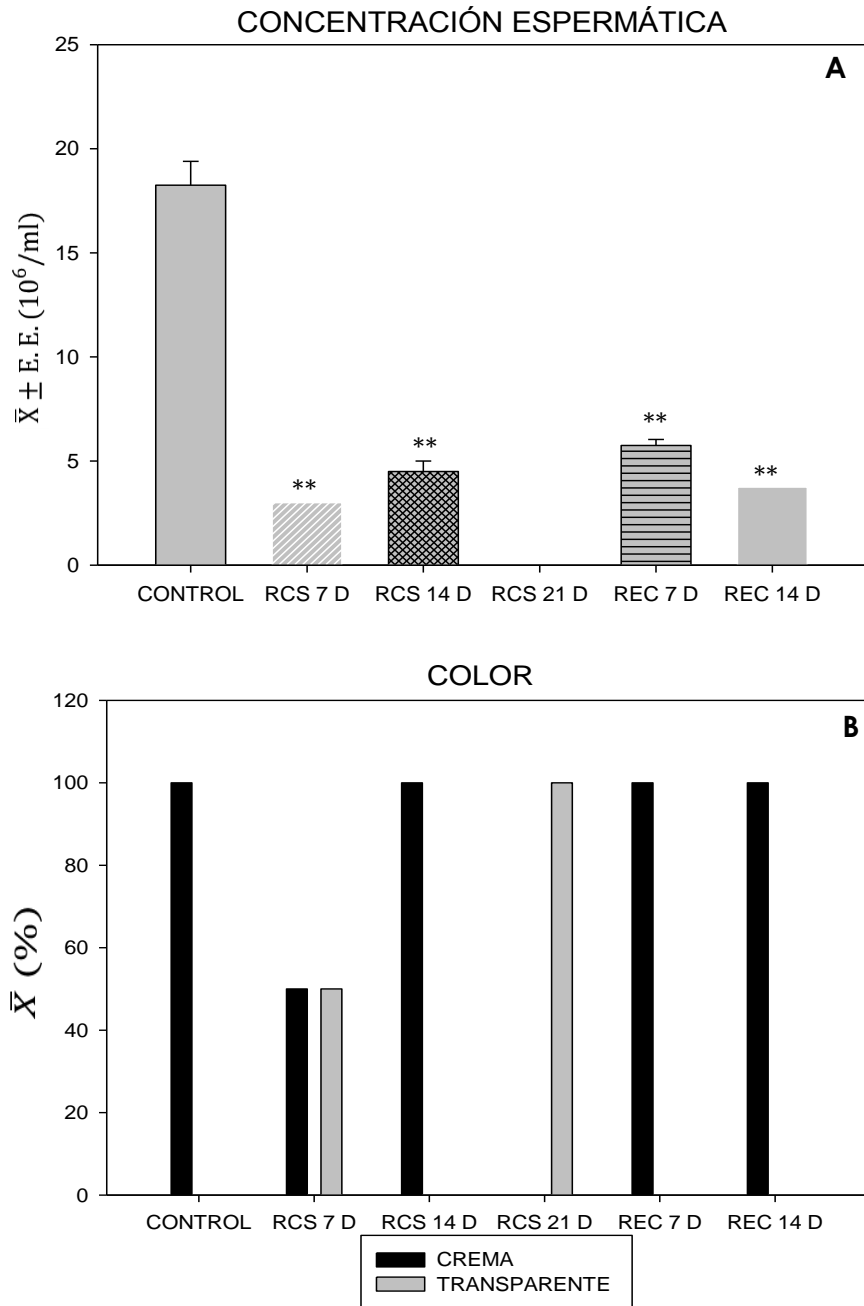


Figura 15. La concentración espermática (A) expresada en 10<sup>6</sup>/ml, disminuye a partir de los 7 días de RCSMOR y se mantiene baja a pesar de que los animales estén en el periodo de REC. El Color del eyaculado (B) vario a los 7 y 21 días de RCSMOR, siendo en este último donde se mostró un 100% de muestras transparentes, coincidiendo en A con la ausencia de espermatozoides en la muestra. ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  diferente contra el control.

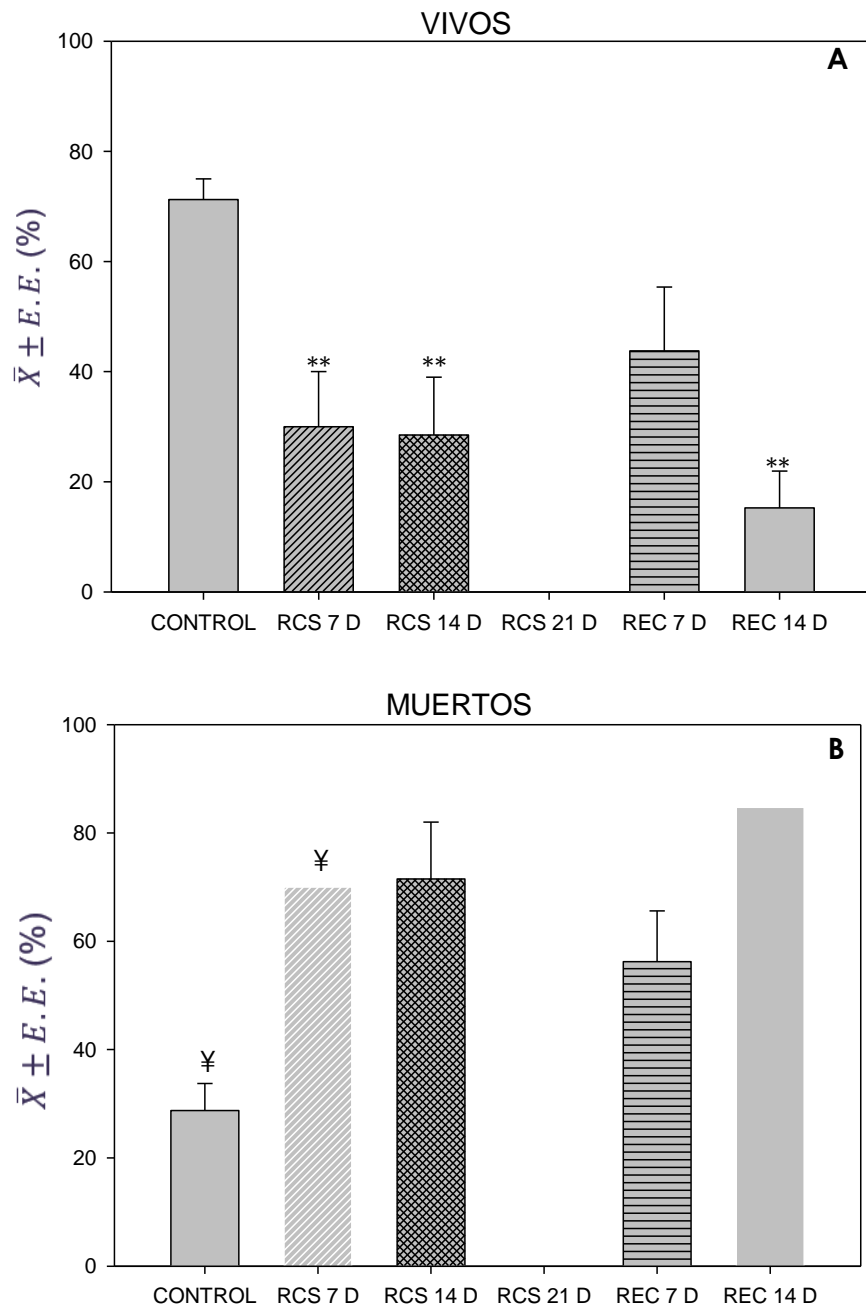


Figura 16. A lo largo de la RCSMOR y REC la viabilidad (A) de los espermatozoides disminuye considerablemente y la mortalidad (B) de manera complementaria aumenta. ( $\bar{X} \pm E.E.$ )( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , diferente contra el control; ¥ diferente contra REC7d  $p < 0.05$ ).

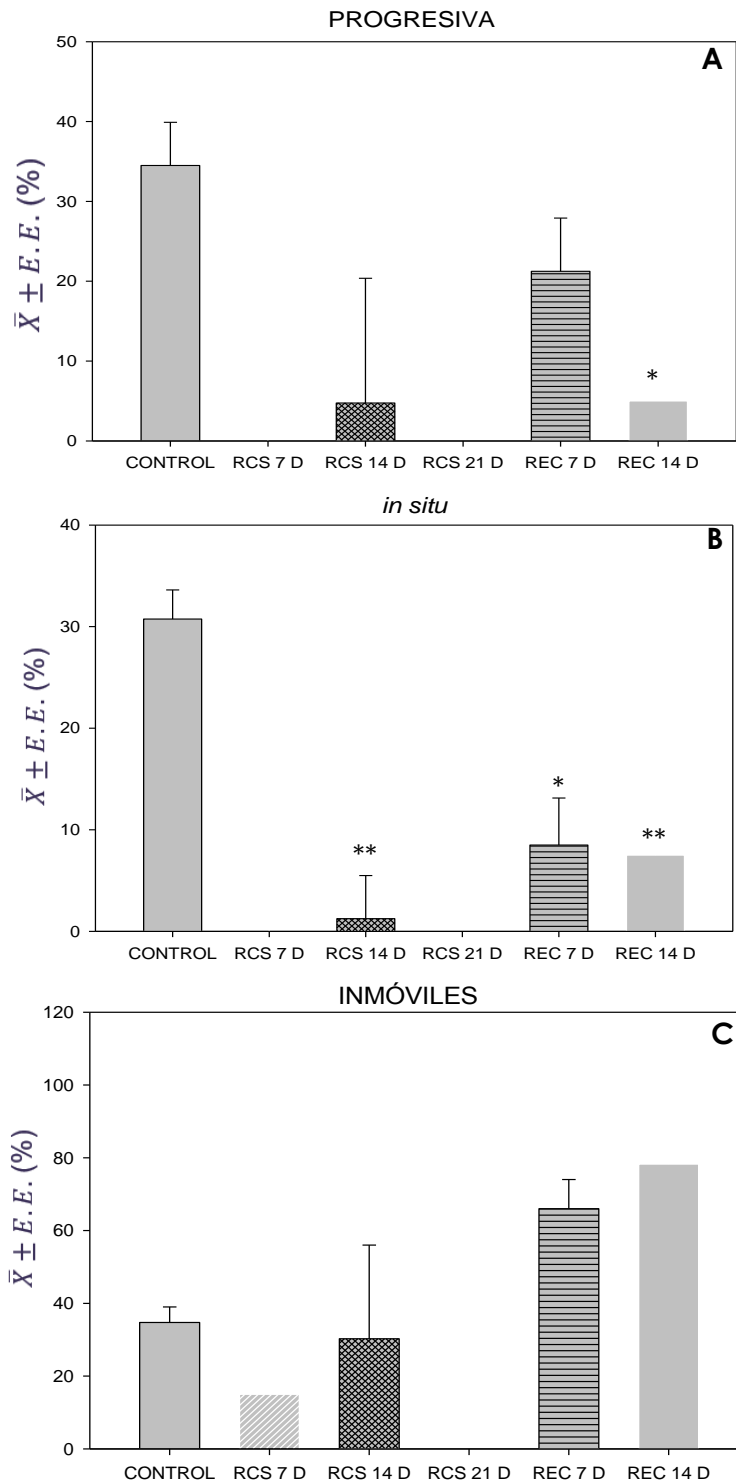


Figura 17. El análisis de la movilidad espermática muestra la disminución en el porcentaje progresiva (A) e *in situ* (B) durante la RCSMOR y REC, mientras los espermatozoides inmóviles (C) incrementaron ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  diferente contra el control; ¥ diferente contra REC7d  $p < 0.05$ ).



Tabla 9. Análisis cuantitativo del tapón seminal

	<b>CONTROL</b>	<b>RCSMOR 7 días</b>	<b>RCSMOR 14 días</b>	<b>RCSMOR 21 días</b>	<b>REC 7 días</b>	<b>REC 14 días</b>
<b>Largo (mm)</b>	9.92±1.14	2.05±2.36	9.9±0.51	10±3.93	11.62±1.70	10.45±0.3
<b>Ancho (mm)</b>	5.3±0.13 <sup>£</sup>	1.37±1.58	5.02±0.32 <sup>£</sup>	3.6±1.48	5.47±0.25 <sup>£</sup>	5.55±0.39 <sup>£</sup>
<b>Peso (mg)</b>	95.25±5.87 <sup>£</sup>	20±23.09	106.37±10.49 <sup>£</sup>	75±28.86	100 <sup>£</sup>	100 <sup>£</sup>

Los datos se presentan como la media ± el error estándar ( $\bar{X} \pm E.E.$ )

£ Diferente a RCSMOR 7 d ( $p < 0.05$ )

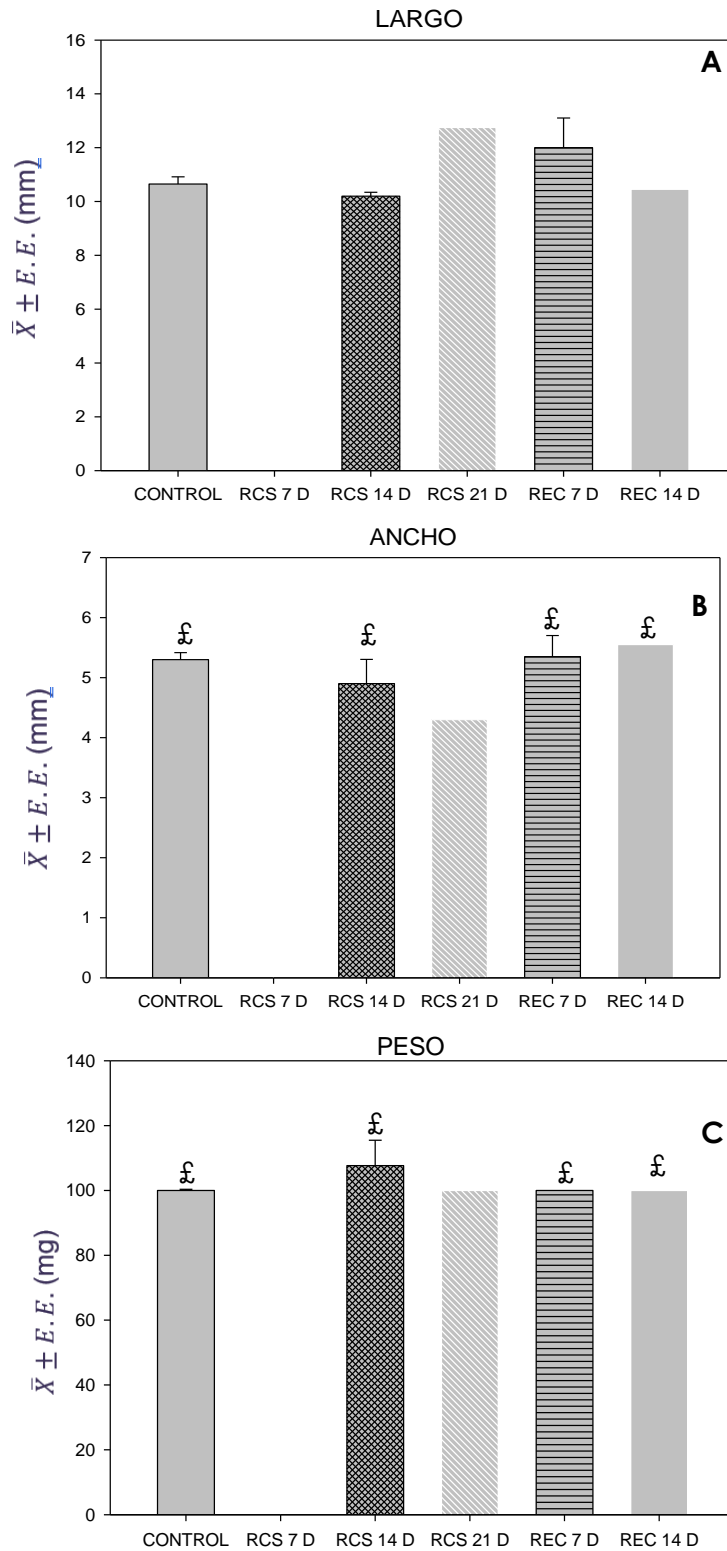


Figura 18. El análisis cuantitativo del tapón mostró la disminución del largo (A), ancho (B) y peso (C) a los 7 días de RCSMOR. ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  diferente contra el control; £ diferente contra RCSMOR 7 d  $p < 0.05$ ).

Tabla 10. Análisis cualitativo del tapón seminal. ( $\bar{X}$ )

	Porcentaje de consistencia			Porcentaje de adhesión		Color	
	ENDURECIDO	BLANDO	NO PRESENTÓ	SI	NO	CREMA	TRANSPARENTE
<b>CONTROL</b>	100	0	0	100	0	100	0
<b>RCSMOR 7 Días</b>	0	25	75	0	100	50	50
<b>RCSMOR 14 DÍAS</b>	50	50	0	50	50	100	0
<b>RCSMOR 21 DÍAS</b>	25	50	25	33.33	66.6	0	100
<b>REC 7 DÍAS</b>	100	0	0	50	50	100	0
<b>REC 14 DÍAS</b>	100	0	0	50	50	100	0

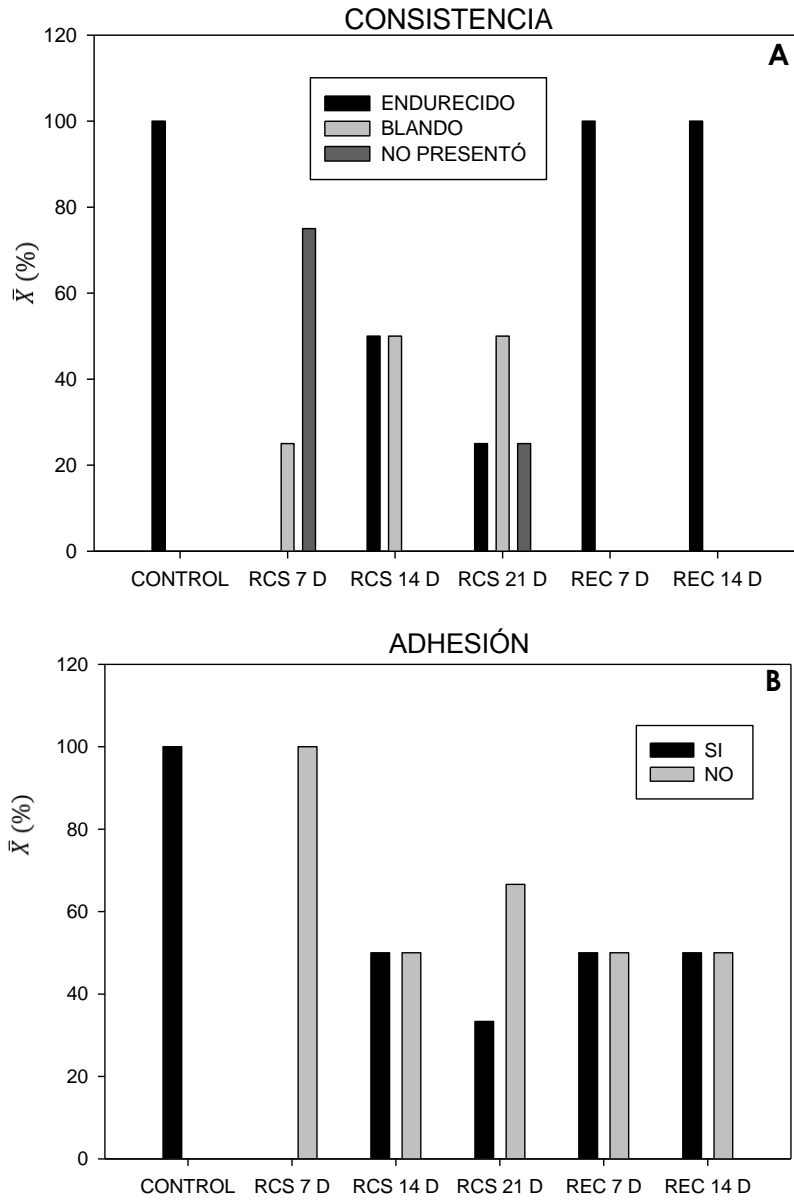


Figura 19. Características cualitativas del tapón seminal a lo largo de la RCSMOR y la REC. Consistencia (A) y Adhesión (B). ( $\bar{X} \pm E. E.$ ) ( $n = 4$ )

#### 11.4. Análisis histológico de las Vesículas Seminales

Belhocine et al. (2007) mostraron que la mucosa de la vesícula seminal presenta variaciones histomorfológicas en diferentes condiciones fisiológicas dependientes de cambios hormonales, en especies con reproducción estacional: 1) en la época reproductora, se forman abundantes pliegues que se proyectan luminalmente, aumentando la superficie de secreción, ya que su sinuosidad forma criptas en la mucosa, conformando múltiples espacios con abundante secreción. En esta condición la pared fibromuscular es delgada; 2) en periodos no reproductores, disminuyen los pliegues y la presencia de secreción entre ellos disminuye, en tanto que la pared fibromuscular aumenta de espesor.

Los resultados obtenidos del análisis histológico mostraron que el grupo control presenta características tisulares propias de actividad reproductora (Fig. 20-control). En tanto que a los 7 días de restricción se observó disminución en la cantidad de secreción en las criptas, tendencia que se acentuó a los 14 y 21 días de RCSMOR, por tanto con una histomorfolología similar a baja actividad reproductora.

En la fotomicrografía se observa a los 14 días de RCSMOR (Fig. 20 recuadro superior derecho) abundante secreción, esto podría deberse a que, debido a la reducción de los pliegues de la mucosa y la consecuente desaparición de criptas, con lo cual la secreción contenida en estas pasó hacia el lumen. Por tanto no necesariamente se incrementó la producción de la misma.

A los 7 y 14 días de REC se observaron cambios con mayor presencia de criptas en la mucosa y la cantidad de secreción en el lumen (Fig. 20).

Aunado al análisis histológico, la citología del epitelio secretor de la mucosa de la vesícula seminal mostró variaciones en la altura del epitelio, debido a la reducción del citoplasma apical, durante la RCSMOR (Fig. 20). Variaciones citológicas que coinciden con lo reportado por Belhocine et al. (2007), en el epitelio de especies con reproducción estacional.

El análisis cualitativo se ve apoyado por el cuantitativo, ya que las mediciones del área total de la glándula, muestran una tendencia en la que disminuye el área durante la RCSMOR siendo significativo hasta los 21 días de RCSMOR (Fig. 21A, Tabla 11;  $p < 0.05$ ). Esto es congruente con la descripción morfológica y su evidente variación. En el área de secreción, se observó una disminución significativa a partir de los 21 días de RCSMOR, con un ligero incremento a partir del periodo de recuperación (Fig. 21B, Tabla 11). La altura del epitelio mostró una tendencia a disminuir desde los 7 días de RCSMOR, siendo significativa a partir de los 14 días de RCSMOR (Fig. 22C, Tabla 11;  $p < 0.01$ ). Estos resultados nos indican cambios importantes en el epitelio, que pueden relacionarse con disminución de la actividad secretora.

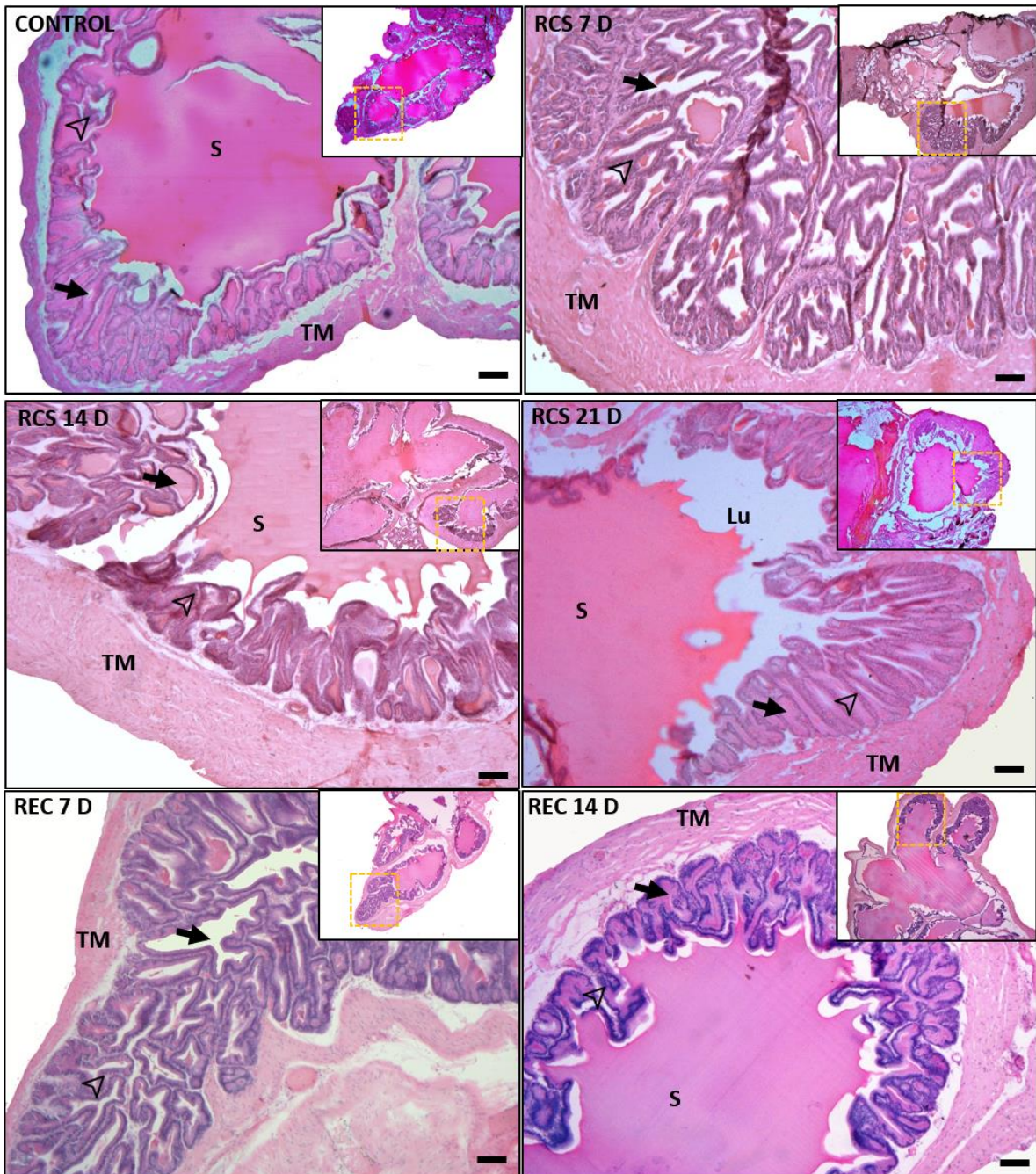


Figura 20. Fotomicrografías de la histología de las Vesículas seminales de la rata. Se observan cambios importantes en la estructura de la mucosa (punta de flecha) y secreción (S) durante el periodo de RCSMOR en comparación con el control. A los 7 días de RCSMOR se observó la disminución de la secreción dentro de las criptas de la mucosa (flecha). A los 14 días de RCSMOR se observó un incremento en la secreción en el lumen (recuadro superior derecho), sin embargo, se mostró una disminución en los pliegues de la mucosa. A partir de los 7 y 14 días de recuperación se observaron cambios en la estructura de la mucosa y la cantidad de secreción en las criptas. (HE, Barra 100  $\mu$ m, aumento original X50; recuadros superiores derechos aumento original X12.50, Barra 400  $\mu$ m). Tejido muscular (TM).

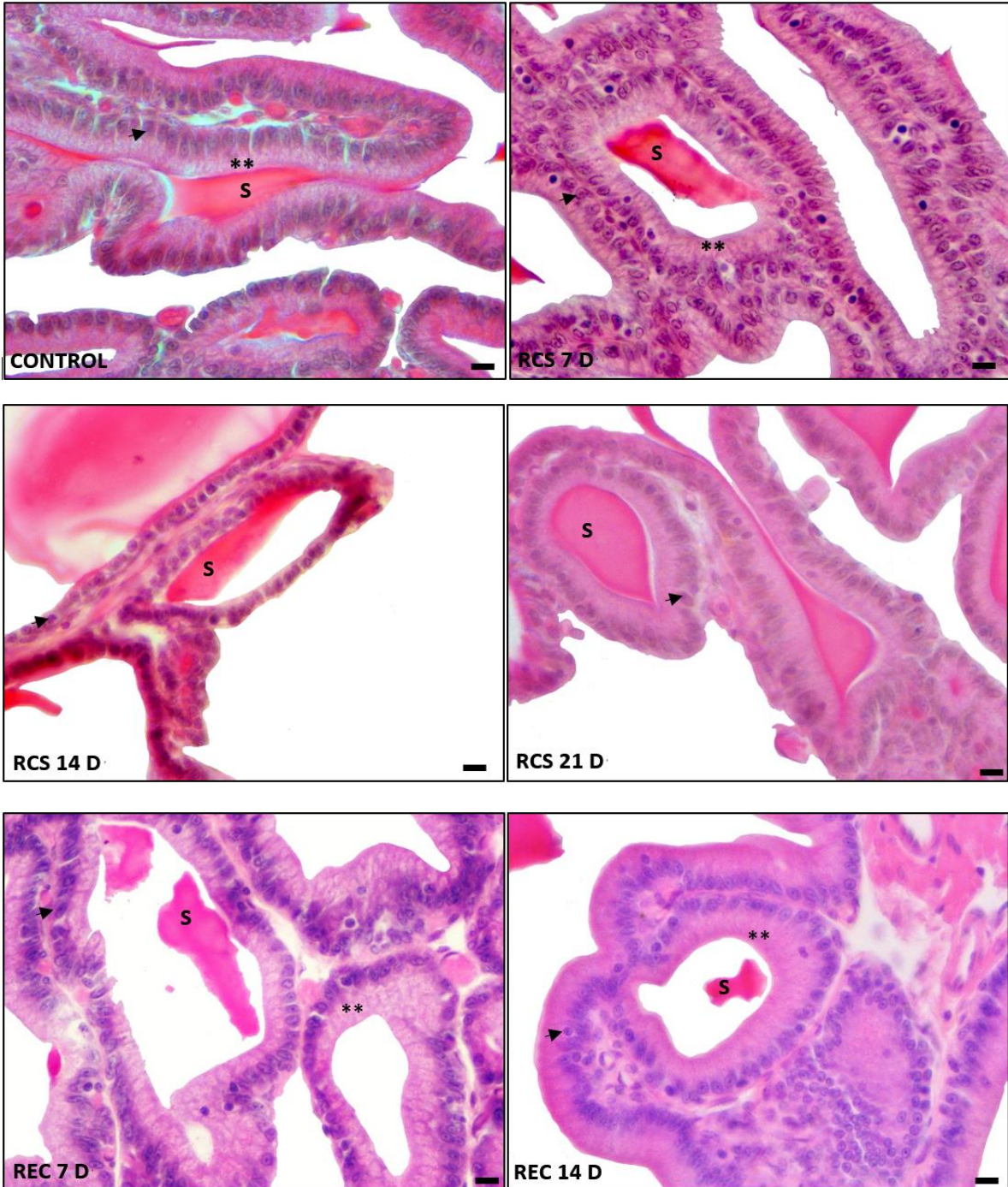


Figura 21. Fotomicrografías que destacan la altura del epitelio de vesículas seminales de rata. Se observó en el control la composición del epitelio (\*), con un núcleo (flecha) alargado y ubicado de manera basal, con un citoplasma ocupado con vesículas secretoras (\*\*) y abundante secreción (S) en las criptas. Se notan cambios ocasionados por las RCSMOR a los 14 días, con disminución de la altura y de las vesículas de secreción; de igual manera disminuyó la secreción observada en las criptas. (HE, Barra 10  $\mu$ m, aumento original X400).



Tabla 11. Área del epitelio secretor, área de secreción y altura del epitelio de las vesículas seminales a lo largo de la RCSMOR y recuperación.

	<b>CONTROL</b>	<b>7 días RCSMOR</b>	<b>14 días RCSMOR</b>	<b>21 días RCSMOR</b>
<b>Área del epitelio (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	5,885,187.19 $\pm$ 829,178.49	6,104,930.45 $\pm$ 1,396,892.42	4,514,671.95 $\pm$ 1,018,460.06	2,540,647.02 $\pm$ 774,663.52*
<b>Área de secreción (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	13,344,088.45 $\pm$ 1,980,327.53	13,438,919.67 $\pm$ 3,898,180.09	7,427,797.32 $\pm$ 1,803,863.27	4,621,372.65 $\pm$ 1,361,079.94*£&
<b>Altura del epitelio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	33.878125 $\pm$ 0.48	25.009375 $\pm$ 2.31	19.5377604 $\pm$ 1.62**	19.7721354 $\pm$ 1.15**

	<b>7 días REC</b>	<b>14 días REC</b>
<b>Área del epitelio (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	1,582,540.79 $\pm$ 187,433.12**§	2,707,820.05 $\pm$ 228,782.47
<b>Área de secreción (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	5,211,105.73 $\pm$ 1,622,038.45**£&	6,387,713.58 $\pm$ 897,082.54
<b>Altura del epitelio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	20.0934896 $\pm$ 0.41**	20.2723438 $\pm$ 0.31**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar ( $\bar{X} \pm \text{E.E.}$ ) (n=2)

\*Diferencia significativa contra el control (p<0.05)

\*Diferencia significativa contra el control (p<0.05)

£ diferente a RCSMOR 7 días (p<0.05)

§ diferente a RCSMOR 7 d (p<0.01)

& diferente a RCSMOR 14 d (p<0.05)

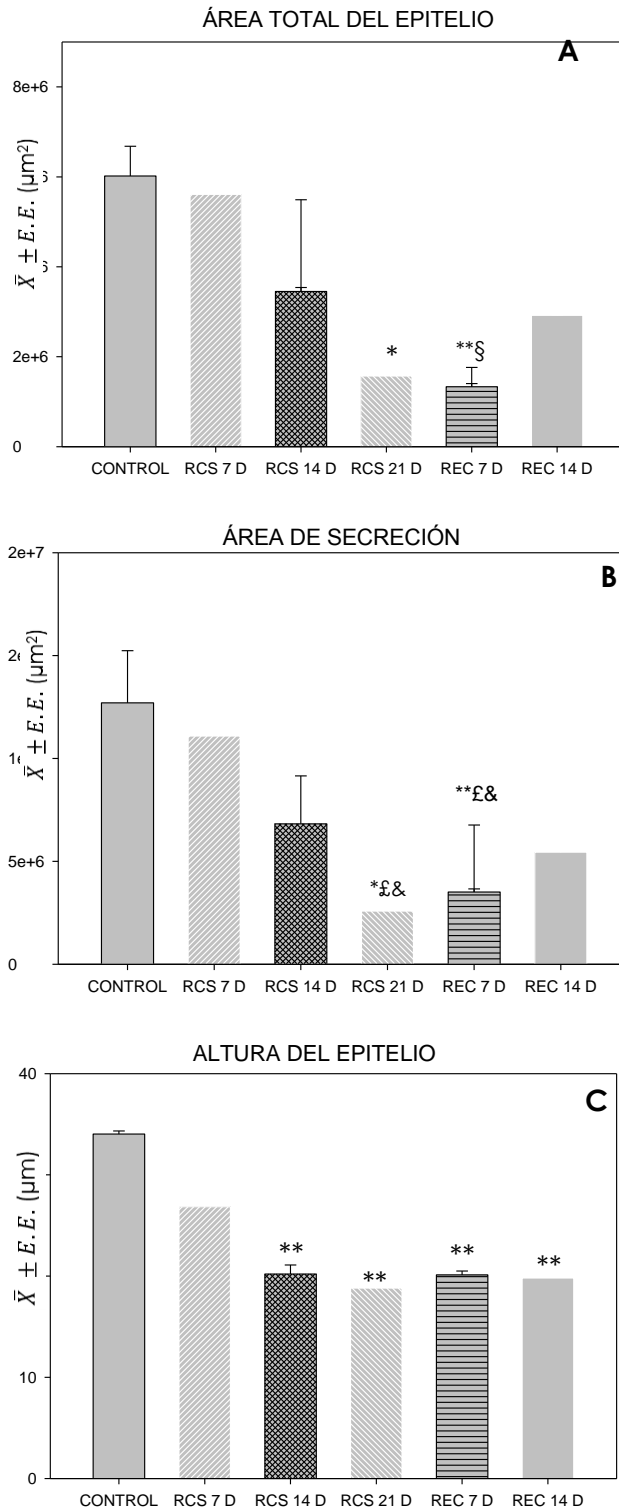


Figura 22. Gráficas del análisis cuantitativo de la histología de vesículas seminales. (A) área total de la glándula, (B) área de secreción y (C) altura del epitelio. Comparación entre el control y los días de RCSMOR y recuperación. ( $\bar{X} \pm E.E.$ ) ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  diferente al control; £ diferente a RCSMOR 7 días  $p < 0.05$ ; § diferente a RCSMOR 7 d  $p < 0.01$ ; & diferente a RCSMOR 14 d  $p < 0.05$ )

## 12. Discusión de resultados

Los resultados obtenidos del presente estudio mostraron que la RCSMOR en las ratas disminuyó el peso corporal y la ingesta alimenticia, no modificó la CSM, redujo la calidad espermática y alteró las características histológicas de las vesículas seminales. En este sentido, se ha evidenciado que la reducción en la cantidad de sueño impacta negativamente en diferentes procesos fisiológicos, contribuyendo al desarrollo de diversos trastornos de salud. La disminución de sueño ocasiona alteraciones metabólicas, conductuales, neuroquímicas y hormonales.

En el caso del humano, se ha mostrado que alteraciones en la cantidad y calidad de sueño impacta negativamente en el metabolismo, asociándose con obesidad y diabetes<sup>44</sup>. Al reducir las horas de sueño incrementa el apetito e índice de masa corporal, reduciendo leptina y aumentando los niveles de ghrelina. En nuestro estudio encontramos que el peso corporal y el consumo de alimento en las ratas disminuyen durante la RCSMOR, con una recuperación gradual durante la REC. Esto pudiera asociarse a que en condiciones de laboratorio los animales solo consumen el alimento que se les proporciona. Los humanos, por el contrario, tienen la facilidad de obtener alimentos con un alto contenido calórico.

En tanto que en el modelo de PSMOR, la alimentación de ratas con un alto contenido calórico no ocasionó incremento del peso o mejoró los efectos de la PS<sup>45</sup>, lo que sugiere que en la pérdida de peso corporal estarían involucrados otros sistemas de regulación. Se ha mostrado, que la PSMOR incrementa los niveles de hormonas catabólicas, como son: Glucocorticoides, epinefrina y norepinefrina; reduciendo los de hormonas anabólicas como leptina, insulina y hormona de crecimiento. Otro de los componentes inherentes de la PSMOR es el estrés, que modifica las preferencias alimenticias, en humanos y en otros animales. La PSMOR impacta en diferentes núcleos hipotalámicos, como, el núcleo arcuato<sup>47</sup>, el cual regula la ingesta alimenticia y participa en el control reproductivo. A su vez, la PSMOR incrementa la actividad simpática, ocasionando

una reducción de la concentración de leptina e incrementando el nivel de glucagón, incluso en la pérdida de peso; esto a su vez incrementa la concentración de ghrelina, favoreciendo la transcripción de Kiss 1<sup>45</sup>, ocasionando cambios en la secreción de GnRH<sup>47</sup>. Por lo cual se debería tener un impacto sobre la reproducción. Aun así, faltarían análisis de la ghrelina y leptina durante el periodo de RCSMOR, para corroborar los resultados que se tienen con PSMOR.

Estudios realizados en ratas machos mostraron que la privación y restricción de sueño indujo alteraciones en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas, disminuyendo la secreción de testosterona<sup>28, 30</sup>. Esta hormona es fundamental para el despliegue de la CSM y el funcionamiento de los órganos andrógeno-dependientes. Asimismo, se ha evidenciado que la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal por el estrés inducido por la RCSMOR<sup>24</sup> reduce los niveles de T, al disminuir la liberación de LH<sup>35</sup>.

La CSM de las ratas se describe como una serie de patrones conductuales que eventualmente culminan en la eyaculación<sup>36</sup>. Los andrógenos son cruciales para la estimulación sensorial<sup>37</sup> y despliegue de la conducta sexual e interacciona con los metabolitos estrogénicos<sup>10</sup>. Trabajos previos realizados con PSMOR han mostrado un efecto negativo en la CSM, incrementando las latencias a monta, intromisión y eyaculación<sup>26, 28, 30</sup>. En el presente trabajo mostramos por primera vez el efecto temporal que la RCSMOR produce sobre la CSM y durante el periodo de recuperación de los animales. Observamos, que la RCSMOR mostró una tendencia a disminuir las latencias a monta e intromisión, lo que nos sugiere que la RCSMOR mejora el componente motivacional. En cuanto al componente ejecutorio no es muy claro, ya que, aunque se muestra una tendencia a disminuir la latencia a eyaculación y el número de montas, el número de intromisiones tiende a incrementar; lo cual puede ser indicativo de que el macho requiere de más intromisiones para lograr alcanzar el umbral eyaculatorio. Aun así, la duración de la serie eyaculatoria mostró una tendencia a disminuir a lo largo de la RCSMOR y REC. Otra característica que forma parte del componente ejecutorio es el índice de intromisión, el cual mostró una tendencia a disminuir durante la

RCSMOR, esto sugiere que la capacidad fértil del macho y la erección peneana se ven disminuidas durante la RCSMOR, corroborando los resultados de la calidad espermática, donde los valores (concentración, movilidad y viabilidad) están disminuidos de manera considerable. Estos resultados contradicen a reportes previos, donde se muestra que condiciones de alteración del sueño y estrés incrementan las latencias, número de eventos y alarga la duración de las series eyaculatorias<sup>28</sup>.

La participación de andrógenos y estrógenos son clave para la modulación de la conducta sexual, así como la progesterona (P). La participación de P en el control de la conducta sexual femenina está bien descrita, en machos se ha mostrado que T es fundamental para el despliegue adecuado de la conducta sexual, pero en situaciones en las que esta hormona se encuentra disminuida, progesterona participa influenciando los mecanismos neuroendocrinos involucrados en la cópula, permitiendo su adecuado despliegue y ayudando en la erección peneana<sup>29, 40</sup>. Los receptores a P se encuentran expresados en MPOA e hipotálamo, de igual manera en hembras y machos, núcleo importante para el despliegue de la CSM<sup>29, 40</sup>. El análisis del efecto de PSMOR y RCSMOR, sobre la concentración de diversas hormonas ya se ha realizado, esto ha permitido evidenciar que ambas condiciones disminuyen la concentración de T, aumenta la concentración de cortisol, mientras que la P se mantiene sin cambios significativos<sup>30</sup>. Por lo cual, sugerimos que la conducta sexual reportada en este trabajo, al no verse afectada con aumento de latencias y número de eventos de las montas, intromisiones y eyaculación, se ve favorecida por la participación de P.

En altas concentraciones la P inhibe la CSM<sup>42</sup>, estudios recientes muestran su efecto sinérgico en conjunto con los andrógenos, así la T mantiene los sitios de unión de P. Pero en ausencia o disminución de T, en la amígdala se incrementan estos sitios y esta a su vez puede modular las rutas bioquímicas, interactuando con MPOA induciendo cambios funcionales en comportamiento dependientes de P como el olfato, cortejo y conducta de apareamiento<sup>42</sup>.

El análisis de la calidad espermática en este trabajo mostró que la concentración espermática se encuentra dentro de los valores previamente descritos<sup>12</sup>, esta concentración se redujo a lo largo de la RCSMOR y durante el periodo de REC la concentración aumentó, sin alcanzar los valores control. Además de esta disminución, se mostraron alteraciones en el tapón seminal, a los 7 días de RCSMOR un mayor porcentaje de animales no presentaron el tapón seminal, en los animales que sí, este tenía una consistencia blanda y no estaba adherido, indicando que no se permitió el adecuado transporte espermático y por lo tanto la concentración fue baja (1.5 millones/ml). El tapón cumple con la función de transporte espermático, al tener una consistencia alterada modifica o incluso elimina el transporte<sup>41, 46</sup>. Sin embargo, a los 21 días de RCSMOR hubo animales que presentaron un tapón endurecido y adherido, aún así, no hubo espermatozoides y fue el valor más bajo de todo periodo de restricción de sueño. Esto puede ser indicativo de que no solo se alteró la función de las glándulas sexuales accesorias, sino que el daño puede asociarse a otras porciones del aparato reproductor masculino involucradas en la formación de los espermatozoides. Sin embargo, hasta el momento no hay trabajos que muestren los cambios en la histología del aparato reproductor masculino de la rata a lo largo de la RCSMOR. En el modelo de PSMOR, Choi y cols., en 2016, mostraron que a los 7 y 14 días de PSMOR se observó una histomorfología anormal de los túbulos seminíferos, provocando retención espermática; por lo cual podríamos sugerir su participación en la ausencia de espermatozoides a los 21 días de RCSMOR a pesar de presentarse el tapón seminal.

Existen dos tipos de movilidad espermática, la movilidad progresiva y la movilidad hiperactivada<sup>12</sup>. La capacidad de movimiento se va adquiriendo en el momento que los espermatozoides atraviesan el epidídimo, en la cabeza del epidídimo tienen un ritmo vibratorio o lento inefectivo que resulta en un patrón de nado en círculos. En cambio, los espermatozoides de la cola del epidídimo tienen movilidad progresiva, ya que el flagelo parece ser más rígido y disminuye el arco de curvatura. Después de un periodo de tiempo en el tracto femenino, los espermatozoides despliegan la movilidad hiperactivada, que se caracteriza por

golpes en forma de látigo de alta amplitud del flagelo, curvas flagelares asimétricas y una trayectoria de natación circular o errática. Algunos factores involucrados en la movilidad son Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y adenosín monofosfato cíclico (cAMP) <sup>39</sup>. Los espermatozoides evaluados, mostraron un deterioro en la movilidad progresiva e *in situ*, con una tendencia a disminuir a lo largo del periodo de RCSMOR y durante la recuperación, incrementando a su vez el porcentaje de espermatozoides inmóviles durante todo el experimento. Esto podría deberse a posibles factores como: alteraciones en la maduración epidídima, para lo cual sería conveniente un análisis detallado de su histomorfología; otro podría ser que no se lleva a cabo la hiperactivación en el momento de la capacitación en el tracto femenino, debido a la disminución de los nutrientes que aportan las glándulas sexuales accesorias, ya que las hembras utilizadas no se sometieron a otra condición que pudiera interferir con la capacitación. Además de estos factores, también se ha evidenciado que la PSMOR y RCSMOR ocasionan cambios en la estructura y función de la próstata ventral ocasionando una atrofia glandular<sup>9</sup>, indicando otros posibles factores que interfieren en la buena calidad espermática y del tapón seminal.

Las vesículas seminales son glándulas con adenómeros de luz irregular, se caracterizan por tener epitelio que varía citológicamente, ya que se observan zonas donde es cilíndrico y otras donde aparece pseudoestratificado, con un núcleo alargado ubicado en posición basal y en la parte apical se encuentra el citoplasma ocupado por vesículas de secreción<sup>51</sup>. La mucosa forma paredes altamente plegadas y contorneadas hacia la luz, donde se encuentra secreción acumulada, conformando en algunas regiones criptas. Asimismo, este epitelio tiende a presentar citoplasma intensamente eosinófilo debido a la composición química de sus secreciones.

En el grupo de RCSMOR por 7 días se observaron características similares al control: los pliegues de la mucosa, con revestimiento epitelial sin variaciones, formando acinos de gran tamaño con ligera disminución de la secreción contenida en las criptas de la mucosa. A los 14 y 21 días de RCSMOR cambió el tamaño de

los pliegues de la mucosa, estos se redujeron y con presencia de abundante secreción luminal. El área y la altura del epitelio mostraron disminución significativa a los 21 días de RCMOR con la consecuente variación de la mucosa, con menor número de pliegues. En el espacio de las criptas la secreción se redujo, no obstante se observa abundante secreción en el lumen. Situación que se explica por el vaciamiento de la secreción criptal hacia el lumen, debido a la reducción del área epitelial con la consecuente disminución de los pliegues de la mucosa. Los cambios citológicos del epitelio incluyen una disminución de las vesículas de secreción apicales. La citología epitelial, el plegamiento de la mucosa y el área de secreción en los grupos de RCMOR se ven modificados probablemente por la variación hormonal que esta condición provoca. Las características histomorfológicas que se ven modificadas durante la restricción vuelven a presentar similitudes al control después del periodo de recuperación, lo que se explica probablemente por la normalización del ambiente hormonal.

Los cambios en la viabilidad y movimiento de los espermatozoides, así como las características del tapón seminal, están directamente relacionados con las secreciones provenientes del complejo prostático<sup>52</sup>. Las vesículas seminales se encargan de la secreción de Fructuosa, proteínas y antioxidantes<sup>38</sup>. Además, provee más del 70% del total del fluido seminal y es importante para la formación del tapón seminal<sup>46</sup>. En algunas de las muestras analizadas se incrementó la viscosidad, por lo que no fue posible su manejo. La presencia de una alta viscosidad regularmente se relaciona con hipofunción de las vesículas seminales, ocasionando bajo conteo espermático y asociándose con infertilidad<sup>38</sup>. Después de la eyaculación, los espermatozoides consumen la fructuosa en un proceso conocido como fructólisis, para la obtención de energía. La secreción de fructuosa está dada por el incremento de óxido nítrico, controlado por estímulos colinérgicos. Además de esto, algunos productos de las vesículas seminales son estimuladores de la movilidad, como potasio, bicarbonato, magnesio, 19-OH-prostaglandina y prolactina, de igual manera la disminución en estos productos culmina en infertilidad; sus secreciones son útiles como defensa para disminuir los niveles de especies reactivas de oxígeno, entre los antioxidantes secretados se encuentran



el superóxido dismutasa, catalasa, glutatión, ácido ascórbico y tioles<sup>38</sup>. Otra propiedad con la que cuenta las secreciones de las vesículas seminales es la estabilidad de la cromatina, disminuyendo la cantidad de zinc contenido en los puentes disulfuro que dan estabilidad a la compactación del DNA dado por proteaminas, para permitir que se dé una adecuada descondensación de la cromatina cuando el espermatozoide penetra el ovocito. El adecuado funcionamiento de las vesículas seminales está dado por el incremento de la testosterona circulante, pero se ha demostrado que también posee receptores LH/hCG, por lo cual también es posible que sea un órgano potencial de la regulación LH<sup>38</sup>. Se ha evidenciado el efecto de kisspeptina sobre la histomorfología de vesículas seminales y la concentración de fructosa, mostrando alteraciones importantes que pueden repercutir en la viabilidad de los espermatozoides<sup>43</sup>. Como se mencionó anteriormente, varios estudios corroboran la relación de la RCMOR con el incremento de Kisspeptina, debido a cambios en el metabolismo por el núcleo arcuato y por regulación en el eje HHA; este péptido se encarga además de la regulación del eje HHG. Al incrementarse cortisol, KISS se incrementa inhibiendo GnRH y LH, por lo tanto, ocasiona la disminución de T<sup>35</sup>. Las vesículas seminales son andrógeno dependiente, por lo que la determinación de fructosa secretada muestra una relación del nivel de fructosa con la actividad andrógena del tracto reproductor<sup>43</sup>.

Con base a nuestros resultados, mostramos el efecto negativo de la RCMOR sobre la calidad espermática e histomorfología de las vesículas seminales. Para esto proponemos, de acuerdo con trabajos previos sobre estrés y privación de sueño que la RCMOR ocasiona cambios en la secreción de leptina y ghrelina, disminuyéndola e incrementándola, respectivamente. El incremento de ghrelina repercute en el núcleo arcuato que se encarga de la regulación de la ingesta alimenticia (NPY) y la regulación de la reproducción (Kiss1). Kiss 1 se encarga de inhibir a GnRH, disminuyendo la secreción de LH, por lo tanto, la testosterona también disminuye. Afectando a órganos andrógeno-dependientes, como las vesículas seminales. También situaciones de estrés pueden tener efecto sobre el eje HHG a través del eje HHA. La RCMOR provoca un componente inherente de

estrés, por lo cual, el incremento de glucocorticoides incrementa la secreción de Kiss ocasionado la inhibición de GnRH y también de manera directa sobre LH (Fig. 23).

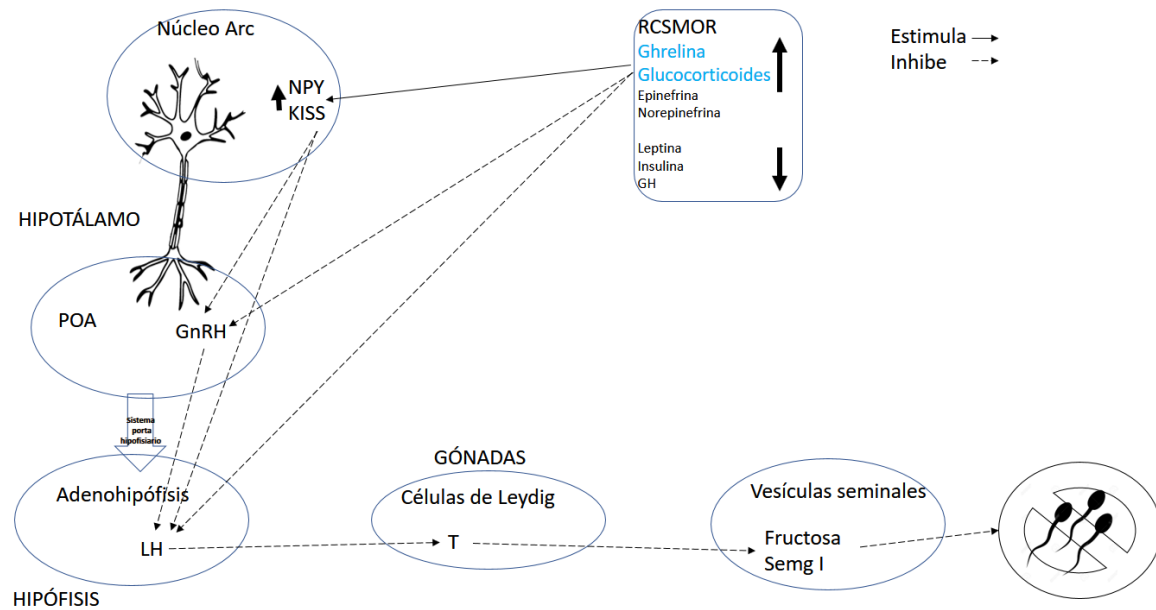


Figura 23. Modelo propuesto del efecto de la RCSMOR sobre el eje H-H-G. Se propone que las alteraciones ocasionadas sobre las vesículas seminales y calidad espermática pueden estar dadas por el incremento de ghrelina o de glucocorticoides, influyendo para que incremente Kiss, afectando el eje HHG con la inhibición de GnRH y LH.

### 13. Conclusiones:

La RCSMOR en las ratas produjo los siguientes efectos:

- Propició una reducción del peso corporal e ingesta alimenticia.
- Provocó una tendencia a mantener el componente motivacional y el ejecutorio en la CSM.
- Modificó las características del eyaculado, disminuyendo la concentración, viabilidad y movilidad.
- Redujo la actividad secretora de las vesículas seminales contribuyendo a la disminución en la calidad espermática.

Durante el periodo de recuperación:

- Favoreció la recuperación de peso e ingesta alimenticia
- Mantuvo el componente motivacional y ejecutorio de la CSM.
- Incremento la concentración espermática, así como la viabilidad y movilidad.
- Mostró un cambio favorable de la histomorfología de las vesículas seminales, aún así se requiere de más tiempo para obtener una calidad espermática óptima.

## 14. Perspectivas

A partir de este estudio las perspectivas que tenemos son:

- Evaluar el efecto de la RCSMOR sobre las glándulas sexuales accesorias, como próstata dorsal y lateral, y glándulas coagulantes. Ya que aún no se han realizado, esto nos podría dar un análisis más integrativo de la función y cambios en la morfología en el periodo de RCSMOR y REC, con el fin de tener información del aporte nutricional que brindan en el plasma seminal a los espermatozoides durante la restricción de sueño.
- Además, sería conveniente analizar la calidad de los espermatozoides desde el epidídimo, para lograr así asociar o negar que los cambios en la calidad espermática, como concentración, movilidad o viabilidad, son causa exclusivamente del plasma seminal o por otro proceso que es parte de la formación y maduración del espermatozoide. Incluyendo un estudio de su histomorfología.
- Por otra parte, sería importante el evaluar concentraciones de hormonas como testosterona, progesterona, corticosterona, leptina y ghrelina; a lo largo del periodo de RCSMOR, así como en la REC, para corroborar los cambios propuestos, debido a que la mayoría de la información muestra los cambios solo al término del modelo de la PSMOR.
- Por último, es importante considerar periodos más largos de REC, ya que el tiempo que evaluamos, no fue suficiente para que los animales obtuvieran los valores iniciales de los diversos parámetros evaluados.

## 15. Referencias

- [1] Carrillo-Mora, P., Ramírez-Peris, J., Magaña-Vázquez, K. (2013). Neurobiología del sueño y su importancia: antología para el estudiante universitario. *Rev. Fac Med*, 56(4): 5-15.
- [2] Ayala-Guerrero, F., Mexicano, G. (2008). Filogenia del sueño: de invertebrados a vertebrados. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 8(1):37-45.
- [3] Jiménez-Anguiano, A., Pacheco-Granados, L., Moreno-Montiel, H. Saldaña-Juárez, C. Velázquez Moctezuma, J. 2006. Factores Inductores Del Sueño. En Quintanar, S. J. L. (Ed) *Neurobiología Experimental De La Conducta: Fundamentos Tópicos Afines* (p. 29-46). México: Departamento Editorial de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- [4] Blanco-Centurión, C. (2008). Introducción al estudio del ciclo vigilia-sueño. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 8(1): 6-18.
- [5] Everson, C. A. (1995). Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. *Behav Brain Res*. 69: 43-54.
- [6] Machado-Borges, R., Hipólido, D.C., Benedito-Silva, A.A., Tufik, S. (2004). Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Behav Brain Res*, 1004: 45-51.
- [7] Wittert, G. 2014. The relationship between sleep disorders and testosterone. *Androgens*. 21: 239-43.
- [8] Suchecki, D., Duarte-Palma, B., Tufik, S. (2000). Sleep rebound in animal deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. *Behav Brain Res*, 875: 14-22.
- [9] Venâncio, D. P., Andersen, M. L., Vilamaior, P. S. L., Santos, F.C, Zager, A., Tufik, S., Taboga, S. R., De Mello, M. T. (2012). Sleep deprivation alters rat ventral

prostate morphology, leading to glandular atrophy: a microscopic study contrasted with the hormonal assays. *J Biomed Biotechnol.* 2012: 1-6.

[10] Morali, G. (1996). Regulación hormonal de la conducta sexual masculina. En: Velázquez-Moctezuma, J. *Biología de la Reproducción* (p. 399-412). México: Reproducciones litográficas.

[11] Eguibar, J. R., Cortés, M. C., Adams. (2013). Control fisiológico de la conducta sexual, la erección y la eyaculación. En: Eguibar, Cuenca, J. R., Cruz, Gómez, Y. *Aparato urogenital. De la biología a la fisiopatología* (pp. 129-144). México: Universidad Autónoma de Tlaxcala.

[12] Lucio, R. A. & Tlachi-López, J. L. (2008). Análisis de la copula y el eyaculado en la rata albina (*Rattus norvegicus*): Manual de Laboratorio. México: Góngora Ediciones.

[13] Jesik, C. J. Holiand, M. Lee, C. 1982. An Anatomic and Histologic Study of the Rat Prostate. *The prostate*, 3: 81-97.

[14] Andersen, M. L., Alvarenga, T.L., Mazaro-Costa, R., Hachul, H. C., Tufik, S. (2011). The association of testosterone, sleep, and sexual function in men and women. *Brain Res*, 1416: 80-104

[15] Tartavouille, T. M., Porche, D. J. (2012). Low testosterone. *J Nurse Pract*, 8(10): 778-786.

[16] Oh MM, Kim JW, Jin MH, Kim JJ, Moon DG. (2012). Influence of paradoxical sleep deprivation and sleep recovery on testosterone level in rats of different ages. *Asian J Androl*, 14(2):330-334.

[17] Gilany, K., Minai-Tehrani, A., Savadi-Shiraz, E., Rezadoost, H., Lakpour, N. (2015). Exploring the Human Seminal Plasma Proteome: An Unexplored Gold Mine of Biomarker for Male Infertility and Male Reproduction Disorder. *J Reprod Infertil*, 16(2): 61-71.

- [18] Gambineri A., Pelusi C., Pasquali R. (2003). Testosterone levels in obese male patients with obstructive sleep apnea syndrome: relation to oxygen desaturation, body weight, fat distribution and the metabolic parameters. *J Endocrinol Invest.* 26: 493–8.
- [19] Hammoud, O. A., Carrell, T. D., Gibson, M., Peterson, C. M., Meikle, A. W. (2012). Updates on the relation of weight excess and reproductive function in men: sleep apnea as a new area of interest. *Asian J Androl*, 14: 77-81.
- [20] Jouvet, D., Vimont, E., Delorme, F., Jouvet, M. (1964). Étude de ña privation sélective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *C. R. Soc. Biol*, 158: 756-59.
- [21] Cohen, H. B., Dement, W. C. (1965). Sleep: changesd in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of paradoxical phase. *Science*, 150: 1328-19.
- [22] Van Hukzen, Z. J. M., Coenen, A. M. L. (1981). PS deprivation and locomotor activity in rats. *Physiol Behav*, 27: 741-44.
- [23] Suchecky, D., Tufik, S. (1998) Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of PS deprivation, *J Sleep Res*, 7: 276-281.
- [24] Machado R. B., Hipólide, D. C., Benedito-Silva, A. A., Tufik, S. (2004). Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res*, 1004 (2004): 45-51.
- [25] Suchecki, D., Duarte, Palma, B., Tufik, S. (2000). Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. *Brain Res*, 875:14-22.
- [26] Velázquez-Moctezuma, J., Monroy, E., Cruz, M. (1989). Facilitation of the effect testosterone on male sexual behavior in rats deprived of REM sleep. *Behav Neural Biol*, 51(1):46-53

- [27] Jensen, T. K., Anderson, A. M., Skakkebaek, N. E., Joensen, U. N., Jensen, M. B., Lassen, T. H., Nordkap, L., Olesen, I. A., Hansen, A. M., Rod, N. H., Jorgensen, N. (2013). Association of Sleep Disturbances with Reduced Semen Quality: A Cross-sectional Study among 953 Healthy Young Danish Men. *Am J Epidemiol*, 177(10): 1027-37.
- [28] Velázquez-Moctezuma, J., Salazar-Domínguez, E., Retana-Márquez, S. (1996). Effects of short- and long-term REM sleep deprivation on sexual behavior in male rats. *Physiol Behav*, 59(2):277-81
- [29] Alvarenga, T. A., Andersen, M. L., Velázquez-Moctezuma, J., Tufik, S. (2009). Food restriction or sleep deprivation: Which exerts a greater influence on the sexual behavior of male rats? *Behav Brain Res*, 202(2):266-271.
- [30] Alvarenga, T. A., Hirotsu, C., Mazaro-Costa, R., Tufik, S., Andersen, M. L. (2015). Impairment of male reproductive function after sleep deprivation. *Fertil Steril*, 103(5):1355-62.
- [31] Choi, J. H., Lee, S. H., Bae, J. H., Shim, J. H., Park, H. S., Kim, Y. S., Shin, C. 2016. Effect of sleep deprivation on the male reproductive system in rats. *JKMS*. 31: 1624-30.
- [32] Lucio, R. A., Rodríguez-Piedracruz, V., Tlachi-López, J. L., García-Lorenzana, M., Fernández-Guasti, A. (2014). Copulation without seminal expulsion: the consequence of sexual satiation and Coolidge effect. *Androl*, 2: 450-57.
- [33] Jiménez-Anguiano, A., Arteaga-Silva, M., Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Masculine sexual activity affects slow wave sleep in Golden hamsters. *Brain Res Bull*, 59(6):429-32.
- [34] Machado R. B., Tufik, S., Suchecki, D. (2013) Role of Corticosterone on Sleep Homeostasis Induced by REM Sleep Deprivation in Rats. *PLoS ONE*, 8(5): e63520.



- [35] Kirby, D. E. Geraghty, A. C. Ubuka, T. Bentley, G. E. Kaufer, D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *PNAS*. 106(27): 11324-11329.
- [36] Veening, J. G. Coolen, L. M. 2013. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: Emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*.
- [37] Petrulis, A. 2013. Chemosignals and hormones in the neural control of mammalian sexual behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 34: 255-67.
- [38] Gonzales. G. F. 2001. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl* 3: 251-58.
- [39] Neill, D. J. (Ed). 2006. Knobil and Neill's Physiology of reproduction. Tercera edición. Elsevier Inc.
- [40] Witt, D. M. Young, L. J. Crews, D. 1995. Progesterone modulation of androgen-dependent sexual behaviour in male rats. *Physiology & Behavior* 57(2): 307-313.
- [41] Kawano, N. Araki, N. Yoshida, K. Hibino, T. Ohnami, N. Makino, M. Kanai, S. Hasuwa, H. Yoshida, M. Miyado, K. Umezawa, A. (2014). Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *PNAS*; 111(11): 4145-50.
- [42] Witt, D. M. Gao, G. Cadwell, J. D. (2003). Testosterone and sexual experience alter levels of plasma membrane binding sites for progesterone in the male rat brain. *Horm Metab Res*; 35: 69-75.
- [43] Ramzan, F. Khan, M. A. Ramzan, M. H. 2014. The effect of chronic kisspeptin administration on seminal fructose levels in male mice. *Endocrine*; 45: 144-47
- [44] Escobar, C. Gonzalez-Guerra, E. Velasco-Ramos, M. Salgado-Delgado, R. Ángeles-Castellanos, M. 2013. La mala calidad de sueño es factor promotor de obesidad. *Rev Mex De trastor Aliment*; 4(2): 133-42.

- [45] Martins, P. JF. Fernandes, L. de Oliveira, A. C. Tufik, S. D´Almeida, V. 2011. Types of diet modulates the metabolic response to sleep deprivation in rats. *Nutrition & Metabolism*; 8(1): 86.
- [46] Kawano, N. Araki, N. Yoshida, K. Hibino, T. Ohnami, N. Makino, M. Kanai, S. Hasuwa, H. Yoshida, M. Miyado, K. Umezawa, A. 2014. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *PNAS*, 111(11): 4145-50.
- [47] Okamura, H. Yamamura, T. Wakabayashi, Y. 2013. Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: an overview of kisspeptin research in domestic animals. *Animals Science Journal*, 84: 369-81.
- [48] Parra, R. Del Sol, M. (2002). Estudio histológico e histoquímico del epidídimo de conejo. *Rev Chil Anat*, 20(3): 269-274.
- [49] McGraw, L. A. Suarez, S. S. Wolfner, M. F. 2014. On matter of seminal importance. *Bioessays* 37: 142-47.
- [50] Hsied, J. T. Liu, S. P. Chang, H. C. Kuo, Y. C. Chen, J. H. Jaw, F. S. Tsai, V. F. 2010. Parasympathetic influence plays an independent and significant role in inducing the contraction of the seminal vesicle of the rat. *Urology* 76(2): 511.e1-511.e4.
- [51] Atlas de histología vegetal y animal (2018). Órganos animales: Vesícula seminal. España, Universidad de Vigo. Recuperado de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/reproductor-vesicula-seminal.php#n>
- [52] Tlachi-López, J. L. López, A. Hoffman, K. Velázquez-Moctezuma, J. García-Lorenzana, M. Lucio, R. A. 2011. Rat dorsal prostate is necessary for vaginal adhesion of the seminal plug and sperm motility in the uterine horns. *Biol Res* 44: 259-267.
- [53] Presnell, J. K. Schreibman, M. P. Animal Tissue Techniques. Quinta edición. The Johns Hopkins University Press. London.

[54] Guevara Pérez. M. A. Amezcua Gutiérrez, C. C. Hernández González, M. Sanz Martín, A. 2012. SexyMater: programa computacional para el registro y análisis de conductas sexuales y maternales en roedores. *Neurobiología* 3(1): 080112.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00051

Matrícula: 2153803691

"Influencia de la restricción crónica de sueño MOR sobre las características del eyaculado e histomorfología de las glándulas sexuales accesorias"

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 2 del mes de marzo del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES  
DR. JOSE LUIS TLACHI LOPEZ  
DR. MARCOS GARCIA JUAREZ  
DR. MARIO GARCIA LORENZANA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ANA KAREN LEON OLGUIN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ANA KAREN LEON OLGUIN  
ALUMNA

REVISÓ  
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISSASI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL

DR. JOSE LUIS TLACHI LOPEZ

VOCAL

DR. MARCOS GARCIA JUAREZ

SECRETARIO

DR. MARIO GARCIA LORENZANA