



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“PAPEL DE LA INERVACIÓN SENSORIAL
EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS
TESTICULARES”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. GERMÁN LEÓN LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ROSALINA MARÍA DE LOURDES REYES LUNA

Vo. Bo.

CO-DIRECTOR:

M. en C. JUAN CARLOS FLORES ALONSO

Vo. Bo.

Diciembre/2019



H. Puebla de Z. a 22 de Noviembre de 2019

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado
Maestría en Ciencias Biológicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

“PAPEL DE LA INERVACIÓN SENSORIAL EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS
TESTICULARES”

Que presenta el estudiante Germán León López con número de matrícula 217470721, aspirante al grado de Maestro en Ciencias Biológicas, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: Estructura y funcionamiento de los seres vivos, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: Dra. Lorena Milflores Flores

Tutor Externo: Dra. Maricruz Anaya Ruiz

Revisor: M. en C. Ubaldo Quiróz López



Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

DECLARATORIA DE TRABAJO ORIGINAL

Por este conducto, Yo, **Germán León López**, declaro que el trabajo de investigación titulado: **“PAPEL DE LA INERVACIÓN SENSORIAL EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TESTICULARES”**, desarrollado para la obtención del grado de; **Maestro en Ciencias Biológicas**, otorgado por la **Facultad de Ciencias Biológicas** de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, es de mi autoría y no ha sido previamente presentado para la obtención de ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

El presente trabajo de investigación se realizó gracias al apoyo de las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgar beca nacional para estudios de posgrado. Número de apoyo: 712252.

Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP), por otorgar beca para estudios de posgrado, durante el tiempo que no se contaba con la beca de CONACyT.

Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por otorgar beca complementaria para estudios de posgrado.

Integrantes del área académica y administrativa de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por el apoyo para ingresar al Programa Nacional de Posgrados de Calidad y por el apoyo para los tramites de titulación.

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP, Puebla, Puebla, México. Por la capacitación en la técnica de espermatobioscopia y por facilitarme el uso de reactivos, material y equipos de laboratorio para el trabajo de experimentación.

Laboratorio de Histofisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP, Puebla, Puebla, México. Por la capacitación en la técnica de histología, perfusión, preparación y aplicación de capsaicina y por facilitarme el uso de reactivos, material y equipos de laboratorio para el trabajo de experimentación.

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Metepec, Puebla, México. Por la capacitación en las siguientes técnicas: cultivos celulares, espermatobioscopia, fragmentación de ADN, inmunofluorescencia y por facilitarme el uso de reactivos, material y equipo de laboratorio para el trabajo de experimentación.

Agradecimientos

A mi directora de tesis, Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna, por los consejos y el conocimiento compartió para poder desarrollar mi proyecto, por el apoyo en trámites y principalmente por darme su valioso tiempo cada vez que tuve dudas y que necesite de su apoyo.

A mi co-director de tesis, M. en C. Juan Carlos Flores Alonso, por su paciencia y disponibilidad para enseñarme técnicas que utilicé en el proyecto, por los consejos académicos, por el apoyo para poder obtener una beca complementaria cuando aún no se contaba con la beca del CONACyT.

Al M. en C. Ubaldo Quiróz López, por compartir sus conocimientos sobre inervación sensorial y fisiología reproductiva, por compartir técnicas que utilicé en el proyecto, por apoyarme para la asistencia al congreso de neurociencias, por su disposición de tiempo cuando necesite de su asesoría en relación al proyecto de investigación y principalmente gracias por su valiosa amistad incondicional.

A la Dra. Maricruz Anaya Ruiz, por las sugerencias sobre el desarrollo del proyecto y los consejos académicos.

A la Dra. Lorena Milflores Flores, por los consejos y sugerencias para el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Ma. Guadalupe Delgado López, por compartir sus conocimientos en histología y facilitarme el uso del micrótomo.

A Zaira y Gabriela (Gabi) y a todos los que integran el Laboratorio de Biología de la reproducción de la BUAP, por su apoyo incondicional y sus consejos.

A mis compañeros y amigos; Arturo, Estrella, Gabriela, Diego, Jesús, Mayra, Fatima, Carolina, Zaya, y los nuevos integrantes del laboratorio de Histofisiología de la BUAP; por el apoyo incondicional y por su valiosa amistad.

A mis compañeros y amigos; Pablo, Ángeles, Danae, Ulises, Israel, Daniel, Miguel, Alberto, Leslie, Pedro, Karina, Elizabeth, Maylet, Nadia, Noemí, Marisel, Gustavo,

y los nuevos integrantes del laboratorio de Biología de la Reproducción del Centro de Investigación Biomedica de Oriente (CIBIOR); por su apoyo durante los experimentos, los conocimientos compartidos, sugerencias, y sobre todo por su valiosa amistad.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Ciencias Biológicas, Judith, Concepción, Lilia, Samanta, Mariana, María de Jesús, Jesús, Fernando.

A cada una de las personas que de alguna manera me brindaron su apoyo a lo largo de mis estudios de maestría.

A mis padres; Silverio Juan y María de los Gozos y mis hermanos; Lariza, Jose Manuel, Rene, Magali, Ramiro, Juan Diego y David Josué, por estar conmigo apoyándome de todas las maneras posibles e imposibles en todo momento que los he necesitado.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. SISTEMA NERVIOSO	4
2.1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	4
2.1.2. SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO.....	8
2.1.3. SISTEMA SENSORIAL	12
2.1.4. FIBRAS TIPO C.....	13
2.1.5. RECEPTOR TRPV1.....	14
2.2. INERVACIÓN TESTICULAR.....	18
2.3. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL TESTÍCULO.....	22
2.3.1. ESPERMATOGÉNESIS.....	28
2.3.2. REGULACIÓN NEUROENDÓCRINA DE LA ESPERMATOGÉNESIS.....	33
2.3.3. PAPEL DE LA INERVACIÓN EN LAS FUNCIONES DEL TESTÍCULO	41
2.4. PROLIFERACIÓN CELULAR INCONTROLADA Y CÁNCER TESTÍCULAR	46
2.5. CARCINÓGENOS DE ORIGEN NATURAL.....	53
2.6. <i>Echeveria gibbiflora</i>	55
3. ANTECEDENTES	57
4. JUSTIFICACIÓN	61
5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	61
6. OBJETIVOS	62
6.1. Objetivo general.....	62
6.2. Objetivos particulares	62
7. MATERIALES Y MÉTODOS	63
7.1. <i>Lugar donde se desarrolló el proyecto</i>	63
7.2. <i>Diseño experimental y procedimiento</i>	63
7.3. PROCEDIMIENTOS	64
7.3.1. <i>Inducción de proliferación de células testiculares con extracto acuoso de Echeveria gibbiflora</i>	64
7.3.2. <i>Análisis espermático</i>	65

7.3.3.	<i>Fragmentación de ADN en espermatozoides (prueba COMETA)</i>	65
7.3.4.	<i>Análisis histológico de testículo</i>	66
7.3.5.	<i>Análisis morfométrico de los túbulos seminíferos</i>	67
7.3.6.	<i>Inmunofluorescencia para proliferación celular (Ki67) y CGRP</i>	67
7.3.7.	<i>Análisis estadístico</i>	68
7.3.8.	<i>Aspectos éticos</i>	68
8.	RESULTADOS	69
8.1.	<i>Motilidad espermática</i>	69
8.2.	<i>Vitalidad espermática</i>	70
8.3.	<i>Concentración espermática</i>	71
8.4.	<i>Fragmentación espermática</i>	74
8.5.	<i>Análisis histológico de testículo</i>	75
8.6.	<i>Morfometría de los túbulos seminíferos</i>	77
8.7.	<i>Expresión del marcador de proliferación (Ki-67) y el neurotransmisor CGRP</i>	82
9.	DISCUSIÓN	88
10.	CONCLUSIONES	100
11.	REFERENCIAS CITADAS	101
12.	ANEXO 1	114
12.1.	Evidencias de participación en congresos y actividades de divulgación	114

INDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1.- Encéfalo y médula espinal.....	7
Figura 2.- Nervios espinales.....	9
Figura 3.- Conexión de los nervios espinales con la médula espinal.....	11
Figura 4.- Receptor TRPV1.....	15
Figura 5.- Desfuncionalización de neuronas sensoriales por capsaicina.....	17
Figura 6.- Inervación del testículo.....	19
Figura 7.- Núcleos del sistema nervioso central relacionados con la inervación del testículo.....	21
Figura 8.- Anatomía del aparato reproductor masculino.....	23
Figura 9.- Compartimento intersticial y tubular del testículo.....	24
Figura 10.- Células que componen el epitelio germinal del testículo.....	27
Figura 11.- Seminoma y seminoma espermatocítico.....	48
Figura 12.- No- seminomas.....	50
Figura 13.- Resultados del porcentaje de motilidad espermática.....	70
Figura 14.- Resultados del porcentaje de vitalidad espermática.....	71
Figura 15.- Resultados concentración espermática.....	73
Figura 16.- Resultados Fragmentación de ADN espermático.....	74
Figura 17.- Resultados cortes histológicos de testículo de ratón.....	75
Figura 18.- Formación de conglomerados celulares en el espacio luminal del túbulo seminífero.....	77
Figura 19.- Resultados área del túbulo seminífero.....	78
Figura 20.- Resultados área del epitelio germinal.....	79
Figura 21.- Resultados del área del Lúmen.....	80

Figura 22.- Área del epitelio germinal en porcentajes.....	81
Figura 23.- Resultados de inmunofluorescencia.....	83
Figura 24.- Resultados intensidad de fluorescencia de Ki-67.....	85
Figura 25.- Resultados intensidad de fluorescencia de CGRP.....	87

1. RESUMEN

La proliferación celular incontrolada, es una de las características principales en enfermedades como el cáncer, que puede generarse en la mayoría de los órganos del cuerpo, provocando la formación de tumores que pueden adquirir la capacidad de provocar metástasis hacia puntos distantes del lugar de origen, causando en algunos casos la muerte de los pacientes. El testículo también puede presentar este tipo de anomalías entre las células que lo componen, sin embargo, los mecanismos que podrían estar regulando este cambio en las células no están bien esclarecidos. Se ha reportado que la inervación sensorial, está involucrada en procesos de metástasis y proliferación celular en algunos tipos de cáncer, como el adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer de células basales y cáncer de mama. Sin embargo, se desconoce si la inervación sensorial, también presente en los testículos, participa en la proliferación celular y en el desarrollo de tumores de origen testicular. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el papel de la inervación sensorial en la proliferación de células testiculares. Se utilizaron 24 ratones de la cepa CD1 de 35 días de edad, los cuales fueron divididos en 4 grupos; dos grupos (IPC e IPC+Caps) fueron inducidos a proliferación de células testiculares mediante la administración de extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* durante 4 días a una dosis de 100mg/kg por vía intraescrotal. Posteriormente, el grupo IPC+Caps fue denervado con capsaicina mediante la administración de 125mg/kg por vía subcutánea, el otro grupo inducido (IPC) solo recibió vehículo de capsaicina; un tercer grupo solo recibió solución salina (CSS); y finalmente el cuarto grupo no se le administró ninguna sustancia y se asignó como control intacto (CI). Los animales se mantuvieron durante 35 días después de la administración de capsaicina y posteriormente fueron sacrificados. Se recuperaron los testículos y epidídimos para posteriores análisis. Se analizó la motilidad, vitalidad y concentración espermática por espermatobioscopia directa, la fragmentación de ADN se analizó por prueba COMETA, la proliferación celular y la expresión de CGRP se realizó por inmunofluorescencia, además, se evaluaron las dimensiones del área del epitelio germinal. Nuestros resultados mostraron una

disminución en el porcentaje de motilidad, vitalidad y concentración de espermatozoides en el grupo IPC, en comparación a los otros grupos experimentales. La fragmentación de ADN espermático no fue afectada en ninguno de los grupos. En el grupo IPC aumentó la expresión de Ki-67 y CGRP en las células del compartimento intersticial y del epitelio germinal en comparación con el grupo CSS. En el grupo IPC+Caps aumentó la expresión de Ki-67 en las células del epitelio germinal al disminuir la expresión de CGRP, en comparación con el grupo IPC. El área del epitelio germinal del grupo IPC fue mayor en comparación con los otros grupos. Además, se observaron agrupaciones de células en el compartimento luminal, que no se observaron en los otros grupos. Concluimos que la inervación sensorial regula de manera estimuladora la producción de espermatozoides y probablemente inhibe los mecanismos de proliferación celular característicos del cáncer testicular.

Palabras clave: cáncer, capsaicina, *Echeveria gibbiflora*

2. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso está formado por varias redes neuronales que realizan procesos como el pensamiento, el lenguaje, los sentimientos, el aprendizaje, la memoria, y toda función y sensación que ocurra en el organismo. Además, permite a los organismos interactuar con su entorno, mediante el procesamiento de la información que recibe del exterior a través de estímulos sensitivos, enviando impulsos de respuesta coordinados de modo que los órganos efectores musculares o glandulares, funcionen juntos y en armonía para el bienestar del individuo (Snell, 2007; Ludwig y Varcallo, 2019).

Aunado a sus funciones principales, recientemente se ha reconocido que el sistema nervioso central, contribuye de manera importante en el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Kuol *et al.*, 2018). Una de las características fundamentales que comparten la mayoría de los tipos de cáncer es la proliferación celular incontrolada, por lo tanto es importante incrementar los estudios para comprender este tipo de procesos en las células. En el presente trabajo nos enfocamos en evaluar el papel de las fibras nerviosas sensoriales, sobre la proliferación celular incontrolada de las células testiculares.

2.1. SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso se subdivide en: sistema nervioso central (SNC), que incluye al encéfalo y la médula espinal, y en sistema nervioso periférico, que incluye a los nervios craneales y espinales y sus ganglios asociados (Snell, 2007; Thau *et al.*, 2019).

2.1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El encéfalo y la médula espinal, son los centros principales donde ocurre la correlación y la integración de la información nerviosa. El encéfalo, se divide en tres partes; el rombencéfalo, el mesencéfalo y el prosencéfalo (Fig.1). El rombencéfalo se subdivide en; bulbo raquídeo (responsable de las funciones autónomas), el puente de Varolio o Pons y el cerebelo que es responsable de coordinar los movimientos de la cabeza, los ojos y el mantenimiento de la postura (Snell, 2007; Ludwig y Varcallo, 2019; Thau *et al.*, 2019).

El mesencéfalo, es la parte estrecha del encéfalo que conecta el prosencéfalo con el rombencéfalo. Está involucrado en el movimiento ocular, así como en las vías de retransmisión visual y auditiva a través de los núcleos geniculados laterales y los núcleos geniculados mediales, respectivamente (Snell, 2007; Ludwig y Varcallo, 2019).

El prosencéfalo se subdivide en diencéfalo y cerebro. El diencéfalo consiste en un tálamo dorsal y un hipotálamo ventral. El tálamo funciona como centro de relevo del cerebro, recibe impulsos aferentes de los receptores sensoriales ubicados en todo el cuerpo y procesa la información para su distribución al área cortical apropiada, es responsable de regular la conciencia y el sueño. El hipotálamo es una de las partes más pequeñas del cerebro y es vital para mantener la homeostasis, se encuentra en el centro del cerebro y se conecta al tronco encefálico a través del fascículo longitudinal dorsal, a la corteza cerebral a través del haz del prosencéfalo medial, al hipocampo a través del fornix, a la amígdala a través de la estría terminal, al tálamo a través del tracto mamilotalámico, a la

hipófisis a través de la eminencia media y a la retina a través del tracto retinohipotalámico . Es responsable de mantener la frecuencia cardíaca, la presión arterial, el apetito, la sed, la temperatura y la liberación de diversas hormonas. Se comunica con la glándula pituitaria para liberar o inhibir la hormona antidiurética, la hormona liberadora de corticotropina, la hormona liberadora de gonadotropina, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, la hormona inhibidora de la prolactina, la hormona liberadora de tiroides y la oxitocina (Fig. 1) (Snell, 2007; Bear y Bollu, 2019; Thau *et al.*, 2019).

El cerebro es la porción más grande del encéfalo, está compuesto por dos hemisferios (izquierdo y derecho) conectados por una masa de sustancia blanca llamada cuerpo calloso. La capa más externa del cerebro se denomina corteza cerebral y se divide mediante surcos en 4 lóbulos; frontal, parietal, occipital y temporal. El lóbulo frontal es responsable de la función motora voluntaria, resolución de problemas, la atención, la memoria, y el lenguaje. El lóbulo parietal es responsable de procesar la información sensorial y contiene a la corteza somatosensorial. Las neuronas en este lóbulo reciben información de los receptores sensoriales y los propioceptores de todo el cuerpo, procesan el saber y forman un entendimiento sobre lo que se está tocando según el conocimiento previo. El lóbulo occipital, recibe información de la retina y luego utiliza experiencias visuales pasadas para interpretar y reconocer los estímulos. Y el lóbulo temporal procesa los estímulos auditivos a través de la corteza auditiva (Snell, 2007; Thau *et al.*, 2019).

Además, en el sistema nervioso central podemos encontrar a los núcleos basales compuestos por el núcleo caudado, el putamen y el globo pálido que son responsables de los movimientos musculares y de la coordinación. Y al sistema límbico que se compone por la corteza piriforme, el hipocampo, los núcleos septales, la amígdala, el núcleo accumbens, el hipotálamo y los núcleos anteriores del tálamo. El hipotálamo recibe la mayor parte de la producción límbica. El hipocampo está involucrado principalmente con la memoria. Los núcleos septales, la amígdala y el núcleo accumbens se encuentran en las áreas subcorticales y son

responsables del placer, el procesamiento emocional y la adicción, respectivamente (Purves *et al.*, 2001; Snell, 2007; Ludwig y Varcallo, 2019; Thau *et al.*, 2019).

Por su parte, la médula espinal propiamente dicha se extiende desde el foramen magnum del cráneo, hasta la primera o la segunda vértebra lumbar. Crea un camino de dos vías entre el cerebro y el cuerpo y se divide en cuatro regiones: cervical, torácica, lumbar y sacra (Fig. 1). Estas regiones se dividen en 31 segmentos con 31 pares de nervios espinales, unidos por las raíces anteriores o motoras y las raíces posteriores o sensitivas. La médula espinal, es una parte altamente organizada del sistema nervioso central. Además, de transmitir información del resto del cuerpo al cerebro y recibir comandos eferentes de diversas partes del cerebro, tiene la capacidad de integrar y modificar tanto señales aferentes de la periferia como señales eferentes de segmentos aferentes y centros supraespinales. Por lo tanto, existe una red complicada de neuronas que normalmente opera en conjunto con el resto del SNC para permitir un control perfecto de las funciones sensoriales, autónomas y motoras (Snell, 2007; Nógrádi y Vrbová, 2013; Thau *et al.*, 2019).

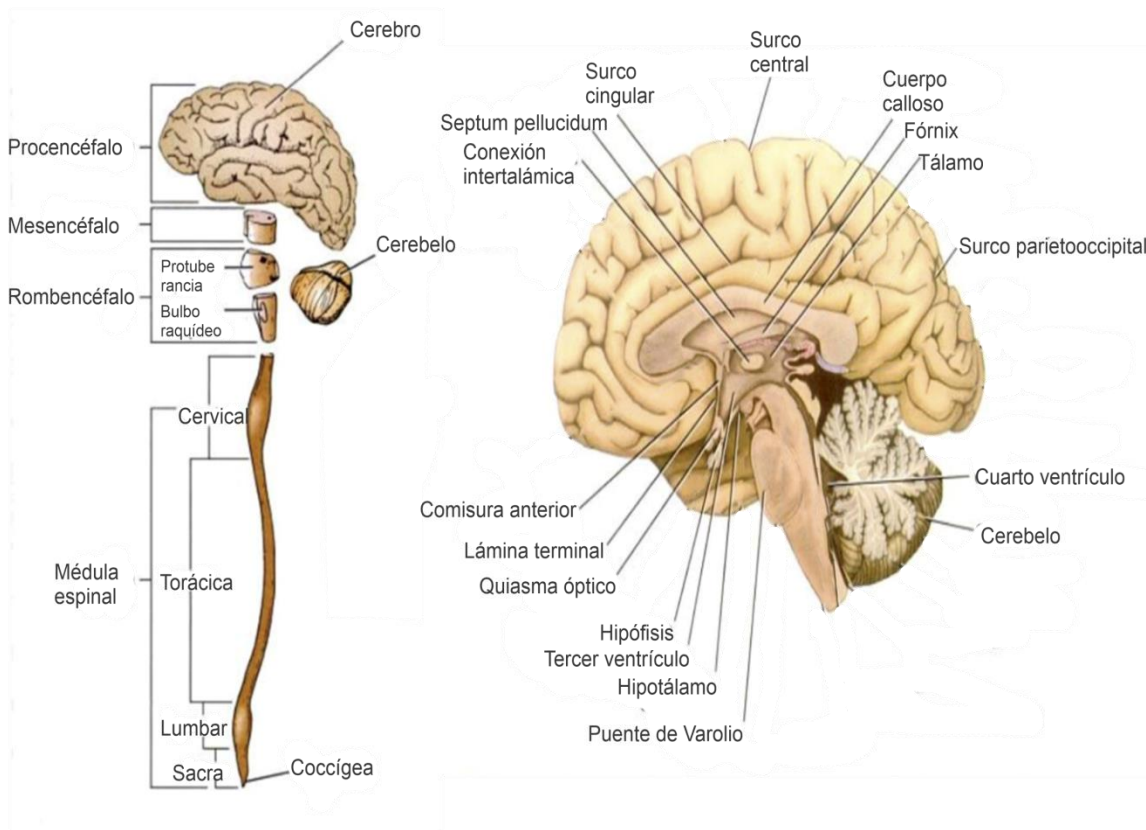


Fig. 1.- Representación del encéfalo y la médula espinal (Izquierda) y algunas de las áreas que componen el diencefalo y el cerebro (derecha). Modificado de Snell (2007).

2.1.2. SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO

El sistema nervioso periférico, está compuesto por los nervios craneales y espinales y sus ganglios asociados (Purves *et al.*, 2001; Snell, 2007).

Nervios craneales y espinales

Los nervios son haces de axones, muchos de los cuales están envueltos por células gliales del sistema nervioso periférico, las células de Schwann. Están formados por haces de fibras nerviosas sostenidas por tejido conectivo (Purves *et al.*, 2001; Snell, 2007).

Existen 12 pares de nervios craneales que salen del encéfalo y pasan a través de forámenes en el cráneo, y 31 pares de nervios espinales que salen de la médula espinal y pasan a través de los forámenes intervertebrales en la columna vertebral. Los nervios espinales, se denominan de acuerdo con las regiones de la columna vertebral que están asociados. Encontramos 8 nervios cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coccígeo (Fig. 2). Cada nervio espinal se conecta con la medula espinal por medio de dos raíces; la raíz ventral y la raíz dorsal. La raíz ventral, consiste en haces de fibras nerviosas que están involucradas en la vía de información eferente, es decir, estas fibras transmiten impulsos desde el sistema nervioso central hacia la periferia del organismo. Las fibras nerviosas eferentes que se dirigen hacia los músculos esqueléticos y causan su contracción se denominan fibras motoras. Sus células de origen se encuentran en el asta ventral de la medula espinal (Purves *et al.*, 2001; Snell, 2007). La raíz dorsal consiste en haces de fibras nerviosas involucradas en la vía de información aferente, es decir, estas fibras transmiten impulsos nerviosos de la periferia hacia el sistema nervioso central. Están vinculadas con la transmisión de información acerca de las sensaciones de tacto, dolor, temperatura y vibración, y reciben el nombre de fibras sensitivas o sensoriales. Los cuerpos celulares de estas fibras nerviosas, se encuentran situados en un engrosamiento de la raíz dorsal, conocido como ganglio de la raíz dorsal (Fig. 3) (Purves *et al.*, 2001; Snell, 2007).

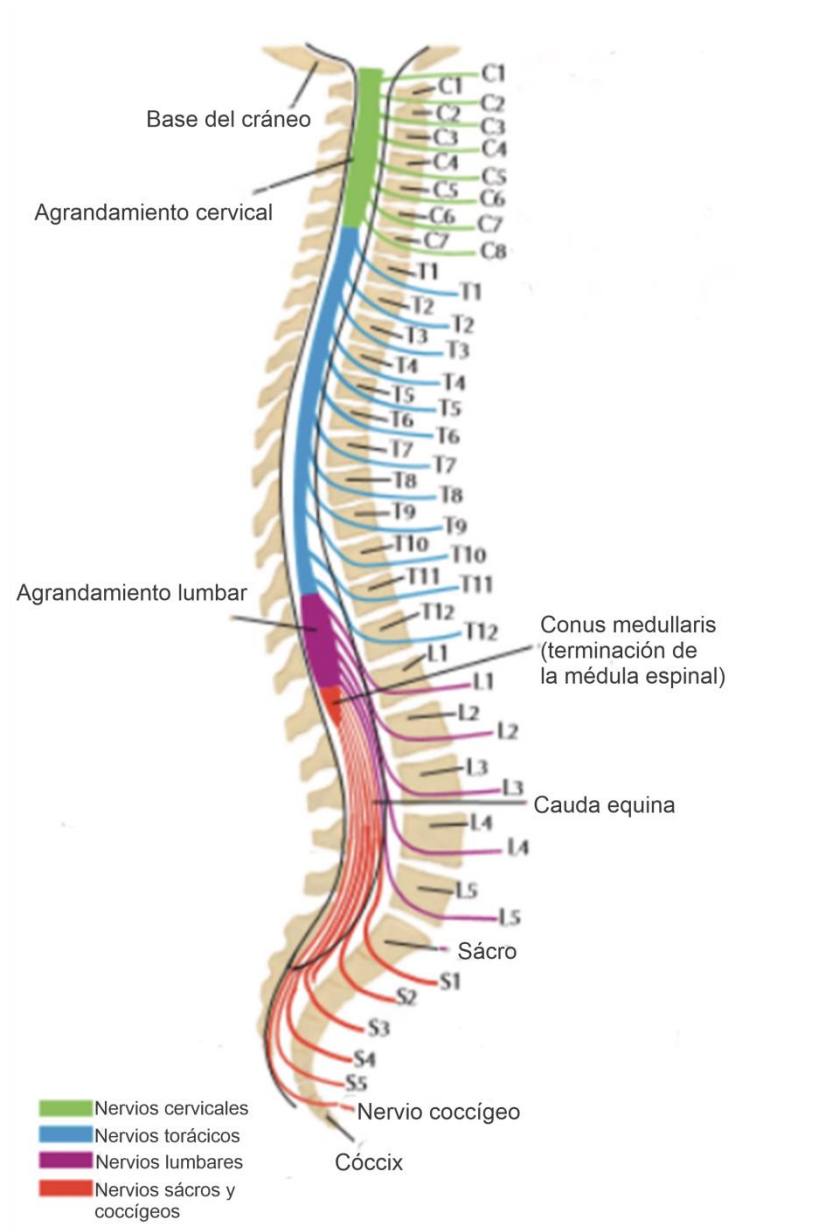


Fig. 2.- Representación de los nervios espinales. Modificado de Felten et al., (2016).

Ganglios

Los ganglios en el sistema nervioso periférico son acumulaciones locales de cuerpos de células nerviosas y células de apoyo. Se pueden clasificar en ganglios sensitivos de los nervios espinales (ganglios de la raíz dorsal) y nervios craneales, y ganglios autónomos. Los ganglios sensitivos, son engrosamientos fusiformes situados sobre la raíz dorsal de cada nervio espinal en una ubicación inmediata proximal a la unión de la raíz ventral correspondiente. Se hallan ganglios similares a lo largo del recorrido de los nervios craneales V, VII, IX y X, y se les conoce como ganglios sensitivos de estos nervios. Las células nerviosas de los ganglios sensoriales envían axones a la periferia, que terminan en receptores especializados, que traducen información sobre una amplia variedad de estímulos. Los procesos centrales de estas células ganglionares sensoriales, entran en la medula espinal o en el tronco encefálico (Purves *et al.*, 2001; Snell, 2007).

Ganglios autónomos

Los ganglios autónomos, que a menudo son de forma irregular, se hallan situados a lo largo del recorrido de las fibras nerviosas eferentes, del sistema nervioso autónomo. Se encuentran en las cadenas simpáticas paravertebrales, alrededor de las raíces de las grandes arterias viscerales en el abdomen y cerca de las paredes de diversas vísceras o incluidos en ellas. Las neuronas motoras viscerales preganglionares en el tronco encefálico y la medula espinal, forman sinapsis con neuronas motoras periféricas, que se encuentran en los ganglios autónomos. Las neuronas motoras en ganglios autónomos inervan músculo liso, glándulas y músculo cardíaco, controlando así el comportamiento involuntario (visceral) (Fig. 3). En la división simpática del sistema motor autónomo, los ganglios están a lo largo o delante de la columna vertebral y entran sus axones a una variedad de objetivos periféricos. En la división parasimpática, los ganglios se encuentran dentro de los órganos que inervan. Otro componente del sistema motor visceral, llamado sistema entérico, se compone de pequeños ganglios esparcidos por toda la pared del intestino (Purves *et al.*, 2001; Snell, 2007).

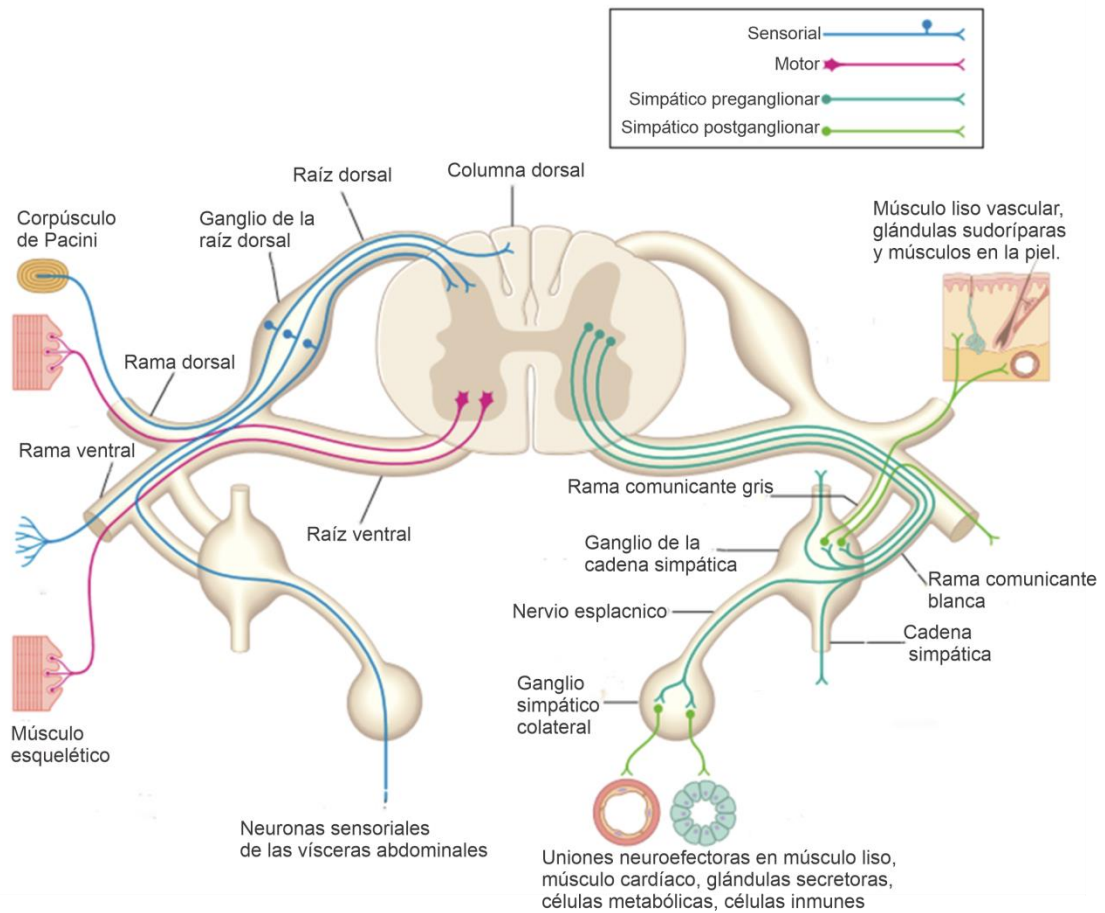


Fig. 3.- Representación de la conexión de los nervios espinales con la médula espinal. Modificado de Felten *et al.*, (2016).

2.1.3. SISTEMA SENSORIAL

El sistema sensorial, se considera a la parte del sistema nervioso responsable de procesar la entrada de estímulos del entorno. La vía sensorial del sistema somatosensorial, involucra nervios espinales que transmiten información sobre el ambiente externo a la médula espinal. Las neuronas sensoriales, son la extremidad aferente de las vías neurales somatosensoriales. La neurona consiste en un cuerpo celular, axón y dendritas. Las dendritas son proyecciones similares a los dedos, que reciben entrada sensorial y transmiten la señal a través del axón al cuerpo celular. Los cuerpos celulares unipolares de las neuronas sensoriales, se encuentran dentro de los ganglios sensoriales, que pueden estar en la raíz dorsal de la médula espinal o a lo largo de los nervios craneales (Koop y Tadi, 2019).

Existen diferentes tipos de receptores para diferentes estímulos: termorreceptores, mecanorreceptores, nociceptores, fotorreceptores y quimiorreceptores. Los receptores dentro de un campo específico, reaccionan a los estímulos mediante la generación de actividad eléctrica a lo largo de la neurona de primer orden, asociado en forma de un potencial de acción. Los nervios sensoriales, tienen diferentes tipos de fibras nerviosas dependiendo de sus receptores asociados. La clasificación de los nervios sensoriales incluye el sistema numérico Erlanger y Gasser. Los propioceptores (sensores de posición), reciben inervación a través de fibras sensoriales de tipo Ia (A-alfa: husillo muscular), Ib (A-alfa: órgano del tendón Golgi) y II (A-beta: táctil y presión). Estas fibras son grandes y mielinizadas con velocidades de conducción rápidas. La inervación de los mecanorreceptores es por fibras sensoriales de tipo II y III (A-alfa: terminaciones nerviosas libres, sensación de frío). Los nociceptores (sensores del dolor) e inervación del termorreceptor, se lleva a cabo por fibras de tipo A-delta y tipo C (tipo C: dolor lento, calor). Las fibras A-delta se mielinizan delgadamente y transmiten información principalmente relacionada con el dolor agudo, para facilitar un reflejo de abstinencia a la sinapsis en el cuerno dorsal de la medula espinal (Koop y Tadi, 2019).

2.1.4. FIBRAS TIPO C

Las fibras tipo C, son más pequeñas y no mielinizadas que requieren un umbral más alto de estímulo que las fibras A-delta. Estas son responsables de la aparición más lenta de dolor más profundo, después de un estímulo inicial transmitido por las fibras A-delta más rápidas. Las fibras tipo C transmiten información sobre estímulos de dolor, térmicos y de presión, mediante la liberación de neurotransmisores como: glutamato, sustancia P (SP), y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Salazar *et al.*, 2009; Koop y Tadi, 2019).

Se pueden dividir en dos clases, en función de su respuesta a los estímulos mecánicos. Las fibras tipo C insensibles mecánicamente (C-MIA), no responden a los estímulos mecánicos o tienen umbral mecánico muy alto. Estas fibras aferentes responden al calor y a varios estímulos químicos nocivos, por ejemplo, capsaicina (componente que le da el sabor picante a los frutos del género *Capsicum*) y a menudo se consideran quimiorreceptores. Las C-MIA en humanos suelen tener grandes áreas de campo receptivo (~5 cm²). Por el contrario, las fibras C mecánicamente sensibles (CMHs) son polimodales y normalmente también responden al calor y a los productos químicos nocivos. En los seres humanos, los CMH tienen áreas de campo receptivo relativamente pequeñas (~2 cm²). Los C-MIA median el dolor asociado con la inyección intradérmica de capsaicina. Después de la administración intradérmica de capsaicina, se puede observar un aumento neurogénico del flujo sanguíneo en la piel que rodea el lugar de aplicación, y la estimulación mecánica de la piel circundante produce la sensación de picazón o dolor (Ringkamp y Meyer, 2014).

2.1.5. RECEPTOR TRPV1

Entre los receptores presentes en las terminales nociceptoras, que actúan como transductores moleculares para despolarizar a las neuronas, se encuentran los miembros de la familia del receptor de potencial transitorio (TRP). Uno de los más estudiados de la familia es el receptor transitorio de potencial vanilloide tipo 1 (TRPV1) (Rosenbaum y Simon, 2007).

El TRPV1, es un homotetrámero de 4 subunidades individuales, con regiones transmembranales y citoplasmáticas. La región transmembranal, tiene 6 segmentos helicoidales (S1-S6); cuatro de ellos (S1-S4) constituyen un dominio estructuralmente homólogo, al dominio del sensor de voltaje de los canales iónicos activados por voltaje. Las hélices restantes S5 y S6 se ensamblan formando un poro o canal (Kasimova *et al.*, 2018).

TRPV1 es un canal de cationes no selectivo, que puede permitir el paso de H^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . TRPV1 puede ser activado por calor, pH ácido, capsaicina, vanilloides, resiniferatoxina, bradiquinina, prostaglandinas, trifosfato de adenosina y metabolitos de ácido araquidónico, como cannabinoides, N'-iodoresiniferatoxina, AMG9810 (Antagonista de TRPV1), SB366791, A-425619, rojo de rutenio y lactona del ácido 12-acetoxi-hawtriwaico (Zhang *et al.*, 2019). Otros compuestos endógenos como las moléculas de señalización proinflamatoria, como los eicosanoides y las citosinas, sensibilizan al TRPV1 en lugar de activar directamente al canal. Este cambio se confiere a través de la fosforilación o cambios conformacionales en los residuos del canal responsables de la sensibilidad al calor o la capsaicina (Fig. 4) (Sadler y Stucky, 2018).

TRPV1, se expresa principalmente en fibras C no mielinizadas (aproximadamente 50%) y en un porcentaje menor en fibras A-delta ligeramente mielinizadas, dentro del sistema nervioso periférico. TRPV1 también se expresa en el sistema nervioso central, en neuronas post sinápticas y en la medula espinal y en varias regiones del cerebro (Rosenbaum y Simon, 2007; Sadler y Stucky, 2018).

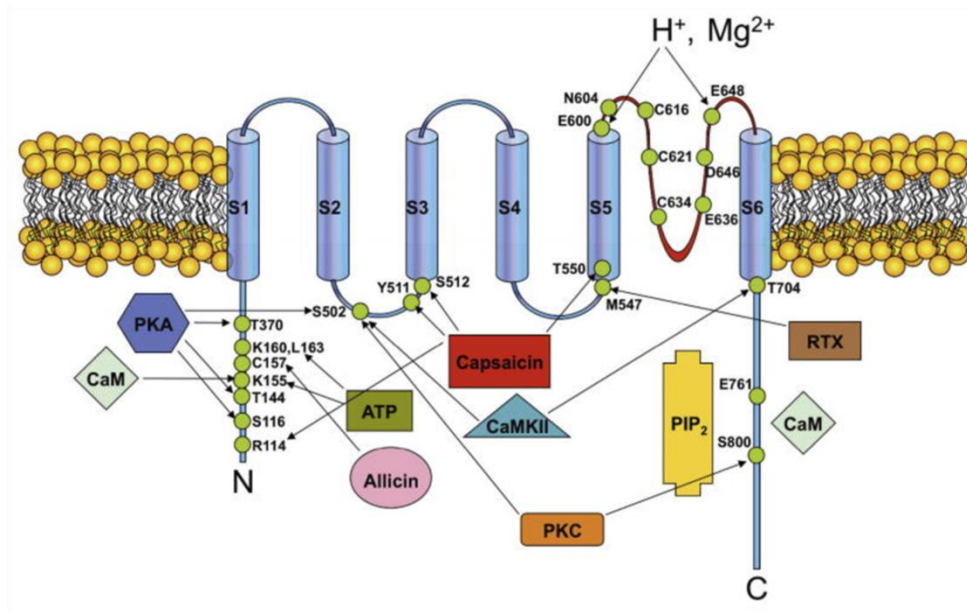


Fig. 4.- Representación del receptor transitorio de potencial vanilloide tipo 1 (TRPV1), con los residuos involucrados en las interacciones ligando-modulador. Tomado de Jara-Oseguera *et al.*, (2008).

Además, se puede encontrar varios órganos y tejidos, incluidos el corazón, los vasos sanguíneos, los pulmones, la tráquea, los riñones, la piel, las retinas, las articulaciones, los intestinos, el cerebro, el útero, los testículos, las glándulas salivales, y el páncreas. A nivel celular, TRPV1 se puede encontrar en células endoteliales, células vasculares del músculo liso, plaquetas, mastocitos, linfocitos, macrófagos, ventrículos cardíacos, la superficie epicárdica, fibras nerviosas sensoriales que inervan el músculo liso, adventicio, la superficie del epicardio ventricular y en células de los órganos reproductores masculinos como, células de Sertoli y células en diferenciación en el epitelio germinal del túbulo seminífero (Zhang *et al.*, 2019).

TRPV1, principalmente participa en la nocicepción y la regulación de la temperatura (Kasimova *et al.*, 2018). Además, juega un papel importante en procesos patogénicos como; aterosclerosis, la lesión por isquemia/reperfusión,

fibrosis y remodelación del miocardio, hipertensión, asma, artritis, dermatitis y diabetes. Cuando los agonistas activan el receptor TRPV1 de las terminales nerviosas sensoriales, pueden inducir la liberación de neuropeptidos, como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la sustancia P (SP) y la somatostatina (SST), que están involucrados en la inflamación y los eventos vasculares. TRPV1 no neural también se asocia con la inflamación (Zhang *et al.*, 2019).

La activación del receptor TRPV1 por capsaicina, puede iniciar la despolarización de la membrana de las neuronas sensoriales (mediada por la entrada de iones de calcio y sodio), produciendo potenciales de acción que se propagan a la médula espinal y el cerebro, detectándose como sensaciones de calor, ardor, escozor o picazón (Fig. 5 A). Además, TRPV1 también se expresa en los orgánulos intracelulares (retículo endoplásmico, mitocondrias), por lo que la aplicación externa de capsaicina puede provocar la liberación adicional de calcio intracelular. La entrada excesiva de calcio al citoplasma de la célula, genera la activación de proteasas sensibles a calcio y puede inducir la despolimerización de componentes del citoesqueleto como los microtúbulos, en consecuencia se inhibe el transporte axoplásmico retrógrado y anterógrado, impidiendo que el factor de crecimiento nervioso (NGF) llegue al cuerpo de la neurona, afectando su capacidad para sintetizar neurotransmisores, provocando la desfuncionalización y degeneración axonal de las fibras sensoriales (Fig. 5 B) (Winter *et al.*, 1995; Gómez-Alvis *et al.*, 1995; Anand y Bley, 2011).

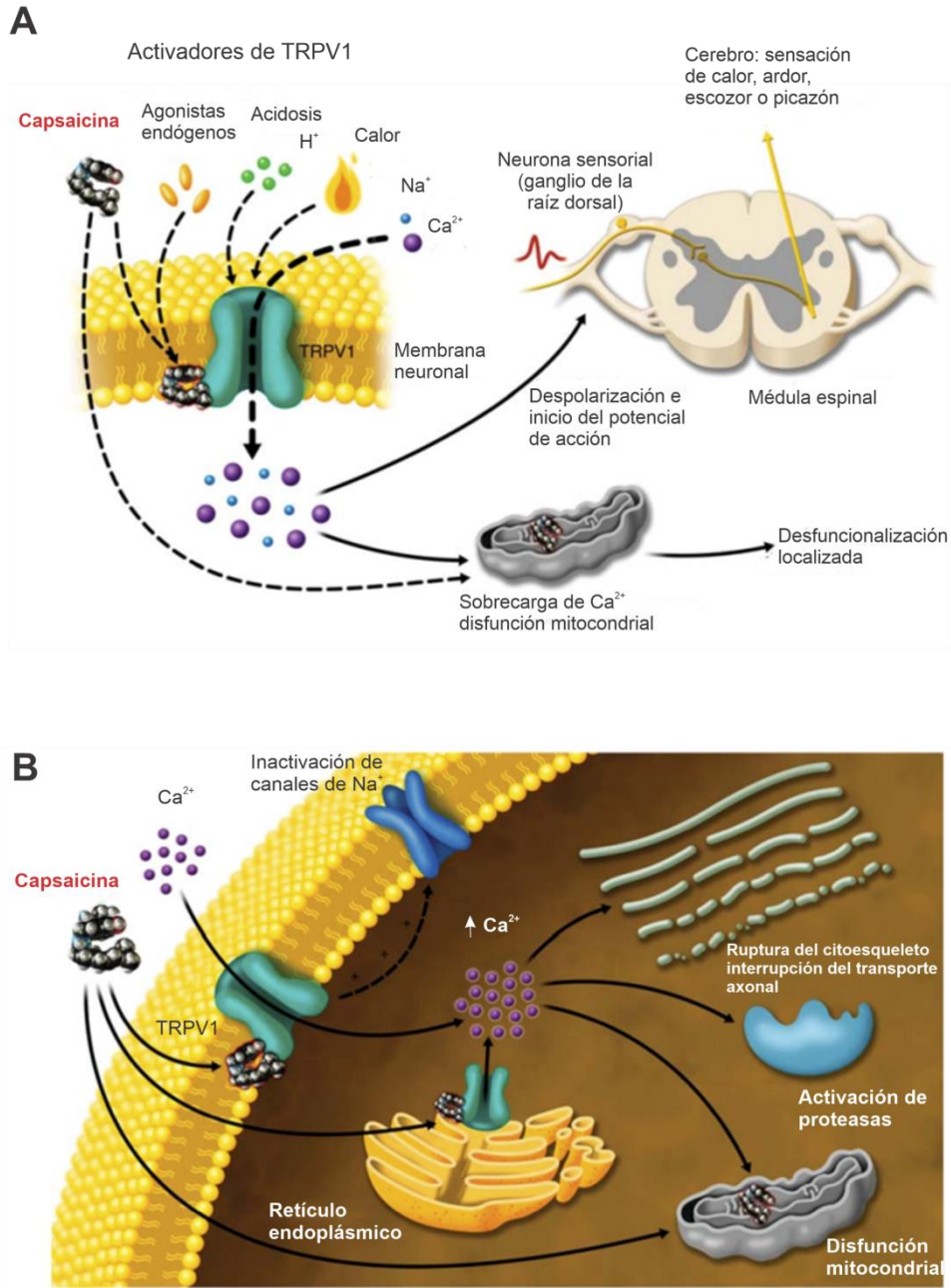


Fig. 5.- Esquema de la activación de potenciales de acción (A) y desfuncionalización de las neuronas sensoriales (B), generados por la entrada de calcio al citoplasma celular. Modificado de Anand y Bley, (2011).

2.2. INERVACIÓN TESTICULAR

Los testículos reciben información nerviosa a través de dos vías principales, el nervio espermático superior (NSS) y el nervio espermático inferior (NSI). Estos nervios presentan fibras eferentes (motoras), tanto simpáticas como parasimpáticas que pertenecen al sistema nervioso autónomo. Además, poseen fibras aferentes (sensoriales viscerales), que envían información hacia el sistema nervioso central. El NSS, es considerado como el principal contribuyente de la inervación del testículo, se origina en los plexos celiaco y aórtico y se extiende a lo largo de la arteria testicular. La túnica albugínea y la túnica vasculosa de los testículos, están inervadas abundantemente y al menos algunas de sus fibras son indudablemente aferentes. Los cuerpos celulares de las fibras preganglionares simpáticas se encuentran en los segmentos torácicos 10 y 11 de la médula espinal. El componente parasimpático del NSS se deriva del nervio vago. El NSI se extiende junto al conducto deferente, penetra el epidídimo y llega al testículo en su polo inferior, las fibras simpáticas del nervio se originan en los plexos mesentéricos e hipogástricos inferiores, mientras que las fibras parasimpáticas corresponden a ramificaciones del nervio pélvico, las neuronas preganglionares del nervio pélvico se encuentran en la región sacra (Fig. 6) (Kumazawa, 1986; Gerendai *et al.*, 2000; Gerendai *et al.*, 2005).

Mediante la técnica de rastreo viral transneuronal, se logró determinar las conexiones supraespinales de los nervios testiculares. Además, de la presencia de células marcadas en las neuronas simpáticas y parasimpáticas de la médula espinal, que dan lugar a la inervación de fibras preganglionares, se observaron neuronas infectadas por virus en varios núcleos cerebrales. En el tronco encefálico, se encontraron células marcadas en el núcleo caudal de rafe (rafe obscurus, rafe pálido, rafe magnus), el locus coeruleus, el núcleo de Barrington y en el núcleo periacueductal mesencefálico gris. En el diencefalo, principalmente se encontraron neuronas marcadas en la división parvocelular del núcleo paraventricular hipotalámico. Además, se detectó un marcaje moderado en el hipotálamo lateral, el área preóptica medial, el hipotálamo dorsal, el área

periventricular y el núcleo arqueado. En el telencéfalo, se encontraron células marcadas en el núcleo de la cama de la estría terminal, el núcleo central de la amígdala, la porción medial de la corteza frontal (principalmente en el área motora primaria) y en una región de la corteza insular (principalmente en la parte posterior del área insular granular (Fig. 7) (Gerendai *et al.*, 2005).

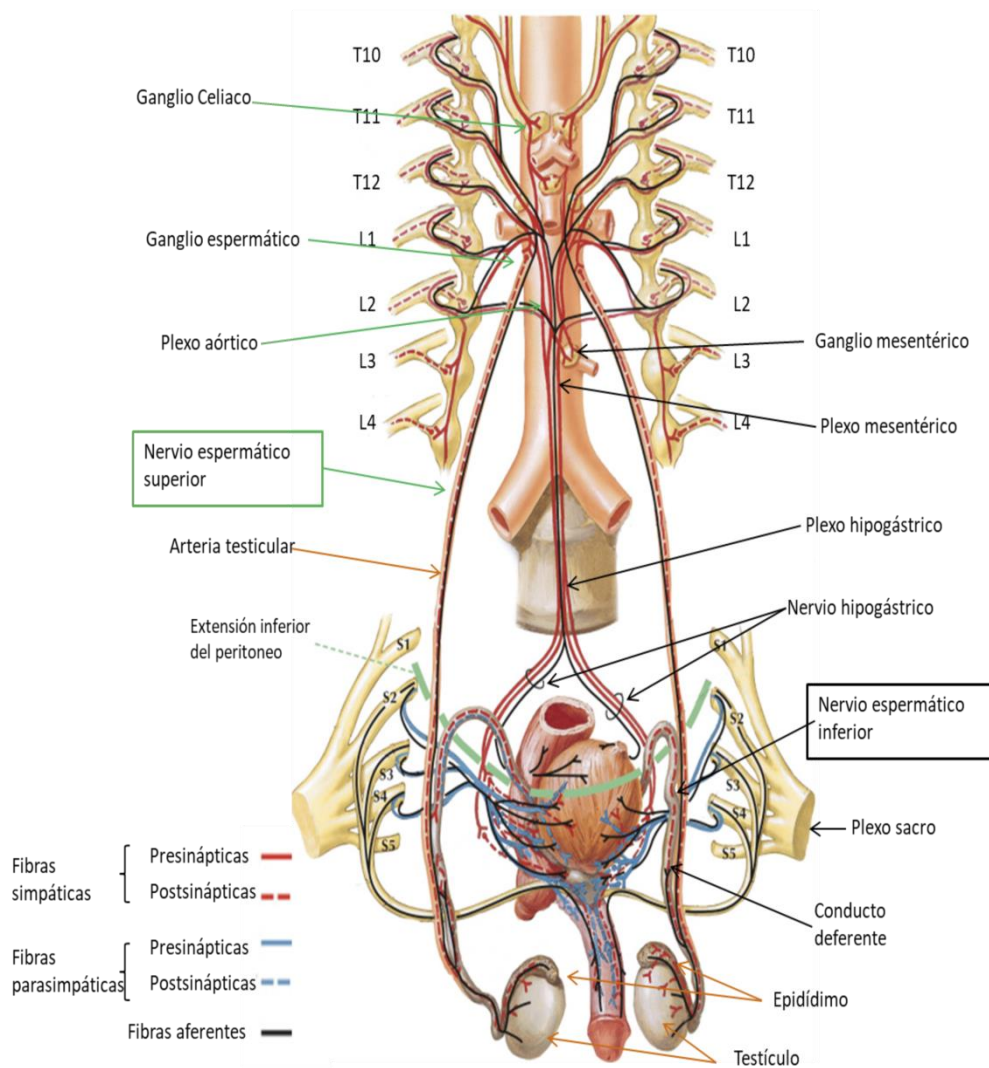


Fig. 6.- Representación de la vía nerviosa del testículo hacia la médula espinal. Modificado de Felten *et al.*, (2016).

Las funciones de los núcleos que fueron positivos al marcaje viral, están relacionadas con funciones vitales de los organismos. Las funciones del tronco encefálico están asociadas a la respiración, la conciencia, la presión arterial, la frecuencia cardíaca y el sueño. Generalmente, los núcleos de la zona periventricular regulan el sistema endocrino. Los núcleos medial y lateral hipotalámicos regulan el comportamiento autónomo y somático. El núcleo arqueado produce hormonas liberadoras, que son secretadas por las terminales del axón en el sistema porta hipotálamo-hipofisario, para controlar la liberación de las hormonas de la pituitaria anterior. La amígdala, funciona como centro de las emociones, el comportamiento y la memoria. También contribuye al control de las reacciones al estrés, la atención y los instintos sexuales. El área insular granular está asociada con funciones somatosensoriales, auditivas y visuales (Haber, 2011; Abu Hasan y Siddiqui, 2019; Basinger y Hogg, 2019; Bear y Bollu, 2019).

Para una mejor comprensión sobre el papel que desempeña la inervación sobre las funciones testiculares, primero se describirá la anatomía y regulación clásica de las funciones testiculares y posteriormente se retomará el papel que desempeñan los nervios y los núcleos cerebrales (descritos en este apartado) sobre la fisiología testicular.

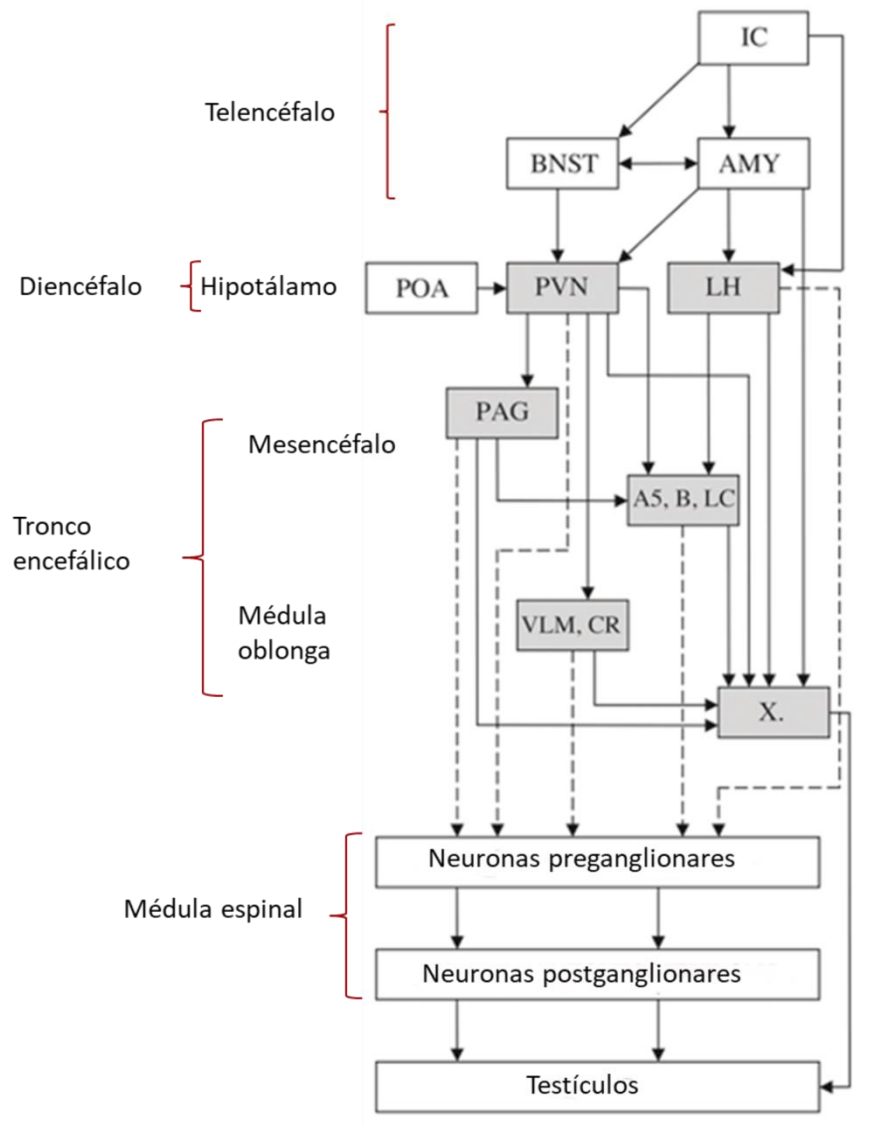


Fig. 7.- Esquema de las conexiones descendentes entre las estructuras del sistema nervioso central y el testículo. Núcleo vagal (X), médula ventrolateral (VLM), núcleo de rafe caudal (CR), grupo de células noradrenérgicas (A5), núcleo de barrington (B), locus coeruleus (LC), sustancia gris periacueductal (PAG), área preóptica (POA), núcleo paraventricular (PVN), hipotálamo lateral (LH), base del núcleo de la estría terminalis (BNST), amígdala (AMY), corteza insular (IC). Modificado de Gerndai et al., (2005).

2.3. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL TESTÍCULO

Los testículos son órganos sexuales internos, cuyas funciones principales son la producción de espermatozoides y de hormonas sexuales como la testosterona. En algunos mamíferos se ubican dentro de la cavidad del escroto, y están cubiertos por una membrana serosa llamada túnica vaginalis (O'Donnell *et al.*, 2017).

La capa externa del testículo, está formada por una gruesa capsula de tejido conectivo fibroso altamente vascularizada, llamada túnica albugínea, que se extiende hacia el mediastino testicular formando lóbulos. En el interior de los lóbulos se encuentra una serie de túbulos llamados túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos forman largos bucles contorneados, que se extienden al mediastino de los testículos y se unen a una red anastomosa de túbulos llamada rete testis. La rete testis, se une al epidídimo mediante túbulos finos llamados conductos eferentes, que tienen la función de reabsorber fluido testicular. El epidídimo, juega un papel importante en la maduración de los espermatozoides, transporte y almacenamiento, y consiste en un solo conducto contorneado que se puede subdividir en tres regiones; cabeza, cuerpo y cola. El polo distal de la cola del epidídimo da lugar al conducto deferente (Fig. 8) (Joseph *et al.*, 2010; O'Donnell *et al.*, 2017).

El conducto deferente, asciende desde el testículo en su superficie posterior como un componente del cordón espermático, que pasa a través del canal inguinal y desciende en la pared posterolateral de la pelvis, para llegar a la cara posterior de la vejiga donde su extremo distal se dilata formando la ampolla deferente. En la ampolla deferente, se une el conducto de la vesícula seminal para formar el conducto eyaculatorio, que pasa a través de la próstata para ingresar a la uretra prostática. El contenido de las vesículas seminales y la próstata (90-95% del eyaculado total) junto con los espermatozoides, se descargan a través de la uretra prostática y peneana (Fig. 8) (O'Donnell *et al.*, 2017).

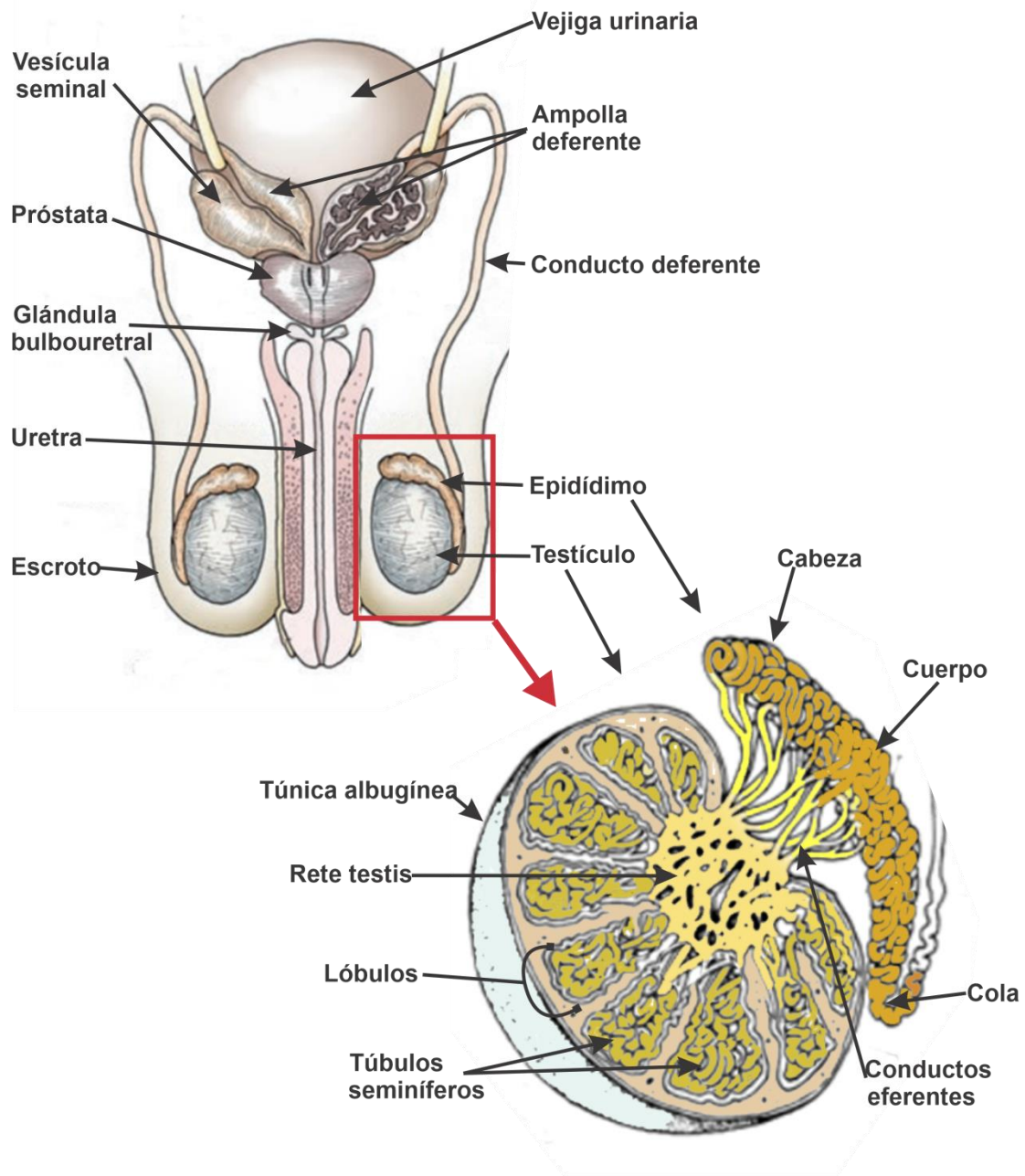


Fig. 8.- Esquema simplificado de las partes anatómicas del aparato reproductor masculino. Modificado de Silber, (2018).

El testículo puede dividirse morfológica y funcionalmente en dos compartimentos, el compartimento intersticial y el compartimento tubular. En el compartimento intersticial se encuentran células de Leydig (encargadas de producir testosterona),

células inmunes, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios, fibroblastos y tejido conectivo; y en el compartimento tubular encontramos a las células germinales (espermatozonias [Sps]) y a las células de Sertoli, que en conjunto forman el epitelio germinal del túbulo seminífero (Fig. 9). La pared del túbulo seminífero consiste, en una membrana basal con células miofibroblásticas modificadas, denominadas células mioideas peritubulares (Weinbauer *et al.*, 2010; Schlatt y Ehmcke, 2014; O'Donnell *et al.*, 2017).

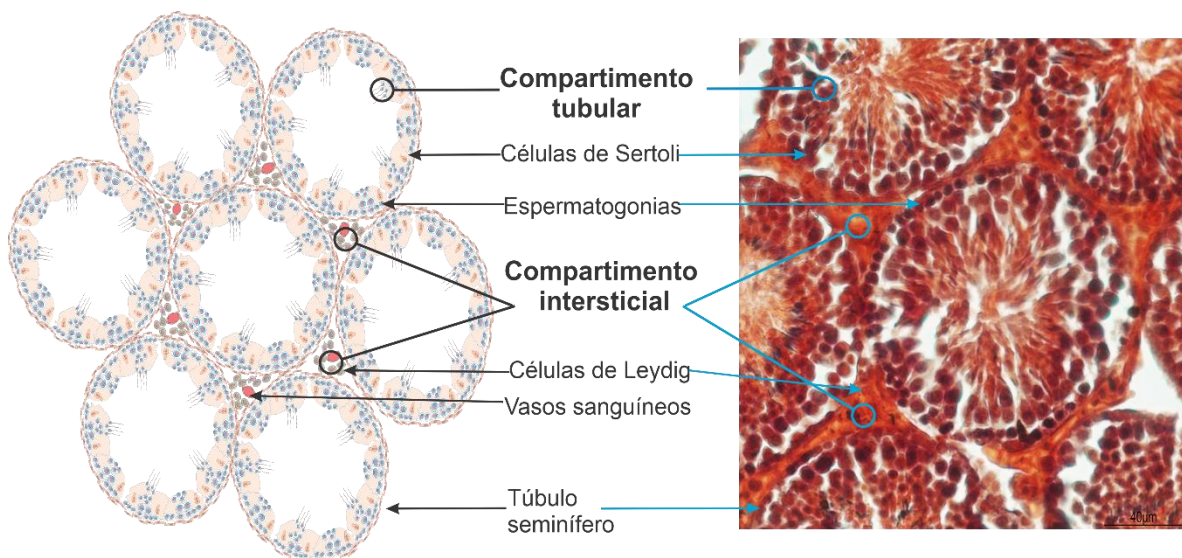


Fig. 9.- Esquema y fotografía de un corte transversal de testículo, donde se muestra el compartimento intersticial y el compartimento tubular, con algunas de sus células asociadas.

Las células de Leydig tienen la función de convertir el colesterol en testosterona, además, tienen la capacidad de sintetizar colesterol a partir de acetato. En roedores, el colesterol se moviliza a la membrana mitocondrial interna de la célula de Leydig, por la proteína reguladora aguda de esteroides y se convierte en pregnenolona por P450_{scc}. La pregnenolona, se difunde desde la mitocondria a las membranas del retículo endoplásmico liso, que contiene 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β HSD). La 3 β HSD, convierte a la pregnenolona en progesterona. Posteriormente dos enzimas que se encuentran en el retículo endoplásmico de las células de Leydig, el citocromo P450 o 17 α -hidroxilasa/C17-

20 liasa (CYP17A1) y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 3, convierten a la progesterona secuencialmente en 17α -hidroxiprogesterona y androstenediona y finalmente en Testosterona (Wang, *et al.*, 2019). Las células de Leydig también producen la hormona peptídica, factor 3 similar a la insulina (INSL3), que está relacionada estructuralmente con la insulina, IGF1 e IGF2. INSL3, tiene una función antiapoptótica en el compartimento de células germinales y puede formar un circuito de retroalimentación autócrina en las células de Leydig (O'Donnell *et al.*, 2017).

Las células de Sertoli, son células epiteliales columnares polarizadas, que participan en el desarrollo de las células germinales, al proporcionar nutrientes y mediar señales externas para apoyar a la espermatogénesis. Tienen una relación física íntima con las células germinales. Las extensiones citoplasmáticas de las células de Sertoli, proporcionan soporte estructural a las células germinales a través de un microfilamento y una red microtubular, presente en el citoplasma celular. Esta arquitectura no es estática, cambia en el túbulo dependiendo de la etapa del proceso de espermatogénesis (Valli *et al.*, 2015; O'Donnell *et al.*, 2017).

Las células de Sertoli, regulan el ambiente interno del túbulo seminífero. Esta regulación se ve facilitada por uniones especializadas de tipo oclusivo entre las células de Sertoli, que se forman en los sitios donde se unen los procesos del citoplasma de las células adyacentes. Estas uniones oclusivas contribuyen a la formación de la barrera hematotesticular, que regula la entrada de una variedad de sustancias desde el intersticio hacia la parte interna del túbulo seminífero. Debido a la ubicación de las uniones oclusivas, las Sps tienen libre acceso a las sustancias del espacio intersticial. Sin embargo, las células germinales por encima de las uniones oclusivas (incluidas las células meióticas y postmeióticas), tienen acceso restringido a los factores del intersticio por la formación de la barrera hematotesticular. Por lo tanto, la barrera hematotesticular divide al epitelio germinal en un compartimento basal, que contiene a las Sps y un compartimento adluminal, que contiene células germinales meióticas y postmeióticas (Fig. 10). A medida que los espermatoцитos preleptotenos migran desde la membrana basal

hacia el compartimento adluminal, las uniones se abren para permitir que tenga lugar la migración celular. La formación y disolución de estas uniones especializadas, están bajo control de numerosos reguladores fisiológicos, incluidos factores endocrinos y parácrinos (Valli *et al.*, 2015; O'Donnell *et al.*, 2017).

Las uniones que contribuyen a la formación de la barrera hematotesticular, son necesarias para la fertilidad. Estas uniones permiten que el ambiente de las células germinales meióticas y postmeióticas, sea controlado con precisión por la célula de Sertoli, lo que permite la entrega precisa de los factores necesarios para el desarrollo de las células germinales. Se ha pensado durante mucho tiempo, que la barrera hematotesticular contribuye al entorno inmunitario privilegiado dentro del epitelio germinal. Las células germinales meióticas y postmeióticas, se desarrollan después del establecimiento de la tolerancia inmune, debido a esto podrían ser reconocidas como extrañas, por lo tanto, la barrera hematotesticular protege a las células germinales en desarrollo del ataque de las células del sistema inmune. Sin embargo, algunos estudios muestran que los túbulos seminíferos continúan excluyendo a las células inmunes, aun cuando las uniones de las células de Sertoli están ausentes (Stanton, 2016; O'Donnell *et al.*, 2017).

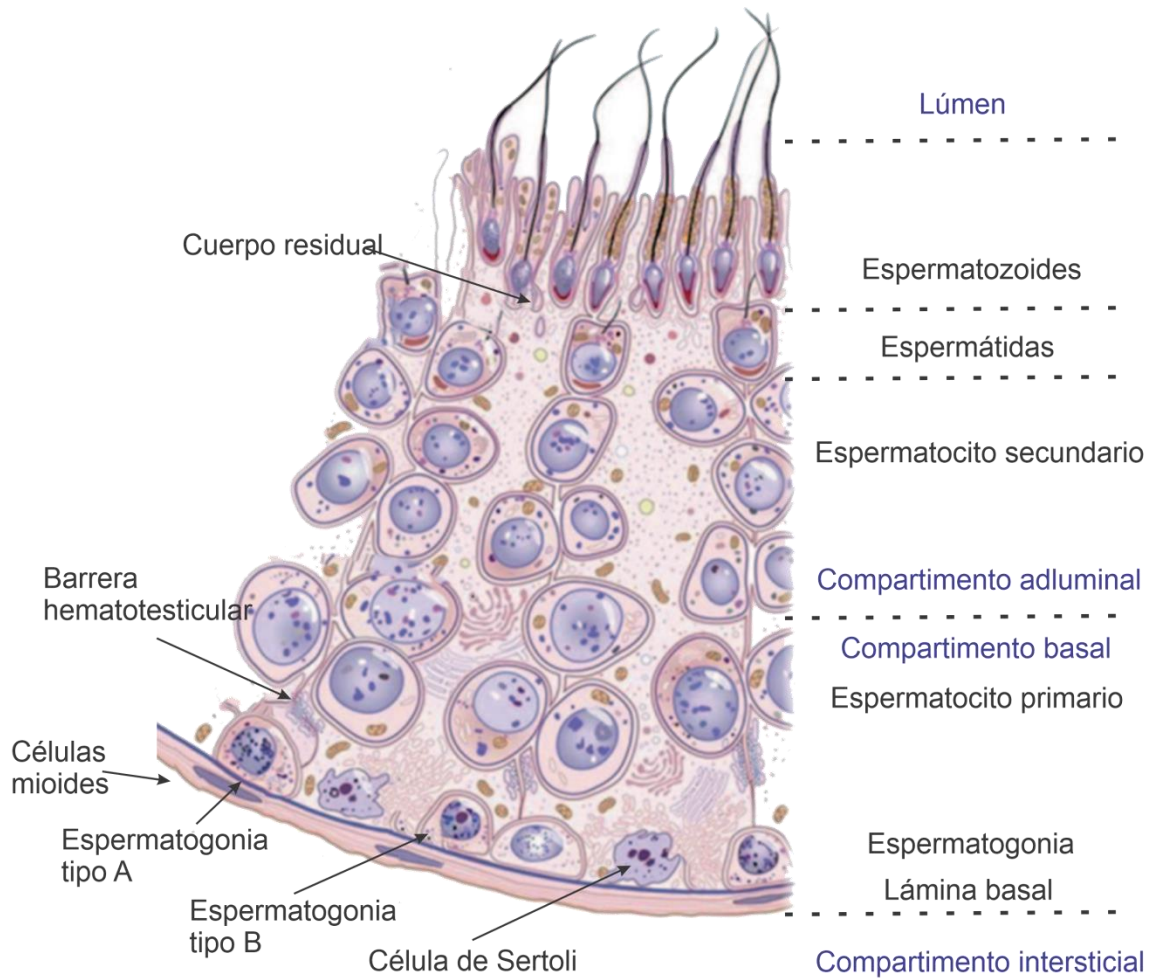


Fig. 10.- Representación de las células que conforman el epitelio germinal una vez activada la espermatogénesis y de los compartimentos formados por la barrera hematotesticular (letras azules). Modificado de Durairajanayagam *et al.*, (2015)

2.3.1. ESPERMATOGÉNESIS

El desarrollo sexual en algunos organismos se puede dividir en infancia, periodo juvenil y edad adulta. La transición entre el periodo juvenil y la edad adulta se define como pubertad. En la pubertad los órganos sexuales maduran de tal forma que, los individuos adquieren la capacidad de reproducirse sexualmente. La capacidad reproductiva que se adquiere en la pubertad, se debe en parte al inicio de un proceso llamado espermatogénesis, que se lleva a cabo en el interior de los túbulos seminíferos (Bhattacharya *et al.*, 2019).

La espermatogénesis consiste en una secuencia de eventos compleja y ordenada, en donde las Sps proliferan y se diferencian en espermatozoides haploides (Fig. 10). La espermatogénesis se puede dividir en tres fases principalmente; 1) proliferación y diferenciación de Sps, 2) meiosis, y 3) espermiogénesis y espermiación. Es importante mencionar que, a medida que las células germinales se dividen y diferencian, no se separan completamente, sino que permanecen unidas por puentes intercelulares. Estos puentes intercelulares persisten en todas las etapas de la espermatogénesis y se cree que facilitan las interacciones bioquímicas, que permiten la sincronización de la maduración de las células germinales (Weinbauer *et al.*, 2010; Schlatt y Ehmcke, 2014; O'Donnell *et al.*, 2017; Oduwole *et al.*, 2018).

Renovación y diferenciación de Sps

Las Sps, son células germinales masculinas precursoras que residen cerca de la membrana basal del epitelio seminífero. Las células madre de espermatogonias (SSC), se dividen para renovar la población de células madre, y proporcionar Sps comprometidas con la vía de diferenciación de las Sps. En general, se pueden identificar dos tipos principales de Sps, conocidas como Sps tipo A y tipo B. Las Sps tipo A exhiben cromatina nuclear fina que se tiñe de un color pálido, y se considera que incluyen al conjunto de SSC, al grupo de Sps indiferenciadas (A_{indif}) y las Sps que se han comprometido a la diferenciación (A_{dif}). El grupo de Sps A_{indif} , está compuesto por las células madre de Sps, la Sps A simple (A_s) y las Sps A en

uniones de dos (pareadas ó A_{pr}), o más de dos uniones (alineadas ó A_{al}) de Sps indiferenciadas, que permanecen conectadas por puentes intercelulares. Una vez por ciclo las Sps A_{indif} se transforman en A_{dif} que luego se denominan A1, A2, etc. Posteriormente una espermatogonia A_{dif} , se divide para producir Sps tipo B. Las Sps tipo B, muestran colecciones de cromatina gruesa cerca de la membrana nuclear y representan las Sps más diferenciadas, que se comprometen a entrar en la meiosis (O'Donnell *et al.*, 2017).

Meiosis

La meiosis, es el proceso por el cual los gametos se someten a una división reductora para proporcionar una espermátide haploide, y en el que la diversidad genética del gameto se garantiza mediante el intercambio de material genético. Durante la meiosis I, se inicia la síntesis de ADN, dando como resultado un gameto tetraploide. El intercambio de información genética se logra durante la recombinación meiótica, que implica la inducción de rupturas de doble cadena de ADN, durante el emparejamiento de cromosomas homólogos y la posterior reparación de las rupturas de doble cadena, utilizando cromosomas homólogos como plantillas. Una vez que se completa el intercambio de material genético, las células proceden a través de dos divisiones reductoras sucesivas, para producir espermátides haploides. Este proceso se rige por sistemas de puntos de control programados genéticamente (O'Donnell *et al.*, 2017).

La meiosis comienza cuando las sp tipo B, pierden su contacto con la membrana basal y forman espermatocitos primarios preleptotenos. Los espermatocitos primarios preleptotenos, comienzan la síntesis de ADN y la descondensación de los cromosomas individuales, lo que resulta en la aparición de filamentos delgados en el núcleo, que caracterizan la etapa de leptoteno. A medida que las células se mueven hacia la etapa de cigoteno, hay un mayor engrosamiento de las cromátides y el emparejamiento de los cromosomas homólogos. El mayor engrosamiento del núcleo y la condensación de los pares de cromosomas homólogos, denominados cromosomas bivalentes, proporcionan las

características nucleares de los espermatoцитos primarios en etapa de paquiteno. Durante la etapa de paquiteno existe un intercambio de material genético, entre cromosomas homólogos derivados de fuentes maternas y paternas, lo que garantiza la diversidad genética de los gametos. Los sitios de intercambio de material genético están marcados por la aparición de quiasmas, y estos se hacen visibles, cuando los cromosomas homólogos se separan ligeramente durante el diploteno (O'Donnell *et al.*, 2017).

La etapa de diploteno, se reconoce por la separación parcial de los pares de cromosomas homólogos, que aún permanecen unidos en sus quiasmas y cada uno todavía está compuesto por un par de cromátides. Con la disolución de la membrana nuclear, los cromosomas se alinean en un huso y cada miembro del par homólogo, se mueve a los polos opuestos del huso durante la anafase. Las células hijas resultantes, se denominan espermatoцитos secundarios y contienen el número haploide de cromosomas, sin embargo, dado que cada cromosoma está compuesto por un par de cromátides, el contenido de ADN sigue siendo diploide. Después de una corta interfase, los espermatoцитos secundarios comienzan una segunda división meiótica durante la cual, las cromátides de cada cromosoma se mueven a los polos opuestos del huso formando células hijas, que se conocen como espermátides redondas (O'Donnell *et al.*, 2017).

Espermiogénesis y espermiación

La transformación de una espermátide redonda en un espermatozoide, representa una secuencia compleja de eventos, que constituyen el proceso de espermiogénesis. No se produce división celular, pero una célula redonda convencional, se convierte en un espermatozoide con capacidad de movilidad. Los pasos básicos en este proceso son consistentes entre todas las especies, y consisten en la formación del acrosoma, cambios nucleares, el desarrollo del flagelo o cola del espermatozoide, la reorganización del citoplasma y orgánulos celulares, y el proceso de liberación de los espermatozoides por la célula de Sertoli, denominado espermiación (O'Donnell *et al.*, 2017).

La formación del acrosoma comienza por la fusión de una serie de gránulos del complejo de Golgi. Estos gránulos migran para entrar en contacto con la membrana nuclear, donde forman una estructura en forma de tapa, que se aplica sobre aproximadamente el 30-50% de la superficie nuclear. La biogénesis del acrosoma, comienza temprano en el desarrollo de la espermátide redonda, y se extiende progresivamente sobre el núcleo, a medida que las espermátides redondas se diferencian aún más (O'Donnell *et al.*, 2017).

Una vez que el acrosoma está completamente extendido, las espermátides redondas comienzan la fase de alargamiento de la espermiogénesis. Durante el alargamiento de la espermátide, el núcleo se polariza a un lado de la célula y entra en aposición cercana con la membrana celular, en una región donde está cubierta por la tapa del acrosoma. Poco después de esta polarización, la cromatina de la espermátide comienza a condensarse de forma visible, formando gránulos progresivamente más grandes y más densos en electrones, junto con un cambio en la forma del núcleo condensado. La condensación de la cromatina, se logra mediante el remplazo de las histonas ricas en lisina, por proteínas de transición que a su vez son reemplazadas por protaminas ricas en arginina. La cromatina de la espermátide se estabiliza posteriormente y es resistente a la digestión por la enzima ADNasa. Asociado con estos cambios hay una marcada disminución en el volumen nuclear y lo que es más importante, se detiene la transcripción génica (O'Donnell *et al.*, 2017).

La formación de la cola, comienza temprano en la espermiogénesis en la fase de espermátide redonda, cuando emerge una estructura filamentosa de uno de los dos centriolos, que se encuentran cerca del complejo de Golgi. Asociado con las relaciones cambiantes de citoplasma nuclear, el flagelo en desarrollo y el par de centriolos, se alojan en una fosa en el núcleo en el polo opuesto al acrosoma. El núcleo central del filamento axial de los flagelos, llamado axonema, consta de nueve microtúbulos dobles que rodean dos microtúbulos centrales únicos, lo que representa un patrón común que se encuentra en los cilios. Esta estructura básica se modifica en la región de su articulación con el núcleo, a través de la formación

de una estructura compleja conocida como pieza de conexión. La formación de los flagelos continúa durante la fase de alargamiento, ya que adquiere su región característica del cuello, la pieza media, principal y final. Las piezas media y principal contienen los componentes de la vaina mitocondrial y fibrosa, respectivamente, e incluyen las fibras densas externas (O'Donnell *et al.*, 2017).

Las espermátides alargadas maduras, se someten a una remodelación compleja adicional durante la espermiación, que es el proceso mediante el cual las espermátides maduras se remodelan y luego se liberan de las células de Sertoli, antes de su paso al epidídimo. Esta remodelación incluye la eliminación de las uniones de adhesión especializadas, que han asegurado una fuerte adhesión de la espermátide a la célula de Sertoli durante su proceso de alargamiento, una mayor remodelación de la cabeza y el acrosoma de la espermátide, y la eliminación del citoplasma extenso para producir al espermatozoide móvil. Los restos del citoplasma espermático forman lo que se denomina cuerpo residual. Los cuerpos residuales, contienen mitocondrias, lípidos y partículas ribosómicas, y se fagocitan y se mueven a la base de la célula de Sertoli, donde se descomponen por mecanismos lisosómicos. La liberación de espermatozoides, al final de la espermiación es un evento instantáneo y probablemente, involucra cascadas de señalización dependientes de la fosforilación dentro de la célula de Sertoli, que resultan en cambios en la naturaleza adhesiva de las moléculas de adhesión celular, que culmina en la liberación de la espermátide madura por las células de Sertoli (O'Donnell *et al.*, 2017).

2.3.2. REGULACIÓN NEUROENDÓCRINA DE LA ESPERMATOGÉNESIS

El eje hipotálamo-hipófisis-testículo, es el clásico ejemplo de un circuito de regulación neuroendócrina, con cascadas jerárquicas de bucles de retroalimentación regulatoria tanto positiva como negativa. A nivel del hipotálamo, principalmente en el núcleo arqueado y el área preóptica mediobasal (POA), se sintetiza la hormona reguladora de gonadotropina (GnRH). Las terminales axonales de las neuronas GnRHérgicas, hacen contacto con los vasos porta-hipofisarios de la eminencia media, donde se libera y transporta a la GnRH (secretada de manera pulsátil) hacia la glándula pituitaria anterior o adenohipófisis. La GnRH estimula a los gonadotropos presentes en la adenohipófisis, a través de un receptor acoplado a proteína G, estimulando la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH), también conocidas como gonadotropinas. La LH y la FSH son liberadas al torrente sanguíneo, y actúan sobre las células de Leydig y las células de Sertoli, respectivamente (Weinbauer *et al.*, 2010; Schlatt y Ehmcke, 2014; Bhattacharya *et al.*, 2019).

Durante la infancia, la red hipotalámica llamada “generador de pulso” de la hormona reguladora de gonadotropinas, se encuentra activa, sin embargo, los niveles de LH y FSH encontrados en suero pueden ser bajos. En la etapa juvenil, el generador de pulso de GnRH se inhibe y vuelve a reactivarse en la pubertad, provocando el resurgimiento de la secreción pulsátil de GnRH, que conduce a niveles elevados de gonadotropinas, que a su vez, actúan sobre los testículos (que ya han madurado en ese momento), induciendo la aparición de la espermatogénesis prolífica (Ilacqua *et al.*, 2018; Bhattacharya *et al.*, 2019).

Hormona Luteinizante (LH)

La función principal de la LH en los testículos, es la estimulación de la producción de testosterona por las células de Leydig. Esto se logra mediante la unión de la LH a su receptor, el receptor de gonadotropina coriónica de la hormona luteinizante (LHCGR), presente en las células de Leydig, activando la producción de enzimas que se requieren para la biosíntesis de testosterona, a partir de un sustrato de

colesterol. La testosterona, es una hormona esteroide lipofílica que es esencial para mantener la espermatogénesis y la fertilidad masculina, actuando como un factor parácrino dentro de los testículos. Además, la liberación de testosterona en el torrente sanguíneo actúa para regular la secreción de LH por la adenohipófisis, a través de un circuito de retroalimentación negativa. Las concentraciones elevadas de testosterona circulante, retroalimentan a nivel del hipotálamo y la adenohipofisis para suprimir la secreción de LH, lo que posteriormente reduce la estimulación de testosterona mediada por LHCGR en las células de Leydig, por lo tanto, una caída en las concentraciones circulantes de testosterona induce la secreción de LH por la adenohipófisis y un aumento concomitante en la producción de testosterona por las células de Leydig (Smith y Walker, 2015).

La eliminación de testosterona o la desactivación de su receptor (receptor de andrógenos [AR]), dan como resultado tres alteraciones importantes en la espermatogénesis. Primero, se interrumpe la integridad de la barrera hematotesticular, dando como resultado que las células germinales meióticas y postmeióticas, que se encontraban en un microambiente aislado, se expongan al ataque autoinmune y a factores citotóxicos. Segundo, la conversión de espermátides redondas en espermátides alargadas se inhibe, debido a defectos en la adhesión celular que causan el desprendimiento prematuro de espermátides redondas de las células de Sertoli. Tercero, los espermatozoides completamente maduros no pueden ser liberados de las células de Sertoli, y las células germinales son fagocitadas por las células de Sertoli (Smith y Walker, 2015; Schlatt *et al.*, 2016).

Las células de Sertoli, las células mioides peritubulares (CMP), las células de Leydig y células endoteliales vasculares, expresan receptores de andrógenos a diferencia de las células germinales, por lo que se cree que la testosterona regula la espermatogénesis de manera indirecta, a través de las células somáticas del túbulo seminífero. Las células de Sertoli, se han considerado como los principales candidatos de la regulación indirecta de la testosterona, por el contacto íntimo que mantienen con las células germinales. La expresión de AR, en las células de

Sertoli postpuberales, está relacionada con las etapas del ciclo del epitelio germinal. Debido a que la expresión de AR es mayor durante la etapa VII, se cree que esta etapa es la más regulada y sensible a la testosterona. Varios modelos en ratas de ausencia de testosterona, confirman que la pérdida progresiva de células germinales comienza durante la etapa VII en ausencia de testosterona (Welsh *et al.*, 2009; Smith y Walker, 2015; O'Donnell *et al.*, 2017).

Las CMP, interactúan íntimamente con las células de Sertoli, para depositar directamente los componentes de la membrana basal que rodean al epitelio germinal. La ablación de AR, específicamente en CMP provoca infertilidad en ratones, disminuyendo el peso de los testículos y una reducción del 86% de las células germinales, en comparación con los ratones de tipo silvestre. La función de las células de Sertoli, también se ve afectada, como lo demuestra una reducción en el diámetro de la luz del túbulo seminífero (una medida de la secreción del líquido del túbulo seminífero) y cambios significativos en la expresión de genes clave, incluidos aquellos previamente identificados como sensibles a la señalización de AR dentro de las células de Sertoli (Welsh *et al.*, 2009; Smith y Walker, 2015; O'Donnell *et al.*, 2017).

Se han identificado varias funciones clave de AR en las células de Leydig, incluida la regulación del número final, el desarrollo morfológico normal y la maduración de células de Leydig en etapa adulta, y el control de la expresión de genes esteroideogénicos. Sin embargo, debido a la falta de un modelo en donde se genere una ablación de AR específico de las células de Leydig, el papel funcional de la señalización de AR específicamente dentro de las células de Leydig, aún no está completamente establecido (Smith y Walker, 2015).

El AR en las células endoteliales vasculares testiculares, está involucrado en el mantenimiento de la dinámica de los fluidos normales y la vasomoción en los testículos (Welsh *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2017).

Hormona Folículo Estimulante (FSH)

La FSH después de ser producida por la adenohipófisis, es transportada a través de la circulación hacia los testículos. En los testículos solamente las células de Sertoli expresan el receptor de FSH. Por lo tanto, todas las funciones de apoyo de la FSH sobre la espermatogénesis, están mediadas por las células de Sertoli (Smith y Walker, 2015).

La función de FSH, cambia durante el desarrollo de las células de Sertoli. La FSH promueve la proliferación de las células de Sertoli antes de la pubertad. Después de la pubertad, cuando las células de Sertoli no se dividen o lo hacen en menor cantidad, la FSH actúa a través de las células de Sertoli para apoyar la viabilidad de las células germinales. La FSH promueve la proliferación de células de Sertoli en ratas de 19 o 20 días de vida fetal, pero la proliferación de las células de Sertoli se detiene 15-20 días después del nacimiento en la rata. Durante este período, los niveles circulantes de FSH y la expresión de los receptores de FSH en las células de Sertoli, permanecen relativamente constantes. Aunque el potencial de señalización de FSH aparentemente no cambia, la FSH puede tener efectos opuestos en las células de Sertoli en proliferación y diferenciación. Se cree que las alteraciones en las vías de señalización mediadas por FSH, son responsables de los diferentes efectos de FSH, que ocurren durante la diferenciación de células de Sertoli (Smith y Walker, 2015; Oduwole *et al.*, 2018).

Se ha documentado, que los efectos de la FSH en la proliferación de células de Sertoli, dependen en parte de IGF1 y activina, que en el testículo es producido por células de Sertoli, Leydig y CMP. FSH e IGF1, se sinergizan para aumentar la actividad de la quinasa AKT promotora del crecimiento en células Sertoli, en contraste, la eliminación del receptor IGF1 en células Sertoli cultivadas reduce la proliferación. Estudios en ratones que carecen del receptor de insulina y / o el receptor IGF1, confirman que la FSH requiere la vía de señalización de insulina-IGF, para mediar los efectos proliferativos en las células inmaduras de Sertoli. En ausencia de señalización de insulina-IGF1, las tasas de proliferación de células de Sertoli se redujeron en el día embrionario 17 y el día 5 postnatal, lo que resulta en un retraso en la maduración de las células de Sertoli y una disminución en el

tamaño de los testículos. Se cree que la combinación de activina y FSH, prolonga la proliferación de células de Sertoli, más allá del período en que la FSH es efectiva por sí sola. La disminución en los niveles de activina observada en la pubertad, corresponde con la interrupción de la proliferación de células de Sertoli y el inicio de la diferenciación. La suma de todos los cambios en la regulación de FSH en las vías de señalización durante el desarrollo de células de Sertoli, proporciona información sobre la regulación de la proliferación y diferenciación de células de Sertoli. Sin embargo, los mecanismos responsables de causar cambios en la señalización intracelular (específica de la etapa de desarrollo) en respuesta a la FSH, no se han caracterizado completamente (Smith y Walker, 2015).

Por otra parte, la FSH regula a la alza el factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF), un miembro de 15 kDa de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que es esencial para la proliferación de células madre germinales. GDNF fue el primer factor encontrado requerido para la auto-renovación y la supervivencia de las SSC. La expresión de GDNF en células de Sertoli de rata adultas *in vivo* es cíclica. Los niveles más altos de ARNm de GDNF están presentes durante las etapas I y XIII a XIV en la rata, correspondientes a las etapas en las que los niveles del receptor de FSH y la unión de FSH por las células de Sertoli son mayores, e inmediatamente antes y durante las etapas que muestran la replicación máxima de una clase única de Sps de tipo A (As), que incluye células madre. Estos datos sugieren que los aumentos específicos de la producción de GDNF, por parte de las células de Sertoli, probablemente causan la proliferación de Sps As, que da como resultado la auto-renovación. En contraste, durante las etapas en que los niveles de GDNF disminuyen, la división de la Sps As y su progenie, tienden a dar como resultado células comprometidas a convertirse en Sps A1 diferenciada. Es posible que las células germinales produzcan señales que inhiben la expresión de GDNF en las células de Sertoli, para causar la especificidad de la etapa de producción de GDNF, debido a que la expresión de ARNm de *Gdnf* aumenta en los testículos que están severamente agotados de células germinales (Smith y Walker, 2015).

Además de los factores de mantenimiento y renovación de SSC, las células de Sertoli producen ligando KIT (KITL) y ácido retinoico (AcR), ambos necesarios para la diferenciación de sp. Similar a la regulación de la expresión de GDNF, la FSH regula la expresión de KITL en las células de Sertoli. Los niveles de KITL son más altos en las etapas II-VI, que preceden a la diferenciación de las Sps A_{ai} a A1 en las etapas VII y VIII en ratas. KITL estimula la proliferación de Sps y previene la apoptosis. Los ratones y las ratas, que se mantienen con una dieta deficiente en vitamina A (el precursor dietético de AcR) son infértiles, con túbulos seminíferos que contienen solo sp KIT-indiferenciadas. El tratamiento con retinol en los animales con deficiencia de vitamina A, provoca la regulación positiva de la expresión de la proteína KIT y la restauración de la espermatogénesis. La vitamina A circula principalmente como retinol unido a RBP (proteína de unión a retinol) y es absorbida por las células de Sertoli en una manera dependiente de STRA6. Es interesante mencionar que, STRA6 está regulado positivamente en etapas posteriores del epitelio seminífero (etapa VII en adelante en ratones), coincidiendo con la diferenciación de A_{ai} en espermatogonía A1. Por lo tanto, la expresión coordinada de los factores de auto-renovación (GDNF) y diferenciación (KITL y AcR), en el nicho de las células de Sertoli, ayudan a determinar el destino del desarrollo de las CSS (Valli *et al.*, 2015).

Función conjunta de la FSH y la testosterona

La FSH y la testosterona inician vías de señalización que contribuyen al apoyo de la espermatogénesis, ambas hormonas comparten algunas características comunes. Una característica que comparten la FSH y la testosterona en ratas jóvenes es la elevación de Ca^{2+} en las células de Sertoli, aunque todavía no se conocen completamente los mecanismos por los cuales el Ca^{2+} elevado podría apoyar la espermatogénesis (Smith y Walker, 2015).

En los roedores prepúberes, la testosterona o la FSH pueden aumentar independientemente el número de células de Sertoli, aunque la FSH es aparentemente más efectiva. La estimulación similar de la proliferación de células

de Sertoli por la FSH y la testosterona, puede deberse a la capacidad compartida de estas hormonas para activar la vía MAPK, en células de Sertoli prepuberales. Por el contrario, solo la FSH es capaz de activar otros factores de señalización que promueven la proliferación, incluidos PI3K y AKT, que pueden explicar las propiedades más efectivas de la FSH para promover la proliferación (Smith y Walker, 2015).

La regulación del factor de transcripción CREB es otro ejemplo, de cómo la testosterona y la FSH se sinergizan para proporcionar los factores necesarios para mantener la espermatogénesis. La fosforilación de CREB en las células de Sertoli es esencial para la supervivencia de los espermatozoides. La FSH es aproximadamente dos veces más efectiva que la testosterona en la fosforilación de CREB. La fosforilación menos eficiente de CREB en presencia de testosterona solamente, puede ser un factor contribuyente responsable de la reducción de la fertilidad. Además, la fosforilación de CREB mediada por testosterona sería restringida solo a las etapas VI-VIII (Smith y Walker, 2015).

La FSH y la testosterona, también pueden actuar en oposición en vías de señalización específicas para apoyar la espermatogénesis. En ratas puberales y postpuberales, la FSH actúa inhibiendo la activación de ERK mediada por testosterona en células maduras de Sertoli. La activación de ERK mediada por testosterona es inhibida por FSH, ya que la estimulación de FSH de las células de Sertoli aumenta los niveles de AMPc que activan PKA, que luego bloquea la activación de RAF1, un miembro inicial de la cascada MAPK. Debido a que el receptor de FSH y los niveles de AR, se expresan cíclicamente de manera desfasada durante el ciclo del epitelio germinal, se esperaría que la FSH limite la activación de ERK durante gran parte del ciclo, excepto durante las etapas VII a VIII, cuando los niveles del receptor de FSH son más bajos y AR son más altos. En contraste los niveles de ERK activado, se elevan en las etapas VII-VIII, adyacentes a las cabezas de las espermátides alargadas en el proceso de liberación y en las regiones adluminales adyacentes a las células germinales en desarrollo. Es posible que esta combinación de señalización de FSH y

testosterona sea un mecanismo por el cual la testosterona y la FSH se sinergizan para apoyar mejor la espermatogénesis. En este caso, la FSH limitaría la activación de ERK en las células de Sertoli, solo en las etapas en las que se requiere la activación de ERK mediada por testosterona, para la remodelación de las uniones de células germinales a las células de Sertoli. En ausencia de esta sinergia, las uniones correctas de adhesión de células germinales a las células de Sertoli podrían no formarse, y las células germinales se liberarían prematuramente (Smith y Walker, 2015).

Se ha demostrado que la FSH, pero no la testosterona, estimula las vías de señalización de PLA2 en las células de Sertoli, pero hasta ahora no se comprende la función de la señalización de PLA2 en el mantenimiento de la espermatogénesis. Otra diferencia entre los dos principales reguladores hormonales de las células de Sertoli y la espermatogénesis, es que la testosterona no regula a la alza la producción de AMPc en las células de Sertoli. Estos hallazgos sugieren que los niveles elevados de AMPc en las células de Sertoli, no son necesarios para la espermatogénesis o que existen mecanismos redundantes (Smith y Walker, 2015).

Finalmente, aunque la FSH y la testosterona activan algunos genes de manera similar, las diferencias en su regulación de la expresión génica probablemente contribuyan a los efectos sinérgicos de las hormonas. La testosterona y la FSH también se sinergizan para promover la proliferación de células de Sertoli. Sin embargo, las acciones de testosterona deben ser indirectas, porque las células de Sertoli fetales y neonatales en proliferación, no expresan el receptor de andrógenos. Apoyando esta idea está el hallazgo de que la eliminación de los receptores de andrógenos en todas las células testiculares, reduce el número de células de Sertoli, mientras que la eliminación de los receptores de andrógenos en las células de Sertoli específicamente, no afecta a la población de células de Sertoli. Una posible explicación de estos resultados es que los efectos de andrógenos están mediados por células mióides peritubulares que expresan receptores de andrógenos durante el desarrollo fetal (Smith y Walker, 2015).

2.3.3. PAPEL DE LA INERVACIÓN EN LAS FUNCIONES DEL TESTÍCULO

Aunado a la regulación neuroendocrina de las funciones testiculares (espermatogénesis y esteroidogénesis), se ha propuesto una regulación mediada por las estructuras neurales a diferentes niveles (periferia, médula espinal, hipotálamo, estructuras límbicas) del circuito que inerva el testículo (Gerendai *et al.*, 2005).

Está bien establecido que la transección de los nervios hacia y desde el testículo, interfiere con las funciones testiculares. La transección del NSS en ratas, induce una reducción en el número de receptores de gonadotropinas y una atenuación de la secreción de andrógenos a la estimulación con gonadotropina corionica humana (hCG) (Campos *et al.*, 1993). Además, la transección del NSS en la rata, produce defectos en la espermatogénesis, incluidas la fagocitosis de las espermátides maduras, vacuolización de los núcleos de las espermátides, la espermiación tardía y las asociaciones celulares incompletas en el 60% de los túbulos seminíferos. Si bien la sección solamente del NSI no afecta la espermatogénesis, la sección de ambos nervios (NSS y NSI) doce semanas después de la cirugía, provoca una regresión del epitelio seminífero, caracterizado por la ausencia de Sps proliferantes (Chow *et al.*, 2000).

En otro trabajo realizado en ratas prepúberes, se encontró que la sección tanto del NSS como del NSI reduce la concentración espermática y las concentraciones de testosterona. Además, se evidenció que la denervación (perdida de la función de las fibras nerviosas), no tiene influencia en la proliferación de las Sps y espermatoцитos primarios, pero si promueve la apoptosis en espermátides redondas y células de Leydig, y reduce la activación de la meiosis de espermatoцитos en cigoteno y paquiteno. En adición, la denervación en ambos nervios, disminuye significativamente la expresión de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1(3 β -HSD1) y los niveles de ARNm del receptor de la hormona luteinizante, pero no tiene influencia sobre la expresión de ARNm del receptor de FSH (Huo *et al.*, 2010)

Con respecto al papel del nervio vago, se ha informado que la vagotomía bilateral tiene un efecto supresor transitorio sobre la liberación de gonadotropinas. En las ratas adultas, la transección unilateral (del lado derecho) del nervio vago induce un aumento significativo de la hormona luteinizante, mientras que, en las ratas prepúberes hemicastradas, la vagotomía del lado derecho combinada con la hemiorquidectomía del lado derecho, disminuye las concentraciones séricas de gonadotropina y la secreción de testosterona (Gerendai *et al.*, 2005)

Los nervios que ingresan al testículo contienen fibras de naturaleza simpática, parasimpática y aferente de tipo sensorial, una sección del nervio completo, nos permite diferenciar el papel específico que desempeña cada una de estas fibras sobre las funciones del testículo. Por lo tanto, se ha recurrido a técnicas de denervación farmacológica, para evidenciar el posible papel que desempeñan los diferentes tipos de fibras que componen a los nervios espermáticos, sobre las funciones del testículo.

La importancia de la inervación simpática en los testículos, se sugiere tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. En ratas neonatales, la simpatectomía farmacológica de los testículos (inyección local de la neurotoxina 6-hidroxi dopamina) retarda el crecimiento y la diferenciación del testículo y previene el desarrollo de hipertrofia testicular compensatoria, después de la hemicastración (Gerendai *et al.*, 1984).

Se ha sugerido que la inervación colinérgica está implicada en el control de la esteroidogénesis, debido a observaciones que indican que la administración de acetilcolina al plexo del nervio espermático inferior, disminuye la secreción de testosterona en testículos de rata. Trabajos realizados por Frankel y Mock (1982) indican que la sección del nervio espermático superior no está implicado en la producción de testosterona en respuesta a la hemicastración, lo que sugiere que los efectos de la acetilcolina podrían estar mediados en parte por el nervio espermático inferior (Zhu *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que las fibras sensoriales presentes en los nervios que ingresan al testículo son importantes en la regulación del desarrollo de las células germinales, ya que su inhibición tiene efectos sobre el proceso de espermatogénesis. En la rata macho recién nacida la eliminación de las fibras sensoriales mediante la administración de 50mg/kg de capsaicina, provoca una disminución en el porcentaje de motilidad, vitalidad y en el número de espermatozoides (Hernández, 2014). Además, en estudiantes universitarios la administración de capsaicina mediante la ingesta de 300 mg de chile habanero diariamente por 3 meses, provoca una disminución en el porcentaje y en el número de espermatozoides viables (León-López G *et al.*, 2017).

Existen pocos datos experimentales disponibles sobre la participación del tronco encefálico en el control neural de los testículos, un informe indica que las lesiones en la formación reticular mesencefálica, causan atrofia testicular y disminución de la espermatogénesis. Los túbulos seminíferos de las ratas lesionadas en la formación reticular mesencefálica, se caracterizan por una disminución general en el número de células de diferentes generaciones del epitelio germinal, acompañado por, degeneración de Sps, espermatocitos y de espermátides en etapas iniciales, y reducción de las áreas de los túbulos seminíferos. Otra característica importante de mencionar, fue una reducción en el recuento completo de las células intersticiales (Ali, 1986).

En otro trabajo realizado en ratas de 30 días de edad, la lesión de los núcleos de rafe dorsal y medial, no indujo cambios en las concentraciones de LH, progesterona y testosterona, pero se observó una disminución en las concentraciones de serotonina en las ratas lesionadas. Sin embargo la lesión del núcleo de rafe dorsal, provocó una disminución de las concentraciones de FSH, así como, una disminución de la concentración y la motilidad espermática, que no se observó en animales con la lesión del núcleo de rafe medial. Estos resultados sugieren que, los núcleos de rafe regulan diferencialmente las funciones reproductivas masculinas (Ayala *et al.*, 2015).

Algunos estudios han indicado que el cerebro, también controla las funciones testiculares mediante un mecanismo independiente de la hipófisis, mediado por los nervios. Estos datos se basan en modelos experimentales especiales, que han permitido proponer la existencia de una vía neural directa entre los testículos y el cerebro, cuya función es proporcionar un control de ajuste fino del órgano. De acuerdo con este punto de vista, los hallazgos indican que la hemiorquidectomía, induce cambios en el contenido de la GnRH en el hipotálamo. Además, se ha informado que la interrupción de impulsos aferentes unilaterales del hipotálamo, previene el aumento de la FSH inducida por hemicastración, si las dos intervenciones se realizan en el mismo lado (derecho) (Gerendai *et al.*, 2005). Los estudios realizados por Turnbull y Rivier (1997), indican que la inyección intracerebroventricular de interleucina-1, suprime la secreción de testosterona inducida por hCG, por una vía neural dependiente de catecolaminas entre el cerebro y los testículos.

La lesión electrolítica del núcleo paraventricular, no influyó en la capacidad de respuesta de las células de Leydig a la hCG, pero evitó el efecto inhibitorio del factor liberador de corticotropina o la respuesta del agonista adrenérgico (Selvage y Rivier, 2003). Otros estudios indican que la inyección intracerebroventricular de etanol, redujo la secreción de testosterona inducida por hCG, sin alterar la concentración sérica y la concentración en el flujo sanguíneo testicular de LH. El tratamiento aumentó significativamente las transcripciones de ARNm de c-fos, en la porción parvocelular del núcleo paraventricular hipotalámico. La lesión del núcleo restauró parcialmente la respuesta de testosterona inducida por etanol a hCG. Estos resultados indican que el núcleo paraventricular, desempeña un papel en el control de la secreción de testosterona, a través de un mecanismo que es independiente de la secreción de LH y de los efectos mediados periféricamente (Selvage *et al.*, 2004).

El papel de la amígdala como uno de los núcleos extrahipotalámicos que modulan la secreción de GnRH, se conoce desde hace décadas. Estudios indican que la amígdala, está involucrada en el control neural dependiente de la hipófisis de la

secreción de testosterona. La lesión unilateral de la amígdala con ácido kaínico, resultó en una disminución significativa en la secreción basal de testosterona (*in vitro*) de ambos testículos y en la secreción sérica de testosterona. La secreción de LH, se suprimió después de la lesión izquierda pero no derecha (Banczerowski, *et al.*, 2003). Estos resultados indican, una asimetría funcional de la amígdala con respecto al mecanismo por el cual, la amígdala izquierda (a través del eje hipotálamo-hipofisario-testicular) y la amígdala derecha (a través de la ruta neural directa) controlan la secreción de testosterona. Estos datos son consistentes con los resultados de otro experimento realizado, en donde la interrupción de impulsos aferentes del área izquierda del lóbulo temporal que contiene la amígdala, en ratas hemicastradas, resultó en una disminución significativa en la esteroidogénesis del testículo restante (derecho), sin cambio en el nivel de LH en suero (Gerendai *et al.*, 2005).

En la rata macho, la lesión unilateral del área cortical insular, donde se podían detectar neuronas relacionadas con los testículos, resultó en una disminución significativa en la secreción basal de testosterona (*in vitro*) y en la concentración sérica de testosterona, cuando la intervención fue en el lado derecho. La lesión en el lado izquierdo o derecho indujo un aumento significativo en el nivel de LH en suero. Sin embargo, el nivel hormonal fue significativamente mayor después de una lesión en el lado derecho en comparación con el lado izquierdo. Los resultados indican que la corteza insular también modula la secreción de testosterona y LH, con un predominio funcional de la corteza insular derecha (Banczerowski *et al.*, 2001).

2.4. PROLIFERACIÓN CELULAR INCONTROLADA Y CÁNCER TESTÍCULAR

El aumento de la proliferación incontrolada en células anormales, es una de las características principales en grados avanzados de neoplasias y enfermedades como el cáncer. Además, las células anormales en constante proliferación pueden generar tumores y adquirir la capacidad de invadir partes adyacentes del cuerpo propagándose a otros órganos. A este último proceso se le denomina metástasis y es la principal causa de muerte por cáncer. Las investigaciones realizadas a lo largo de varias décadas, respaldan la hipótesis de que estos cambios se deben a mutaciones, pérdida o inactivación de los genes de control celular (Carter *et al.*, 2003; Chao *et al.*, 2008; Wang-Michelitsch y Michelitsch, 2015; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018).

La formación de tumores en el testículo está asociada principalmente a células germinales (90-95%), no obstante, también se pueden generar tumoraciones en células de Leydig y células de Sertoli, aunque en menor frecuencia (5-10%). Existen diferentes clasificaciones para los tumores de células germinales testiculares (TCGT). Se han clasificado en dos grandes grupos, seminomas (seminoma clásico y seminoma espermatocítico) y no seminomas (carcinoma embrionario, tumor de saco vitelino, teratoma). También se han clasificado en base a la edad en la que se presentan comúnmente: 1) teratomas, tumores de saco vitelino y tumores de coriocarcinomas (en lactantes); 2) seminomas y no-seminomas (en adolescentes y adultos); y 3) seminomas espermatocíticos (en adultos) (Singh *et al.*, 2011; Howitt *et al.*, 2015; Gurney *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016).

La mayoría de los TCGT (seminomas y no-seminomas) se originan a partir de un precursor común, la neoplasia de células germinales *in situ* (GCNIS), inicialmente denominada carcinoma *in situ* de testículo. Se considera que la GCNIS se origina a partir de células germinales inmaduras (gonocitos) detenidas durante el desarrollo y que persistieron fuera de la vida fetal/perinatal. En consecuencia, la

morfología de las células GCNIS se parece mucho a la de los gonocitos fetales, pero con una cromatina irregular en los núcleos. Las células de la GCNIS, se encuentran dentro de los túbulos seminíferos, con mayor frecuencia en una sola fila a lo largo de la membrana basal (Rajpert-De *et al.*, 2018).

El seminoma clásico, es el tumor de células germinales más común, representando aproximadamente el 50 % de todos los TGCT. Ocurre en hombres mayores en comparación con los no seminomas, con una edad media de 40 años. Los pacientes con seminoma, tienen un pronóstico de supervivencia extremadamente bueno, con más del 95%, debido a su naturaleza radiosensible y quimiosensible. Por lo general, el seminoma crece en formaciones parecidas a nidos y láminas de células, con septos fibrosos delgados que separan los nidos y lobulillos de las células tumorales. Dentro de los septos se pueden encontrar linfocitos prominentemente variables. El seminoma, tiende a presentar un aspecto bastante monótono de células con citoplasma claro a pálido a eosinófilo. Los núcleos son típicamente grandes (pero generalmente no pleomorfos), prominentes y por lo general manchados. Los contornos nucleares son en su mayoría redondeados, pero a menudo al menos un borde tiene una esquina cuadrada. Además, es común observar inflamación linfocítica e inflamación granulosa que puede ser extensa (Fig. 11 A) (Howitt *et al.*, 2015).

El seminoma espermatocítico, a excepción de otros tipos de TCGT no se deriva de una GCNIS y tiene un perfil de genes similar a la espermatogonia o espermatocitos primarios tempranos. Los seminomas espermatocíticos se componen de 3 tipos de células tumorales; pequeñas, mediana/intermedia y grande/gigante. Generalmente predominan las células intermedias, que pueden imitar otro tipo de tumor llamado seminoma anaplásico. Las células gigantes a menudo son multinucleadas y demuestran un pleomorfismo con cromatina en forma de espirene. Las células pequeñas pueden confundirse con linfocitos, debido al escaso citoplasma que presentan (Fig. 11 B) (Howitt *et al.*, 2015; Rajpert-De *et al.*, 2018).

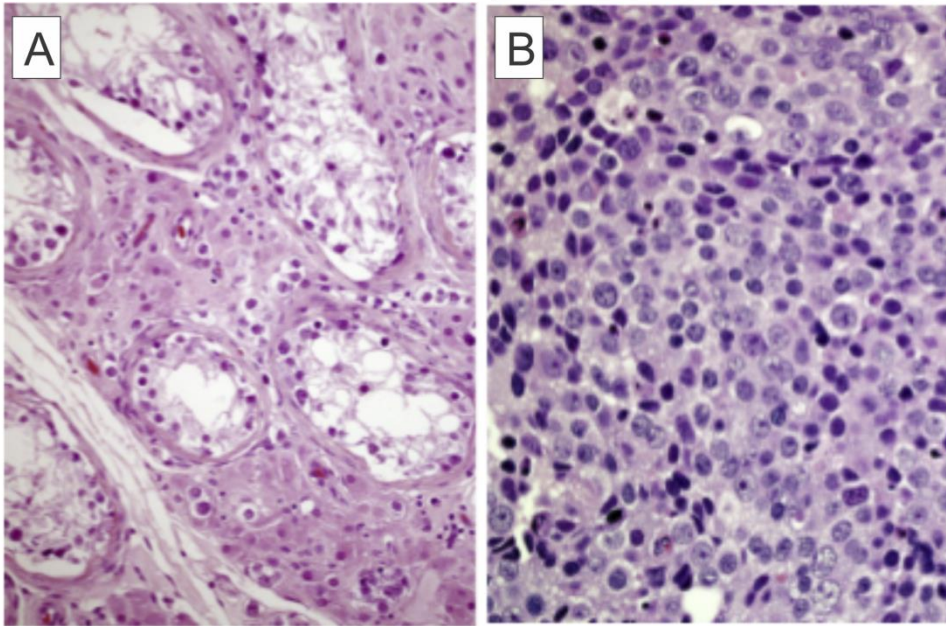


Fig. 11.- Cortes histológicos de un seminoma (A) y un seminoma espermatocítico (B). Tinción de hematoxilina y eosina (400X). Tomado de Howitt *et al.*, (2015).

Los no-seminomas, muestran una gran variedad de formas histológicas y contienen carcinoma embrionario indiferenciado y componentes somáticos parcialmente diferenciados, a lo largo del linaje embrionario de cualquier tejido. Los no-seminomas también contienen componentes de tejido extraembrionario (tumor de saco vitelino y coriocarcinoma) (Rajpert-De *et al.*, 2018).

El carcinoma embrionario, afecta principalmente a hombres jóvenes con una edad media de 32 años. Se encuentra comúnmente como un componente de un no-seminoma mixto. Puede mostrar una variedad de patrones de crecimiento, incluidos crecimiento sólido, papilar, tubular y glandular. El crecimiento sólido es más común, pero generalmente se acompaña de otros patrones arquitectónicos. Las células tumorales de un carcinoma embrionario, son grandes con una cantidad moderada de citoplasma anfófilico y bordes celulares indistintos. Los núcleos son grandes y exhiben pleomorfismo, uno o más núcleos prominentes y abundante mitosis. Ocasionalmente puede mostrar citoplasma despejado y bordes

celulares bien visualizados, posiblemente generando confusión con el seminoma (Fig. 12 A) (Howitt *et al.*, 2015).

El teratoma se considera como un componente de TGCT mixto. Está compuesto por una amplia variedad de estructuras derivadas de elementos exodérmicos, endodérmicos y mesodérmicos, es común encontrar epitelios escamosos y glandulares en este tipo de tumores (Fig. 12 B) (Howitt *et al.*, 2015).

El tumor de saco vitelino (YST), es el TGCT más común en niños menores de 2 años. Tiene una gran variedad de morfologías histológicas. La morfología más común en YST es la morfología reticular o microquística con estroma mixoide y cuerpos de Schiller-Duval, que consisten en un anillo de YST que rodea un vaso sanguíneo, típicamente dentro de un espacio quístico. Además, se pueden observar glóbulos hialinos intracitoplasmáticos y material eosinófilo denso extracelular (Fig. 12 C) (Howitt *et al.*, 2015).

El coriocarcinoma es extremadamente raro en forma pura en los testículos, pero puede verse como un componente de un tumor mixto de TGCT. A diferencia de los otros TGCT, la mayoría de los pacientes con coriocarcinoma presentan síntomas relacionados con enfermedad metastásica, en lugar de una masa testicular palpable. Los niveles séricos de Beta-hCG están marcadamente elevados y la ginecomastia puede estar presente en algunos pacientes. Anteriormente el coriocarcinoma testicular era rápidamente mortal si no se trataba inmediatamente. Sin embargo, en la actualidad, es posible la curación con quimioterapia combinada, incluso después de una diseminación generalizada. El coriocarcinoma se asocia con hemorragia y necrosis extensas, y se compone de células de trofoblasto mononucleado y sincitiotrofoblasto (synT), que pueden estar presentes en cantidades variables. Las células trofoblásticas mononucleadas se caracterizan por ser de tamaño mediano, con una cantidad moderada de citoplasma eosinófilo claro pálido y núcleos con contornos irregulares, cromatina gruesa y uno o más nucléolos. Los bordes de las células son típicamente distintos. Las células synT se caracterizan por un tamaño celular mucho mayor,

multinucleación frecuente, citoplasma densamente eosinófilo o ligeramente anfófilo y núcleos marcadamente hiper cromáticos e irregulares. Las células synT pueden mostrar una gran vacuolización intracitoplasmática, impartiendo una apariencia microquística. La invasión linfovascular se identifica fácilmente en prácticamente el 100 % de los casos (Fig. 12 D) (Howitt *et al.*, 2015).

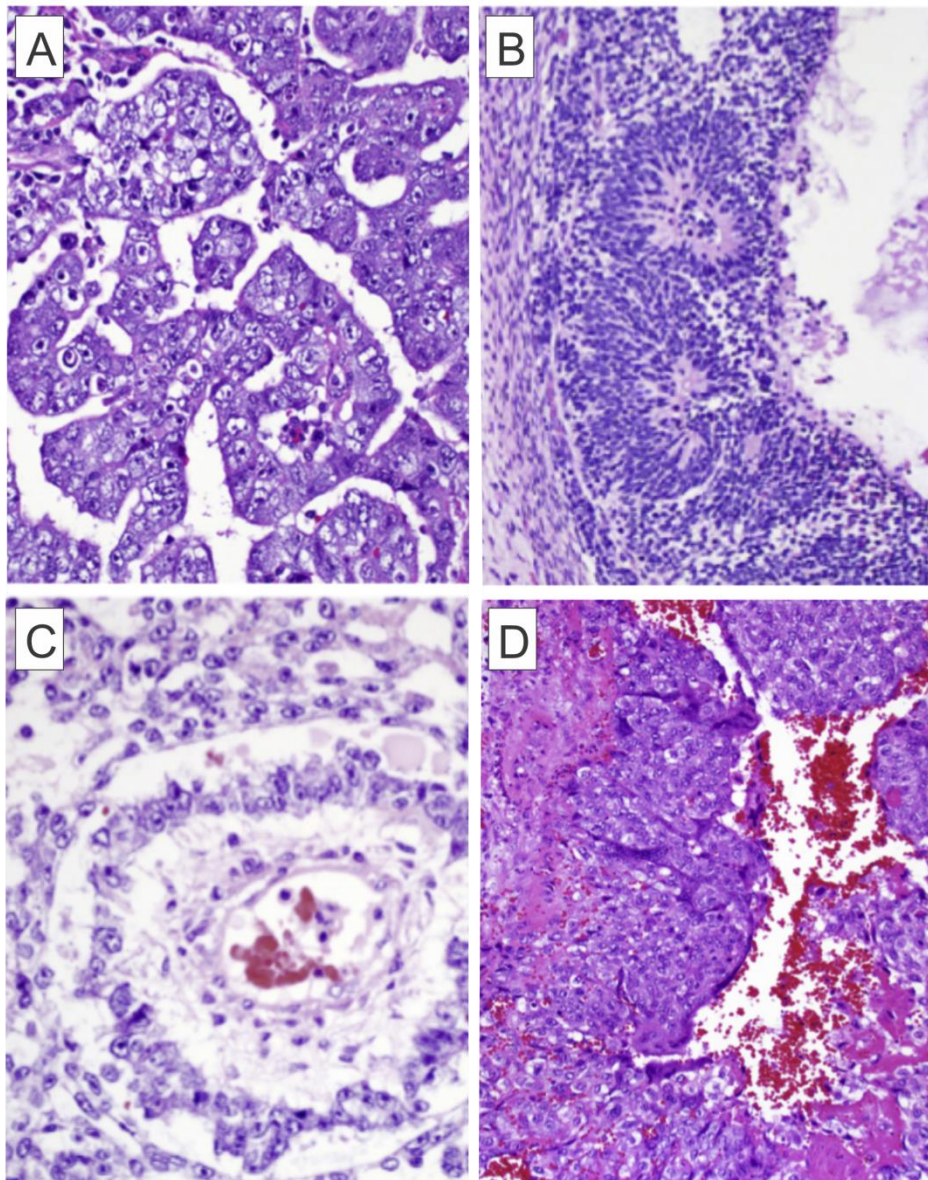


Fig. 12.- Cortes histológicos de diferentes tipos de no-seminomas. Carcinoma embrionario (A), Teratoma (B), Tumor de saco vitelino (C), y Coriocarcinoma (D). Tinción de hematoxilina y eosina (400X). Tomado de Howitt, *et al.*, (2015).

Se ha reportado una mayor incidencia de tumores testiculares, en países de Europa y en Estados Unidos de América, presentando diferencias entre etnias; las personas de piel blanca presentan la mayor tasa de incidencia, seguido por personas de origen hispano, personas asiáticas y finalmente personas de piel negra. Y se prevé que para el año 2026 la mayor tasa de incidencia se presentará en hombres de origen hispano al menos en los Estados Unidos de América (Gómez-Dantés *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016; Ghazarian *et al.*, 2017).

México carece de información precisa sobre la incidencia nacional del cáncer de testículo, pero existen algunos trabajos sobre su prevalencia en el país. En un estudio efectuado entre 1985 y 1994 por el Instituto Nacional de Cancerología, se identificaron 28,581 pacientes con confirmación histológica de cáncer, de los cuales 8,984 (31%) fueron casos reportados en hombres, en donde los tumores más frecuentes fueron los de testículo (8.3%), seguidos por los de pulmón (7.4%), linfoma de Hodgkin (7.1%) y el cáncer de próstata (5.5%). Otro estudio realizado en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, entre los años 2005 y 2012, se reportó una frecuencia de 29,863(40.1%) casos de cáncer en hombres, de los cuales el cáncer de próstata representó el tipo de tumor más frecuente con 12.3%, seguido del cáncer de colon y recto (8.7%), cáncer de piel (6.0%) y el cáncer testicular con el 5.6%. De los 907 casos de muerte en hombres por causa de cáncer reportados en ese trabajo, el cáncer de colon representó el 14.2% de los casos, seguido del cáncer de testículo (8.0%), el de estómago (6.5%), de pulmón (5.0%) y de próstata (2.4%) (Martínez-Sánchez *et al.*, 2013).

Las causas que originan el cáncer testicular, así como las que provocan el aumento en su incidencia aún no están bien esclarecidas. Sin embargo, el factor de riesgo identificado con mayor frecuencia asociado con el cáncer testicular es la criptorquidia, padecimiento en donde uno o ambos testículos permanecen en la cavidad abdominal sin descender hacia el escroto de forma normal. Se ha reportado que esta alteración puede aumentar cinco veces más el riesgo de desarrollar cáncer testicular (Smith *et al.*, 2016; Giannandrea y Fagnoli, 2017).

Por otra parte, se ha estimado que los hermanos de los pacientes con cáncer testicular, tienen 10 veces más riesgo para desarrollar esta enfermedad, mientras que los padres o hijos tienen de cuatro a seis veces el riesgo de padecerla. Además, se ha sugerido que otros factores de riesgo como son las infecciones por Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), el aumento de las concentraciones endógenas de estrógenos durante el embarazo, la exposición prenatal o postnatal a varias sustancias estrogénicas ocupacionales y medioambientales como, los productos químicos que alteran el sistema endócrino, así como, el tabaquismo y el consumo de cannabinoides, podrían ser los principales responsables de la etiología de esta enfermedad, sin embargo, esta teoría sigue en discusión (Gurney *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016; Giannandrea y Fagnoli, 2017).

2.5. CARCINÓGENOS DE ORIGEN NATURAL

Existe evidencia experimental de diferentes sustancias de origen natural que tienen efectos de carcinogenicidad y mutagenicidad, a continuación, se describen algunos de estos compuestos.

La aflatoxina, una micotoxina que se produce en los granos y otros productos alimenticios, es carcinogénica en diferentes especies de animales, como: ratones, ratas, truchas, patos y monos, con efectos dosis respuesta. Principalmente se ha implicado en el cáncer de hígado (Newberne *et al.*, 1979).

Derivados de hidracina de los hongos *Agaricus bisporus* y *Gyromitra esculenta*, los cuales se consumen en todo el mundo, podrían tener efectos cancerígenos en ratones y en hámster y son mutagénicos en bacterias. Sin embargo, aún no se ha podido determinar en los seres humanos (Toth y Patil, 1979; Toth *et al.*, 1981).

Varios alcaloides de pirrolizidina, por ejemplo, monocrotalina, son carcinógenos en animales y mutagénicos en varios sistemas de pruebas. Las ratas que fueron alimentadas con una planta llamada “pie de gallina” que contiene estos alcaloides desarrollaron tumores (Hirono *et al.*, 1979).

Constituyentes de las plantas, como las metilxantinas, la tiourea, los taninos, la cumarina, el ácido parasorbico, el safrol, el estragol y el eugenol, así como, los estrógenos de las plantas como la zearalenona, son cancerígenos en animales de laboratorio y mutagénicos en sistemas celulares bacterianos o de mamíferos (Consejo nacional de investigación (US) Comité de Dieta, Nutrición y Cáncer, 1982).

Recientemente en el trabajo de tesis realizado por Marisel Sánchez, en el laboratorio de Biología de la Reproducción, del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social HGZ No. 5, se observó que la administración diaria durante 4 días consecutivos de extracto acuoso de una planta llamada *Echeveria gibbiflora*, en una dosis de 100mg/kg por vía

intraperitoneal, puede inducir pequeñas tumoraciones en hígado, vaso e intestino, en ratones CD1 de 5 semanas de edad (Datos no publicados).

A raíz de los resultados obtenidos en la tesis de Marisel Sanchez, realizamos ensayos en ratones machos CD1 de 5 semanas de edad, administrando la misma dosis (100mg/kg) de extracto acuoso de la planta, durante 4 días consecutivos mediante vía intraescrotal. En los resultados obtenidos, observamos una estimulación de la proliferación de las células testiculares, principalmente en las células del compartimento intersticial, evidenciado por la expresión del marcador de proliferación Ki-67 mediante inmunofluorescencia. Estos cambios se presentaron a partir de 9 días después de la última administración del extracto. Por lo tanto, sugerimos que la administración del extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* (EaEg) por vía intraescrotal, se podría utilizar para generar modelos de proliferación de células testiculares en ratones CD1 (Datos no publicados [Germán León López *et al.*, 2019]).

2.6. *Echeveria gibbiflora*

Es una roseta suculenta perenne que pertenece a la familia *Crassulaceae*. Presenta tallos simples o ramificados, gruesos hasta de 1 m de alto (A veces en sitios sombreados) que junto con la inflorescencia de aproximadamente el mismo largo pueden alcanzar un total de 2 m. Presenta 14 - 20 hojas formando una roseta en el extremo, glaucas tendiendo a enrojecerse sobre todo en la superficie, ovaladas u oblongas-espatuladas, con el envés aquillado, has cóncavo de 12 - 30 cm de largo por 7 - 15 cm de ancho, ápice triangular o escotado, pedúnculo floral con hojas semejantes a las de la roseta pero más reducida. El eje de la inflorescencia mide más de 60 cm de largo, la inflorescencia paniculada es de color rojo-amarillo y a veces pruinosos, sépalos desiguales lanceoladas de 7 mm a 1.5 cm de largo, corola de 12-14 mm de largo con el tubo corto, lóbulos lanceolados, aquillado embonados en la basé, semillas largamente oblongas de 0.75 mm de largo. Es conocida popularmente como "Oreja de burro" y sus registros se encuentran en México y Sudamérica (Olivia, 1993).

Se ha utilizado como planta ornamental, pero también se ha utilizado en la Medicina Tradicional Mexicana, como método anticonceptivo mediante lavados vaginales después del coito (Reyes *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 1999). Se ha observado que, el EaEg tiene efectos sobre la motilidad y la aglutinación en los espermatozoides de algunas especies de mamíferos. Una fracción purificada de *Echeveria gibbiflora*, produce un efecto tipo hipotónico en los espermatozoides de cobayo. Principalmente se observa una distención de la membrana plasmática sobre la región del acrosoma, produciéndose la formación de una enorme burbuja en la cabeza. Además, se reporta un efecto de aglutinación intensa e inmovilización instantánea en los espermatozoides (Delgado *et al.*, 1999).

En espermatozoides de ratón, la administración de EaEg de manera *in vitro*, tiene efectos negativos en la capacitación, la reacción acrosomal y la concentración de calcio intracelular, pero no en la vitalidad espermática. Por otra parte, cuando se administra una dosis de 100-200mg/kg de EaEg por vía intraperitoneal durante 7

días en ratones adultos CD1, el porcentaje de motilidad espermática disminuye de manera estadísticamente significativa (Cordero-Martínez *et al.*, 2016).

A pesar de que se ha propuesto al extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora*, como método anticonceptivo de baja toxicidad, trabajos realizados por Olivia (1993), demostraron que la administración durante 30 días con 2.5mL de EaEg por vía oral en ratones Balb/c, produjo un incremento de micronúcleos en células sanguíneas, estadísticamente significativo con respecto al control. Estos datos sugieren posibles efectos genotóxicos del EaEg.

3. ANTECEDENTES

Existen evidencias que sugieren que los órganos en donde comúnmente se desarrolla cáncer, pueden tener una relación con la actividad de las fibras nerviosas que los están inervando. La función que desempeña cada una de las diferentes fibras (simpáticas, parasimpáticas y sensoriales) presentes en los nervios que ingresan a los órganos, pueden variar dependiendo del tipo de cáncer y del órgano afectado.

Se ha considerado que al menos tres factores biológicos básicos contribuyen al inicio y la progresión de la tumorigénesis; 1) el estrés oxidativo, que conduce al daño del ADN; 2) la inflamación, que contribuye a escapar de la apoptosis; y 3) la actividad simpática excesiva, que afecta el lugar donde las células cancerosas harán metástasis. Se ha propuesto que el nervio vago es un factor común que puede inhibir a los tres factores biológicos básicos, involucrados con el inicio y progresión de la tumorigénesis (De Couck *et al.*, 2018).

Erin *et al.* (2008), observaron que la vagotomía unilateral (derecha o izquierda) previa a la inyección de células metastásicas de corazón, provenientes de un carcinoma mamario (4THMpc), aumenta la metástasis a pulmón, corazón, hígado y riñón, en ratones Balb/c, 27-30 días después de la inyección de células 4THMpc. En el corazón la metástasis aumentó solo después de la vagotomía izquierda. Además, la vagotomía real aumentó los niveles de SP, mientras que la operación simulada disminuye los niveles de SP en el pulmón. Estos resultados proporcionan evidencia de que la actividad del nervio vago puede proteger contra la enfermedad metastásica.

Para evaluar los efectos de la inervación autónoma en el crecimiento de tumores en mama, Kamiya *et al.* (2019), desarrollaron técnicas genéticas para manipular la inervación autónoma de manera específica de tipo tumor y fibra, en ratones con xenoinjertos de cáncer de mama humano y en ratas con tumores de mama inducidos químicamente. Encontraron que, después de la estimulación de los nervios simpáticos en los tumores, el crecimiento y la progresión del cáncer de

mama se aceleran, pero se reducen estos efectos después de la estimulación de los nervios parasimpáticos. La denervación simpática específica del tumor, suprimió el crecimiento tumoral y reguló de forma negativa la expresión de moléculas de punto de control inmunitario (muerte programada 1 [PD-1], ligando de muerte programada 1 [PD-L 1] y FOXP3) en mayor medida, en comparación con el bloqueo farmacológico de los receptores β -adrenérgicos. En contraste la simulación inducida genéticamente de la inervación parasimpática de tumores, disminuyó la expresión de PD-1 y OD-L 1.

Además en humanos, mediante un análisis retrospectivo de muestras de cáncer de mama de 29 pacientes, se reveló que el aumento de la densidad nerviosa simpática y parasimpática en los tumores, se asoció con resultados clínicos malos y se correlacionó con una mayor expresión de las moléculas del punto de control inmunitario. Con estos hallazgos se sugiere que la inervación autónoma participa en la regulación de la progresión del cáncer de mama (Kamiya *et al.*, 2019).

En el carcinoma hepatocelular (CHC), también se ha evidenciado el papel regulatorio del sistema nervioso autónomo. Zhang *et al.* (2017), mostraron que el tejido de CHC está inervado por fibras simpáticas y parasimpáticas, y que la densidad de estas fibras está asociada a un mal pronóstico de los pacientes. Además, informaron que los receptores adrenérgicos β_2 y los receptores colinérgicos α_7 , M1 y M3, se expresan tanto en células primarias como en líneas celulares de hepatoma, lo que indica que estos receptores pueden desempeñar funciones esenciales en la regulación de CHC, desencadenado por el sistema nervioso autónomo.

En otro estudio, se realizó un análisis patológico retrospectivo y cuantificación de la densidad de fibras nerviosas simpáticas, en pacientes con CHC y se realizó hepatocarcinogénesis inducida con dietilnitrosamina en ratas. Los datos obtenidos mostraron una alta densidad de fibras nerviosas simpáticas y receptores adrenérgicos α_1 , en las células de Kupffer, y se asoció con un mal pronóstico de CHC. La denervación simpática o el bloqueo de α_1 -AR, disminuyó la incidencia de

CHC inducida con dietilnitrosamina. Además, se observaron efectos sinérgicos de la interleucina-6 (IL-6) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en la hepatocarcinogénesis. La supresión del sistema nervioso simpático, redujo la expresión de IL-6 y TGF- β , que suprimió la hepatocarcinogénesis. Se sugiere que las células de Kupffer juegan un papel importante en estos procesos, debido a que después de la ablación de las células de Kupffer, se inhibió la expresión de IL-6 y TGF- β y el desarrollo de CHC. En este trabajo se indica que, la inervación simpática es importante para la hepatocarcinogénesis, que se promueve mediante la activación de α 1-AR de las células de Kupffer, dando como resultado el mantenimiento de un microambiente inflamatorio, que es uno de los factores relacionados con la aparición del CHC (Huan *et al.*, 2017).

Por otra parte, en un modelo de ratones macho C57BL/6J simpatectomizados mediante una inyección intraperitoneal de neurotoxina 6-hidroxidopamina, que después de 7 días recibieron una inyección de células de melanoma B16-F10. Se encontró que la simpatectomía, retrasó el desarrollo de los tumores palpables a los 20 días después de la inyección de células de melanoma. Sin embargo, a pesar de que se prolongó significativamente la supervivencia de los ratones portadores de tumor, después de los 20 días el peso del melanoma desarrollado aumentó significativamente en los ratones simpatectomizados, en comparación con los animales intactos. Los autores de este trabajo sugieren, que estos hallazgos contraintuitivos pueden indicar que, las intervenciones que afectan el sistema nervioso simpático, pueden ejercer efectos complejos sobre la progresión del tumor (Horvathova *et al.*, 2016; Horvathova *et al.*, 2016b).

La función de los nervios en el desarrollo de cáncer de próstata, se ha reportado en ratas. Coarfa *et al.* (2018), denervaron la próstata de ratas química (Botox) y físicamente, antes de implantar ortotópicamente células cancerosas de próstata de humano. La denervación bilateral resultó en una reducción de la incidencia y el tamaño del tumor en ratones. Además, se exhibió un perfil genético característico, que indica la traducción y el paro bioenergético. Los autores concluyen que los

nervios juegan un papel en la homeostasis de los tejidos epiteliales normales y están involucrados en la supervivencia del tumor de cáncer de próstata.

Por otra parte, las fibras sensoriales que también se encuentran formando parte de los nervios que ingresan a los diferentes órganos. De igual forma están involucrados de manera importante en el desarrollo de tumores cancerígenos.

Saloman *et al.* (2016), demostraron que en ratones denervados sensorialmente al nacimiento, mediante la administración de capsaicina (50mg/kg de peso corporal), presentaron un retraso en la formación de neoplasias pancreáticas intraepiteliales inducidas y un aumento en la edad de supervivencia, en comparación a los ratones con neoplasias pancreáticas inducidas y que tenían la inervación sensorial intacta.

Los trabajos realizados por Peterson *et al.* (2015), demostraron que en el ratón de 7.5 semanas de edad con carcinoma basocelular, la sección de los nervios cutáneos suprime la tumorigénesis. Interesantemente, este efecto fue mayor en los epitelios de la cúpula táctil, quienes presentan una inervación sensorial mayor y que son altamente tumorigénicos. Los autores sugieren que los nervios sensoriales podrían estar activando la señalización de Hedgehog, un factor importante que promueve el desarrollo del carcinoma basocelular.

Por el contrario, el grupo de Erin *et al.* (2004), mostró que en ratones adultos la denervación sensorial realizada por la administración de capsaicina (125 mg/kg PC s.c.), previa a la inyección de células de carcinoma mamario 4T1 en la glándula mamaria, provocó un incremento significativo de la metástasis en el pulmón y corazón. Este efecto se revirtió cuando la inervación sensorial se recuperó. Cabe resaltar que la denervación con capsaicina a una dosis de 125 mg/kg en adulto, es reversible a diferencia de lo que sucede cuando la denervación sensorial se realiza en ratones recién nacidos. Lo que nos permite sugerir que en el desarrollo del cáncer mamario la inervación sensorial tendría un rol inhibitorio en los mecanismos involucrados en la metástasis.

4. JUSTIFICACIÓN

Existen evidencias que permiten sugerir que la inervación sensorial, es un factor a considerar dentro los mecanismos (proliferación celular, tumorigénesis y metástasis) involucrados en el desarrollo de algunos tipos de cáncer. Estas evidencias muestran un rol diferente de la inervación sensorial dependiendo del tipo de cáncer y del propio órgano afectado (Erin *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2015; Saloman *et al.*, 2016). Se sabe que la inervación sensorial participa de manera estimuladora en la regulación de la espermatogénesis (Hernández, 2014; León-López G *et al.*, 2017). Sin embargo, no existe algún trabajo realizado sobre el papel de la inervación sensorial en la proliferación anormal de células testiculares. Por lo que este trabajo contribuirá a generar más información sobre otras posibles vías involucradas en la proliferación de células testiculares. Además, la información obtenida en este trabajo, podría utilizarse en un futuro para generar prácticas de prevención, así como alternativas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la proliferación celular incontrolada, característica principal de varios tipos de cáncer incluyendo el cáncer testicular.

5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

El bloqueo de la inervación sensorial inhibe la proliferación anormal en células testiculares inducida por la administración de extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* en un modelo murino.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Analizar los efectos del bloqueo de la inervación sensorial en la proliferación de células testiculares, inducida por la administración de extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* en un modelo murino.

6.2. Objetivos particulares

Determinar los efectos del bloqueo de la inervación sensorial después de la inducción de proliferación de células testiculares sobre:

- a) La motilidad, viabilidad y concentración de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo.
- b) La fragmentación de ADN, mediante la técnica de COMETA.
- c) La morfometría de los túbulos seminíferos.
- d) La proliferación celular mediante la expresión del marcador KI-67.
- e) La expresión de fibras inmunorreactivas a CGRP.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Lugar donde se desarrolló el proyecto

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Biología de la Reproducción, en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social HGZ No. 5. Ubicado en Km 4.5 carretera federal Atlixco-Metepec C.P. 74360 Metepec, Puebla, México. De igual manera en el Laboratorio de Biología de la Reproducción y el Laboratorio de Histofisiología, ambos ubicados en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

7.2. Diseño experimental y procedimiento

En el siguiente trabajo se utilizaron 24 ratones CD1 de 35 días de edad que se dividieron en 4 grupos iguales. Los primeros dos grupos denominados como, inducción de proliferación celular (IPC) e inducción de proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps), fueron inducidos a proliferación de células testiculares mediante la administración de extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* (EaEg), a una dosis de 100mg/kg de peso corporal por vía intraescrotal, durante 4 días continuos. Después de la última administración de EaEg se dejó recuperar a los animales durante 10 días, al décimo día al grupo de ratones IPC+Caps, se le bloqueó la función de las fibras sensoriales (denervación sensorial) mediante la administración de capsaicina (se disolvió en tween-80 [10%], etanol [10%] y agua esteril [80%]), a una dosis de 125mg/kg de peso corporal dividida en dos dosis. La primera dosis fue de 50mg/kg y 24 horas después se administró la segunda dosis que fue de 75mg/kg por vía subcutánea. Al grupo IPC se le administró vehículo de capsaicina (tween-80 [10%], etanol [10%] y agua estéril [80%]), siguiendo un procedimiento similar que el grupo IPC+Caps. Los animales fueron anestesiados con ketamina/xilazina (80mg/kg;15mg/kg i.m) y justo antes de administrar la capsaicina o vehículo de capsaicina se inyectó atropina a una dosis de 5mg/kg por vía intraperitoneal. Un tercer grupo de ratones denominado control de solución

salina (CSS), fue anestesiado y administrado con solución salina al 0.9% por vía intraescrotal, durante 4 días seguidos. El último grupo denominado control intacto (CI), no se le realizó ningún procedimiento, los ratones solo se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*. Todos los animales, fueron sacrificados al término de 35 días después de la última administración de capsaicina y se recuperaron testículos y epidídimos para su posterior análisis.

Criterios de inclusión

- Ratones machos en buen estado de salud.
- En el caso de los grupos con denervación sensorial, animales que presenten signos de denervación sensorial, como son; pérdida del brillo en los ojos y alteraciones en la micción.

Criterios de exclusión

- Ratones administrados con capsaicina que no presenten signos de denervación sensorial.
- Ratones en mal estado de salud.

7.3. PROCEDIMIENTOS

7.3.1. Inducción de proliferación de células testiculares con extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora*

Los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina a una dosis de 0.10ml/10grs. Una vez que el anestésico generó su efecto, se administró EaEg (100mg de *Echeveria gibbiflora* en 1 ml de agua desmineralizada) por vía intraescrotal en una dosis de 100mg/Kg de PC. La administración de EaEg se realizó diario durante 4 días consecutivos. Se realizó un procedimiento similar para el grupo CSS, lo único que cambió fue la inyección intraescrotal de EaEg por una inyección intraescrotal

de solución salina al 0.9%. Al grupo designado como CI no se le realizó ningún procedimiento.

7.3.2. Análisis espermático

Se diseccionó el epidídimo, recuperando solamente la cola unida al conducto deferente. Posteriormente se perfundió la cola del epidídimo, inyectando por el conducto deferente 1 ml de medio Storey, las soluciones celulares obtenidas se mantuvieron a una temperatura de 37 ° C. Para la motilidad espermática se tomó una alícuota de 10µl de la solución celular y se observó en el microscopio óptico, utilizando el objetivo de 40x. Se contó el número de espermatozoides con motilidad progresiva rápida, motilidad *in situ* y espermatozoides sin movimiento, para posteriormente obtener los porcentajes por muestra. Para el análisis de vitalidad espermática se llevó a cabo una tinción vital, utilizando SYBR14 e ioduro de propidio. Para ello se tomaron 5µl de SYBR14, 5µl de ioduro de propidio y 10 µl de solución de espermatozoides. Se realizó una preparación con 10µl de la mezcla y se observó en microscopia de fluorescencia utilizando el objetivo de 40x. Se obtuvieron los porcentajes de los espermatozoides tomando en cuenta los siguientes aspectos; aquellos espermatozoides que presentaron fluorescencia verde brillante se consideraron como vitales, mientras que los espermatozoides que presentaron fluorescencia roja se consideraron como no vitales. La determinación de la concentración de espermatozoides se llevó a cabo utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

7.3.3. Fragmentación de ADN en espermatozoides (prueba COMETA)

Se preparó agarosa al 4 % y se formó una capa en un portaobjetos de 75x25mm, se dejó reposar en cámara húmeda hasta que solidificara el gel. Posteriormente se preparó agarosa al 3% y se hizo una mezcla con 250µl de muestra de espermatozoides y 750 µl de agarosa al 3%. Se agregó una alícuota de la mezcla sobre el gel de agarosa al 4 % previamente montado en el portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y se mantuvo en cámara húmeda con hielo. Se retiró el cubreobjetos y se agregó buffer de lisis con DTT 10mM y se incubó durante 45

minutos, las muestras se lavaron do veces con Tris. Posteriormente se realizó una electroforesis a 50 Volts y 300 miliamperes durante 15 minutos, utilizando TAE 1x como medio. Al término de la electroforesis las muestras se lavaron tres veces con tris. Finalmente, las muestras fueron incubadas con naranja de acridina (1mg/ml diluido 2:500) durante 10 minutos, se lavaron dos veces y se montaron para su observación en el microscopio de fluorescencia.

Se contaron 200 células en diferentes campos por muestra tomando en cuenta lo siguiente: aquellos espermatozoides que presentaban un barrido de ADN del núcleo del espermatozoide parecido a un cometa, se consideraron como espermatozoides fragmentados, mientras que aquellos espermatozoides que mantenían bien delimitada el área de la cabeza sin barridos de ADN, se consideraron como espermatozoides no fragmentados. Los resultados se expresaron en porcentajes.

7.3.4. Análisis histológico de testículo

Los testículos se fijaron en formalina tamponada. Posteriormente se deshidrataron mediante cambios de alcohol y cloroformo realizados en el siguiente orden: alcohol 70% (72 hrs.), alcohol 96% (12 hrs.), alcohol 100% (12 hrs.), cloroformo (12 hrs.), cloroformo (2 hrs.). Una vez deshidratados los órganos se incluyeron en parafina durante 2 hrs. a 60° C. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 10µm de espesor con ayuda de un micrótopo manual (modelo: erma Tokyo). Se utilizó la tinción Hematoxilina-Eosina la cual consistió en lo siguiente: se desparafinaron los cortes en una cámara de formol durante 24 horas y posteriormente se pasaron al tren de tinción de Hematoxilina-Eosina que se realizó en el siguiente orden: Xilol (dos cambios de 1.5 min c/u), alcohol 100% (1.5 min), alcohol 96% (1.5 min), agua destilada (1.5 min), hematoxilina de Mayer (1.5 min), agua (tres cambios de 5 min c/u), eosina (15 seg), alcohol 96% (1.5 min), alcohol 100% (1.5 min), carbol-xiol (1.5 min), xilol (1.5 min). Al término de la tinción, los cortes histológicos se cubrieron con resina sintética, se dejaron secar 24 horas y

posteriormente se analizaron mediante un microscopio invertido, equipado con un sistema de captura DS-F13 y análisis de imágenes L4 by Nikon.

7.3.5. Análisis morfométrico de los túbulos seminíferos

Se eligieron laminillas de dos ratones por cada grupo. Se seleccionaron los cortes en mejor estado y se realizó lo siguiente:

- Por cada corte seleccionado se tomaron microfotografías, mediante un microscopio invertido equipado con un sistema de captura DS-F13 y análisis de imágenes L4 by Nikon.
- Se tomó una microfotografía a cada túbulo seminífero de todo el corte. Se seleccionaron solo los túbulos seminíferos que presentaron una forma circular y que estuvieran completos.
- Se tomaron medidas del área total y del área del lumen en 30 túbulos seminíferos por cada grupo. Se utilizó la función “área” incluida en el analizador de imágenes L4 by Nikon, para llevar a cabo las mediciones. Finalmente se calculó el área del epitelio germinal, restando el área del lumen al área total del túbulo seminífero.

7.3.6. Inmunofluorescencia para proliferación celular (Ki67) y CGRP

Se cortaron secciones de testículo de 6 μm de espesor y se montaron en porta objetos cubiertos con Poly-L-lysina. Los cortes se desparafinaron en estufa de secado a 74° C durante 60 minutos, posteriormente se sumergieron en xileno durante 20 minutos y se hidrataron con una serie de etanol-agua en el siguiente orden: alcohol 100% (10 min), alcohol 90% (5 min), alcohol 70% (5 min), agua destilada (4 min). La recuperación del antígeno se realizó incubando las laminillas en buffer citrato de sodio durante 15 minutos a 94° C. Se lavaron las muestras con agua desmineralizada durante 4 minutos y se agregó PBS/Tritón al 0.25% durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron las muestras con PBS y se agregó BSA-PBST y se dejó incubar por 30 minutos. Enseguida se agregaron los anticuerpos primarios monoclonales de Ki-67 (IgG mouse Ki-67 (8D5) mAb, Cell Signaling

Technology) y CGRP (IgG** CGRP (D5R8F) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology) a una relación de dilución de 1:800 (diluidos en BSA-PBST), y se dejó incubar durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Posteriormente se realizó un lavado con BSA- PBST, se agregaron los anticuerpos secundarios (Goat pAb anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 y Rabbit anti mouse CFL 488) y se incubó durante dos horas a 37° C en cámara húmeda. Después se lavaron las muestras con BSA-PBST, se agregó Hoechst a una concentración de 1:500 y se dejó incubar durante 15 minutos a 37° C. Finalmente se montaron las muestras y se observaron en un microscopio invertido Zeiss Axioobserver, con sistema de iluminación estructurada Apotome 2.0, con filtros de fluorescencia a 230, 488 y 594 nm. Se tomaron fotografías y se realizaron mediciones de la intensidad de fluorescencia, con ayuda del software Zen Black by Zeiss y Zen lite 3.0 (Blue edition) by Zeiss, respectivamente.

7.3.7. Análisis estadístico

Se realizaron ANOVAS de una vía y pruebas de Kruskal-Wallis, para determinar diferencias estadísticamente significativas, entre los cuatro grupos para los diferentes parámetros estudiados. Se utilizó un valor de significancia de $P \leq 0.05$ utilizando el programa R.

7.3.8. Aspectos éticos

Los animales se mantuvieron con acceso libre de alimento y agua, en un ciclo de luz-oscuridad de 14/10 horas. Los procedimientos se realizaron conforme la NOM-062-ZOO 1999, que establece el uso y cuidado de animales de laboratorio.

8. RESULTADOS

Se graficó y comparó el porcentaje de motilidad, vitalidad y la concentración espermática entre testículo izquierdo y testículo derecho y entre grupos.

8.1. Motilidad espermática

Cuando se indujo la proliferación celular mediante la administración de EaEg (IPC), el porcentaje de motilidad espermática disminuyó de manera estadísticamente significativa, en las células recuperadas tanto de testículo izquierdo como testículo derecho, en comparación con las células recuperadas de testículo izquierdo del grupo control que solo recibió la administración de solución salina (CSS).

Algo similar sucedió cuando se indujo la proliferación celular mediante la administración de EaEg y posteriormente se denervó mediante la administración de capsaicina (IPC+Caps), el porcentaje de motilidad espermática disminuyó de manera estadísticamente significativa, en las células recuperadas de testículo derecho, en comparación con el porcentaje de motilidad espermática de las células recuperadas de testículo izquierdo del grupo control que solo recibió la administración de solución salina (CSS) (Fig. 13).

Motilidad espermática

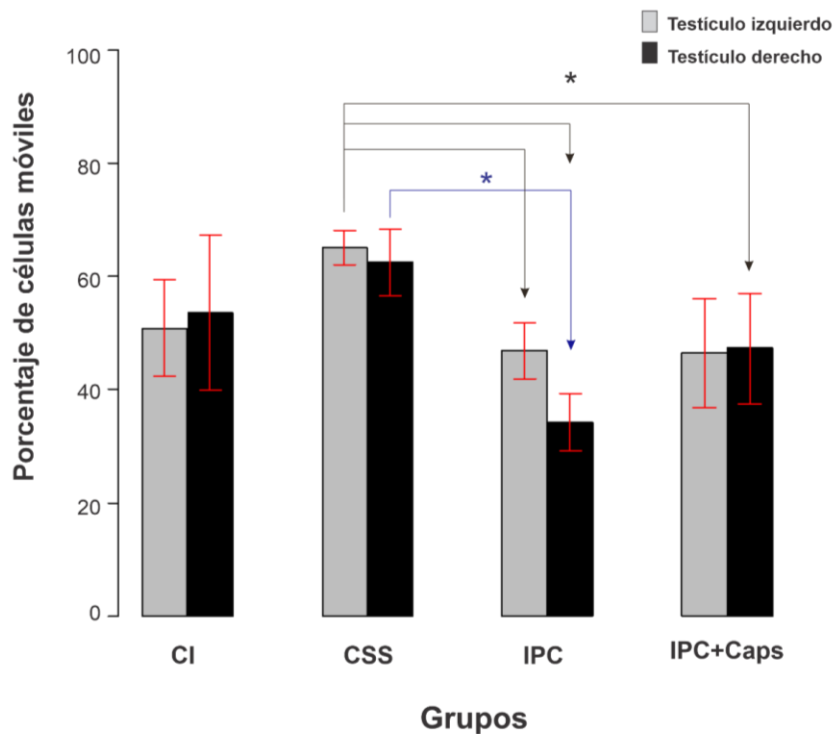


Fig. 13.- Media \pm e.e.m del porcentaje de motilidad espermática de testículo izquierdo y derecho de los grupos: control intacto (CI), control solución salina (CSS), inducción de proliferación celular (IPC) e inducción de proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). Se observa una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de motilidad espermática, en testículo izquierdo y derecho del grupo IPC y en testículo derecho del grupo IPC+Caps, con respecto al testículo izquierdo del grupo CSS (Flechas negras). El porcentaje de motilidad espermática de testículo derecho del grupo IPC, disminuyó de manera significativa en comparación con el testículo derecho del grupo CSS (Flecha azul). El valor de significancia (*) utilizado fue de $p < 0.05$.

8.2. Vitalidad espermática

El porcentaje de vitalidad espermática presenta un patrón similar al porcentaje de motilidad espermática. Cuando se indujo la proliferación celular mediante la administración de EaEg (IPC), el porcentaje de vitalidad espermática disminuyó de manera estadísticamente significativa, en las células recuperadas de testículo derecho, en comparación con el porcentaje de vitalidad de las células recuperadas

de testículo derecho del grupo CSS y el porcentaje de vitalidad espermática de las células recuperadas de testículo izquierdo del grupo IPC+Caps (Fig. 14).

Vitalidad espermática

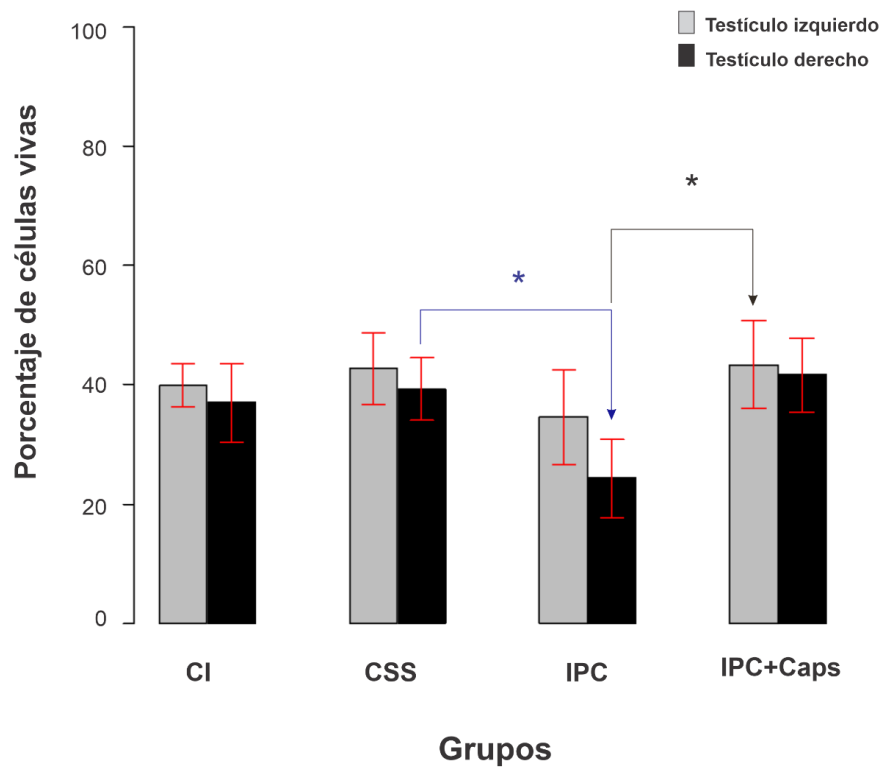


Fig. 14.- Media \pm e.e.m del porcentaje de vitalidad espermática de testículo izquierdo y derecho de los grupos: control intacto (CI), control solución salina (CSS), inducción de proliferación celular (IPC) e inducción de proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). Se observa una disminución significativa del porcentaje de vitalidad en el testículo derecho del grupo IPC, con respecto al testículo derecho de los grupos IPC+Caps (Flecha negra) y CSSS (Flecha azul). El valor de significancia (*) utilizado fue de $p < 0.05$.

8.3. Concentración espermática

Cuando se indujo la proliferación celular mediante la administración de EaEg (IPC), la concentración espermática disminuyó de manera estadísticamente significativa, en las muestras recuperadas tanto de testículo izquierdo como

testículo derecho, en comparación con la concentración espermática en las muestras recuperadas de ambos testículos, del grupo control que solo recibió la administración de solución salina (CSS) y el grupo control que no se le administró ninguna sustancia (CI).

Se observó una tendencia similar cuando se indujo la proliferación celular en el testículo mediante la administración de EaEg y posteriormente se denervó mediante la administración de capsaicina (IPC+Caps), la concentración espermática de las muestras recuperadas de testículo izquierdo, disminuyó de manera estadísticamente significativa, en comparación con la concentración espermática de las muestras recuperadas de ambos testículos, del grupo que solo recibió la administración de solución salina (CSS) y el grupo control que no se le administró ninguna sustancia (CI). Sin embargo, la concentración espermática de las muestras recuperadas de testículo derecho, solo fue diferente de manera estadísticamente significativa, en comparación con la concentración espermática de las muestras recuperadas de ambos testículos del grupo que se le administró solución salina (CSS) (Fig. 15).

Concentración espermática

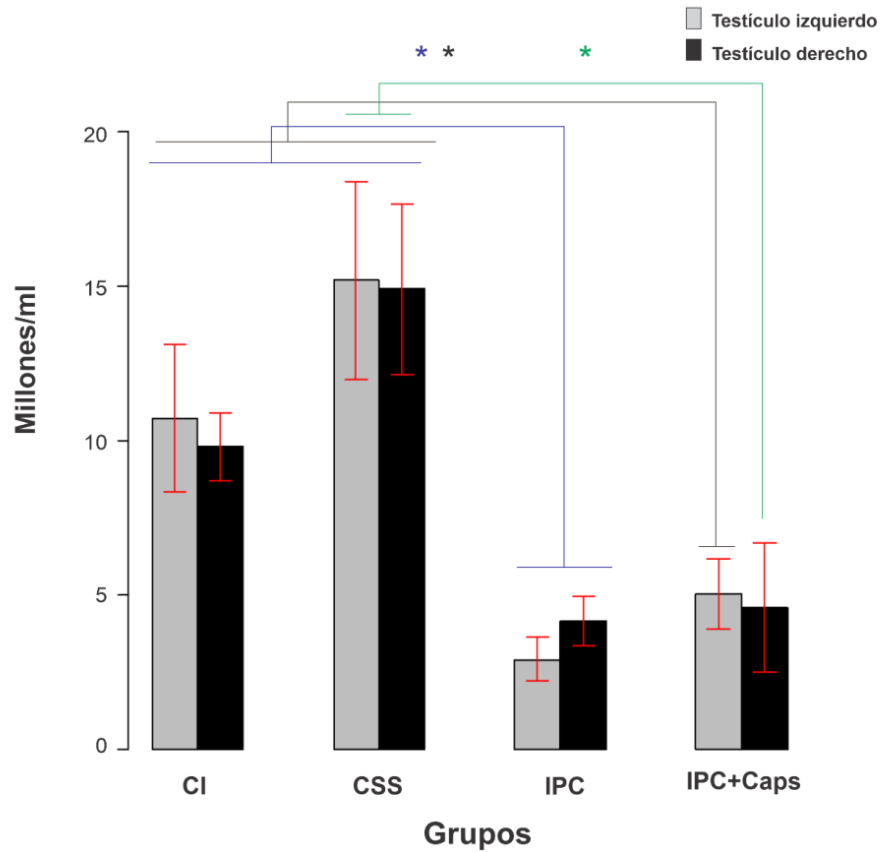


Fig. 15.- Media \pm e.e.m de la concentración espermática de testículo izquierdo y derecho de los grupos: control intacto (CI), control solución salina (CSS), inducción de proliferación celular (IPC) e inducción de proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). Se observa una disminución significativa de la concentración espermática, tanto de testículo izquierdo como testículo derecho del grupo IPC en comparación con los grupos CI y CSS (línea azul). La concentración espermática del testículo izquierdo del grupo IPC+Caps, disminuyó de manera significativa en comparación con ambos testículos de los grupos CI y CSS (línea negra). La concentración espermática del testículo derecho del grupo IPC+Caps, disminuyó significativamente en comparación con ambos testículos del grupo CSS (línea verde). El valor de significancia(*) utilizado fue de $p < 0.05$.

8.4. Fragmentación espermática

En los análisis de la prueba COMETA realizada en los espermatozoides recuperados tanto de testículo izquierdo como de testículo derecho, no se observó la dispersión de fragmentos de ADN en todas las muestras analizadas. Por lo tanto, el porcentaje de fragmentación de ADN para todos los grupos fue de 0% (Fig.16).

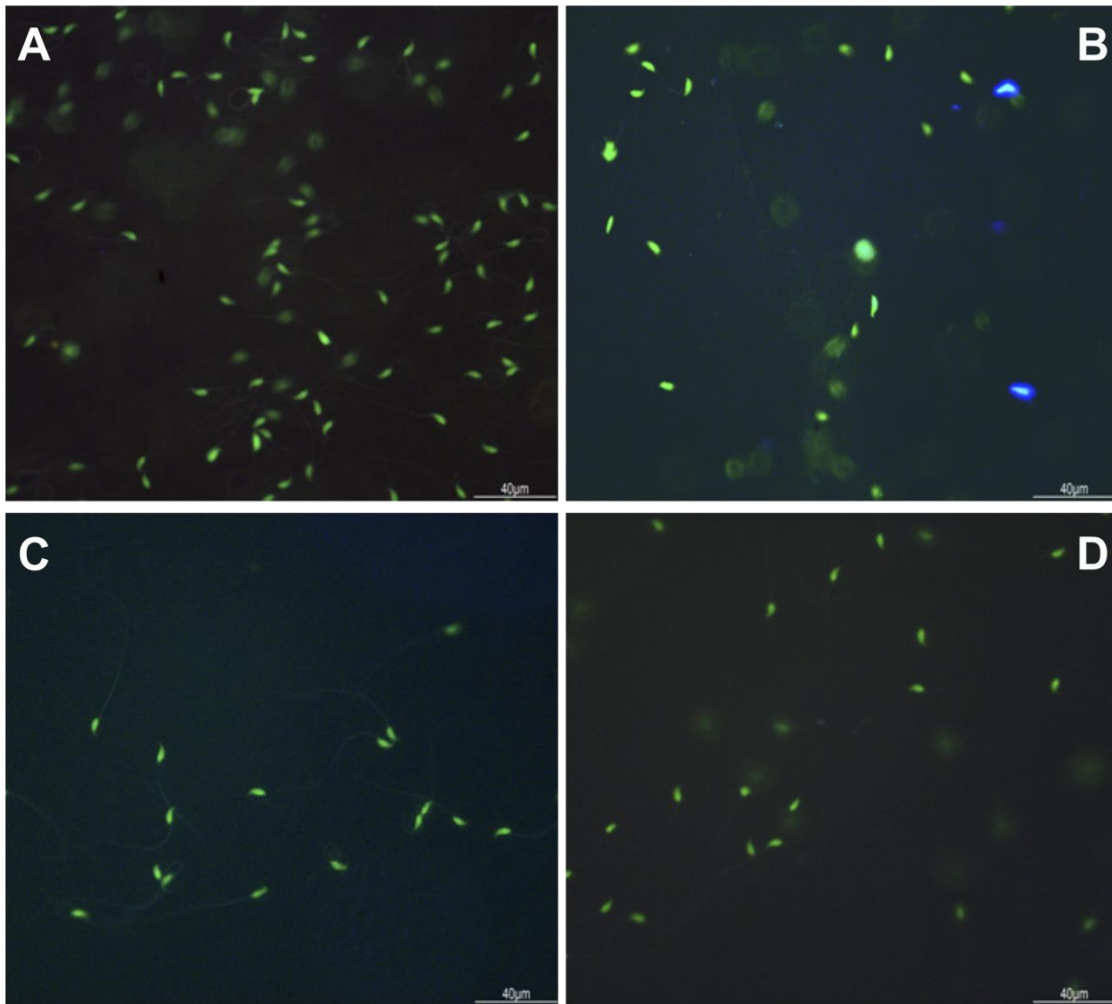


Fig. 16.- Microfotografías de espermatozoides de ratón, después del procedimiento de la prueba COMETA, que se utilizó para evidenciar ADN espermático fragmentado. No se observó dispersión de fragmentos de ADN, después de realizar la electroforesis en los espermatozoides de todos los grupos. Control intacto(A), control solución salina (B), inducción de proliferación celular (C) e inducción de proliferación celular + capsaicina (D). Tinción con naranja de acridina y microscopia de fluorescencia (20X).

8.5. *Análisis histológico de testículo*

En los cortes histológicos de testículo del grupo control que solo recibió solución salina (CSS) y el grupo control que no se le administró ninguna sustancia (CI), se observó una distribución ordenada de las células del epitelio germinal, con la presencia de Sps cercanas a la lámina basal, células en diferenciación a lo largo del epitelio germinal y células de Sertoli con los citoplasmas extendidos hacia el lumen. El compartimento intersticial se observó con pocas células de Leydig delimitadas por las células mioides peritubulares que estaban rodeando a los túbulos seminíferos (Fig. 17 A y B).

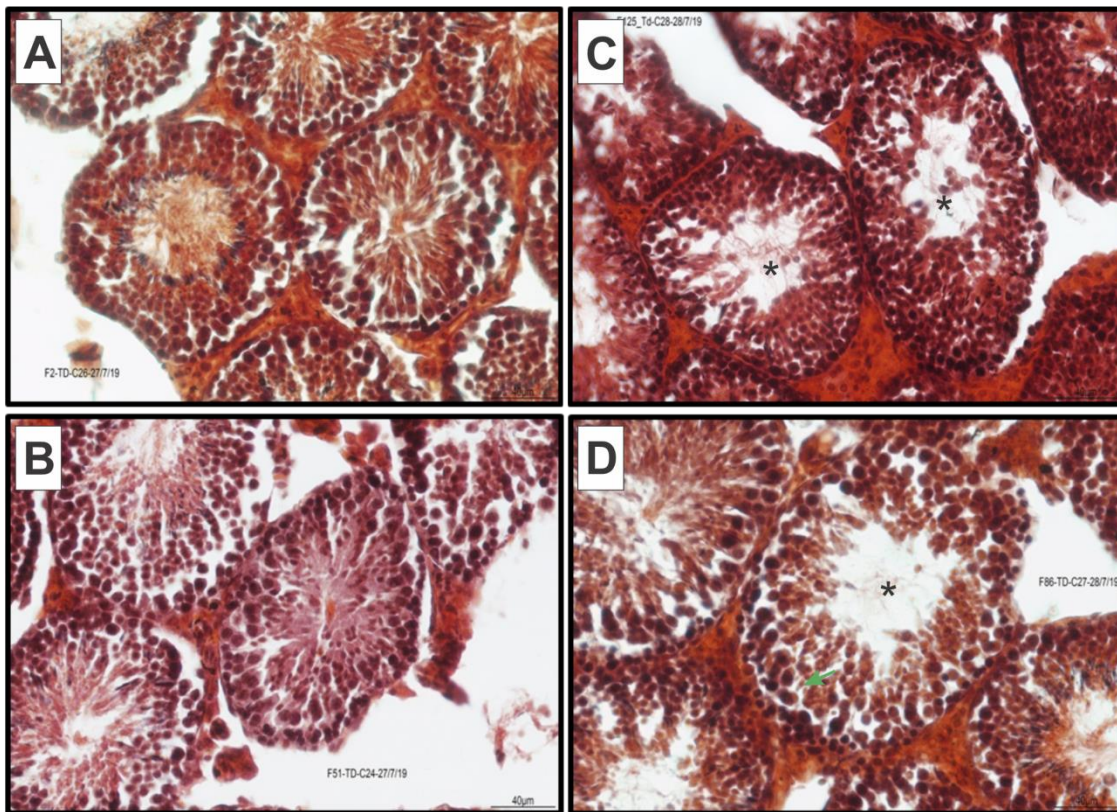


Fig. 17.- Microfotografías de cortes histológicos de testículo de ratón. Los túbulos seminíferos de C y D, muestran una mayor área del lumen en (*) en comparación con A y B. En D se observa desorganización del epitelio germinal y menor cantidad de citoplasma de las células de Sertoli (➔). Control intacto (A), control solución salina (B), inducción de proliferación celular (C) e inducción de proliferación celular + capsaicina (D). Tinción de hematoxilina-eosina y microscopía óptica (20X).

En los cortes histológicos de los testículos del grupo que fue inducido a proliferación celular, mediante la administración de EaEg (IPC), se observó una mayor cantidad de células dentro de los túbulos seminíferos con una organización desordenada. El citoplasma de las células de Sertoli en algunos túbulos seminíferos, no se observó extendido hacia el lumen, pero si se observó rodeando a las células del epitelio germinal (Fig. 17 C). Además en el lumen de varios túbulos seminíferos, se observó la presencia de conglomerados celulares. Las células que formaban parte de los conglomerados en su mayoría eran células redondas, algunas de ellas con núcleos agrandados, y pocas células con citoplasma amorfo, asociadas con espermátides elongadas. El compartimento intersticial se observó extendido con una gran cantidad de células (Fig. 18 A y B).

En cuanto a los cortes histológicos del grupo que fue inducido a proliferación celular, mediante la administración de EaEg y posteriormente sometido a denervación sensorial mediante la administración de capsaicina (IPC+Caps), se observó una mayor desorganización de las células del epitelio germinal. El citoplasma de las células de Sertoli, no es tan notorio en comparación con los grupos control y el grupo que fue inducido a proliferación celular (Fig. 17 D). En algunos túbulos seminíferos se observó la pérdida de la lámina basal, que delimitaba el compartimento intersticial con el compartimento tubular, además, se observó la posible presencia de algunas células del epitelio germinal en el compartimento intersticial. En el lumen del túbulo seminífero, no se observó la presencia de conglomerados celulares, como fue en el caso del lumen de los túbulos seminíferos del grupo que fue inducido a proliferación celular. Por otra parte el compartimento intersticial también se observó extendido con una mayor cantidad de células (Fig. 18 C y D).

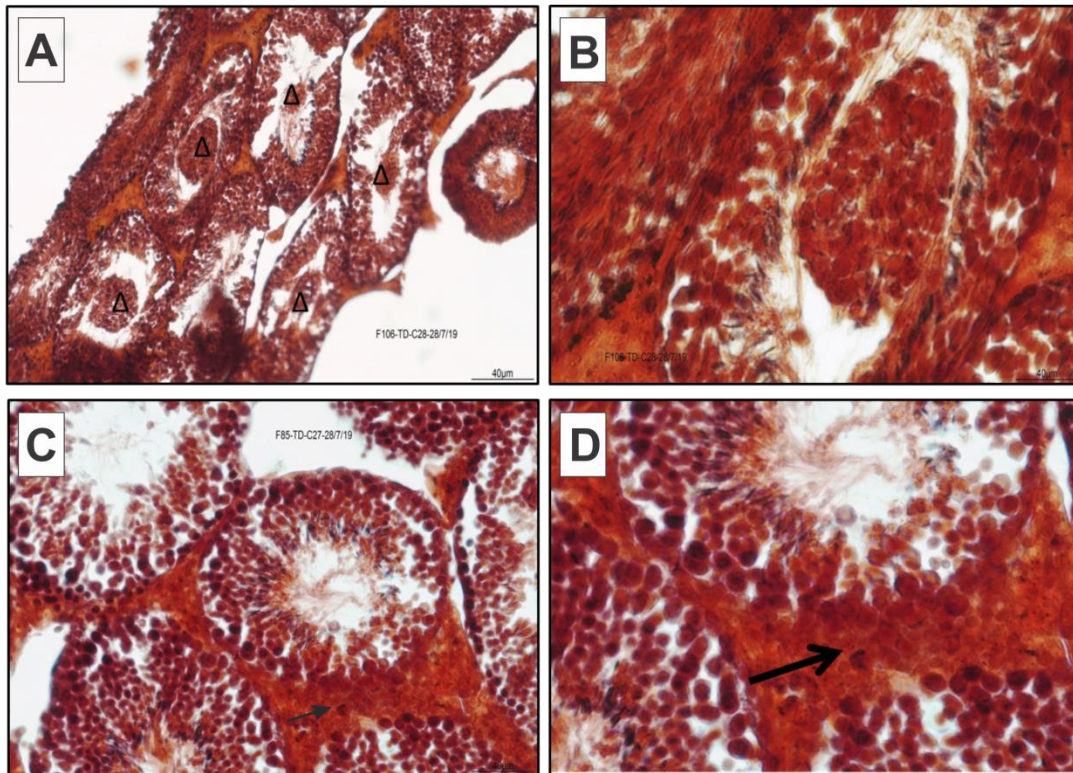


Fig. 18.- Microfotografías de cortes histológicos de testículo de ratón. En la imagen A y B se muestra la formación de conglomerados de células dentro del lumen de los túbulos seminíferos, en el grupo que se indujo a proliferación celular (Δ). En las imágenes C y D se muestra pérdida de la integridad de la lamina basal del túbulo seminífero y la posible migración de las células del epitelio germinal hacia el compartimento intersticial (➤). Tinción de hematoxilina-eosina y microscopia óptica (A y C=20X; B y D= 40X).

8.6. Morfometría de los túbulos seminíferos

Los análisis morfométricos de los túbulos seminíferos, evidenciaron un aumento estadísticamente significativo en el área total de los túbulos seminíferos, del grupo control tratado con solución salina (CSS) y el grupo que fue inducido a proliferación celular mediante la administración EaEg y posteriormente denervado con capsaina (IPC+Caps), en comparación con el control que no se le administro ninguna sustancia (CI) (Fig. 19).

Área del túbulo seminífero

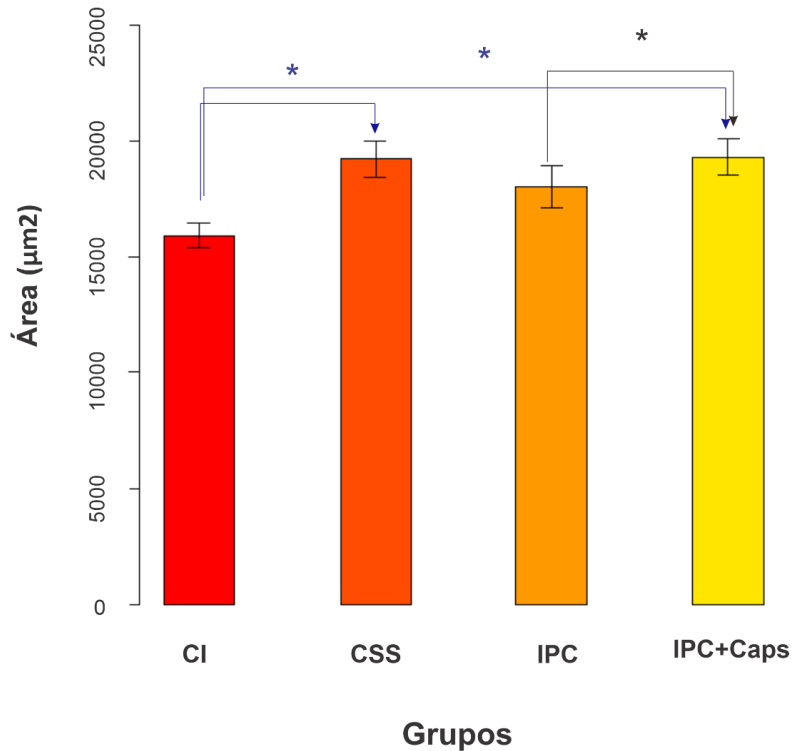


Fig. 19.- Gráfica que representa la media \pm e.e.m, del área de los túbulos seminíferos de los grupos: control intacto (CI), control solución salina (CSS), inducción de proliferación celular (IPC) e inducción de proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). Se observa un aumento significativo en el área del túbulo seminífero en los grupos CSS y IPC+Caps, en comparación con el grupo CI (flechas azules). El área del túbulo seminífero del grupo IPC, disminuyó en comparación con el grupo IPC+Caps (flecha negra), pero no fue diferente de los grupos CI y CSS. El valor de significancia (*) utilizado fue de $p < 0.05$.

El área del epitelio germinal del grupo control que se le administró solución salina (CSS), el grupo que fue inducido a proliferación celular mediante la administración de EaEg (IPC) y el grupo que fue inducido a proliferación celular, mediante la administración de EaEg y posteriormente denervado con capsaicina (IPC+Caps), fue mayor de manera estadísticamente significativa, en comparación con el grupo control que no se le administro ninguna sustancia (CI) (Fig. 20).

Área del epitelio germinal

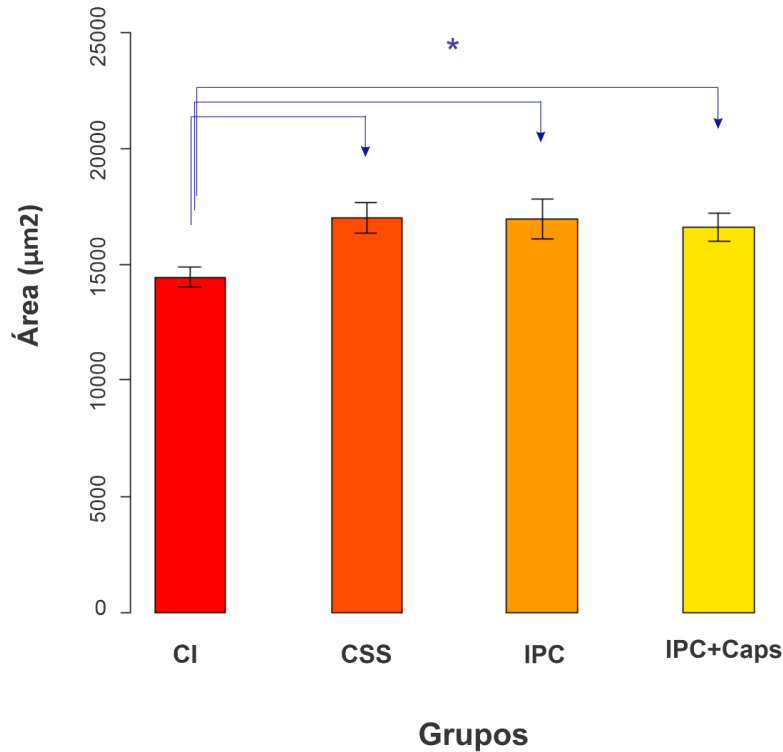


Fig. 20.- Gráfica que representa la media \pm e.e.m, del área del epitelio germinal de los grupos: control intacto (CI), control solución salina (CSS), inducción de proliferación celular (IPC) e inducción de proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). El área el epitelio germinal aumentó de manera significativa en los grupos CSS, IPC e IPC+Caps, en comparación con el grupo CI (flechas azules). El valor de significancia (*) utilizado fue de $p < 0.05$.

El área del lumen del grupo que fue inducido a proliferación celular mediante la administración de EaEg y posteriormente denervado con capsaicina (IPC+Caps), fue mayor en comparación con el grupo que fue inducido a proliferación celular (IPC) y con el grupo control que no se le administró ninguna sustancia (CI). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Fig. 21).

Área del lumen del túbulo seminífero

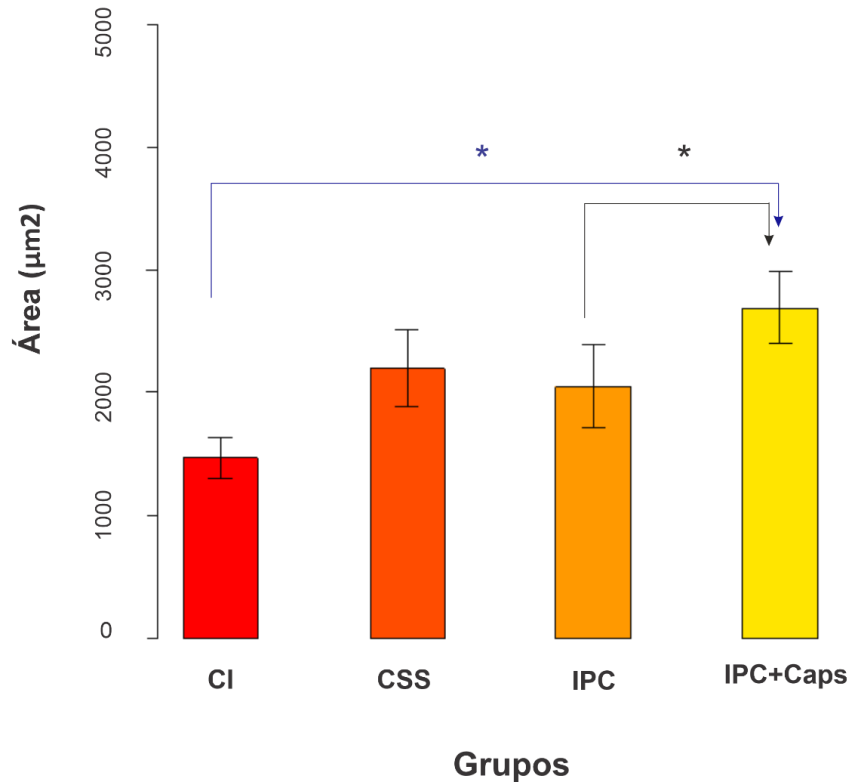


Fig. 21.- Gráfica que representa la media \pm e.e.m, del área del lumen de los túbulos seminíferos de los grupos: control intacto (CI), control solución salina (CSS), inducción de proliferación celular (IPC) e inducción de proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). El área del lumen aumentó de manera significativa en el grupo IPC+Caps, en comparación con los grupos CI e IPC (flechas azul y negra). El valor de significancia (*) utilizado fue de $p < 0.05$.

Al comparar el porcentaje que ocupa el epitelio germinal del área total de los túbulos seminíferos, se observó que el epitelio germinal del grupo que fue inducido a proliferación celular mediante la administración de EaEg (IPC) ocupó el 94.34% del área total del túbulo seminífero, este porcentaje fue mayor que el porcentaje del epitelio germinal de los otros 3 grupos (CI=91.12%; CSS=89.14%; IPC+Caps=86.64%). Además, el porcentaje del epitelio germinal del grupo que fue

inducido a proliferación celular mediante la administración de EaEg y posteriormente denervado con capsaicina (IPC+Caps) fue menor (86.64%), en comparación con el porcentaje del epitelio germinal de los otros tres grupos (CI=91.12%; CSS=89.14%; IPC=94.34%). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Fig. 22).

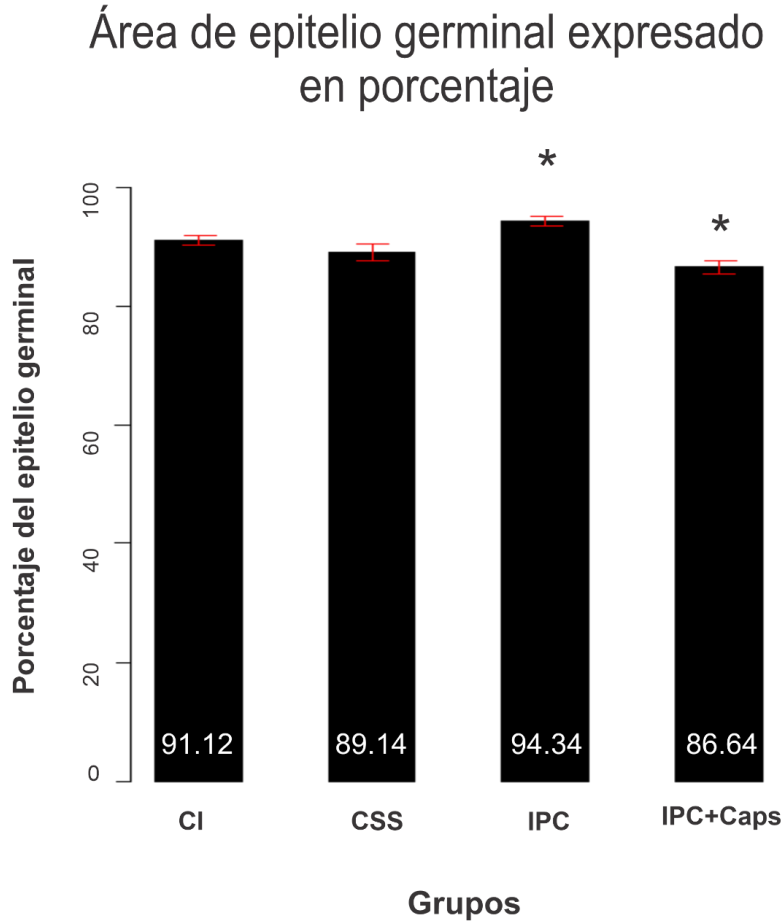


Fig. 22.- Gráfica que representa la media \pm e.e.m, del porcentaje que ocupa el área del epitelio germinal del total del túbulo seminífero. El porcentaje que ocupa el epitelio germinal del grupo IPC, fue mayor en comparación con los grupos CI, CSS e IPC+Caps. El porcentaje que ocupa el epitelio germinal del grupo IPC+Caps, fue menor en comparación con los grupos CI, CSS e IPC. Control intacto (CI), control solución salina (CSS), inducción de proliferación celular (IPC) e inducción de proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). El valor de significancia (*) utilizado fue de $p < 0.05$.

8.7. *Expresión del marcador de proliferación (Ki-67) y el neurotransmisor CGRP*

Cuando se administró a los ratones del grupo control solución salina (CSS), se observó la expresión del marcador de proliferación Ki-67 y el neurotransmisor CGRP, principalmente en el citoplasma de las células del compartimento intersticial, aunque también se observó una ligera expresión dentro de los túbulos seminíferos. (Fig. 23).

Cuando se indujo la proliferación celular mediante la administración de EaEg (IPC), la expresión del marcador de proliferación Ki-67 y del neurotransmisor CGRP, se observó asociado al citoplasma de las células del compartimento intersticial y una ligera expresión asociada a las células del epitelio germinal, en el interior de los túbulos seminíferos (Fig. 23).

Cuando se indujo la proliferación celular mediante la administración de EaEg y posteriormente se denervó con capsaicina (IPC+Caps), se observó la expresión de Ki-67 tanto en las células del compartimento intersticial como en las células del compartimento tubular, asociado principalmente al núcleo de las células en el interior de los túbulos seminíferos, con una marcada expresión en las Sps. La expresión de CGRP se observó principalmente en el citoplasma de las células del compartimento intersticial (Fig. 23).

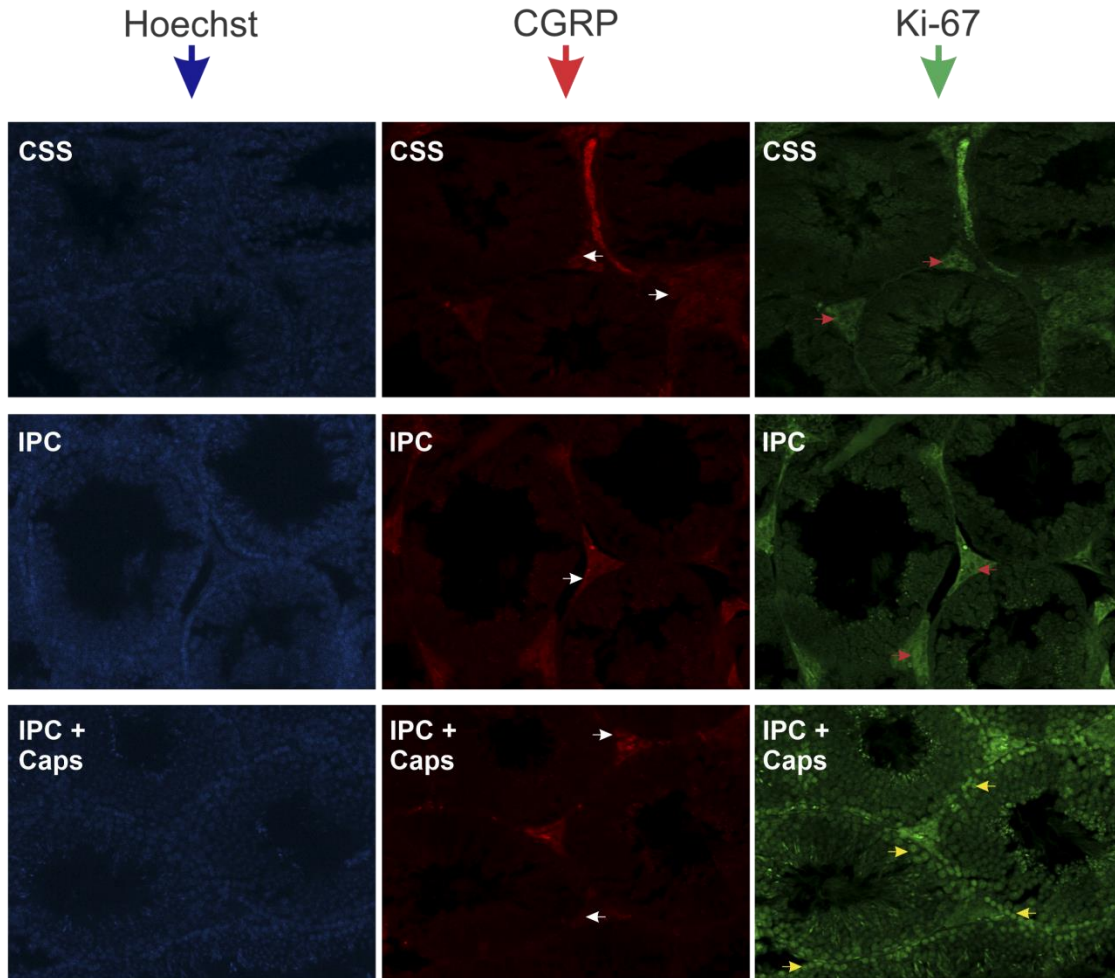


Fig. 23.- Microfotografías de cortes histológicos de testículo de ratón. Se muestra la inmunofluorescencia expresada por el marcador de proliferación Ki-67 (verde), el neurotransmisor CGRP (rojo) y el colorante de ADN Hoechst (azul). Control solución salina (CSS), inducción de proliferación celular (IPC) e inducción de proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). La expresión de CGRP se observa principalmente en el citoplasma de las células intersticiales en los tres grupos (flechas blancas). La expresión de Ki-67 se observa en el citoplasma de las células intersticiales CSS e IPC (flechas rojas). En el caso del grupo IPC+Caps, la expresión de Ki-67 se observa en los núcleos de las células germinales (flechas amarillas). Microscopía de fluorescencia, objetivo de 20X.

Para poder evidenciar las posibles diferencias en la expresión de los marcadores para proliferación celular y el neurotransmisor CGRP, se realizaron mediciones de intensidad de fluorescencia y se compararon entre grupos. Las mediciones se realizaron en el compartimento intersticial y en el área del epitelio germinal.

La intensidad de fluorescencia del marcador de proliferación Ki-67, fue mayor de manera significativa, tanto en el compartimento intersticial como en el epitelio germinal, en el grupo que fue inducido a proliferación celular (IPC) y en el grupo que fue inducido a proliferación celular y posteriormente denervado con capsaicina (IPC+Caps), en comparación con el grupo control que recibió solución salina (CSS). Cabe resaltar que la intensidad de fluorescencia de Ki-67 entre el compartimento intersticial del grupo que fue inducido a proliferación celular (IPC) y el compartimento intersticial del grupo que fue inducido a proliferación celular y posteriormente denervado con capsaicina (IPC+Caps), se observó en niveles similares (Fig.27). Sin embargo, los niveles de intensidad de fluorescencia de Ki-67 del epitelio germinal fueron diferentes, siendo menor en el epitelio germinal del grupo que se indujo a proliferación celular (IPC), en comparación con la intensidad de fluorescencia del epitelio germinal del grupo que se indujo a proliferación celular y posteriormente se denervó con capsaicina (IPC+Caps) (Fig. 24).

Intensidad de fluorescencia de Ki-67

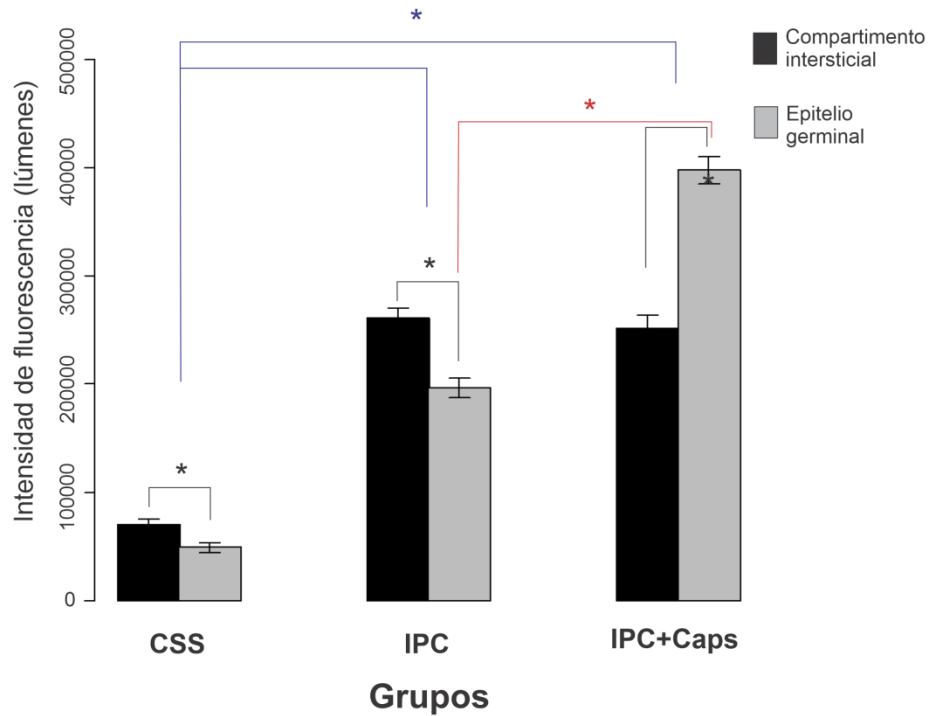


Fig. 24.- Gráfica que representa la media \pm e.e.m, de la intensidad de fluorescencia del marcador de proliferación Ki-67, en el compartimento intersticial y en el epitelio germinal de los grupos: control solución salina (CSS), inducción a proliferación celular (IPC) e inducción a proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). La intensidad de fluorescencia de Ki-67 aumentó de manera significativa en los grupos IPC e IPC+Caps, tanto en el compartimento intersticial como en el epitelio germinal, comparado con el grupo CSS (líneas azules). La intensidad de fluorescencia de Ki-67 del epitelio germinal en los grupos CSS e IPC, fue menor estadísticamente en comparación con la intensidad de fluorescencia expresada en el compartimento intersticial. La intensidad de fluorescencia de Ki-67 del epitelio germinal del grupo IPC+Caps, fue mayor estadísticamente en comparación con la intensidad de fluorescencia de Ki-67 en el epitelio germinal del grupo IPC (línea roja). El valor de significancia (*) utilizado fue de $p < 0.05$.

La intensidad de fluorescencia del neurotransmisor CGRP, aumentó en el compartimento intersticial del grupo que se indujo a proliferación celular (IPC) y en el compartimento intersticial del grupo que se indujo a proliferación celular y posteriormente fue denervado con capsaicina (IPC+Caps), en comparación con la intensidad de fluorescencia en el compartimento intersticial del grupo que se le administró solución salina (CSS). Sin embargo la intensidad de fluorescencia de CGRP fue menor en el compartimento intersticial del grupo que se indujo a proliferación celular y posteriormente fue denervado con capsaicina (IPC+Caps), en comparación con la intensidad de fluorescencia del grupo que se indujo a proliferación celular con extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* (IPC) (Fig. 25).

La intensidad de fluorescencia del neurotransmisor CGRP en el epitelio germinal, presentó el mismo patrón de intensidad de fluorescencia que se observó en el compartimento intersticial. Siendo mayor la intensidad de fluorescencia de CGRP en el epitelio germinal del grupo que se indujo a proliferación celular (IPC) y en el epitelio germinal del grupo que se indujo a proliferación celular y posteriormente fue denervado con capsaicina (IPC+Caps), en comparación con el grupo control que fue administrado con solución salina (CSS). De igual forma, en el grupo que se indujo a proliferación celular y posteriormente fue denervado con capsaicina (IPC+Caps), la intensidad de fluorescencia de CGRP en el epitelio germinal fue menor, en comparación con la intensidad de fluorescencia de CGRP en el epitelio germinal del grupo que se indujo a proliferación celular mediante la administración de EaEg (IPC) (Fig. 25).

Intensidad de fluorescencia de CGRP

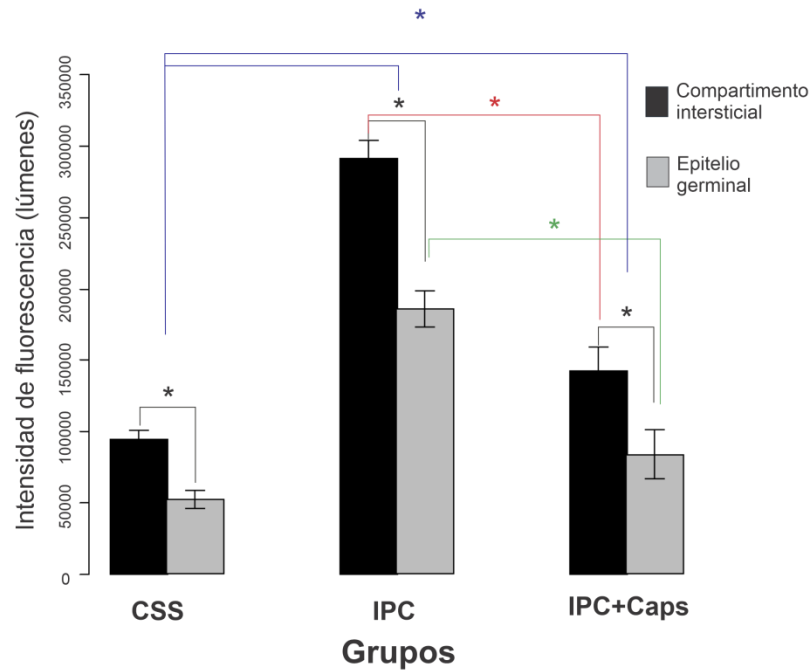


Fig. 25.- Gráfica que representa la media \pm e.e.m, de la intensidad de fluorescencia del neurotransmisor CGRP, en el compartimento intersticial y en el epitelio germinal de los grupos: control solución salina (CSS), inducción a proliferación celular (IPC) e inducción a proliferación celular + capsaicina (IPC+Caps). La intensidad de fluorescencia de CGRP aumentó de manera significativa en los grupos IPC e IPC+Caps, tanto en el compartimento intersticial como en el epitelio germinal, comparado con el grupo CSS (líneas azules). La intensidad de fluorescencia de CGRP en el compartimento intersticial y en el epitelio germinal del grupo IPC, fue mayor estadísticamente en comparación con los grupos CSS e IPC+Caps. La intensidad de fluorescencia de CGRP del epitelio germinal de los grupos CSS, IPC e IPC+Caps, fue menor estadísticamente en comparación con la intensidad de fluorescencia de CGRP en el compartimento intersticial de los mismos grupos. El valor de significancia (*) utilizado fue de $p < 0.05$.

9. DISCUSIÓN

Se ha reportado el efecto del extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora*, sobre la calidad espermática en diferentes mamíferos incluyendo el humano. En la mayoría de los trabajos, los resultados mostraron que el EaEg, disminuye la motilidad y promueve la formación de aglutinaciones espermáticas, cuando se adiciona directamente a los espermatozoides. Sin embargo, la vitalidad no se ve afectada (Delgado *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2002; Cordero-Martínez *et al.*, 2016). En nuestros resultados observamos una disminución tanto de la motilidad como de la vitalidad de los espermatozoides, principalmente en el testículo derecho del grupo que fue inducido a proliferación celular mediante la administración de EaEg, cuando se administró de manera intraescrotal. Sin embargo, en los análisis microscópicos realizados, no se observaron aglutinaciones espermáticas.

Los resultados obtenidos en la motilidad y la vitalidad espermática, nos indican posibles efectos negativos de EaEg sobre la función del epidídimo. Debido a que los espermatozoides después de alcanzar su maduración estructural en el testículo, requieren otro tipo de maduración post-testicular, para que adquieran la capacidad de motilidad completa. Esta maduración post-testicular se lleva a cabo en el epidídimo, en donde los lípidos y proteínas de membrana del espermatozoide se modifican, permitiendo que la célula reaccione a las señales en el tracto reproductor femenino y pueda activar otros mecanismos necesarios para la fertilización del ovocito como son; la hipermotilidad, la reacción acrosomal y la fusión del espermatozoide con el ovocito (Björkgren y Lishko, 2017).

En el modelo utilizado en este trabajo, se pretendió generar un contacto directo de EaEg con el testículo, realizando la administración de EaEg por vía intraescrotal, con el fin de inducir proliferación celular específicamente en las células testiculares. Sin embargo debido a la cercanía anatómica que presenta el epidídimo con el testículo, es posible que el EaEg también estuviera en contacto directo con el epidídimo, afectando sus funciones y por ende afectando el porcentaje de motilidad y vitalidad de los espermatozoides.

Es interesante mencionar que, el porcentaje de motilidad y vitalidad espermática en el grupo administrado con EaEg y posteriormente denervado mediante la administración de capsaicina, se observó con valores similares al porcentaje de motilidad y vitalidad espermática del grupo control administrado con solución salina. Estos resultados sugieren una posible recuperación de los efectos negativos causados por la administración de EaEg, sobre el porcentaje de motilidad y vitalidad espermática, que podría estar modulado por los efectos de la denervación sensorial, provocados por la administración de capsaicina.

Para poder entender, de qué manera podría la denervación sensorial revertir los efectos causados por la administración de EaEg, sobre la motilidad y vitalidad espermática, es necesario analizar la siguiente información:

1.- El epidídimo recibe información nerviosa a través del nervio espermático inferior (NSI), que se origina en los plexos mesentéricos e hipogástricos inferiores y fibras que se derivan de las ramas del nervio pélvico (Kumazawa, 1986; Gerendai *et al.*, 2000; Gerendai *et al.*, 2005). A pesar de que los plexos y nervios que ingresan al epidídimo contienen fibras sensoriales, se ha considerado que la principal contribución de los plexos mesentéricos e hipogástricos inferiores al epidídimo es de naturaleza simpática (Kumazawa, 1986, Sengupta *et al.*, 1994; Gerendai *et al.*, 2000; Shea *et al.*, 2000; Gerendai *et al.*, 2005; Tubbs *et al.*, 2015).

2.- La función del epidídimo es sensible a la integridad de la inervación simpática. En ratas, la pérdida de la inervación simpática provoca la pérdida de la velocidad de natación curvilínea y en línea recta de los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo (Patki *et al.*, 2008).

3.- Se han reportado efectos antagonistas entre el sistema simpático y el sistema sensorial en varios tejidos. La densidad de las fibras sensoriales y la síntesis y liberación de CGRP aumentan después de la simpatectomía (Schon *et al.*, 1985; Matsushima *et al.*, 1995; Aberdeen *et al.*, 1992; Ekström y Ekman, 2005; Hachani *et al.*, 2010). En contraste, la densidad de las fibras simpáticas y la liberación de

noradrenalina aumentan después de la denervación sensorial (Terenghi *et al.*, 1986; Van Ranst y Lauweryns, 1990; Hachani *et al.*, 2010).

4.- La administración de CGRP de forma dosis dependiente, puede inhibir las respuestas contráctiles en los conductos deferentes de la rata, que fueron mediadas predominantemente por la activación de fibras nerviosas noradrenérgicas postganglionares. Sugiriendo que en el conducto deferente de la rata, CGRP puede inhibir la liberación de noradrenalina durante la estimulación del nervio adrenérgico (Ohhashi y Jacobowitz, 1985).

5.- En algunas patologías como la endometriosis, existe un desequilibrio entre las fibras nerviosas simpáticas y sensoriales (Liang y Yao, 2016). La densidad de las fibras nerviosas sensoriales es menor significativamente en el peritoneo no afectado, en comparación con la lesión del endometrio, mientras que la densidad de fibras nerviosas simpáticas es mayor significativamente en el peritoneo no afectado, en comparación con la densidad de fibras nerviosas simpáticas en el tejido lesionado (Ferrero *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 2012).

En nuestro experimento, cuando se administró a los ratones EaEg por vía intraescrotal, se observó la presencia de tejido recubriendo al testículo y al epidídimo, principalmente en la zona de la cola del epidídimo y el primer segmento del conducto deferente. El tejido permaneció durante los 35 días que se mantuvieron los ratones en experimentación. Es probable que la inervación sensorial y simpática en estas condiciones, sufriera un desequilibrio en la densidad de fibras nerviosas, como se ha reportado en patologías como la endometriosis. Probablemente se generó un aumento de la densidad de las fibras nerviosas sensoriales, provocando un efecto antagonista en la función de las fibras nerviosas simpáticas, lo que explicaría por qué al provocar una denervación sensorial mediante la administración de capsaicina, el porcentaje de motilidad y vitalidad espermática aparentemente se encontraron en niveles similares al control, efecto posiblemente mediado por la reactivación de la inervación simpática.

Por otra parte, en el trabajo realizado por Hernández, (2014), al provocar una denervación sensorial mediante la administración de una sola dosis de 50 mg/kg de capsaicina en ratas recién nacidas, disminuyó el porcentaje de motilidad, vitalidad y concentración espermática. Indicando que el bloqueo de las fibras sensoriales, en un modelo en donde el epidídimo se encuentra en condiciones normales, afecta de manera negativa al porcentaje de motilidad y vitalidad de los espermatozoides. Estos resultados son contrarios a nuestros resultados. En primera instancia se puede sugerir que los efectos de la denervación sensorial, podrían variar cuando se realiza en un modelo de ratón recién nacido y cuando se realiza en un modelo de ratón adulto, como fue el caso del modelo utilizado en este trabajo. Además, estos resultados permiten sugerir que la función de la inervación sensorial no solo dependerá del órgano que está inervando, si no que probablemente también depende de la situación patológica en la que se encuentre el órgano.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el efecto de EaEg se ha relacionado principalmente con la disminución de la motilidad y la formación de aglutinaciones espermáticas, administrado de manera directa en los espermatozoides. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre los efectos en la concentración espermática, debido a que la mayoría de trabajos se han realizado en modelos *in vitro*. En este trabajo la concentración espermática disminuyó de manera estadísticamente significativa en el grupo que fue inducido a proliferación celular mediante la administración de EaEg (IPC) y en el grupo que fue inducido a proliferación celular y posteriormente denervado mediante la administración de capsaicina (IPC+Caps) en comparación con los controles (CSS y CI). Estos resultados nos indican posibles efectos tóxicos de EaEg sobre la espermatogénesis.

La concentración espermática depende de factores que regulan la espermatogénesis a nivel del epitelio germinal, un mal funcionamiento en los factores que inducen la proliferación celular, así como, en los factores relacionados con la diferenciación celular en el epitelio germinal, podrían dar como resultado una disminución en la concentración espermática, estos factores son

aportados principalmente por las células de Sertoli, que a su vez son estimuladas por múltiples factores que incluyen; la aportación hormonal del eje hipotálamo hipófisis testículo, la aportación de testosterona por las células de Leydig y de algunas proteínas como inhibina y activina, entre otras (Welsh *et al.*, 2009; Smith y Walker, 2015; Björkgren y Lishko, 2017; O'Donnell *et al.*, 2017). Además, de la regulación neuroendocrina también se ha sugerido una regulación neural fina de la espermatogénesis (Gerendai *et al.*, 2005).

La sección del nervio espermático superior (NSS), en la rata, produce fagocitosis en las espermatides maduras, vacuolización de los núcleos de las espermatides, la espermiación tardía y las asociaciones celulares incompletas en el 60% de los túbulos seminíferos. Si bien la sección solamente del nervio espermático inferior (NSI) no afecta la espermatogénesis, la sección de ambos nervios (NSS y NSI) doce semanas después de la cirugía, provocó una regresión del epitelio seminífero caracterizado por la ausencia de Sps proliferantes (Chow *et al.*, 2000). En ratas prepúberes, se encontró que la sección tanto del NSS como del NSI, promueve la apoptosis en espermatides redondas y células de Leydig, y reduce la activación de la meiosis de espermatocitos en cigoteno y paquiteno. Además, la denervación en ambos nervios, disminuye significativamente la expresión de 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (3β -HSD1) y los niveles de ARNm del receptor de la hormona luteinizante, pero no tiene influencia sobre la expresión de ARNm del receptor de FSH (Huo *et al.*, 2010).

Por otra parte la función de las fibras sensoriales podría ser un factor involucrado en la regulación de la concentración espermática. Hernandez, (2014), al bloquear la función de las fibras sensoriales mediante la administración de 50 mg/kg de capsaicina en ratas recién nacidas, reporta una disminución en la concentración espermática. Indicando un papel estimulador de la inervación sensorial sobre la espermatogénesis en ratas.

Cabe resaltar que en el grupo que se indujo a proliferación celular y posteriormente fue denervado con capsaicina (IPC+Caps), la concentración

espermática disminuyó de una manera similar al grupo que fue inducido a proliferación celular (IPC). No se observó un efecto de posible recuperación como sucedió en el porcentaje de motilidad y vitalidad espermática, pero tampoco el efecto negativo provocado por la administración de EaEg se incrementó por la administración de la capsaicina. Lo que nos indica que posiblemente entre el epidídimo y el testículo existen mecanismos distintos en cuanto a las funciones que desempeñan las fibras sensoriales que inervan a estos órganos. Esta idea podría respaldarse debido a que el testículo recibe información nerviosa principalmente del nervio espermático superior (NSS), que se origina en los plexos celiaco y aórtico con un aporte del nervio vago, mientras que el epidídimo recibe mayor aporte de información nerviosa a través del nervio espermático inferior. No obstante, el testículo también recibe una aportación nerviosa proveniente del nervio espermático inferior (NSI). Sin embargo la sección del nervio espermático inferior por sí solo no afecta la espermatogénesis (Chow *et al.*, 2000).

Uno de los objetivos de este trabajo fue, evaluar si los tratamientos utilizados en el experimento generaban daño al material genético de los espermatozoides, debido a que en el trabajo realizado por Olivia, (1993), se reportan efectos genotóxicos de EaEg en células sanguíneas. Además, los efectos genotóxicos de la capsaicina en las células testiculares son controversiales (Narasimhamurthy, 1988; Mizrak *et al.*, 2008).

En este trabajo se evaluó la fragmentación de ADN mediante la prueba COMETA. En ninguno de los grupos, se observaron núcleos de espermatozoides con ADN fragmentado. Nuestros resultados indican que el EaEg, no genera genotoxicidad en el espermatozoide como lo podría hacer en las células sanguíneas. Probablemente se debe a que las células de Sertoli proporcionan una barrera hematotesticular, que podría estar impidiendo el contacto directo de EaEg con el espermatozoide.

Además, cuando administramos 125 mg/kg de capsaicina por vía subcutánea, después de la administración de EaEg, tampoco observamos fragmentación de

ADN. Nuestros resultados coinciden con los resultados reportados por Narasimhamurthy, (1988), quien administró a ratones albinos adultos, dosis de capsaicina de 0.4, 0.8, y 1.6 mg/kg por vía intraperitoneal durante cinco días, sin encontrar signos de toxicidad en las células testiculares. Sin embargo nuestros resultados difieren con lo reportado por Mizrak *et al.*, (2008), en donde la administración de capsaicina en dosis de 150 μ M y 250 μ M, generaron apoptosis y signos de fragmentación de ADN en células madre de Sps cultivadas *In vitro*. Estos resultados podrían sugerir que, los efectos ocasionados por la capsaicina en la fragmentación de ADN de las células espermáticas, dependen del modelo experimental, haciendo hincapié en la importancia de la barrera hematotesticular en los modelos *In vivo*.

El mecanismo por el cual se generan las alteraciones de la cromatina del espermatozoide no se conoce con precisión, pero se han propuesto al menos 3 teorías que podrían explicar el origen del daño; 1) durante el empaquetamiento de la cromatina espermática, 2) apoptosis y 3) estrés oxidativo (Agarwal y Said, 2003). En este trabajo los espermatozoides obtenidos para la prueba de fragmentación, corresponden a espermatozoides que iniciaron o se encontraban en formación, en el momento que se administraron los tratamientos con extracto y capsaicina. Es probable que en ese momento los efectos provocados por el extracto o la capsaicina aún no se hicieran presentes, ya que la duración de la espermatogénesis en el ratón es de aproximadamente 34.5 días (Oakberg, 1956). Por lo que para poder evaluar este parámetro, sugerimos realizar las pruebas de fragmentación espermática en un tiempo más prolongado, después de la última administración de los tratamientos.

Para poder evidenciar el papel que desempeña la inervación sensorial, sobre los posibles efectos de proliferación celular causados por EaEg, realizamos análisis en la histología testicular. Ha sido interesante observar que la administración por vía intraescrotal de EaEg en nuestro modelo de ratón CD1, provocó alteraciones en la organización de las células, tanto del compartimento intersticial como del epitelio germinal, por primera vez se están reportando estos resultados.

Principalmente observamos una mayor cantidad de células, tanto en el compartimento intersticial como en el compartimento tubular. Además, observamos la formación de conglomerados celulares en el lumen del túbulo seminífero, del grupo que se indujo a proliferación celular mediante la administración de EaEg.

Estas observaciones se complementan con los resultados obtenidos en las mediciones del área de los túbulos seminíferos. Tanto en el grupo control administrado con solución salina, como en el grupo que se indujo a proliferación celular con EaEg, y el grupo que se indujo a proliferación celular con EaEg y posteriormente fue denervado con capsaicina, se observó un aumento en el área de los túbulos seminíferos, y un aumento en el área del epitelio germinal, comparado con el control intacto. Sin embargo, cuando revisamos el porcentaje que ocupaba el área del epitelio germinal, en comparación con el área total de los túbulos seminíferos, los resultados mostraron que en el grupo que fue inducido a proliferación celular mediante la administración de EaEg, el área del epitelio germinal ocupó el 94.34 % del área total del túbulo, este porcentaje fue mayor en comparación con los demás grupos, corroborando la observación de mayor presencia de células dentro del túbulo seminífero, en el grupo que fue inducido a proliferación celular mediante la administración de EaEg.

Aún más interesante, fueron los resultados del grupo que fue inducido a proliferación celular mediante la administración de EaEg y posteriormente denervado con capsaicina (IPC+Caps). En este grupo el área del epitelio germinal ocupó el 86.64% del área total del túbulo seminífero, este porcentaje fue menor de manera estadísticamente significativa en comparación con el grupo que se indujo a proliferación celular (IPC) y en comparación con ambos controles. Además, los conglomerados observados en el grupo que solo se indujo a proliferación celular, no se observaron en el grupo que se indujo a proliferación celular y posteriormente fue denervado con capsaicina. Lo que nos indica un posible efecto de estimulación de la proliferación celular causado por EaEg, y un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular provocado por la administración de EaEg, al bloquear la

función de las fibras sensoriales mediante la administración de capsaicina. Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta en este trabajo, en donde mencionamos que el bloqueo de la inervación sensorial provocaría la inhibición de la proliferación anormal de células testiculares.

No obstante los resultados del análisis de intensidad de fluorescencia, del marcador para proliferación celular (Ki-67) y el neurotransmisor CGR, nos arrojaron datos contradictorios a nuestra hipótesis. En primera instancia cuando se administró EaEg, la intensidad de fluorescencia de Ki-67 observada en el compartimento intersticial y en el epitelio germinal aumentó en comparación con el grupo control, indicando que el EaEg, puede estimular mecanismos de proliferación en las células testiculares. Sin embargo cuando se indujo la proliferación celular mediante la administración de EaEg y posteriormente se denegó mediante la administración de capsaicina, la intensidad de fluorescencia de Ki-67 aumentó aún más en el epitelio germinal, en comparación con la intensidad de fluorescencia del epitelio germinal del grupo control y el grupo que se indujo a proliferación celular, este aumento estuvo relacionado con una disminución de la intensidad de fluorescencia de CGRP, indicando que la falta de inervación sensorial, podría potencializar los efectos provocados por la administración de EaEg, en la proliferación de las células del epitelio germinal.

Es interesante mencionar que a pesar de que la intensidad de fluorescencia de CGRP disminuyó en el compartimento intersticial después de la administración de capsaicina, los niveles de intensidad de fluorescencia de Ki-67 en el compartimento intersticial se mantuvieron igual que el grupo que se indujo a proliferación celular, indicando que en las células del compartimento intersticial, la regulación de la proliferación celular no depende de la inervación sensorial.

Los estudios realizados sobre los efectos de los componentes de las plantas en enfermedades como el cáncer, están enfocados en los efectos anticancerígenos de sus componentes activos (Wang *et al.*, 2012). Aun así se han reportado los efectos de algunas plantas sobre la estimulación de la proliferación celular. Los

productos comerciales disponibles que contienen soja, trébol rojo y combinaciones herbales, indujeron un aumento en las tasas de proliferación de células de cáncer de mama sensibles a estrógenos (MCF-7) (Bodinet y Freudenstein, 2004). Los extractos de fruta de *Psoralea corylifolia*, mostraron actividad estimuladora de la proliferación de células osteoblásticas en la línea de células UMR106, los efectos se atribuyen al contenido de cumarinas y flavonoides, como componentes principales de la fruta (Wang, *et al.*, 2001).

Aún se desconoce cuál es el componente activo de EaEg, que podría generar la estimulación de la proliferación de las células testiculares. Sin embargo se ha reportado la presencia de cristales de calcio bis- hexahidratado altamente soluble, en el contenido de las hojas de *Echeveria gibbiflora* (Reyes *et al.*, 2005). Es posible que la actividad estimuladora de *Echeveria gibbiflora* sobre la proliferación de células testiculares, se relacione con el contenido de calcio presente en sus hojas. En soporte a esta idea, se ha sugerido que el calcio está involucrado en la regulación de la proliferación celular, debido a las fluctuaciones en la concentración citosólica de calcio, que se observan a lo largo del ciclo celular. Se ha demostrado que los fibroblastos no transformados, detienen la división celular cuando se cultivan en medios con bajo contenido de calcio (Humeau *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha demostrado que un aumento controlado de calcio, induce la supervivencia independiente de hormonas y la proliferación de células de leucemia mieloeritroide, mediado por la vía de señalización MAPK/ERK (Apáti *et al.*, 2003).

Tanto la FSH como la LH, pueden elevar los niveles de calcio en las células de Sertoli en ratas jóvenes. Además, ambas hormonas pueden activar la vía de señalización de las MAPK, que podría estar involucrada en el aumento del número de células de Sertoli en roedores prepúberes (Smith y Walker, 2015). Por otra parte se ha demostrado que la vía Wnt/ β -catenina está involucrada en la proliferación de las Sps de ratones (Golestaneh *et al.*, 2009). Si bien la señalización de Wnt es una vía compleja, en la que la β -catenina típicamente funciona como un mediador central, se han propuesto al menos otras tres vías mediadas por Wnt, que funcionan independientemente de β -catenina, una de

estas vías implica la activación de la quinasa II dependiente de calcio/calmodulina y proteína quinasa C (Kohn y Moon, 2005).

De igual forma no está bien establecido, cuáles son los mecanismos que activa la innervación sensorial para regular la proliferación de las células testiculares. Sin embargo, se ha reportado que CGRP puede estimular la proliferación en las células epiteliales endoteliales y células epiteliales alveolares humanas (Haegerstrand *et al.*, 1990; Kawanami *et al.*, 2009). Además, cuando se genera una denervación sensorial, que provoca la disminución de CGRP, se retrasa la formación de neoplasias pancreáticas intraepiteliales y suprime la tumorigénesis en ratones con carcinoma basocelular (Peterson *et al.*, 2015; Saloman *et al.*, 2016).

Por otra parte en el trabajo realizado por Erin *et al.* (2004), la denervación sensorial mediante la administración de capsaicina, en un modelo de cáncer de mama, agiliza los procesos de metástasis, hacia el pulmón y el corazón. En nuestro trabajo, los niveles bajos de CGRP provocados por la denervación sensorial mediante la administración de capsaicina, se relacionaron con un aumento en la proliferación de las células del epitelio germinal. Complementando estos resultados, es importante mencionar que en los análisis histológicos del grupo que se indujo a proliferación celular, mediante la administración de EaEg y posteriormente fue denervado con capsaicina, se observó una pérdida de la integridad de la lámina basal. Además, parecía que las células del epitelio germinal estaban migrando hacia el compartimento intersticial.

Tomando en cuenta lo anterior, nos dimos a la tarea de contar la cantidad de túbulos seminíferos que presentaban las características de pérdida de la lámina basal y aparente migración celular hacia el compartimento intersticial. Los resultados obtenidos mostraron que, en el grupo que se indujo a proliferación celular mediante la administración de EaEg, el 33% de los túbulos seminíferos contados, presentó la característica de pérdida de integridad de la lámina basal y de aparente migración celular hacia el espacio intersticial o hacia los túbulos

seminíferos vecinos. Por otra parte, en el grupo que se indujo a proliferación celular con EaEg y posteriormente fue denervado con capsaicina, el porcentaje de los túbulos seminíferos que presentaron estas características fue de 53%. En contraste, en los grupos control no se observaron alteraciones en la lámina basal, ni la aparente migración celular hacia el compartimento intersticial. No obstante, las evidencias obtenidas en este trabajo aun no son lo suficientemente fuertes, para apoyar la idea de que lo observado en los cortes histológicos de testículo, de los animales que fueron inducidos a proliferación celular y posteriormente denervados con capsaicina, se trate de una invasión celular o una metástasis como sucedió en el modelo de cáncer de mama, después de generar una denervación sensorial mediante la administración de capsaicina (Erin *et al.*, 2004). Se requieren más estudios, para poder esclarecer los posibles mecanismos regulatorios de la inervación sensorial, en la migración y la metástasis de las células testiculares.

10. CONCLUSIONES

- 1) El extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* disminuye el porcentaje de motilidad, vitalidad y la concentración espermática en ratones CD1.
- 2) La falta de inervación sensorial, restaura los efectos provocados por el extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* en la motilidad y vitalidad pero no en la concentración espermática de ratones CD1.
- 3) El extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* y la capsaicina no inducen fragmentación en el ADN del espermatozoide de ratón CD1.
- 4) En ratones CD1, la inervación sensorial mantiene la morfometría normal de los túbulos seminíferos.
- 5) El extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* estimula procesos de proliferación en células testiculares.
- 6) La inervación sensorial retarda los mecanismos de proliferación celular en las células testiculares, inducidos por el extracto acuoso de *Echeveria gibbiflora* en ratones CD1.

11. REFERENCIAS CITADAS

Aberdeen, J., Milner, P., Lincoln, J., y Burnstock, G. (1992). Guanethidine sympathectomy of mature rats leads to increases in calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves. *Neuroscience*, 47(2), 453–461.

Abu Hasan, Q., y Siddiqui, W. (2019). Neuroanatomy, Amygdala. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537102/>

Agarwal, A., y Said, T. M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human reproduction update*, 9(4), 331-345.

Ali, M. A. (1986). Effects of mesencephalic lesion on the histomorphology of testis and spermatogenesis. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 30(1), 11-21.

Anand, P., y Bley K. (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British journal of anaesthesia*, 107(4), 490-502.

Apáti, Á., Jánossy, J., Brózik, A., Bauer, P.I., y Magócsi, M. (2003). Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line, TF-1. *Revista de Química Biológica*, 278 (11), 9235-9243.

Arnold, J., de Arellano, M. L. B., Rüter, C., Vercellino, G. F., Chiantera, V., Schneider, A., y Mechsner, S. (2012). Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis. *Brain, behavior, and immunity*, 26(1), 132-141.

Ayala, M. E., Velázquez, D. E., Mendoza, J. L., Monroy, J., Domínguez, R., Cárdenas, M., y Aragón, A. (2015). Dorsal and medial raphe nuclei participate differentially in reproductive functions of the male rat. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 132.

Banczerowski, P., Csaba, Z., Csernus, V., y Gerendai, I. (2001). Lesion of the insular cortex affects luteinizing hormone and testosterone secretion of rat: Lateralized effect. *Brain research*, 906(1-2), 25-30.

Banczerowski, P., Csaba, Z., Csernus, V., y Gerendai, I. (2003). Lesion of the amygdala on the right and left side suppresses testosterone secretion but only left-sided intervention decreases serum luteinizing hormone level. *Journal of endocrinological investigation*, 26(5), 429-434.

Basinger, H., y Hogg, J.P. (2019). Neuroanatomy, Brainstem. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544297/>

Bear, M.H., y Bollu, P.C. (2019). Neuroanatomy, Hypothalamus. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525993/>

Bhattacharya, I., Sen Sharma, S., y Majumdar, S. S. (2019). Pubertal orchestration of hormones and testis in primates. *Molecular reproduction and development*, 86, 1505-1530.

Björkgren, I., y Lishko, P.V. (2017). Fertility and TRP Channels. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK476107/>

Bodinet, C., y Freudenstein, J. (2004). Influence of marketed herbal menopause preparations on MCF-7 cell proliferation. *Menopausia* , 11 (3), 281-289.

Campos, M. B., Chiochio, S. R., Calandra, R. S., y Ritta, M. N. (1993). Effect of bilateral denervation of the immature rat testis on testicular gonadotropin receptors and in vitro androgen production. *Neuroendocrinology*, 57(2), 189-194.

Carter, B. Z., Wang, R. Y., Schober, W. D., Milella, M., Chism, D., y Andreeff, M. (2003). Targeting survivin expression induces cell proliferation defect and SubsequentCell death involving mitochondrial pathway in myeloid leukemic cells. *Cell cycle*, 2(5), 486-491.

Chao, D. L., Sanchez, C. A., Galipeau, P. C., Blount, P. L., Paulson, T. G., Cowan, D. S., y Reid, B. J. (2008). Cell proliferation, cell cycle abnormalities, and cancer

outcome in patients with Barrett's esophagus: a long-term prospective study. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6988-6995.

Chow, S. H., Giglio, W., Anesetti, R., Ottenweller, J. E., Pogach, L. M., y Huang, H. F. (2000) The effects of testicular denervation on spermatogenesis in the Sprague-Dawley rat. *Neuroendocrinology*, 72(1), 37-45.

Coarfa, C., Florentin, D., Putluri, N., Ding, Y., Au, J., He, D., ... y Kadmon, D. (2018). Influence of the neural microenvironment on prostate cancer. *The Prostate*, 78(2), 128-139.

Cordero-Martínez, J., Aguirre-Alvarado, C., Guzmán-Soriano, J. G., Sánchez-Arroyo, C. E., Flores-Alonso, J. C. y Rodríguez-Páez, L. (2016). Effects of aqueous crude extract of *Echeveria gibbiflora* on mouse sperm function. *Systems biology in reproductive medicine*, 62(5), 343-352.

De Couck, M., Caers, R., Spiegel, D., y Gidron, Y. (2018). The role of the vagus nerve in cancer prognosis: a systematic and a comprehensive review. *Journal of Oncology*, 2018.

Delgado, N. M., Ramírez, J. T., Hernández, A. O., Merchant-Larios, H., Sánchez-Vázquez, M. L., Ramírez, G. y Reyes, R. (1999). Effects of a purified fraction from *Echeveria gibbiflora* aqueous crude extract on guinea-pig spermatozoa. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13(1), 46-49.

Ekström, J., y Ekman, R. (2005). Sympathectomy-induced increases in calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, substance P-and vasoactive intestinal peptide (VIP)-levels in parotid and submandibular glands of the rat. *Archives of oral biology*, 50(10), 909-917.

Erin, N., Barkan, G. A., Harms, J. F., y Clawson, G. A. (2008). Vagotomy enhances experimental metastases of 4THMpc breast cancer cells and alters substance P level. *Regulatory peptides*, 151(1-3), 35-42.

Erin, N., Boyer, P. J., Bonneau, R. H., Clawson, G. A. y Welch, D. R. (2004). Capsaicin-mediated denervation of sensory neurons promotes mammary tumor metastasis to lung and heart. *Anticancer research*, 24(2B), 1003-1010.

Felten, D. L., O'Banion, M. K., y Maida, M. S. (2016). 9—Peripheral Nervous System. *Netter's Atlas of Neuroscience, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands*, 153-231.

Ferrero, S., Haas, S., Remorgida, V., Camerini, G., Fulcheri, E., Ragni, N., y Capellino, S. (2010). Loss of sympathetic nerve fibers in intestinal endometriosis. *Fertility and sterility*, 94(7), 2817-2819.

Frankel, A. I., y Mock, E. J. (1982). A study of the first eight hours in the stabilization of plasma testosterone concentration in the hemicastrated rat. *Journal of Endocrinology*, 92, 225–229.

Gerendai, I., Banczerowski, P. y Halász, B. (2005). Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine*, 28(3), 309-318.

Gerendai, I., Nemeskéri, Á., y Csernus, V. (1984). Depending on the dose 6-OHDA stimulates or inhibits the testis of immature rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 84(04), 27-36.

Gerendai, I., Toth, I. E., Boldogkői, Z., Medveczky, I., y Halasz, B. (2000). Central nervous system structures labelled from the testis using the transsynaptic viral tracing technique. *Journal of neuroendocrinology*, 12(11), 1087-1095.

Ghazarian, A. A., Kelly, S. P., Altekrose, S. F., Rosenberg, P. S. y McGlynn, K. A. (2017). Future of testicular germ cell tumor incidence in the United States: forecast through 2026. *Cancer*, 123(12), 2320-2328.

Giannandrea, F., y Fagnoli, S. (2017). Environmental factors affecting growth and occurrence of testicular cancer in childhood: an overview of the current epidemiological evidence. *Children*, 4(1), 1.

Golestaneh, N., Beauchamp, E., Fallen, S., Kokkinaki, M., Uren, A. y Dym, M. (2009). Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction*, 138(1), 151.

Gómez-Alvis, A., Melucci, J., Quiroga, P. y Mandrile, E. L. (1995). Capsaicina. *Acta Farm. Bonaerense*, 14(1), 63-70.

Gómez-Dantés, H., Lamadrid-Figueroa, H., Cahuana-Hurtado, L., Silverman-Retana, O., Montero, P., González-Robledo, M. C. y Hamavid, H. (2016). The burden of cancer in Mexico, 1990-2013. *Salud pública de México*, 58(2), 118-131.

Gurney, J. K., Sarfati, D. y Stanley, J. (2015). Obscure etiology, unusual disparity: the epidemiology of testicular cancer in New Zealand. *Cancer Causes & Control*, 26(4), 561-569.

Haber, S.N. (2011). Neuroanatomy of Reward: A View from the Ventral Striatum. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92777/>

Hachani, R., Houcine, D. A. B., Sakly, M., Vicaut, E., Callebert, J., Sercombe, R., y Kacem, K. (2010). Influence of antagonist sensory and sympathetic nerves on smooth muscle cell differentiation in hypercholesterolemic rat. *Autonomic Neuroscience*, 155(1-2), 82-90.

Haegerstrand, A., Dalsgaard, C.J., Jonzon, B., Larsson, O., y Nilsson, J. (1990). Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(9):3299-3303.

Hernández., G. (2014). Participación de la inervación sensorial sobre la espermatogénesis de rata. Tesis. Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

Hirono, I., Haga, M., Fujii, M., Matsuura, S., Matsubara, N., Nakayama, M., y Hosaka, S. (1979). Induction of hepatic tumors in rats by senkirikine and symphytine. *Journal of the National Cancer Institute*, 63(2), 469-472.

Horvathova, L., Padova, A., Tillinger, A., Osacka, J., Bizik, J., y Mravec, B. (2016). Sympathectomy reduces tumor weight and affects expression of tumor-related genes in melanoma tissue in the mouse. *Stress*, 19(5), 528-534.

Horvathova, L., Tillinger, A., Padova, A., y Mravec, B. (2016). Sympathectomized tumor-bearing mice survive longer but develop bigger melanomas. *Endocrine regulations*, 50(4), 207-214.

Howitt, B. E., y Berney, D. M. (2015). Tumors of the testis: morphologic features and molecular alterations. *Surgical pathology clinics*, 8(4), 687-716.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539846/>

Huan, H. B., Wen, X. D., Chen, X. J., Wu, L., Wu, L. L., Zhang, L., ... y Xia, F. (2017). Sympathetic nervous system promotes hepatocarcinogenesis by modulating inflammation through activation of alpha1-adrenergic receptors of Kupffer cells. *Brain, behavior, and immunity*, 59, 118-134.

Humeau, J., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Núñez, L., Villalobos, C., Kroemer, G. y Senovilla, L. (2018). Calcium signaling and cell cycle: progression or death. *Calcio celular*, 70, 3-15.

Huo, S., Xu, Z., Zhang, X., Zhang, J., y Cui, S. (2010). Testicular denervation in prepuberty rat inhibits seminiferous tubule development and spermatogenesis. *Journal of Reproduction and Development*, 56(4), 370-378.

Ilacqua, A., Francomano, D., y Aversa, A. (2018). The physiology of the testis. Principles of Endocrinology and Hormone Action. Endocrinology. Springer, Cham, 455-491.

Joseph, A., Hess, R. A., Schaeffer, D. J., Ko, C., Hudgin-Spivey, S., Chambon, P., y Shur, B. D. (2010). Absence of estrogen receptor alpha leads to physiological alterations in the mouse epididymis and consequent defects in sperm function. *Biology of reproduction*, 82(5), 948-957.

Kamiya, A., Hayama, Y., Kato, S., Shimomura, A., Shimomura, T., Irie, K., y Ochiya, T. (2019). Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression. *Nature Neuroscience*, 22 (8), 1289-1305.

Kasimova, MA, Yazici, AT, Yudin, Y., Granata, D., Klein, ML, Rohacs, T. y Carnevale, V. (2018). A hypothetical molecular mechanism for TRPV1 activation that invokes rotation of an S6 asparagine. *The Journal of general physiology*, 150(11), 1554-1566.

Kawanami, Y., Morimoto, Y., Kim, H., Nakamura, T., Machida, K., Kido, T., y Kido, M. (2009). Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of alveolar epithelial cells. *Respiratory research*, 10(1), 8.

Kohn, A. D., y Moon, R. T. (2005). Wnt and calcium signaling: β -catenin-independent pathways. *Cell calcium*, 38(3-4), 439-446.

Koop, LK., y Tadi, P. (2019). Neuroanatomy, Sensory Nerves. Recuperado de: Kumazawa, T. (1986). Sensory innervation of reproductive organs. *Progress in brain research*, 67, 115-131. Elsevier.

Kuol, N., Stojanovska, L., Apostolopoulos, V., y Nurgali, K. (2018) Role of the nervous system in cancer metastasis. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 37(1), 5.

León-López, G., Hernández-Morales, F., Reyes-Luna, R., López-Morales, D. y Quiróz-López, U. (2017). Efectos del consumo de chile habanero (*Capsicum chinense*) sobre la calidad espermática en estudiantes universitarios. *Revista Peruana de obstetricia y enfermería*, 12(1).

Liang, Y., y Yao, S. (2016). Potential role of estrogen in maintaining the imbalanced sympathetic and sensory innervation in endometriosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 424, 42-49.

Ludwig, P.E., y Varacallo, M. (2019) Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS). Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442010/>

Martínez-Sánchez, Y. L., Escudero-de los Ríos, P. M., Arias-Flores, R. y Barrios-Bautista, F. (2013). Epidemiología del cáncer en pacientes adultos del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. *Cirugía y Cirujanos*, 81(6).

Matsushima, S., Sakai, Y., y Hira, Y. (1995). Sprouting of non-sympathetic myelinated and unmyelinated fibres in response to chronic sympathetic denervation in the pineal gland of the Chinese hamster, *Cricetulus griseus*. *Journal of neurocytology*, 24(7), 519-531.

Mizrak, S. C., Gadella, B. M., Erdost, H., Ozer, A., van Pelt, A. M., y Van Dissel-Emiliani, F. M. (2008). Spermatogonial stem cell sensitivity to capsaicin: an in vitro study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6(1), 52.

Narasimhamurthy, K. (1988) Non-mutagenicity of capsaicin in albino mice. *Food and Chemical Toxicology*, 26(11-12), 955-958.

National Research Council (US) Committee on Diet, Nutrition, and Cancer. Diet, Nutrition, and Cancer. (1982). Recuperado de:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK216630/>

Newberne, P. M., Weigert, J., y Kula, N. (1979). Effects of dietary fat on hepatic mixed-function oxidases and hepatocellular carcinoma induced by aflatoxin B1 in rats. *Cancer research*, 39(10), 3986-3991.

Nógrádi, A., y Vrbová, G. (2013). Anatomy and Physiology of the Spinal Cord. Recuperado de : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6229/>

O'Donnell, L., Stanton, P., y de Kretser, DM. (2017). Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis. Recuperado de:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279031/>

Oakberg, E. F. (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *American Journal of Anatomy*, 99(3), 507-516.

Oduwole, O., Peltoketo, H., y Huhtaniemi, I. (2018). Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis. *Frontiers in endocrinology*, 9, 763. doi: 10.3389 / fendo.2018.00763

Ohhashi, T., y Jacobowitz, D. M. (1985). Effect of calcitonin gene-related peptide on the neuroeffector mechanism of sympathetic nerve terminals in rat vas deferens. *Peptides*, 6(5), 987-991.

Olivia, T. B. (1993). Estandarización de las pruebas de micronúcleos e índice mitótico para determinar genotoxicidad de plantas con actividad aglutinante-inmovilizante de los espermatozoides de ratón.

Organización Mundial de la Salud [OMS] (2018). Cáncer. Nota descriptiva. Recuperado el 12 de noviembre de 2018 de: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Patki, P., Woodhouse, J., Hamid, R., Craggs, M., y Shah, J. (2008). Effects of spinal cord injury on semen parameters. *The journal of spinal cord medicine*, 31 (1): 27–32. doi: 10.1080 / 10790268.2008.11753977

Peterson, S. C., Eberl, M., Vagnozzi, A. N., Belkadi, A., Veniaminova, N. A., Verhaegen, M. E. y Wong, S. Y. (2015). Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. *Cell stem cell*, 16(4), 400-412.

Purves, D., Augustine, G.J., y Fitzpatrick, D. (2001). Neuroscience. 2nd edition. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11061/>

Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N.E., y Toppari, J. (2018). Testicular Cancer Pathogenesis, Diagnosis and Endocrine Aspects. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278992/>

Reyes, R., Merchant-Larios, H., Ortega-Hernández, A. y Delgado, N. M. (2002). Male contraception, IV: hypotonic-like effect from *Echeveria gibbiflora* on human sperm. *Archives of andrology*, 48(6), 443-449.

Reyes, R., Sánchez-Vázquez, M. L., Merchant Larios, H., Ortega Hernández, A., y Delgado, N. M. (2005). CALCIUM (HYDROGEN-1-MALATE) HEXAHYDRATE ON *Echeveria gibbiflora* LEAVES AND ITS EFFECT ON SPERM CELLS. *Archives of andrology*, 51(6), 461-469.

Ringkamp, M., y Meyer, R. (2014). Pruriceptors. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200917/>

Rosenbaum, T., y Simon, S. A. (2007). TRPV1 Receptors and Signal Transduction. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5260/>

Sadler, K. E., y Stucky, C. L. (2018). Neuronal transient receptor potential (TRP) channels and noxious sensory detection in sickle cell disease. *Neuroscience letters*.

Salazar, H., Oseguera-Juara, A., y Rosenbaum, T. (2009). The TRPV1 channel as a target for the treatment of pain. *Revista de neurologia*, 48(7), 357-364.

Saloman, J. L., Albers, K. M., Li, D., Hartman, D. J., Crawford, H. C., Muha, E. A., y Davis, B. M. (2016). Ablation of sensory neurons in a genetic model of pancreatic ductal adenocarcinoma slows initiation and progression of cancer. *Proceedings of the national academy of sciences*, 113(11), 3078-3083.

Schlatt, S., Ehmcke, J., y Wistuba, J. (2016). Cell biology and physiology of male reproduction. *Der Urologe*, 55(7), 868-876.

Schlatt, S., y Ehmcke, J. (2014). Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective. *Seminars in cell & developmental biology*, 29, 2-16. Academic Press.

Schon, F., Ghatei, M., Allen, J.M., Mulderry, P.K., Kelly, J.S., Bloom, S.R. (1985). The effect of sympathectomy on calcitonin gene-related peptide levels in the rat trigeminovascular system. *Brain research*, 348(1), 197-200.

Selvage, D. J., Lee, S. Y., Parsons, L. H., Seo, D. O., y Rivier, C. L. (2004). A hypothalamic-testicular neural pathway is influenced by brain catecholamines, but not testicular blood flow. *Endocrinology*, 145(4), 1750-1759.

Selvage, D. J., y Rivier, C. (2003). Importance of the paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway between the brain and the testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary. *Endocrinology*, 144(2), 594-598.

- Sengupta, J. N., y Gebhart, G. F. (1994). Characterization of mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the colon of the rat. *Journal of Neurophysiology*, 71(6), 2046-2060.
- Shea, V. K., Cai, R., Crepps, B., Mason, J. L., y Perl, E. R. (2000). Sensory fibers of the pelvic nerve innervating the rat's urinary bladder. *Journal of neurophysiology. Journal of neurophysiology*, 84(4), 1924-1933.
- Singh, S. R., Burnicka-Turek, O., Chauhan, C., y Hou, S. X. (2011). Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(3), 468-483.
- Smith, L. B., y Walker, W. H. (2015). Hormone signaling in the testis. *Knobil and Neill's physiology of reproduction. 4th edition. Edited by plant TM, Zeleznick AJ. Amsterdam: Elsevier*, 637-90.
- Smith, S., Janitz, A., y Campbell, J. (2016). Epidemiology of testicular cancer in Oklahoma and the United States. *The journal of the oklahoma state medical association*, 109(7-8), 385.
- Snell, R. S. (2007). Neuroanatomía clínica. Ed medica panamericana. Pag 592. https://books.google.com.mx/books?id=9AjM5_4tmMkC
- Stanton, P. G. (2016). Regulation of the blood-testis barrier. *Seminars in cell & developmental biology*, 59, 166-173. Academic Press.
- Terenghi, G., Zhang, S.Q., Unger, W.G., Polak, J.M., (1986). Morphological changes of sensory CGRP-immunoreactive and sympathetic nerves in peripheral tissues following chronic denervation. *Histochemistry*. 86 (1), 89–95.
- Thau, L., y Singh, P. (2019). Anatomy, Central Nervous System. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542179/>
- Toth, B., Patil, K. y Jae, HS (1981). Carcinogenesis of 4-(hydroxymethyl) benzenediazonium ion (tetrafluoroborate) of *Agaricus bisporus*. *Cancer research* , 41 (6), 2444-2449.

Toth, B., Patil, K., Erickson, J., y Kupper, R. (1979). False morel mushroom *Gyromitra esculenta* toxin: N-methyl-N-formylhydrazine carcinogenesis in mice. *Mycopathologia*, 68(2), 121-128.

Tubbs, R. S., Shoja, M. M., Loukas, M. (2015). Abdominal Pre-and Para-aortic and Inferior Hypogastric Plexuses. *Nerves and Nerve Injuries*, 647-658. Academic Press.

Turnbull, A. V. y Rivier, C. (1997). Inhibition of gonadotropin-induced testosterone secretion by the intracerebroventricular injection of interleukin-1 β in the male rat. *Endocrinology*, 138(3), 1008-1013.

Valli, H., Phillips, B. T., Orwig, K. E., Gassei, K., Nagano, M. C. (2015). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 1, 595-635.

Van Ranst, L., y Lauweryns, J.M., (1990). Effects of long-term sensory vs. sympathetic denervation on the distribution of calcitonin gene-related peptide and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the rat lung. *Journal of neuroimmunology*, 29(1-3), 131-138.

Wang, D., Li, F. y Jiang, Z. (2001). Osteoblastic proliferation stimulating activity of *Psoralea corylifolia* extracts and two of its flavonoids. *Planta médica*, 67 (08), 748-749.

Wang, H., Oo Khor, T., Shu, L., Su, Z. Y., Fuentes, F., Lee, J. H., y Tony Kong, A. N. (2012). Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(10), 1281-1305.

Wang, Y., Li, H., Zhu, Q., Li, X., Lin, Z., y Ge, R. S. (2019). The cross talk of adrenal and Leydig cell steroids in Leydig cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 192, 105386.

Wang-Michelitsch, J., y Michelitsch, T. M. (2015). Cell transformation in tumor-development: a result of accumulation of Misrepairs of DNA through many generations of cells. *arXiv preprint arXiv:1505.01375*.

Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., y Nieschlag, E. (2010). Physiology of testicular function. *Andrology*, 11-59.

Welsh, M., Saunders, P.T., Atanassova, N., Sharpe, R.M., y Smith, L.B. (2009) Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *The FASEB Journal*, 23 (12), 4218–4230. doi: 10.1096 / fj.09-138347

Winter, J., Bevan, S., y Campbell, E. A. (1995). Capsaicin and pain mechanisms. *British Journal of Anaesthesia*, 75(2), 157-168.

Zhang, L., Wu, L. L., Huan, H. B., Chen, X. J., Wen, X. D., Yang, D. P., y Xia, F. (2017). Sympathetic and parasympathetic innervation in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma*, 64(6), 840-846.

Zhang, X., Ye, L., Huang, Y., Ding, X., y Wang, L. (2019). The potential role of TRPV1 in pulmonary hypertension: Angel or demon? *Channels*, 13 (1), 235–246. doi: 10.1080 / 19336950.2019.1631106

Zhu, C., Palmada, M. N., Aguado, L. I., y Cavicchia, J. C. (2002). Administration of acetylcholine to the spermatic nerve plexus inhibits testosterone secretion in an in vitro isolated rat testis–nerve plexus system. *International journal of andrology*, 25(3), 134-138.

12. ANEXO 1

12.1. Evidencias de participación en congresos y actividades de divulgación

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Otorga la presente:

CONSTANCIA

A: _____

Germán León López

Por participar en la Serie de Seminarios con su plática:

PAPEL DE LA INERVACIÓN SENSORIAL EN EL DESARROLLO DE
CÁNCER TESTICULAR

"Pensar bien para vivir mejor"
H. Puebla de Zaragoza a 04 de Septiembre de 2018

Dr. Salvador Galicia Isasmendi
DIRECTOR

Dr. Rosalinda Reyes Luna
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN

Palestina Guevara Fiore
COORDINADORA DE POSGRADO



BUAP

Oficio No. FCBDIR/62/19
Asunto: Constancia

A QUIEN CORRESPONDA
PRESENTE

Por este medio, el que suscribe D. en C. Salvador Galicia Isasmendi, Director de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, hago constar que el 25 de enero de 2019 el **C. Germán León López**, en el marco de la XV Semana del Biólogo impartió el tema: **“Papel de la inervación sensorial en el desarrollo de cáncer testicular”**, durante el evento denominado “Café Científico”.

A petición del interesado, se extiende la presente constancia de participación, en la Heroica Puebla de Zaragoza, a los **veintiocho días del mes de enero de dos mil diecinueve**

ATENTAMENTE
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"


D.en C. **SALVADOR GALICIA ISASMENDI**
DIRECTOR



C.c.p. archivo
Dr.SGI/ksg*

Facultad de Ciencias Biológicas



Otorga la presente:

CONSTANCIA

A: Lic. Germán León López

Por impartir la ponencia titulada:


«Efecto de *Echeveria gibbiflora* sobre la proliferación de células testiculares»

Dentro del marco de las III JORNADAS DE REPRODUCCIÓN, BUAP

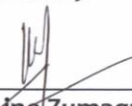
El 2 de mayo de 2019.

Pensar bien para vivir mejor
H. Puebla de Zaragoza a 2 de mayo de 2019




Dr. Salvador Galicia Isasmendi
DIRECTOR
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS




Dr. Lino Zumaquero Rios
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



BUAP

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
otorga la presente:

CONSTANCIA

A: Germán León López

Por su asistencia al **VI Congreso Nacional de Embriología**
Realizado del 02 al 04 de octubre de 2019

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z; a 04 de octubre de 2019

M.C. José Luis Gándara Ramírez
Director

Dr. Javier Sánchez Pérez
Coordinador Académico



BUAP

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
otorga la presente:

CONSTANCIA

A: Biol. Germán León López

Como Jurado Calificador del Concurso de Carteles en el Marco del
VI Congreso Nacional de Embriología
Realizado del 02 al 04 de octubre de 2019

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z; a 04 de octubre de 2019

M.C. José Luis Gándara Ramírez
Director

Dr. Javier Sánchez Pérez
Coordinador Académico



CHICAGO, IL
OCTOBER 19-23



*Neuroscience 2019
October 19 - 23
Chicago, IL*

Please let this serve to certify that

German Leon, na

has attended Neuroscience 2019, the 49th Annual Meeting of the Society for Neuroscience at McCormick Place in Chicago, IL. The person listed above has participated in the presentation listed below:

Session Type: Poster
Session Title: Neuroinflammation: Neurophysiological Responses
Session Date/Time: 10/23/2019 8:00
Presentation Number: 675.11
Presentation Title: Effects of sensory denervation on the proliferation of testicular cells

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Sincerely,

A handwritten signature in cursive script that reads "Kyle Hayden".

Kyle Hayden, CMP
Director, Meeting Programs and Attendee Services
Society for Neuroscience

Date: October 23, 2019

