



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**RECUPERACIÓN DE LA FERTILIDAD MEDIANTE LA
ADMINISTRACIÓN DE ACETIL L-CARNITINA.
LA RATA DESNERVADA SENSORIALMENTE COMO
MODELO DE ESTUDIO**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

ARTURO GUADALUPE RODRÍGUEZ RUBI

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. UBALDO QUIRÓZ LÓPEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Biol. MARIA ROSETE ENRIQUEZ

ASESORES DE TESIS:

Dra. DOLORES LÓPEZ MORALES

Dra. ROSALINA MARIA DE LOURDES REYES LUNA

MARZO 2020





BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**RECUPERACIÓN DE LA FERTILIDAD MEDIANTE LA
ADMINISTRACIÓN DE ACETIL L-CARNITINA.
LA RATA DESNERVADA SENSORIALMENTE COMO
MODELO DE ESTUDIO**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

ARTURO GUADALUPE RODRÍGUEZ RUBI

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. UBALDO QUIRÓZ LÓPEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Biol. MARIA ROSETE ENRIQUEZ

ASESORES DE TESIS:

Dra. DOLORES LÓPEZ MORALES

Dra. ROSALINA MARIA DE LOURDES REYES LUNA



MARZO 2020



Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del concejo de ciencia y tecnología del estado de Puebla (**CONCYTEP**).

Agradecimientos

A mis padres, Teodoro y Juana, por apoyarme siempre en las decisiones que he tomado.

A mis hermanos, Teodoro y Aldo, por recordarme siempre que puedo contar con ellos para lo que sea.

Al M.V.Z José de Jesús por ser el compañero de las conversaciones interesantes, el de los momentos gratos, el apoyo incondicional. Por ser inspiración en las cosas que hago y por haber trascendido en mi vida en tan solo dos años. Sin ti, este tiempo habría sido diferente.

A mis amigos, por los proyectos que compartimos, los buenos y malos momentos que pasamos durante mi estancia en la universidad.

Al M. en C: Ubaldo Quiroz y al Biol. Guillermo Tello, por enseñarme las implicaciones de hacer ciencia así como a hacerme consciente de lo que ello implica. Por los momentos de enseñanza y sus consejos.

A todo el equipo del Laboratorio de Histofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP, por recibirme y enseñarme que, además de trabajo duro, hay otros quehaceres que podemos compartir.

***L**os logros no son momentos gratos si no se incluye en ellos a las personas que lo impulsaron. Gracias a todos.*

ÍNDICE

i) Abreviaturas

1.0 Resumen	9
2.0 Introducción	10
2.1 Aparato reproductor de la rata macho: Estructura y localización	10
2.2 Aparato reproductor de la rata macho: el viaje de los espermatozoides	12
2.3 Espermatogénesis y su regulación neuroendocrina	15
2.4 Inervación: control holístico de la reproducción	19
2.5 Fibras nerviosas sensoriales: aspectos reproductivos y metabólicos	22
2.6 Capsaicina: La rata denervada sensorialmente como modelo de estudio	23
2.7 Infertilidad y esterilidad: paradojas y consideraciones	26
2.8 Acetil L- Carnitina: una molécula multifuncional	27
3.0 Antecedentes	30
4.0 Justificación	33
5.0 Hipótesis	34
6.0 Objetivos	34
7.0 Metodología	35
7.1 Tratamiento farmacológico y grupos experimentales	35
7.2 Sacrificio y procesamiento de muestras	37
7.3 Análisis estadístico	39
8.0 Resultados	40
9.0 Discusión	45
10.0 Conclusiones	51
11.0 Perspectivas	52
12.0 Anexos	53
13.0 Referencias	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del sistema reproductor de la rata macho.....	14
Figura 2: Control neuroendocrino de la espermatogénesis y esteroidogénesis.....	18
Figura 3: Inervación del sistema reproductor de la rata macho.....	21
Figura 4: Estructura molecular y mecanismo de acción de la capsaicina.....	25
Figura 5: Estructura y metabolismo de la acetil L- carnitina.....	29
Figura 6: Diseño experimental.....	36
Figura 7: Conteo espermático total.....	41
Figura 8: Conteo espermático izquierdo y derecho.....	42
Figura 9: Porcentaje de viabilidad total.....	42
Figura 10: Porcentaje de motilidad total.....	43
Figura 11: Expresión de CGRP en los testículos.....	44
Figura 12: Efectos plausibles de la capsaicina.....	53

i) ABREVIATURAS

CAPS: Capsaicina

ALGAR: Acetil L- Carnitina

VH: Vehículo

LCAR: L- Carnitina

H-P-T: Hipotálamo – Pituitaria - Testículo

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

LH: Hormona luteinizante

FSH: Hormona foliculo estimulante

LHR: Receptor de hormona luteinizante

T: Testosterona

E₂: Estradiol

DHT: Dihidrotestosterona

ABP: Proteína de unión a androgenos

CG: Ganglio celiaco

HG: Ganglio hipogástrico

IMP: Plexo mesentérico inferior

SHP: Plexo hipogástrico superior

SSN: Nervio espermático superior

LP: Plexo lumbar

CP: Plexo celiaco

PR: Plexo renal

ISN: Nervio espermático inferior

PN: Nervio pélvico

PP: Plexo pélvico

AG: Ganglios accesorios

MPG: Ganglio pélvico mayor

NPud: Nervio pudendo

HN: Nervio hipogastrico

TRP: Receptor de potencial transitorio

TRPV: Receptor vanilloide de potencial transitorio

TRPV1: Receptor vanilloide de potencial transitorio tipo uno

ATP: Adenosin trifosfato

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SP: Sustancia P

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

NK-R1: Receptor de neuroquinina 1

ROS: Especies reactivas de oxígeno

OMS: Organización mundial de la salud

HO-1: Hemioxigenasa 1

SOD: Superoxido dismutasa

NGF: Factor de crecimiento neural

ERK: Señal extracelular regulada por cinasas

OCTN2: Transportador de carnitina/catión orgánico dos

PSB

BSA-PSBT

mRNA-LHR

SST: Somatostatina

NPY: Neuropeptido Y

DRG: Ganglio de la raíz dorsal

CPT1: Carnitin-palmitoiltransferasa uno

1.0 Resumen

En los mamíferos del sexo masculino, su reproducción está regulada principalmente por el eje neuroendócrino hipotálamo-pituitaria-testículos. Aunado a éste eje existe una vía neural que permite una comunicación bidireccional entre los testículos y diversas estructuras del SNC. La comunicación neural ingresa o sale del testículo a través de los nervios espermáticos superior e inferior (SSN y ISN, respectivamente). El componente somatosensorial de la vía neural representa un vínculo en la comunicación entre los testículos y el sistema nervioso central. El bloqueo de la comunicación sensorial de manera quirúrgica o farmacológica con capsaicina hacia las fibras nerviosas sensoriales ha permitido conocer el papel de la información neural en los procesos fisiológicos de la fertilidad masculina. Además se sabe que la desnervación sensorial neonata inducida por capsaicina es irreversible. Mientras que, se ha propuesto que la acetil l-carnitina (ALCAR) es una molécula eficaz en la promoción de la actividad neuromoduladora, proponiendo la existencia de plasticidad neuronal. Es por esto que el objetivo principal de este proyecto fue analizar si la administración de ALCAR induce plasticidad neuronal que permita restablecer la comunicación sensorial y los parámetros reproductivos de la rata macho. Se usaron 30 ratas macho neonatas de la cepa CII-ZV, estas fueron distribuidas en tres grupos (n=10). Las ratas neonatas recibieron administraciones de vehículo de capsaicina (VH/) o bien de capsaicina (CAPS) en una dosis de 50mg / kg, después a los 21 días de edad se hicieron administraciones de VH de ALCAR o de ALCAR en una dosis de 50mg / kg. Los grupos fueron distinguidos según el patrón de las administraciones mencionadas; VH+ALCAR CAPS+VH y CAPS+ALCAR. A los 90 días de edad fueron sacrificados y se evaluaron los parámetros de viabilidad, motilidad y concentración espermática. También se registró el peso de los testículos, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas coagulantes y la masa corporal. Finalmente los datos fueron analizados con el paquete estadístico MiniTab. Los resultados muestran que la administración de ALCAR en ratas denervadas sensorialmente se incrementa significativamente el porcentaje de espermatozoides viables y el número total de espermatozoides en comparación a los otros dos grupos (CAPS+VH y VH+ALCAR). Mientras que en el porcentaje de motilidad de los espermatozoides se incrementó en los animales del grupo (CAPS+ALCAR) en comparación al grupo CAPS+VH; el incremento aún fue estadísticamente mayor en los animales que sólo fueron tratados con ALCAR, en comparación a los grupos CAPS+ALCAR y CAPS+VH, respectivamente. Por otro lado, en el grupo CAPS+ALCAR el peso de las vesículas seminales así como el peso corporal aumentaron significativamente ($p < 0.05$). en comparación a los otros dos grupos experimentales. Estos resultados nos permiten sugerir que la administración de ALCAR en ratas macho desnervadas con capsaicina al nacimiento restituye parámetros reproductivos, probablemente a través de mecanismos neuroendócrinos y/o neurales que permiten restablecer la comunicación sensorial entre los testículos y el SNC.

2.0 Introducción

El estudio del aparato reproductor en los mamíferos representa un quehacer clásico dentro de la fisiología de la reproducción, dicha tarea ha logrado el desarrollo del conocimiento en el área reproductiva, permitiendo con esto la resolución de problemas asociados a esta, tal como la infertilidad. Sin embargo, el funcionamiento del aparato reproductor no es unidireccional con sus causas y efectos, más bien representa una red de eventos coordinados en espacio y tiempo. Debido a esto, los expertos han volcado su atención hacia otros componentes del aparato reproductor, como la inervación. Esto permitirá explicar el fenómeno de la reproducción desde un punto de vista holista y así los tratamientos de para contrarrestar la infertilidad podrían ser más dirigidos a las necesidades de cada persona con este padecimiento.

Las problemáticas asociadas a la infertilidad siguen en aumento, a nivel mundial cerca del 15% de las parejas padece infertilidad y cerca del 50% de estos casos se debe al factor masculino mientras que el 20- 30% es por causas mixtas ([Nallella, Sharma, Aziz y Agarwal. 2006](#)).

2.1 Aparato reproductor de la rata macho: Estructura y localización

La estructura el aparato reproductor de la rata macho comprende tres elementos internos principales; los testículos, las glándulas accesorias y los conductos reproductores, así como dos elementos externos; el escroto y el pene, anatómicamente estos elementos se encuentran en el área genital. Los testículos son estructuras ovaladas pareadas que, en la etapa reproductiva, se encuentran alojados en el exterior de la cavidad abdominal dentro del saco escrotal, esto mantiene su microambiente aproximadamente a 5°C por debajo de la temperatura corporal, a su vez el musculo dartos constituye una capa muscular subcutánea y forma un septo que divide el escroto en dos compartimentos donde se alojan cada uno de los testículos. El músculo dartos junto a otros grupos musculares como el cremaster colabora para movilizar las gónadas, elevándolas en función de la temperatura ambiental. Cada testículo se encuentra envuelto, además del tejido que conforma el saco escrotal, por la túnica vaginal y la albugínea que le proveen protección y lo delimitan contribuyendo así a soportar su forma ovalada distinguiendo dos regiones principales; el polo superior y el inferior. La estructura interna del testículo está definida por la organización lobulada de

los túbulos seminíferos y cada lóbulo está separado entre sí por septos. Pese a esta organización, los túbulos seminíferos de cada lóbulo convergen en la *rete testis* hasta los conductos eferentes, los primeros conductos reproductores. Estos se encuentran en el polo superior de cada testículo y se comunican con el epidídimo, otra estructura interna del aparato reproductor que, como el testículo, es pareada. El epidídimo se divide en tres regiones principales: cabeza, cuerpo, y cola, las cuales están conformadas por una serie de arreglos tubulares altamente compactados; la cabeza se encuentra unida a un cuerpo graso y se mantiene comunicada con el testículo a través de los conductos eferentes, esta región mantiene una estructura lobular cerca del polo superior del testículo y se adelgaza hacia el polo inferior del mismo formando el cuerpo del epidídimo el cual recorre longitudinalmente por el testículo disminuyendo la compactación de los túbulos (Liu, 2019)

Después de esta estructura se encuentra la cola del epidídimo donde los túbulos adquieren nuevamente un arreglo lobular compacto. Unido a esta última región se encuentra el conducto deferente, un segundo conducto reproductor conformado por una capa relativamente gruesa de músculos circulares y longitudinales, alojado dentro del escroto asociado a tejido conectivo, vasos sanguíneos, nervios y ramas linfáticas en una estructura conocida como cordón espermático. Los conductos deferentes de cada cola del epidídimo se extienden de forma superior hacia la cavidad abdominal a través del canal inguinal de la pared abdominal y posteriormente continúan por la cavidad pélvica hacia la región posterior de la vejiga urinaria donde se engrosa formando una ampolla y convergen en la uretra. La ampolla del conducto deferente lo comunica con otras estructuras como las vesículas seminales las cuales representan a dos estructuras emparejadas en forma de hoz ubicadas por encima de la vejiga urinaria conformadas por células granuladas cuyas secreciones son vertidas a la luz de las mismas (Knoblauch, 2012; Kareiva y Rose, 2014; Clement y Giuliano, 2016). De forma pareada y asimétrica dentro de la curvatura de cada vesícula seminal se encuentran las glándulas coagulantes (Bindu, Kishore, Raju, Nagamalleswari y Makkena, 2017). Posteriormente, el conducto eyaculador que es, un tercer conducto reproductor formado por el acortamiento de la ampolla, comunica a la próstata con la vía espermática. Esta estructura se localiza anterior al recto por debajo de la vejiga urinaria y esta regionalizada en cuatro lóbulos: ventral, dorsal, lateral y anterior (o glándula del coágulo) cada uno constituidos por tejido muscular y glandular. Posterior a esta región se encuentran dos sacos pequeños conocidos como glándulas de Cowper o

bulbouretrales las cuales contribuyen a la lubricación del pene así como a la remoción de compoens de la orina a través del mismo, esta función también está asociada con las secreciones de las glándulas prepuciales (en ratas) alojadas en la parte más distal de la uretra. A este nivel anatómico es posible distinguir tres regiones uretrales; la uretra prostática; la uretra membranosa conformada por células musculares del esfínter estriado; y la uretra peneana que tiene lugar antes del meato urinario. Finalmente, el pene, órgano copulador del macho, aloja el último segmento de la uretra donde se forma el meato, un orificio en común para eventos urinarios y eyaculatorios (Figura 1-a). El pene, en su estado fisiológico eréctil, está asociado con la cópula y se le relaciona mayormente con la excitación pre-copulatoria (**Adebayo, Akinloye, Olurode, Anise, y Oke, 2011**).

Anexo a las estructuras anteriormente mencionadas existe una red de nervios, vasos sanguíneos y linfáticos que contribuyen a la regulación y mantenimiento del aparato reproductor. Los cordones espermáticos representan un puente entre el testículo y otros sistemas, se encuentra constituido por elementos musculares (prolongación del musculo cremaster), vasculares (arteria espermática, arteria del conducto deferente y plexo pampiforme), linfático (nodos linfáticos lumbares e iliacos) y nervioso (nervio espermático, plexo renal, plexo mesentérico y fibras simpáticas) (**Liu, 2019**). Este conjunto de elementos contribuyen al control holístico de la función testicular.

2.2 Aparato reproductor de la rata macho: el viaje de los espermatozoides

El aparato reproductor de la rata es muy similar a la de otros mamíferos tales como los primates, y su actividad fisiológica preferente involucra los tres elementos antes mencionados; gónadas, conductos reproductores, glándulas reproductivas y órgano copulador (**Domínguez, 1997**). Los testículos albergan cientos de túbulos seminíferos que alojan al epitelio germinal, el cual es sostenido y nutrido por las células de Sertoli quienes forman la barrera hematotesticular. Dicha barrera mantiene a las células haploides de la línea germinal aisladas del sistema inmune. Por otro lado, en el tejido intersticial es decir, entre los túbulos seminíferos se encuentran vasos sanguíneos, tejido conectivo, células musculares y células de Leydig, las cuales están asociadas a la producción y control de andrógenos, principalmente la testosterona. Ésta hormona es

uno de los principales factores que estimulan y regulan el proceso de espermatogénesis (producción de espermatozoides).

Los espermatozoides producidos inician su viaje desde la luz de cada túbulo seminífero y son arrastrados, por contracciones de las células miodes peritubulares, hacia la *rete testis*, donde convergen, y continúan por los conductos eferentes hasta llegar al epidídimo donde serán arrastrados por contracciones de las células de la musculatura lisa desde la cabeza hasta la cola del mismo. En la región luminal de los túbulos del epidídimo se genera un microambiente especializado rico en proteínas, entre ellas, enzimas antioxidantes relacionadas principalmente con la protección y maduración de los espermatozoides previéndoles movilidad a partir de la activación de la dineína y de este modo su capacidad fecundante se hace evidente (Parra y del Sol, 2002). Durante el evento eyaculatorio los espermatozoides viajan por el conducto deferente hasta las ampollas y los conductos eyaculadores donde tienen contacto con las vesículas seminales, las cuales secretan un fluido rico en fructuosa que les provee un medio nutritivo, además de representar el 50-80% del volumen del eyaculado. Así mismo las glándulas coagulantes vierten su contenido a los espermatozoides, sin embargo, la funcionalidad de este se ha asociado únicamente a la participación en la generación del tapón vaginal (Bindu, Kishore, Raju, Nagamalleswari y Makkena, 2017). Después de pasar por el conducto eyaculador, los espermatozoides atraviesan por la uretra prostática donde convergen con la próstata, esta secreta una sustancia blanquecina de naturaleza alcalina conocida como líquido prostático. Dicha característica protege a los espermatozoides del microambiente ácido de la vagina. Por otro lado el componente muscular de la próstata también contribuye a la eyaculación, contrayéndose coordinadamente con otros grupos musculares como el musculo bulbocavernoso. El siguiente segmento por el que pasan los espermatozoides es la uretra membranosa, donde coinciden con los fluidos de las glándulas bulbouretrales las cuales inician su actividad secretora durante la pre-cópula. Es por esto que se le ha asociado a la remoción de componentes de la orina y lubricación del pene principalmente. Enseguida los espermatozoides son arrastrados hacia la uretra peneana donde tienen contacto con las secreciones de las glándulas prepucales las cuales, al igual que las glándulas bulbouretrales, se les ha relacionado principalmente con la actividad pre-copulatoria (Pacey y Williams, 2018; Córdova, 2009).

Los espermatozoides en conjunto con los productos de las glándulas reproductoras forman el fluido seminal y son arrastrados por contracciones musculares a través de la

uretra hasta ser expulsados por el pene en la eyaculación. Este evento conduce el fluido seminal a la vagina, la parte del fluido que contiene a los espermatozoides atraviesa el cérvix y continúa su recorrido por los cuernos uterinos, mientras que el resto del fluido se endurece en la vagina formando el tapón vaginal, una estructura considerada como estrategia reproductiva en la rata (**Lucio y Tlachi-López, 2008**) Ya en el útero los espermatozoides culminan su viaje con el proceso de capacitación y fecundación del ovocito. En el humano, este evento toma lugar en el primer tercio del oviducto y está caracterizado por desencadenar dos reacciones, la acrosomal, en el espermatozoide y la cortical en el ovocito. La fecundación termina cuando se da la formación del cigoto, el cual es arrastrado hasta el útero donde se desarrolla para dar lugar a un nuevo organismo (**Recuperado de <https://embryology.med.unsw.edu.au>**). Este proceso está acompañado por los diferentes oligoelementos del fluido seminal cuya interacción con el útero le permiten modular la interacción del espermatozoide en el tracto reproductor de la hembra (**McGraw, Suarez y Wolfner, 2014**).

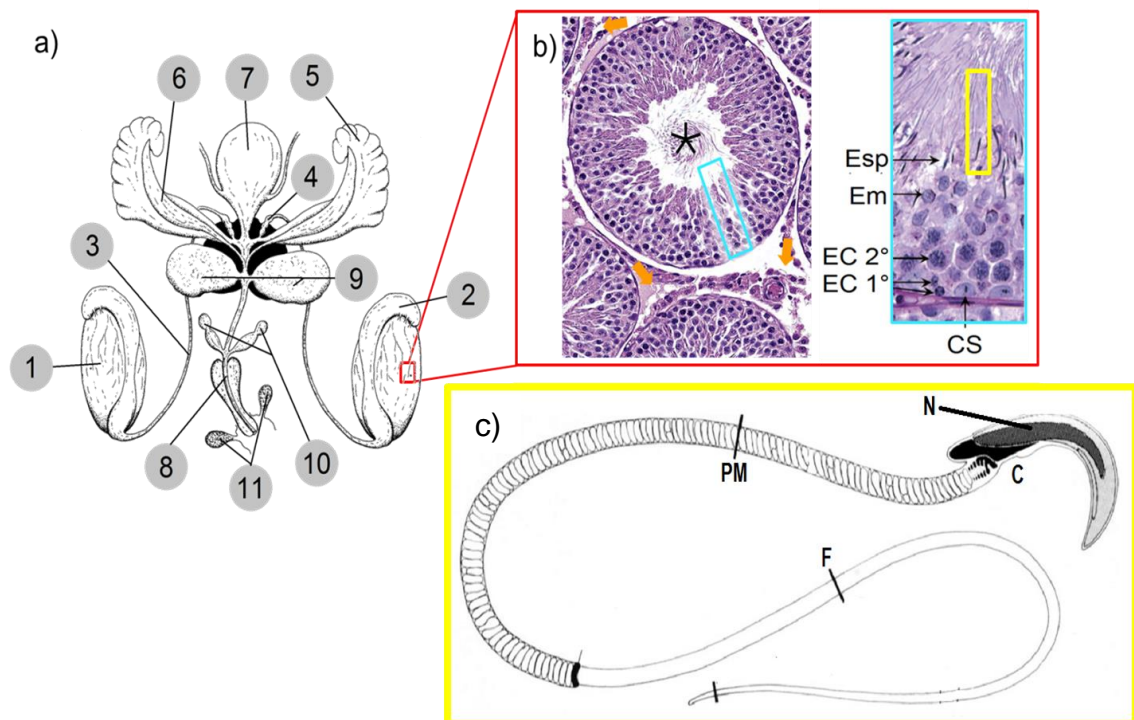


Figura 1 | Estructura del sistema reproductor de la rata macho. a) Morfología del aparato reproductor de la rata macho. 1; testículo, 2; epidídimo, 3; conductos deferentes, 4; ampollas, 5; vesículas seminales, 6; glándulas del coagulo, 7; vejiga urinaria, 8; cuerpo del pene, 9; próstata, 10; glándulas bulbouretrales, 11; glándulas prepuciales. b) Estructura de los túbulos seminíferos donde se muestra el espacio intersticial (flechas en anaranjado) y el epitelio germinal (rectángulo azul) donde se aprecian los espermatozoides (Esp), las espermatogonias (Em), los espermatoцитos primarios y secundarios (EC 1y 2) así como las células de Sertoli (CS). c) Morfología de un espermatozoide de rata donde se aprecia el núcleo (N) la cabeza (C), la pieza media (PM) y el flagelo (F). **Modificado de DG, H. L. P. R. C., y Smith, 2010; Creasy y Chapin, 2018.**

2.3 Espermatogénesis y su regulación neuroendocrina

Como ya se mencionó anteriormente el proceso de espermatogénesis, tiene lugar en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos, que consiste en la diferenciación y proliferación celular para generar gametos masculinos y esta conservado en la mayoría de los animales (Roosen-Runge, 1977). Este proceso inicia con la fase de proliferación caracterizada por una población de células diploides formada durante la vida embrionaria que en la edad reproductiva se multiplican por mitosis (espermatogonia tipo A), cuando parte de esta población deja de dividirse (espermatogonia tipo B) da lugar a la fase meiótica donde se forman espermatocitos primarios en los cuales se detona la primera división meiótica, caracterizada por una profase I donde se da el proceso de alineamiento de los cromosomas homólogos y el entrecruzamiento de los mismos permitiendo que cada célula resultante sea diferente entre sí, esta fase puede durar hasta tres semanas (Kasuga, Aigaki y Osanai, 1999). La primera división meiótica termina con la formación de dos células llamadas espermatocitos secundarios. Los cuales carecen de una fase S en su interface, por tanto, al iniciar los espermatocitos secundarios la segunda fase meiótica inicia como células diploides y al final se originan dos células haploides, es decir por cada espermatogonia tipo B se forman cuatro células haploides conocidas como espermátides. Finalmente, estas últimas pasan por un proceso llamado espermiogénesis en el cual atraviesan cambios morfofisiológicos dando lugar a espermatozoides diferenciados. Durante este proceso las espermátides sufren elongación (elongación nuclear) y la formación del flagelo, generando así la formación del cuerpo acrosomal a partir del aparato de Golgi, la parte anterior del flagelo, a partir del re-arreglo de las mitocondrias y finalmente la disminución del citoplasma. Estos cambios nos permiten distinguir en cada espermatozoide tres regiones principales: cabeza, pieza media y cola/flagelo (Figura 1-c) (Cheng y Mruk, 2015).

Cada componente de este proceso se distribuye a lo largo del epitelio germinal de los túbulos seminíferos sostenidos por las células de Sertoli, entre éstas células se ubica la línea germinal, hacia la región basal del túbulo se ubican las espermatogonias tipo A seguidas de las espermatogonias tipo B, en otro estrato separado por la barrera hematotesticular se encuentran los espermatocitos primarios y secundarios, por último, más cercano a la luz de los túbulos se distribuyen las espermátides seguidas de los

espermatozoides ya diferenciados y liberados hacia la luz del túbulo en un proceso conocido como espermiación (Figura 1-b)(**Holstein, Schulze y Davidoff, 2003; Cheng y Mruk, 2012**).

El eje neuroendocrino hipotálamo – pituitaria – testículos (H-P-T) es uno de los responsables de la regulación extrínseca de los procesos de espermatogénesis y esteroidogénesis. Dicha regulación inicia en el hipotálamo donde las neuronas de kisspeptinas estimulan la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) a través de neuronas GnRHérgicas, Los pulsos de GnRH liberados llegan a la hipófisis (pituitaria) y se unen a los receptores de membrana de las células que residen en esta región iniciando así una cascada de señalización a partir de la unión a receptores acoplados a proteína-G (R-GnRH). Estos eventos resultan en la expresión genética de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) las cuales son sintetizadas y expulsadas por exocitosis al medio extracelular donde tienen contacto con vasos sanguíneos. Esta liberación sucede gracias al aumento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular (**Winters y Huhtaniemi, 2017**).

Las hormonas gonadotropinas LH y FSH son arrastradas por el sistema circulatorio al resto del cuerpo donde tendrán contacto con diferentes órganos diana, hasta llegar a los testículos. Dentro de los testículos la LH se une a las células de Leydig a través del receptor de membrana asociado a proteína G (LHR). Esta unión desencadena una cascada de señalización que provoca la síntesis de testosterona (T), estradiol (E_2) y dihidrotestosterona (DHT) las cuales participan en la regulación de otros procesos reproductivos, este proceso es conocido como esteroidogénesis. Localmente la T se incorpora a los vasos sanguíneos aledaños a las células de Leydig en el intersticio de los túbulos seminíferos llegando a otras estructuras del aparato reproductor como el epidídimo, las vesículas seminales y la próstata, y por otro lado llega al epitelio germinal a través de ligando intermedios y se une a la proteína de unión a andrógenos (ABP) en la membrana de las células de Sertoli y otros componentes del epitelio germinal donde se le ha asociado a la regulación de la espermiación (**Kumar et al., 2015**). Además de la LH, la esteroidogénesis está regulada por la acción de la prolactina, otra molécula liberada por la glándula hipófisis (**Creasy y Chapin, 2018**). Así mismo, uno de los blancos de la FSH son las células de Sertoli donde, junto con la T, contribuye al mantenimiento de las actividades de estas células de las cuales podemos resaltar el de proporcionar soporte estructural y metabólico a las células germinales, la secreción del fluido tubular para el transporte de espermatozoides, el mantenimiento de la barrera

hematotesticular, la secreción de inhibina y ABP así como la regulación del proceso de espermatogénesis (Figura 2) (Zini, 2011).

La actividad de secreción de GnRH, LH y FSH es autorregulada de forma endocrina principalmente por la T, el E₂, la DHT y la inhibina, productos generados a partir de esta vía, a este fenómeno se le conoce como autorregulación negativa. La leptina y la grelina, producidas en células del tejido adiposo y en las glándulas oxínticas del fondo gástrico respectivamente, se unen a la autorregulación de este eje neuroendocrino (McCann *et al.*, 2001; Tena-Sempere, 2007). Esta autorregulación también está influenciada por estímulos externos censados por la visión, la olfacción, la audición y el tacto a través de neuronas del sistema sensorial (Bustos-Obregón y Torres-Díaz, 2012). Actualmente se sabe que el eje H-P-T no es el único responsable en la regulación de las funciones testiculares, sino que, aunado a este existe un sistema de nervios que comunican a las gónadas con el sistema nervioso central y que además esta comunicación neural es asimétrica para cada gónada, es decir, las rutas de inervación son diferentes entre gónada izquierda y derecha (Gerendai, Csaba, Vokó y Csernus, 1995).

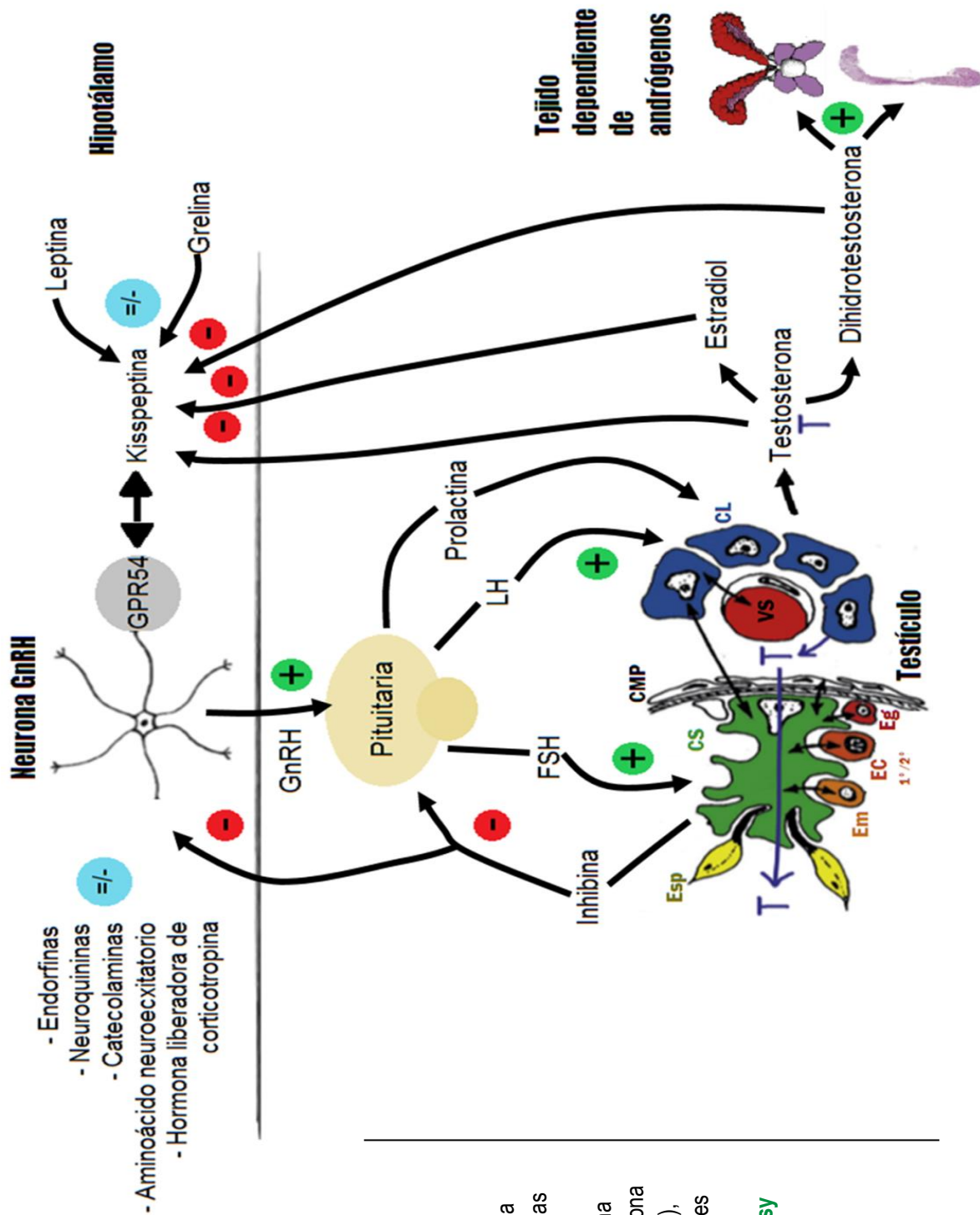


Figura 2 | Control neuroendocrino de la espermatogénesis y la esperidogénesis; Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), testosterona (T), vasos sanguíneos (VS), células mioideas peritubulares (CMP), células de Leydig (CL). **Modificado de Creasy y Chapin, 2018.**

2.4 Inervación: control holístico de la reproducción

Las estructuras genitales y perigenitales poseen inervación extrínseca por medio de las cuales reciben y envían información a través de fibras nerviosas autonómicas de los sistemas simpáticos, parasimpáticos y de fibras nerviosas somáticas a través de los sistemas somatomotor y somatosensorial haciendo más fino el control de los procesos relacionados con la reproducción.

El sistema nervioso simpático o toracolumbar posee neuronas preganglionares que se localizan en la región lateral de la sustancia gris de los segmentos T12-L2 y se proyectan hacia los ganglios celiaco (CG) e hipogástrico (HG) generando los nervios espláncnicos superior, menor y lumbar, este último posee neuronas cuyas proyecciones recorren los plexos mesentérico inferior (IMP) e hipogástrico superior (SHP), así mismo sus fibras postganglionares inervan estructuras localizadas por debajo del diafragma (**Clement y Giuliano, 2015**). Dentro del aparato reproductor del macho podemos destacar dos nervios importantes dentro de este sistema de inervación al testículo; el nervio espermático superior (SSN) el cual representa la mayor contribución de inervación al testículo y recorre el ganglio mesentérico superior, siguiendo la arteria testicular en el cordón espermático por los plexos Lumbar (LP) y celiaco (CP) y renal (RP), y el nervio espermático inferior (ISN) que se origina del ganglio mesentérico inferior, sigue la región lumbar-esplágnica y recorre por la vía deferente inervando al testículo pasando previamente por el epidídimo (**Sosa et al., 2009**).

El otro componente nervioso que contribuye a la inervación extrínseca del aparato reproductor masculino es el sistema nervioso parasimpático o craneosacral. Este se origina en el tallo cerebral y en las secciones intermediolaterales de la sustancia gris de la medula sacra (S2-S4) y sus fibras inervan los órganos genitales externos, entre otras estructuras como el recto, la prostata y la vejiga urinaria. Las fibras preganglionares de este sistema viajan a través del nervio pélvico (PN) y se comunican con neuronas postganglionares en el plexo pélvico (PP), su actividad ha sido relacionada principalmente con la erección y la eyaculación (**Manzo et al., 2000**).

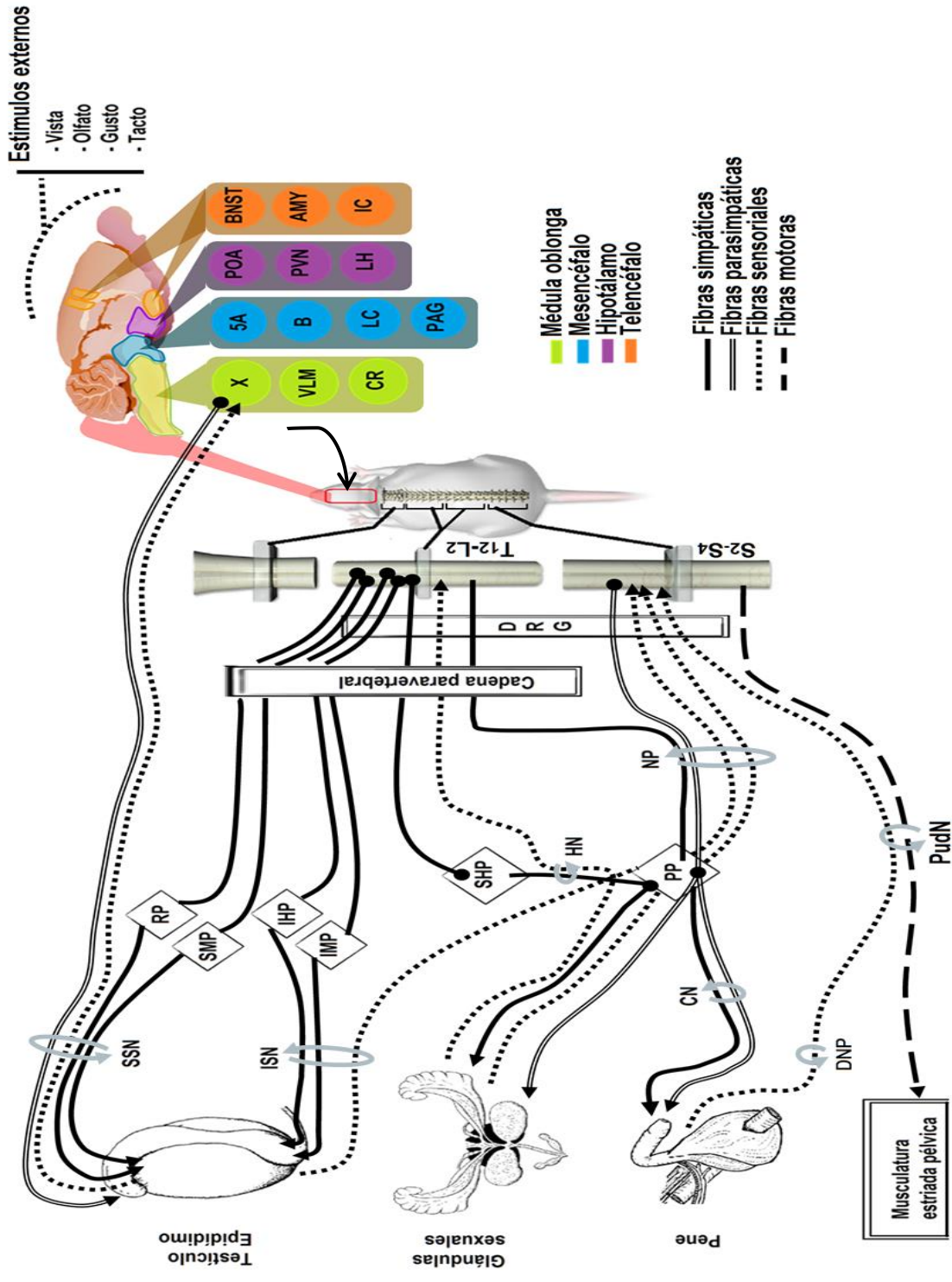
En la rata macho el PP está formado bilateralmente por ganglios accesorios (AG) y por el ganglio pélvico mayor (MPG), este último contiene fibras nerviosas postganglionares simpáticas, parasimpáticas y sensoriales que inervan a la próstata, las vesículas

seminales, las glándulas bulbouretrales, los testículos, el pene, el recto, el colon descendente y la vejiga urinaria, por otro lado los AG proyectan sus nervios innervando las ampullas, las glándulas coagulantes, las vesículas seminales, los conductos deferentes y la vejiga urinaria (**Luckensmeyer y Keast, 1994; Luckensmeyer y Keast, 1995; Luckensmeyer y Keast, 1998; Arellano, Xelhuantzi, Mirto, Hernández y Cruz, 2019**). Las neuronas del MPG proyectan sus axones a través del nervio pélvico y este converge con el nervio pudendo (PudN) e ingresan en los segmentos medulares L6–S1 (**Arellano et al., 2019**). Por otra parte, se sabe que la ablación de los AG provoca infertilidad en la rata macho reduciendo su éxito de preña (**Arellano-Hernández, 2019**)

Las fibras nerviosas del sistema somatomotor poseen neuronas con somas en los segmentos S1-S4 de la médula y sus axones recorren por el PudN hasta el músculo estriado del piso pélvico. Finalmente, las fibras nerviosas sensoriales relacionadas con la vía reproductiva masculina pueden dividirse en dos; la primera incluye neuronas sensoriales primarias cuyos axones recorren a través del NPd y sus somas se alojan en el ganglio de la raíz dorsal de los segmentos S2-S4. Una segunda vía es constituida por fibras nerviosas que viajan a través del nervio hipogástrico (HN) después de recorrer por segmentos lumbosacrales (**McKenna, 1999**). Los blancos de muchas de estas fibras son vasos sanguíneos, piel, tejido parenquimatoso, pene, glándulas accesorias del aparato reproductor y testículos (Figura 3).

En la rata, la innervación extrínseca asociada a los testículos es de naturaleza simpática, parasimpática y sensorial, además se le ha relacionado con la actividad de núcleos específicos en el SNC, tales como núcleo del tracto solitario, el núcleo caudal de Rafé, el locus coeruleus, el área pre-óptica, la amígdala central, la corteza insular y el área lateral del hipotálamo. Estas descripciones fueron posible gracias a la técnica de trazado viral trans-sináptico (**Gerendai, Toth, Boldogkői, Medveczky, y Halasz, 2000**). Del mismo modo, la actividad en la innervación de los epidídimos, con característica y naturaleza similar a la de los testículos, está relacionada con la actividad de los núcleos antes mencionados implicados en la innervación testicular, además se incluirían a los núcleos de Barrington y los núcleos paraventriculares hipotalámicos (**Gerendai et al., 2001**). Esta evidencia nos permite presumir de una relación fisiológica significativa entre las estructuras reproductivas, particularmente los testículos y los epidídimos, y su innervación extrínseca, es decir, el componente neural de cada estructura está asociado a la regulación de su función.

Figura 3 | Inervación del sistema reproductor de la rata macho. Las flechas indican la dirección de la información nerviosa, la cual atraviesa en conjunto en forma de nervios por diferentes ganglios y plexos: Nervio espermático superior (SSN), nervio espermático inferior (ISN), nervio cavernoso (CN), nervio dorsal del pene (DNP), nervio pudendo (PudN), nervio hipogástrico (HN), nervio pélvico (NP), plexo pélvico (PP), plexo hipogástrico superior (SHP), plexo mesentérico inferior (IMP), plexo hipogástrico inferior (IHP), plexo mesentérico superior (SMP), plexo renal (RP), ganglio de la raíz dorsal (DRG). Una vez que la información de los testículos llega al sistema nervioso central el cual proyecta neuronas al testículo desde las siguientes estructuras: A5: grupo de células noradrenergicas; AMY: amígdala; B: núcleo de Barrington; BNST: base del núcleo de estria terminalis; CR: núcleo de raphe caudal; IC: corteza insular; LC: locus coeruleus; LH: hipotálamo lateral; PAG: Sustancia gris



2.5 Fibras nerviosas sensoriales: aspectos reproductivos y metabólicos

Los estímulos sensoriales son de gran importancia para el reino animal en los procesos de interacción inter e intraespecífica, socialización, toma de decisiones y reproducción. Se sabe que durante la cópula de las ratas el macho logra un nivel sexual crítico para alcanzar la eyaculación en condiciones preferentes, según su experiencia, parte de los componentes involucrados en este evento es la información sensorial provista a la rata macho desde los órganos genitales y la provista como incentivo a través del oído, la visión y el olfato (**Georgiadis, Kringelbach y Pfaus, 2012**). Particularmente el olfato, está relacionado con la integración quimiosensorial y la actividad endocrina (e.g. captación de sustancias relacionadas con la pre-cópula) pre-copulatoria. Un estudio en ratones develó que la renovación neuronal o neurogenesis del bulbo olfatorio accesorio, es crucial para que los procesos de cortejo, cópula, gestación e incluso lactancia se lleven a cabo de forma correcta (**Schellino et al., 2016**). Las diversas respuestas e interpretaciones de los organismos ante diferentes estímulos externos e internos dependen de las características de las fibras nerviosas activadas, en este caso la amplia y diversa conformación del sistema somatosensorial presente en arreglos diferentes a lo largo del cuerpo provee información determinante en la toma de decisiones.

El sistema somatosensorial está conformado por diferentes grupos neuronales que según el tipo de receptor de acuerdo con la transducción sensitiva podrán ser clasificados en termocepción, mecanocepción y nocicepción, en conjunto representan para los diferentes grupos de animales la primera línea de reconocimiento de formas, texturas, fuerzas, etc. Otra división está definida por las características de los receptores ya que pueden presentar arreglos diferentes, adoptando especializaciones funcionales (e.g: corpúsculos de Pacini y Meissner), o bien presentar terminaciones nerviosas libres, asociadas a especializaciones en nocicepción y termorrecepción. También pueden ser clasificadas según la velocidad de conducción de energía y tamaño del axón en fibras tipo $A\alpha$, β y δ , rápidos y lentos respectivamente, B y C. Los axones tipo A son los más grandes y rápidos, seguidos de los de tipo B, y los más lentos son los axones tipo C amielínicos. Los estímulos dolorosos o nociceptivos y térmicos se encuentran relacionados principalmente con las fibras C y $A\delta$ (**Fitzpatrick, 2010a**).

El reconocimiento de estímulos dolorosos se debe al proceso de transducción eléctrica, este evento permite el censado, la interpretación y la respuesta que el organismo dé en función del estímulo. De forma general, la categorización de las señales dolorosas considera un estímulo agudo, conocido como primer dolor (reconocido por fibras A δ), y un estímulo tardío difuso y duradero, conocido como segundo dolor (reconocido por fibras C). Sin embargo, dada la diversidad de estímulos, ha sido difícil el estudio del dolor de forma puntual. Aunque actualmente se asocia la actividad de reconocimiento de estímulos a canales catiónicos de potencial transitorio (TRP) (Fitzpatrick, 2010b).

La transducción de estímulos sensoriales así como la iniciación de procesos inflamatorios ante daño tisular se han asociado estrechamente a los canales catiónicos TRP, ya que su característica ion selectiva les permite responder a una amplia gama de estímulos. Particularmente, los estímulos térmicos y nociceptivos se encuentran asociados a canales vanilloides de potencial transitorio tipo 1 (TRPV1), estos se encuentran distribuidos en las membranas plasmáticas y organelos en neuronas tipo A δ y C principalmente (Pecze, Viskolcz y Oláh, 2017; Fitzpatrick, 2010b). El canal TRPV1 es un homotetrámero permeable a cationes monovalentes y divalentes que contiene seis dominios transmembranales con un poro hidrofóbico entre los dominios cinco y seis, además sus terminales amino y carboxilo se encuentran en el espacio citoplasmático, es decir, dentro de la célula o del organelo (Smutzer y Devassy, 2016). La actividad de este canal genera potenciales de acción que pueden ser interpretados como ardor o comezón, o bien iniciar procesos inflamatorios, dicha actividad es gatillada por su estimulación a través de factores indirectos, dentro de estos últimos encontramos receptores de serotonina, adenosina trifosfato (ATP), histamina, proteasas y bradiquininas, o bien por factores directos como temperaturas elevadas, acidosis, gradientes de sodio (Na⁺) y calcio (Ca²⁺), agonistas endógenos y exógenos como los vanilloides (Anand y Bley, 2011).

2.6 Capsaicina: La rata denervada sensorialmente como modelo de estudio

La capsaicina (CAPS; C₁₈H₂₇NO₃) es un protoalcaloide del grupo de los vanilloides presente en especies vegetales del género *Capsicum* de la familia *Solanaceae*, es decir, en la mayoría de las especies de chiles y algunas especies como la canela. Su estructura molecular consta de un anillo aromático del grupo vanilil (cabeza), una amina

como pieza central y una cola alifática de carácter hidrofóbico, esto la hace una molécula altamente permeable a la membrana plasmática (Figura 4-a) (Frias y Merighi, 2016).

Fisiológicamente la CAPS representa un potente y selectivo agonista exógeno del canal TRPV1 presente en fibras sensoriales primarias nociceptivas, como ya se mencionó (Figura 4-b). La activación de este canal por la acción de CAPS desencadena una serie de eventos decisivos en el funcionamiento celular; primeramente promueve el aumento de Calcio (Ca^{2+}) intracelular generando un gradiente iónico que produce la despolarización de la neurona, esta información recorre a través del axón y por la médula espinal hasta llegar al SNC donde el estímulo es interpretado como ardor, comezón, quemor etc. Por otro lado, se induce la liberación de la Sustancia P (SP) y el Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP) a partir de la activación indirecta de receptores de neuroquinina 1 (NK-R1) y del receptor de CGRP respectivamente (Holzer, 1998). Estos dos importantes neuropéptidos tienen efecto sobre la micro vascularización y la vasodilatación, lo que permite el incremento de la permeabilidad vascular y favorece la reacción pro-inflamatoria por citoquinas, también inducen dilatación microvascular, provocando el aumento del flujo sanguíneo (Brain, Tippins, Morris, MacIntyre y Williams, 1986).

Actualmente existen tratamientos en los cuales se emplea CAPS en dosis pequeñas y controladas para aliviar el dolor periférico localizado, así como para combatir padecimientos tumorales, cutáneos y de obesidad (Georgescu *et al.*, 2017). Sin embargo, el empleo de dosis elevadas y/o crónicas reduce progresivamente la reacción inflamatoria inicial, además de tener efectos neurotóxicos, desensibilizando las neuronas ante estímulos externos o internos por la retracción de la terminal axónica o por la destrucción de las mismas (Basith, Cui, Hong y Choi, 2016). Dicha acción neurotóxica es generada por la sobre estimulación del canal TRPV1 lo cual permite un incremento considerable de Ca^{2+} intracelular aumentando a su vez la expresión de proteasas dependiente de Ca^{2+} , también tiene efecto sobre las mitocondrias entorpeciendo su funcionalidad, estas modificaciones provocan el desmantelamiento del citoesqueleto, disfuncionalidad mitocondrial y modificación de la expresión genética lo cual, finalmente, es causa de la retracción del axón de las fibras nerviosas aferentes nociceptivas o bien de su muerte (Figura 4-c). Esto la ha convertido en una herramienta fiable para el estudio de la importancia relativa de las fibras nerviosas en las que repercute; fibras sensoriales principalmente (Hiura, 2000).

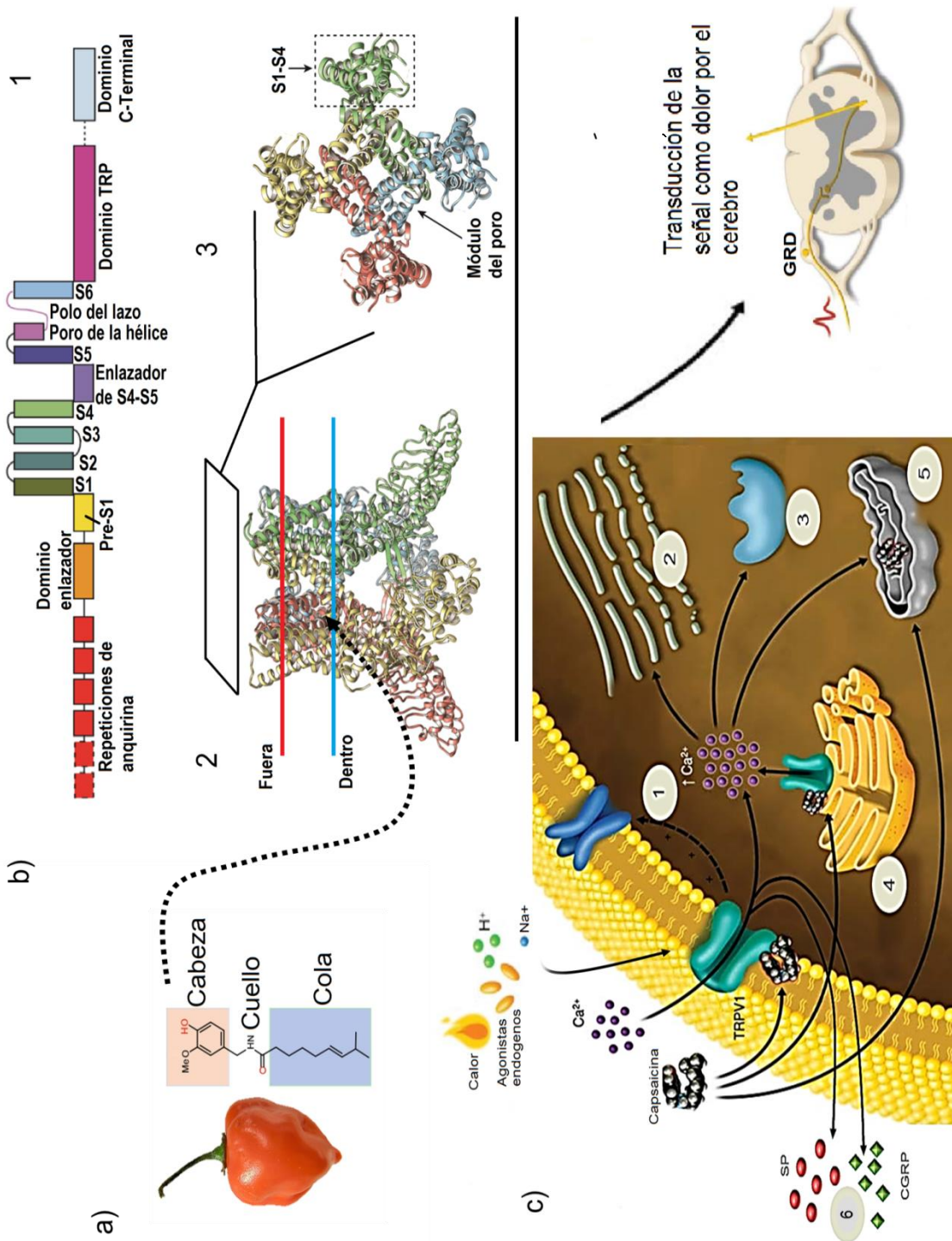


Figura 4 | Estructura molecular y mecanismo de acción de la capsaicina. a) Chile habanero y esquema en bastones de la capsaicina. b) Receptor y canal TRPV1, 1; arreglo molecular del receptor TRPV1, 2; estructura cuaternaria del canal TRPV1 donde se señala el sitio de unión de la capsaicina (flecha punteada) la cual atraviesa la membrana plasmática (MP), 3; vista superior del canal TRPV1 donde se aprecia mejor la unión de sus cuatro dominios para formar el poro. c) Consecuencias celulares de la unión prolongada de capsaicina al canal TRPV1; 1. Inactivación de canales de sodio (NA⁺), 2. Desmantelamiento del citoesqueleto, 3. Activación de proteasas dependientes de calcio, 4. Liberación de calcio del retículo entoplasmático rugoso, 5. Liberación de mitocondrial y 6. Liberación de

2.7 Infertilidad y esterilidad: paradojas y consideraciones

El control de los procesos relacionados con la reproducción es altamente complejo e involucra la participación paralela de las vías reproductivas neuroendocrinas y neurales, dicha participación es sumamente coordinada por lo que la falla en alguna de estas vías y sus componentes repercute de forma sutil o severa en la reproducción. Dichas repercusiones pueden derivar en un diagnóstico médico de infertilidad que, según su tipo, resulte posible prescribir un tratamiento simple o alternativas más sofisticadas para contrarrestarla y lograr parámetros de fertilidad saludables. Este problema de salud representa al 15% de las parejas en edad reproductiva y el 40-50% de estas es a causa del factor masculino, dichas cifras siguen en aumento, haciendo de este un problema de carácter mundial (**Sharlip et al., 2002**). Los principales problemas involucrados en la infertilidad masculina pueden ser divididos en tres; post-testiculares, testiculares y pre-testiculares. Es en este último donde se agrupan los desórdenes de carácter endocrino y neural, dichos problemas pueden ser gatillados por factores congénitos, externos e idiopáticos (**de Kretser, 1997; Dohle et al., 2005**). Particularmente el estrés oxidativo es uno de los problemas metabólicos que acompaña este tipo de padecimientos mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales se presentan en los diferentes niveles celulares relacionados con la reproducción, incluidos los espermatozoides, alterando significativamente la morfología, motilidad y genética de los mismos. Esto lleva, eventualmente, a problemas de fertilidad (**Makker, Agarwal y Sharma, 2008**).

Existen diferentes pruebas para determinar el estado potencial de fertilidad masculina permitiendo generar un diagnóstico y con base en este proponer un tratamiento viable ante el problema de infertilidad. Una de estas pruebas es el Espermograma o Seminograma estandarizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y actualizado desde 1980. Estas pruebas incluyen diferentes evaluaciones agrupadas en parámetros macro y microscópicos, en estos últimos se incluyen la motilidad, la viabilidad y la concentración espermática principalmente, además indica los rangos de discriminación de los valores evaluados para su interpretación (**Kumar y Singh, 2015**). No obstante se recomienda reconsiderar los límites saludables de algunos parámetros espermáticos múltiples pruebas para obtener un diagnóstico más certero (**Nallella, Sharma, Aziz y Agarwal, 2006**).

Uno de los procedimientos alternativos en parejas con problemas de infertilidad severos que desean tener hijos es la técnica de Inyección Espermática Intracitoplasmática (ICSI). Este tipo de procedimiento requiere de equipo y personal especializado por lo que resulta costoso para determinados sectores de la población infértil. Por otro lado, se han reportado malformaciones, defectos genéticos y congénitos en pacientes nacidos a partir de esta técnica (**Bonduelle et al., 1996**). En contraste existen otros tratamientos menos costosos que permiten el restablecimiento de parámetros de fertilidad espermática basados en el consumo sistematizado de vitaminas y antioxidantes como la acetil L-Carnitina (**Adewoyin et al., 2017**).

2.8 Acetil L- Carnitina: una molécula multifuncional

La Acetil L- Carnitina (ALCAR) es una molécula endógena perteneciente al grupo de las acilcarnitinas derivada de la acetilación de la L-carnitina que principalmente se encuentra en hígado, riñones, epidídimo y cerebro, relacionada con el metabolismo celular, principalmente con la movilización de ácidos grasos, la homeostasis de membranas, el mejoramiento energético, la acción antioxidante y la plasticidad sináptica (**Jones, McDonald y Borum, 2010**). Su relevancia metabólica ha permitido el desarrollo de suplementos alimenticios a base de LCAR y ALCAR con la finalidad de aumentar el rendimiento físico a partir de la generación de energía (**Fielding, Riede, Lugo y Bellamine, 2018; Iossa et al., 2002**), además, recientemente se le ha relacionado con la reparación del daño neurológico y la protección ante estrés metabólico a través del restablecimiento de la actividad mitocondrial y la modulación de la expresión genética por lo que se ha convertido en una molécula beneficiosa ante el tratamiento farmacológico de padecimientos neurológicos del sistema nervioso central (SNC) (Figura 5-a, c) (**Forloni, Angeretti y Smioldo, 1994**).

Dentro de las múltiples actividades atribuidas a la ALCAR podemos resaltar su papel en la homeostasis del estrés oxidativo; como antiapoptótico y como neuromodulador. En la primera actividad, antioxidante, se le ha asociado a la modulación de la expresión de diferentes agentes relacionados con la remoción de moléculas oxidantes, tal es el caso de la hemi-oxigenasa 1 (HO-1) en astrocitos de la rata, así como de la súper oxido dismutasa (SOD). Por otro lado, también promueve la supervivencia celular a través de la vía mitocondrial reduciendo la actividad de citocromo c y caspasa 3. Finalmente, su

papel neuromodulador está asociado con el aumento de la expresión del factor de crecimiento neural (NGF), antioxidantes y señales extracelulares reguladas por cinasas (ERK) así como la regeneración nerviosa en SNC y periférico donde provee cambios estructurales y eléctricos (**Hausott y Klimaschewski, 2019**), (Figura 5-b). Dicha regeneración en neuronas periféricas ya ha sido estudiada en el nervio ciático, en neuronas T sensoriales y en motoneuronas. Estas características hacen de ALCAR una molécula efectiva en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como el desorden de Alzheimer y el mal de Parkinson (**Jones, McDonald y Borum, 2010**).

Así mismo las propiedades metabólicas de ALCAR, antes mencionadas, han consolidado tratamientos contra la infertilidad masculina y es que al estar estrechamente relacionada con el epidídimo juega un papel importante en la maduración, metabolismo y eyaculación de los espermatozoides, todos ellos procesos trascendentes en la capacidad fertilizadora de los mismos. La ALCAR también se presenta, aunque en menor cantidad que en el epidídimo, dentro del testículo en espermatoцитos primarios y en tejido testicular en desarrollo donde juega un papel importante en la regulación indirecta de la espermatogénesis, es por esto que su actividad repercute sobre los parámetros de motilidad y concentración espermática principalmente (**Agarwal y Said, 2004**). Dichos tratamientos ya han sido probados con resultados favorables en masculinos con problemas de infertilidad bajo diferentes condiciones; pacientes con diagnósticos puntuales de infertilidad o diagnósticos con causas idiopáticas (**Jeulin y Lewin, 1996**).

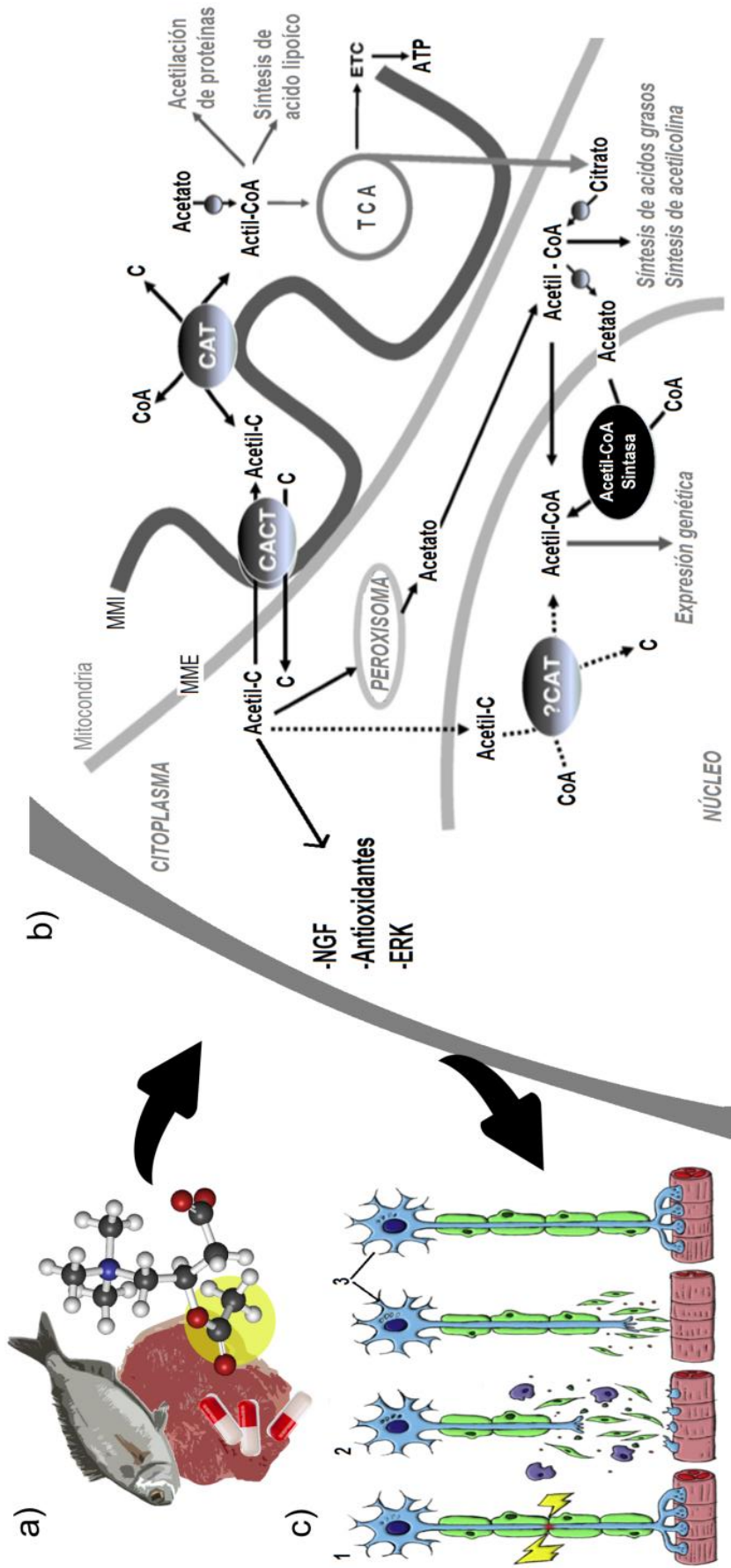


Figura 5 | Estructura y metabolismo de la Acetil L- Carnitina (acetil-C). a) Fuentes indirectas y directas de acetil L-carnitina y estructura molecular, el grupo acetilo es señalado con un círculo amarillo. b) Ruta de síntesis de acetil-C y productos consecuentes de esta. c) Etapas en de la regeneración neuronal/axón, 1; daño neuronal, 2; reclutamiento de componentes asociados al daño y 3; elongación y restablecimiento del axón. **Modificado de Rosca, Lemieux y Hoppel, 2009 y Hausott y Klimaschewski, 2019**

3.0 Antecedentes

La denervación sensorial por vía farmacológica ha sido usada en diferentes modelos de estudio con la finalidad de dilucidar el papel de las fibras nerviosas sensitivas en la comunicación y función de estructuras determinadas, para esto se usan principalmente animales como modelo de estudio. **Fitzgerald (1983)** presentó una extensa revisión donde expone el papel de las fibras nerviosas sensoriales en diferentes procesos biológicos usando la rata desnervada con Capsaicina (CAPS) como modelo de investigación. La mayoría de los proyectos enunciados en esta revisión usaron dosis de 30 y 50 mg/kg de CAPS para inducir la muerte de fibras nerviosas periférica de tipo C y A delta en ratas neonatas comprobando con esto la participación de neuronas sensoriales primarias en los sistemas digestivo, cardiovascular y circulatorio, en este sentido 50 mg/kg de CAPS es suficiente para degenerar fibras nociceptivas causando neuropatía sensitiva (**Danigo, Magy y Demiot, 2013**).

Se sabe que la administración subcutánea de 50mg/kg de CAPS a ratas hembras neonatas disminuye los niveles séricos de progesterona y testosterona a los 10 y 20 días de edad, además disminuye la actividad de los sistemas hipotalámicos monoaminérgicos, así como el éxito de preñez de las ratas desnervadas (**Quiróz, Morales-Ledesma, Morán, Trujillo y Domínguez, 2014**). Un estudio *in vitro* comprobó que dosis pequeñas de CAPS (10 y 50 μ M) tienen efectos estimulantes en la proliferación de células de la granulosa y, por el contrario, dosis elevadas de CAPS (100-200 μ M) inducen procesos de muerte celular por apoptosis (**Güler y Zik, 2018**).

Previamente hemos (**Hernandez Lopez, 2014**) mostrado el efecto de la denervación sensorial inducida por la administración de CAPS sobre el funcionamiento gonadal en la rata macho, la administración de 50mg/kg de CAPS a ratas macho neonatas y sacrificadas a los 90 días de edad resultó en una disminución significativa sobre del número total de espermatozoides, los porcentajes de motilidad rápida y de espermatozoides viables. En contraste, en cuanto a la regulación de ALCAR en control metabólico, el control de la expresión genética, la modulación de agentes antioxidantes, la disminución del proceso apoptótico, así como su relación con la neuromodulación y la neuroprotección de neuronas del SNC y periférico, concluyendo que la ALCAR representa un fármaco viable en el tratamiento de neuropatías y lesiones de diferentes nervios gracias a su intervención en diferentes rutas metabólicas (**Traina, 2016; Faroni,**

Mobasser, Kingham y Reid, 2015), así mismo representa una molécula hábil en promover plasticidad a neuronas periféricas así como su regeneración ante daño (**Onofri et al., 2013**).

Se ha reportado que, en la rata con lesión del nervio ciático, inducida por constricción crónica, la sola administración de ALCAR provee protección neuronal gracias al aumento de la expresión del factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrópico proliferador proveniente de células gliales y la arteminina. Se observaron cambios significativos en la morfología de las neuronas dañadas así como un aumento en el grado de mielinización de sus axones (**Tomassoni et al., 2018**). En cuanto a su participación en la regeneración neural se sabe que la administración sistémica de ALCAR (50mg/kg/día) en ratas con previa remoción de la continuidad de nervios periféricos a través de intervenciones quirúrgicas promueve la reparación de dichas lesiones. Esta reparación incluye la síntesis de las neuronas que componen el nervio lesionado así como el aumento de la mielinización de los axones de las mismas (**Wilson, Hart, Wiberg y Terenghi, 2010; Hart, Wiberg, Youle y Terenghi, 2002**). Estos efectos son mayores bajo este tratamiento que otros neuroprotectores como la leptina y la melatonina (**Onger et al., 2017**). Particularmente, se ha relacionado esta acción con el potencial reparador de la ALCAR sobre neuronas sensoriales dañadas o destruidas en traumas donde se ha perdido la sensibilidad y cuya administración sistémica resulta en un tratamiento eficiente (**Hart et al., 2002; Wilson, Hart, Brännström, Wiberg y Terenghi, 2007**). Sin embargo, esta acción reparadora de la ALCAR que ha sido evaluada en nervios relacionados con traumas severos, pero su efecto aún no ha sido estudiado en nervios que inervan el aparato reproductor.

En materia de fertilidad se sabe que la administración de ALCAR por tres meses ha mostrado ser más efectiva que la L- carnitina (LCAR) en el tratamiento de la infertilidad masculina aumentando significativamente la motilidad espermática en masculinos diagnosticados con astenozoospermia de carácter idiopático, interesantemente este aumento es potenciado si se combinan ambos fármacos en un solo tratamiento (**Balercia et al., 2005**). Del mismo modo **Zhou, Liu y Zhai (2007)** realizaron una extensa revisión en la cual evidenciaron la administración de LCAR y/o ALCAR como tratamientos efectivos ante problemas de infertilidad masculina mejorando la tasa de embarazo y la calidad espermática. Por otro lado, el efecto antioxidante de ALCAR en el desarrollo de los espermatozoides fue comprobado en ratas con lesión gonadotóxica del testículo por la acción de cisplatina, para esto evaluaron la morfología de los túbulos

seminíferos a través de cortes histológicos del testículo así como la expresión de agentes pro-apoptóticos como Caspasa 9, 8 y 3 donde la ALCAR mostró un efecto normalizador en los niveles de expresión de estos, es decir, disminuyó la muerte celular por apoptosis en el testículo (Coşkun *et al.*, 2013).

Las bondades de la ALCAR ante problemas de fertilidad en el macho se deben parcialmente a su acción sobre la actividad metabólica. Uno de los responsables de dicha acción es el transportador de carnitina (OCTN2), su acción permite el transporte de lípidos, esteroides y glucocorticoides, aumentando con esto la concentración de carnitina (CAR) y sus derivados, como la ALCAR, en la célula. La expresión de OCTN2 en el epitelio del epidídimo está estrechamente relacionada con la madurez de los espermatozoides (Li *et al.*, 2017). Estos estudios permiten sugerir que la LCAR y la ALCAR tienen un efecto estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que controlan la fertilidad.

Este proyecto, además de evidenciar el rol de la inervación sensorial en diferentes eventos fisiológicos que trastocan el funcionamiento del aparato reproductor masculino, busca demostrar el rol de la ALCAR como un agente que brinda estabilidad a circuitos neurales periféricos dañados, particularmente aquellos que involucran fibras nerviosas sensoriales sensibles a CAPS, a partir de su acción plástica a la que se le han asociado múltiples procesos metabólicos; homeostasis energética y regulación indirecta de antioxidantes principalmente.

4.0 Justificación

El mal funcionamiento de las estructuras reproductivas resulta afecciones que pueden ser diagnosticadas como infertilidad. Esta problemática es de talla mundial y sus cifras van en aumento a causa de factores crecientes como la contaminación y el estrés metabólico así como del factor genético y epigenético. Ante esto se han generado diversos tratamientos para resolverla, sin embargo muchos de estos son costosos, poco accesibles y consideran solo parcialmente la naturaleza del control reproductivo por lo que en ocasiones resulta en anomalías en los bebés producto de estos tratamientos. La información neuronal periférica es un interlocutor importante en la comunicación y control de las funciones reproductivas por el sistema nervioso central y su ausencia o atrofia puede repercutir severamente en la fertilidad.

La ALCAR es un fármaco capaz de atenuar los efectos de diferentes enfermedades neurodegenerativas e incluso reparar nervios lesionados normalizando su funcionamiento. Estas bondades también resultan en un tratamiento eficiente contra la infertilidad a mediano plazo con un costo más accesible con respecto a otras técnicas de reproducción asistida. Por lo anterior, este proyecto tiene como propósito contribuir en la comprensión de los procesos fisiológicos del control reproductivo, particularmente el control neural. También contribuirá al sector médico y clínico al evidenciar la ALCAR como un tratamiento viable ante problemas de infertilidad en masculinos.

Conocer el papel de cada interlocutor en el control de la reproducción es de gran importancia para la comprensión del mismo así como para el tratamiento de alguna patología relacionada con este. Esta visión holista permitirá reconsiderar los métodos de reproducción asistida invasivos así como comprobar el potencial de reparación neural de la ALCAR y su relación con la fertilidad masculina.

5.0 Hipótesis

El control neuroendocrino de la reproducción está regulado por estructuras encefálicas como el hipotálamo, éste a su vez es regulado por información proveniente de áreas extraencefálicas tales como las fibras nerviosas sensoriales. De esta forma la ausencia o atrofia de al menos uno de los interlocutores repercutirá en el control neuroendocrino de la reproducción. Dicha condición puede ser atendida por factores neuroreparadores que promuevan la neurogénesis y/o el restablecimiento de los circuitos neuronales. La ALCAR es una molécula con potencial neureparador por lo que su administración sistémica durante la pubertad y la adultez de ratas denervadas sensorialmente al nacimiento promoverán la neurogénesis de diferentes fibras, entre ellas las fibras nerviosas sensoriales, restableciendo el control normal, o cercano a este, de los parámetros espermáticos evaluados.

6.0 Objetivos

- Objetivo general

Analizar los efectos del ALCAR, en ratas machos denervadas sensorialmente con capsaicina, sobre diferentes parámetros espermáticos.

- Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la administración sistémica de 50 mg/Kg/día de ALCAR diariamente a partir del día 21 de edad, en ratas de 90 días de edad denervadas sensorialmente al nacimiento, sobre:

- Peso corporal, gonadal, de la próstata y de las vesículas seminales.
- Motilidad, viabilidad y concentración espermática.

Cada parámetro se evaluará de forma conjunta y bilateral, es decir, si son elementos pareados se evaluarán por separado también.

7.0 Metodología

Modelo experimental y condiciones de mantenimiento general

Se usaron 30 ratas macho neonatas, de la cepa CII-ZV provenientes del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) regido por la norma NOM-062-ZOO-1999 según los criterios establecidos por el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Laboratorio). El manejo de las ratas fue monitoreado por el bioterio y fueron mantenidas con un ciclo de luz-oscuridad 12/12hrs, se les proporciono agua y alimento para roedores *ad libitum*. La temperatura se estableció a 21°C con una humedad relativa de 39-70%.

7.1 Tratamiento farmacológico y grupos experimentales

Los animales fueron distribuidos al azar en 3 grupos de 10 roedores cada uno, a los cuales se les suministró un tratamiento farmacológico que consistió en una sola dosis de 50 mg/kg de Capsaicina® (Sigma, S Luis. MO, USA) diluida previamente en una solución compuesta por 10% de etanol, 10% de Tween 80 y 80% de solución salina (Pisa, México®), así como de administraciones diarias de 50 mg/kg de acetil L-carnitina® (Sigma, S Luis. MO, USA) diluida en solución salina (Pisa, México®). Las administraciones de estos fármacos se decidieron según el grupo experimental al que fueron azarosamente asignados descritos a continuación (Figura 6):

- **Grupo VH + ALCAR:** grupo administrado s. c. con un volumen equivalente a una dosis de 50mg/kg de vehículo de capsaicina al nacimiento y posteriormente a los 21 días de edad con una dosis diaria de 50mg/kg/día de acetil L-carnitina i. p. hasta los 90 días de edad.
- **Grupo CAPS + ALCAR:** grupo administrado s. c con 50mg/kg de Capsaicina al nacimiento y posteriormente a los 21 días de edad con una dosis diaria de 50mg/kg/día de acetil L-carnitina i. p. hasta los 90 días de edad.

- **Grupo CAPS + VH:** grupo administrado con 50mg/kg de Capsaicina al nacimiento de forma subcutánea (s. c.) y posteriormente con una dosis diaria de 50mg/kg/día de manera intraperitoneal (i. p.) desde los 21 días y hasta los 90 días de edad.

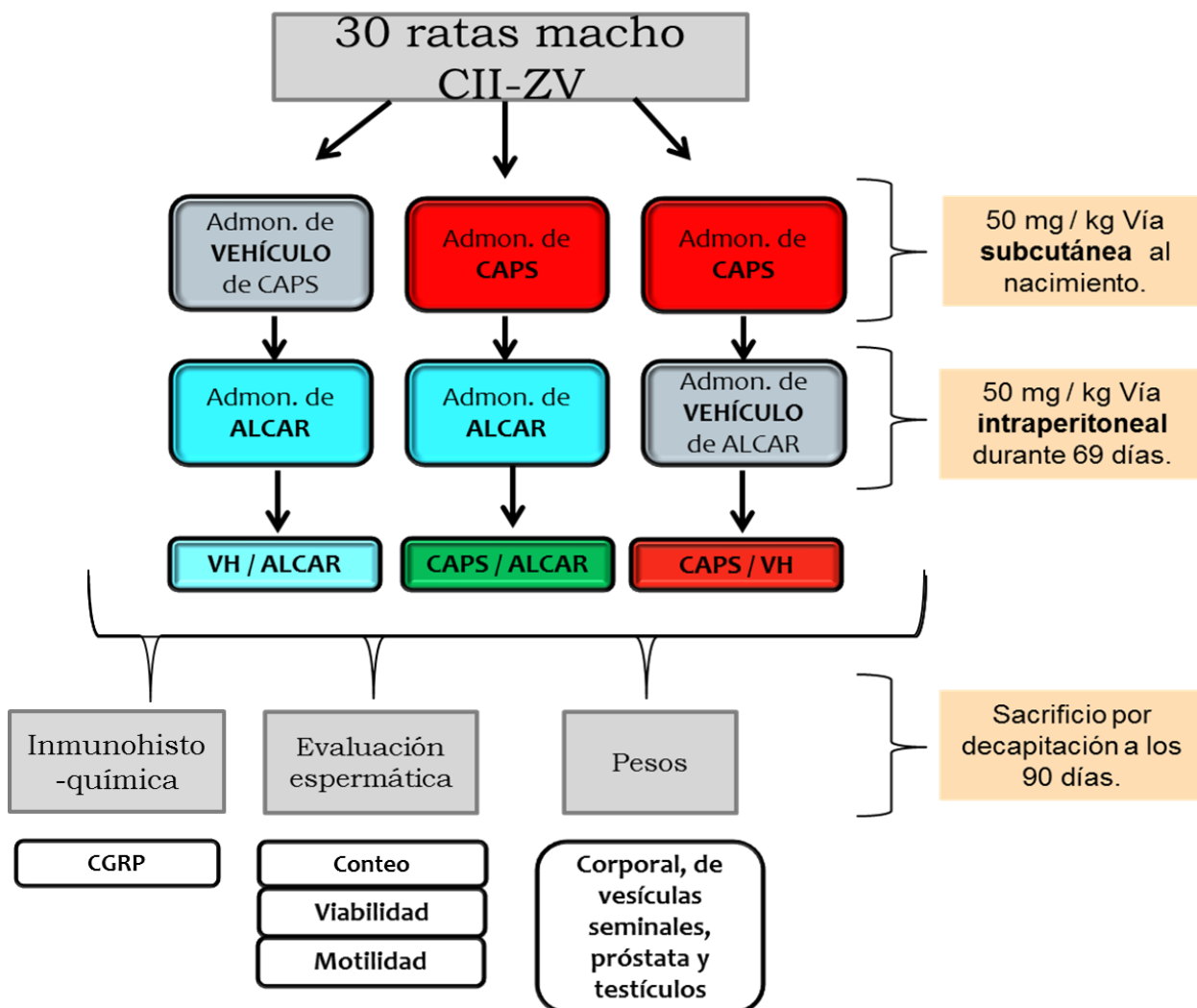


Figura 6 | Diseño experimental.

7.2 Sacrificio y procesamiento de muestras

Las ratas fueron sacrificadas a los 90 días de edad por decapitación con previo uso de anestesia (Perntobarbital sódico®, PiSA agropecuaria. México), 200µL/100gr) como método de eutanasia, inmediatamente se hizo la disección de los órganos reproductores (testículos, vesículas seminales y próstata) para ser pesados en una balanza analítica, el epidídimo fue extraído con el conducto deferente unido para obtener los espermatozoides de dicha estructura por perfusión con un volumen fijo de 3 mL de solución Hartman (PiSA S.A de C.V, México), la colecta de espermatozoides del epidídimo derecho se mantuvo separada de la del izquierdo lo que permitió una evaluación independiente por cada lado.

Análisis microscópico de parámetros espermáticos: Motilidad, Viabilidad y Conteo Espermático

Para el análisis espermático se siguió la metodología indicada en el manual de laboratorio para el análisis de semen así como del manual para el análisis de semen humano bajo parámetros establecidos por la OMS (Reyes-Luna, 2015).

- Motilidad espermática

Primeramente se evaluó la motilidad espermática colocando una alícuota de 10µL de muestra sobre un portaobjetos y cubriéndola con un cubreobjetos de 22X22mm, una vez enfocada la muestra bajo un enfoque de 400 X de un microscopio óptico modelo primo star (Carl Zeiss) se contaron 200 o más espermatozoides) y se clasificaron en motilidad A (progresiva), esta a su vez en AR (motilidad progresiva rápida) y AL (motilidad progresiva lenta), motilidad B (no progresiva o *in situ*) y motilidad C (inmóvil).

- Viabilidad espermática

Posteriormente para el análisis de viabilidad espermática se mezcló 10µL de muestra con 10µL de eosina nigrosina en un tubo plástico de 50µL, una vez homogenizada la muestra teñida se colocó una alícuota de 10µL en un portaobjetos y cubriéndola con un cubreobjetos de 22X22 mm, se contaron 200 o más espermatozoides a 400 X, los espermatozoides fueron agrupados en viables (espermatozoides no teñidos/claros) e inviables (espermatozoides con la cabeza teñida/oscuros).

El resultado de estas dos evaluaciones fue expresado en porcentaje, donde el cien por ciento es el total de espermatozoides contados para cada parámetro.

- **Conteo espermático**

Finalmente para el conteo espermático se colocó 10µL de muestra sobre un portaobjetos y cubriéndola con un cubreobjetos de 22X22mm se contaron los espermatozoides de tres campos completos dentro de la muestra. Después se obtuvo el promedio de dicho conteo para preparar una muestra secundaria con ayuda de las tablas de referencia para el conteo de espermatozoides del manual basado en la OMS. Esta segunda muestra diluyó parte del producto de la perfusión del epidídimo con diluyente de Weimman, de este modo se aseguró que ningún espermatozoide presentara motilidad. Por último, se colocó 10 µL de la muestra secundaria en una cámara de Neubauer de doble retículo (Marienfeld Superior) para el conteo de los espermatozoides en las cuadrículas centrales visto a 400 X, el conteo total de las dos cámaras (CT), y los valores obtenidos a lo largo de este procedimiento fueron necesarios para obtener el factor de conversión (FC). Usando estos valores y con ayuda de las tablas proporcionada por el manual basado en la OMS se obtuvo el número de espermatozoides por mL $(\frac{X/2}{FC})$ y posteriormente los millones de espermatozoide por volumen de muestra, es decir por 3 mL, $(\frac{X}{FC})(3)$.

Expresión de CGRP en el testículo

Posterior a la extracción de los epidídimos se realizó la extirpación de los testículos, los cuales fueron sumergidos en el fijador Bouin, después de 24 horas estos fueron cambiados a alcohol al 70%. Posteriormente fueron deshidratados e incluidos en parafina para ser cortados a 10µm en un micrótopo (Erma, Tokyo®), dichos cortes fueron colocados y fijados en portaobjetos preparados con poly L- lisina.

Los cortes obtenidos se sometieron a la técnica de inmunohistoquímica para lo cual 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 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 una 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 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 nanómetros. Se tomaron fotografías y se compararon entre los grupos enalizados.

7.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados, primeramente, en una base de datos construida en Excel (office 2010), esto con el fin de ordenarlos apropiadamente para posteriormente analisis en el paquete estadístico MiniTab 2018®. Primeramente se analizó la distribución de los datos por cada grupo de estudio, después se compararon los tres grupos procesados bajo la prueba de ANOVA seguido de la prueba de Tukey para los parámetros evaluados: conteo espermático, peso corporal y peso de estructuras reproductivas.

*Los datos que presentaron una distribución no paramétrica o son de naturaleza porcentual se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis de comparación para datos no paramétricas seguidos de la prueba U de Mann Witney.

8.0 Resultados

Al analizar el peso corporal y de las estructuras reproductivas se obtuvo que; los testículos izquierdo y derecho, así como la próstata no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en los grupos analizados. En contraste el peso corporal y de las vesículas seminales (V.S. + G.C.) presentó un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en el grupo CAPS+ALCAR respecto a los otros grupos evaluados (Tabla 1).

Estructura / g	Tratamientos			Valor de p
	CAPS+VH	CAPS+ALCAR	VH+ALCAR	ANOVA
Corporal	326.8 ± 57.3 b	377.90 ± 27.44 a	316.30 ± 19.85 ab	S
V.S. + G.C.	0.766 ± 0.329 a	1.3010 ± 0.4020 b	1.0328 ± 0.277 ab	S
Próstata	0.3635 ± 1419	0.4785 ± 0.1423	0.3467 ± 0.1137	N
Testículo-Tot	1.5363 ± 0.1377	1.5815 ± 0.1676	1.6293 ± 0.0531	N
				K.W
Testículo-Izq	1.5267 ± 0.1902	1.6661 ± 0.0573	1.6425 ± 0.0573	N
Testículo-Der	1.5460 ± 0.1108	1.4969 ± 0.3062	1.61161 ± 0.0592	N

Tabla 1 | Peso corporal y de las estructuras reproductivas (media±e.e.m) de ratas macho con 90 días de edad. La significancia estadística se determinó con un valor de $p \leq 0.05$ (S), y por el contrario, si no existió tal diferencia se determinó con el valor de $p > 0.05$ (N).

La administración de ALCAR en los animales desnervados sensorialmente provocó un incremento significativo en el número de espermatozoides en comparación al grupo con sólo desnervación sensorial (Figura 7). El análisis por lado revela que dicho incremento es debido a un incremento por parte del testículo izquierdo en los animales del grupo CAPS+ALCAR. También se observa en las ratas del grupo VH+ALCAR un incremento en el número de espermatozoides del testículo izquierdo en comparación a los de su lado derecho (Figura 8).

El análisis de la viabilidad espermática mostró que la administración de ALCAR en animales con o sin desnervación sensorial incrementa en el porcentaje de viabilidad, siendo sólo estadísticamente significativo el grupo CAPS+ALCAR en comparación al grupo CAPS+VH (Figura 9). El análisis por lado, mostró que en los animales del grupo CAPS+ALCAR el porcentaje de viabilidad espermática es estadísticamente mayor en el

testículo izquierdo en comparación a los testículos izquierdos de los otros dos grupos experimentales (Tabla 2).

El porcentaje de motilidad espermática se incrementa con la administración de ALCAR ya sea en animales con o sin desnervación sensorial, en comparación al grupo CAPS+VH. El incremento es estadísticamente significativo sólo en el grupo VH+ALCAR en comparación a los animales con desnervación sensorial (CAPS+VH; Figura 10). También este incremento se observa en los testículos izquierdos de los animales tratados con ALCAR con o sin desnervación sensorial en comparación al porcentaje de motilidad de espermatozoides del lado izquierdo del grupo CAPS+VH. No se observaron diferencias entre los testículos izquierdos versus derechos de cada grupo experimental (Tabla 2).

Conteo espermático total

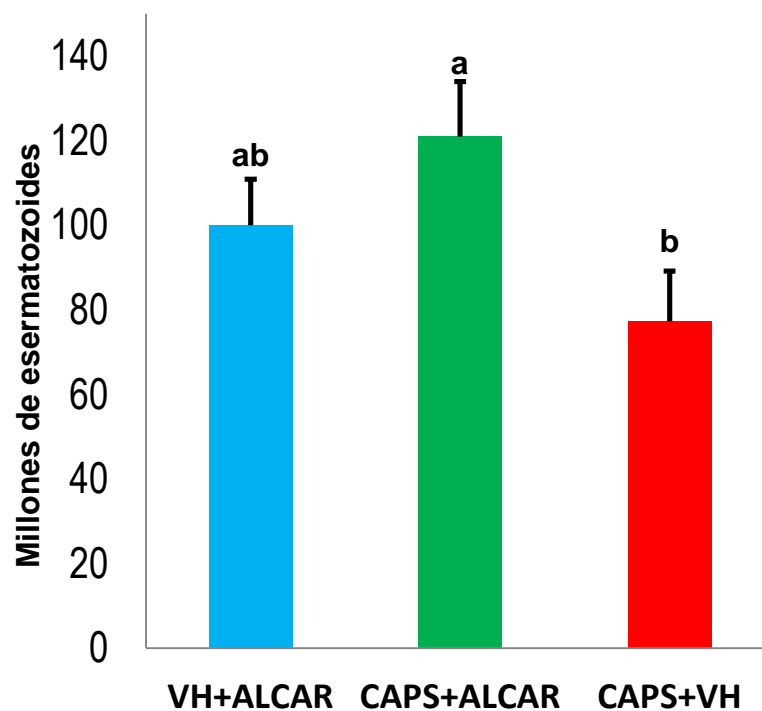


Figura 7 | Conteo espermático total (media ± e. e. m.) donde el grupo CAPS+ALCAR presenta un mayor número de espermatozoides ($p < 0.05$) con respecto al grupo CAPS+VH. Pruebas ANOVA y Tukey.

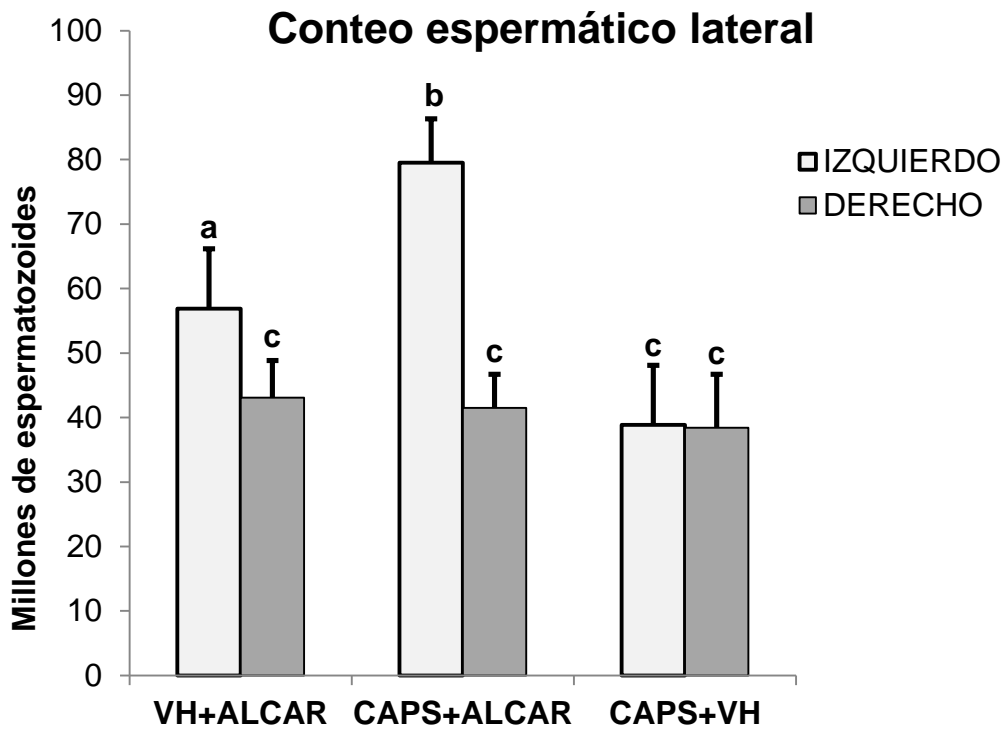


Figura 8 | Conteo espermático izquierdo y derecho (media ± e. e. m.) donde el lado izquierdo fue mayor ($p < 0.05$) con respecto al lado derecho en los grupos VH+ALCAR y CAPS+ALCAR, Pruebas ANOVA y Tukey

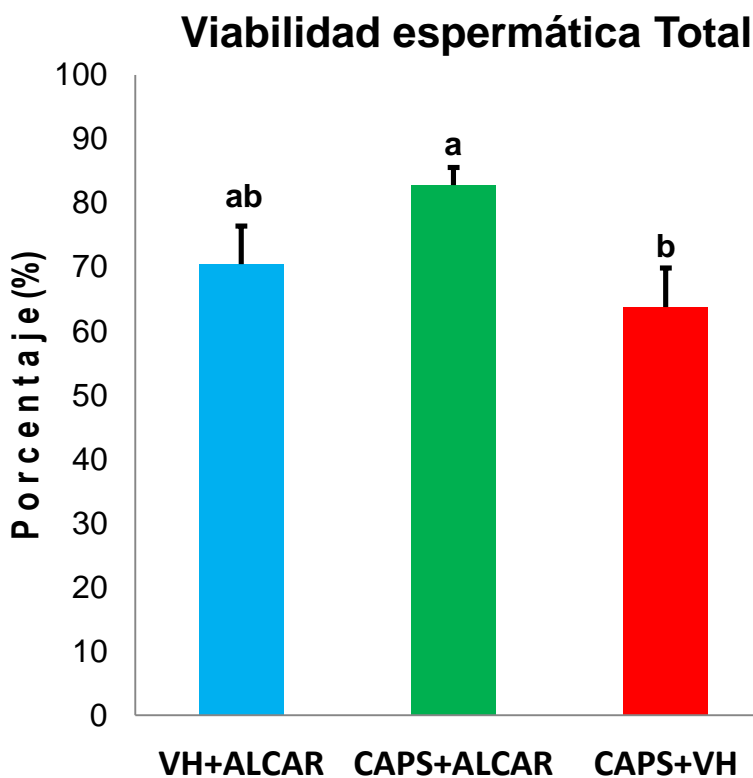


Figura 9 | Porcentaje de viabilidad total (media ± e. e. m.) donde el grupo CAPS+ALCAR presenta un mayor porcentaje de espermatozoides viables ($p < 0.005$) que el grupo CAPS+VH. Pruebas Kruskal Wallis y U de Man Whitney.

Motilidad espermática Total

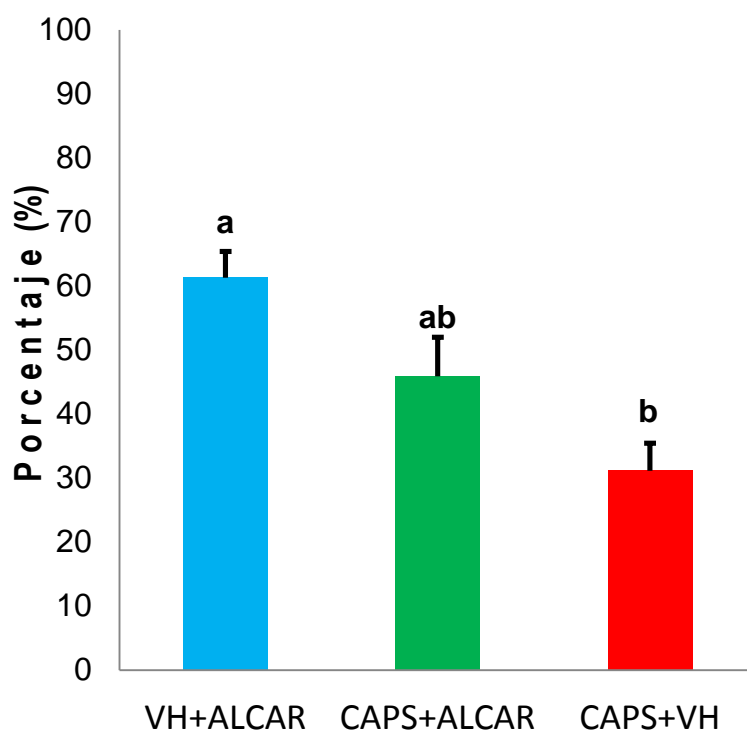


Figura 10 | Porcentaje de motilidad total (media \pm e. e. m.) donde el grupo VH+ALCAR presenta un mayor porcentaje de espermatozoides móviles ($p < 0.005$) que el grupo CAPS+VH. Pruebas Kruskal Wallis y U de Man Witney.

Parámetro (%)	Tratamiento			K. W.	
	CAPS+VH	CAPS+ALCAR	VH+ALCAR	"U"	M. W.
Motilidad Izq	27.84 \pm 3.68a	46.23 \pm 6.67ab	67.41 \pm 3.67b	S	N
Motilidad Der	34.46 \pm 6.82	45.55 \pm 5.57	55.17 \pm 5.59	N	
Viabilidad Izq	63.99 \pm 5.85a	83.33 \pm 3.59b	70.96 \pm 5.64ab	S	N
Viabilidad Der	63.48 \pm 6.41	82.26 \pm 2.32	69.93 \pm 6.68	N	

Tabla 2 | Porcentaje de motilidad y viabilidad por lado (media \pm e.e.m), $p \leq 0.05$ (S), y por el contrario, si no existió tal diferencia se determinó con el valor de $p > 0.05$ (N). Pruebas Kruskal Wallis y "U" de Man Witney.

Por otra parte, el estudio de inmunohistoquímica en los testículos mostró que pocas células intersticiales y del túbulo seminífero presentaron inmunorreactividad al CGRP (Figura e y f). La administración de ALCAR en las ratas previamente desnervadas sensorialmente provocó una gran expresión tanto en las células intersticiales como del túbulo seminífero (Figura 11, c y d). Resultó interesante que en el grupo de VH+ALCAR se observaron más células inmunorreactivas a CGRP (Figura 11, a y b) en comparación al grupo CAPS+VH pero menos que el grupo CAPS+ALCAR.

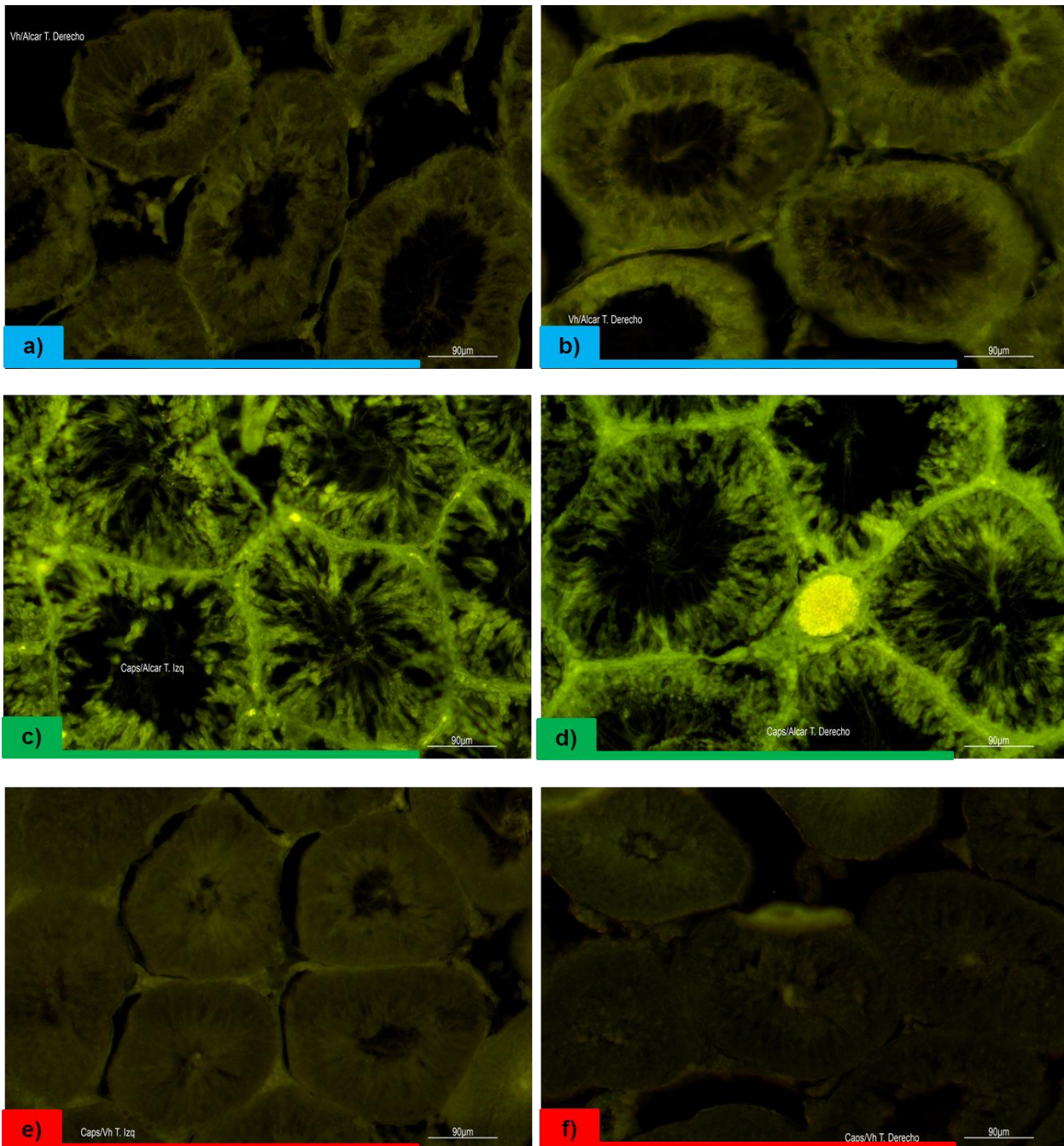


Figura 11 | Expresión de CGRP en los testículos, izquierdo y derecho respectivamente, de los grupos analizados; VH+ALCAR (a, b), CAPS+ALCAR (c, d) y CAPS+VH (e, f.)

9.0 Discusión

Los resultados aquí presentados evidencian el amplio papel de la ALCAR en la fisiología reproductiva de la rata macho, reflejado principalmente en los parámetros de motilidad, viabilidad y conteo espermático. Del mismo modo enfatiza el papel de la inervación sensorial en los fenómenos reproductivos, en los parámetros antes mencionados. En estos términos se debe tener en cuenta que, 1); el papel de la inervación de las estructuras reproductivas, entre ellas los testículos y los epidídimos, es de gran importancia en la fisiología de la reproducción en la rata macho, 2), La ALCAR es una molécula con un extenso papel metabólico, de entre los cuales destacamos su relación con la reparación neural, 3); del mismo modo, la ALCAR, también está envuelta en el control fisiológico de la reproducción en niveles intrínsecos y extrínsecos, neurales y endocrinos.

Los individuos del grupo CAPS+VH y CAPS+ALCAR presentaron lesiones cutáneas en la parte dorsal del cuello así como en algunas regiones de las extremidades, este efecto ya ha sido reportado por otros autores donde a administración de 60-50mg/ kg de CAPS en roedores debilita las respuestas sensoriales a estímulos táctiles, térmicos y químicos (**Fitzgerald, 1983**). Así mismo, los animales de estos grupos, presentaron manchas de orina en la región genital asociada a problemas de micción. Al respecto, se sabe que el funcionamiento la vejiga urinaria, así como del tracto urinario en general, está relacionado con la actividad de canales TRPV1 (**Franken, Uvin, De Ridder y Voets, 2014**) por lo que el daño de las fibras nerviosas relacionadas con este canal trajo consigo una respuesta disfuncional en la micción de los individuos de estos grupos (figura 12). Estas evidencias confirman que la administración de CAPS es una herramienta altamente efectiva para abordar el estudio de las fibras nerviosas sensoriales en la fisiología reproductiva.

Por otro lado el peso de las gónadas no reflejó diferencias estadísticas por efecto de los tratamientos evaluados. Sin embargo se sabe que la discontinuidad quirúrgica del SSN así como del ISN en la pubertad de ratas macho resulta en una disminución de los parámetros de peso y diámetro relativo de los testículos (**Huo, Xu, Zhang, Zhang y Cui, 2010**), esta disminución asociada a la inervación del testículo nos permite sugerir que las fibras nerviosas sensoriales, relacionadas con estos dos nervios, no contribuye

de forma significativa en el peso de las gónadas masculinas. En contraste el peso de las vesículas seminales y las glándulas coagulantes presentaron un aumento significativo en los individuos del grupo CAPS+ALCAR, estas estructuras se encuentran inervadas por el MPG y los AG (Arellano, Xelhuantzi, Mirto, Hernández y Cruz, 2019), estos últimos podrían contener fibras nerviosas sensoriales las cuales estarían involucradas en el desarrollo de estas estructuras por lo que el daño de estas y el posterior tratamiento con ALCAR resultó en un aumento en su peso.

El peso corporal también presentó variaciones significativas entre los grupos analizados siendo el grupo VH+ALCAR el que presentó el menor peso. Se sabe que, fisiológicamente, la ALCAR puede transferir su grupo acetilo convirtiéndola en LCAR, ésta última se asocia a la movilización y metabolismo de ácidos grasos (Fielding, Riede, Lugo y Bellamine, 2018) por lo que su administración crónica resulta en una disminución en el peso. Este efecto ya ha sido evidenciado en mujeres con ovario poliquístico después de doce semanas tratadas con suplementos a base de carnitina (Samimi *et al.*, 2016). Adicionalmente se sabe que la administración de ALCAR a través de la dieta (bebidas) interviene en el reparto de nutrientes en ratas Wistar jóvenes y puede reducir la resistencia a la leptina en ratas adultas (Iossa *et al.*, 2002). Contrario a esto, el grupo CAPS+ALCAR presentó un peso significativamente mayor respecto al grupo CAPS+VH.

En relación a los parámetros de motilidad, viabilidad y concentración espermática, los grupos analizados también presentaron diferencias significativas siendo en estos dos últimos parámetros donde se presentó un aumento significativo en el grupo de CAPS+ALCAR sobre el grupo CAPS+VH, estos resultados son consistentes con trabajos anteriores donde la remoción farmacológica de las fibras nerviosas sensoriales con CAPS resultó en porcentajes bajos de motilidad, viabilidad y conteo espermático así como de atrofia en el área luminal y del epitelio germinal de los tubos seminíferos (Hernández Lopez, 2014). Aunado a esto se ha reportado que la denervación quirúrgica del SSN y el ISN, en la cual también se interrumpe la comunicación sensorial entre las gónadas y el SNC, afecta el desarrollo normal del testículo, en particular la morfología de los tubos seminíferos, así como la respuesta de las células esteroidogénicas como las células de Leydig disminuyendo la expresión del mRNA-LHR y la secreción de testosterona. Estos efectos además se conservan desde la pubertad hasta los 60 y 90 días de edad (Huo, Xu, Zhang, Zhang y Cui, 2010). En contraste, en la rata macho adulta la escisión de los nervios asociados al cordón espermático por

microcirugía resulta en cambios mínimos en la estructura y función de los testículos y de los conductos deferentes (Laudano *et al.*, 2014). Esto indica que la discontinuidad de la información sensorial y de nervios completos repercute funcionalmente en la esteroidogénesis y por ende en la espermatogénesis, eventos que repercuten a su vez significativamente en la viabilidad y concentración espermática. No obstante los efectos adversos de la CAPS en la fisiología reproductiva de la rata macho no solo obedece a factores extrínsecos, si no que también repercute de forma intrínseca en dicho proceso debido a que los canales de la familia TRPV, con afinidad a los vanilloides, no solo se encuentran distribuidos en diferentes componentes neuronales a través del tracto reproductivo y en diferentes regiones del SNC como hipotálamo (núcleo arcuato, hipotálamo posterior, núcleo intrafascicular), si no que también se encuentra en células espermáticas y espermatozoides en el testículo (canales TRPV1 y TRPV5), la próstata (canales TRPV2, TRPV4 y en menor expresión TRPV1 y TRPV2) y células epiteliales del epididimo (canales TRPV6) (Götz, Qiao, Beck y Boehm, 2017; Li *et al.*, 2010; Wang, Pu y Wang, 2007; Fecher-Trost, Wissenbach y Weissgerber, 2017).

Por otro lado, el aumento en porcentaje de viabilidad y en el conteo espermático en el grupo de CAPS/ALCAR sugiere la activación de mecanismos asociados a la reparación de fibras nerviosas sensoriales por parte la ALCAR. Se sabe que, la regeneración de nervios periféricos seccionados de forma quirúrgica está relacionada con un aumento de factores neurotróficos (e.g, Factor de crecimiento neural; NGF), neuropéptidos (e.g. SP, CGRP, SST y NPY), factores de transcripción y proteínas asociadas al crecimiento (GAPs), este fenómeno trastoca morfofisiológicamente estructuras como el cordón espinal y el DRG además de que puede ser propiciado e incluso acelerado con terapias medicamentosas que incluyan la administración farmacológica de ALCAR (Liu y Wang, 2020). Además, esta reparación neural por parte de ALCAR aumenta el conteo de neuronas sensoriales y a su vez disminuye el porcentaje de pérdida de las estas en nervios con axotomía periférica (Hart, Wiberg, Youle y Terenghi, 2002). Este efecto de reparación neuronal está asociado a la activación de vías secundarias a su ruta metabólica, tal como la activación de la señal extracelular regulada por cinasas (ERK) las cuales están relacionadas con la elongación del axón y la regeneración nerviosa, dichos eventos han sido estudiados sobre neuronas sensoriales del DRG en la rata adulta (Hausott y Klimaschewski, 2019).

Del mismo modo la administración de 50mg/kg/día de ALCAR en ratas macho adultas SD con lesión del DRG en los segmentos de la medula espinal L4 y L5 disminuye

significativamente la pérdida neuronal y normaliza la morfología de las mismas, esto evidencia la capacidad neuroreparadora de la ALCAR ante daño a estructuras nerviosas periféricas (**Hart, Wiberg, Youle y Terenghi, 2002**) Sumado a esto se sabe que, el suministro de ALCAR a pacientes con neuropatía periférica dolorosa representa un tratamiento efectivo, el cual favorece la conducción y regeneración nerviosa, estos efectos trastocan la funcionalidad neuronal, dado que los mecanismos por los cuales actúa la ALCAR permiten, entre otras cosas, la extensión de neuritas, esta evidencia propone a la ALCAR como un analgésico eficaz en el tratamiento de dolor neuropático (**Di Stefano, Di Lionardo, Galosi, Truini, y Cruccu, 2019; Notartomaso, S. (2017); Notartomaso et al, 2017; Sima, Calvani, Mehra y Amato, 2005**).

Además de la activación de mecanismos de reparación de fibras nerviosas, la ALCAR se relaciona con la homeostasis energética, la regulación nutricional y el control hormonal a través su acción sobre la LCAR y esta a su vez con los mecanismos de activación de la carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1) en el hipotálamo. Dicho control se ha relacionado principalmente con la expresión de la leptina y la grelina (**Stark, Reichenbach y Andrews, 2015**). En este sentido, la acción de la LCAR permite el control de la expresión hormonal de la leptina y la grelina a partir de la regulación neuroendocrina. Del mismo modo se ha relacionado a la ALCAR con el control neuroendocrino de hormonas reproductivas como GnRH y LH, en mujeres con amenorrea hipotalámica funcional, (**Genazzani et al., 2011**) además, el efecto de ALCAR puede ser potenciado por la administración coordinada con la LCAR (**Genazzani et al., 2017**).

Resulta interesante observar que en el modelo de estudio de la rata diabética la administración de 50 mg/kg de LCAR tiende a normalizar diferentes parámetros espermáticos; motilidad, viabilidad y conteo espermático. Dicha tendencia se mantiene al analizar la expresión de genes apoptóticos en el epitelio germinal, es decir, la administración de LCAR disminuye la apoptosis en ratas diabéticas. Sin embargo, los efectos antes mencionados son dependientes de la dosis ya que con la administración de 100 y 200 mg/kg de LCAR el incremento de los parámetros espermáticos ya mencionados es estadísticamente significativo. (**Mardanshahi, Rezaei, Zare, Shafaroudi y Mohammadi, 2019**).

Por otra parte, el mismo efecto estimulador en los parámetros espermáticos de motilidad, viabilidad y concentración aumentan significativamente con la administración

de 50 y 150mg/kg de L-CAR en gallos. Este efecto estaría explicado por una estimulación del eje neuroendócrino hipotálamo-hipófisis-gónadas dado que se ha visto también un aumento en la expresión de FSH, GnRH y melatonina (Elokil *et al.*, 2019)

A nivel intrínseco, es decir a nivel celular, se ha mostrado que la L-CAR estimula la función mitocondrial, actividad importante en el desarrollo y maduración de los espermatozoides, e.g., la homeostasis de las ROS y la disminución de la actividad de proteínas pro-apoptóticas y del citocromo-c, que promueven la viabilidad espermática, reduciendo así el estrés metabólico. También se le ha relacionado con la maduración de los espermatozoides en el epidídimo donde la tirosina, presente en la pieza media y la cola este, es fosforilada permitiendo activación del espermatozoide, este evento también está asociado con la producción de radicales libres, (Pena *et al.*, 2009) estos efectos ya han sido evaluados en hombres que presentan astenozoospermia. Sumado a esto se tiene evidencia de que la L-CAR aumenta la expresión del NGF, el cual ha sido relacionado con la función de las estructuras reproductivas en la rata macho. Dicho factor de crecimiento se expresa ampliamente en componentes relacionados con la fertilidad, tales como las células de Leydig, células germinales, en el epitelio de los conductos eferentes y deferentes, el epidídimo, las vesículas seminales, las glándulas coagulantes y la próstata (Li *et al.*, 2005).

Mucho se ha hablado ya de los efectos positivos de la L-CAR ante la destrucción neuronal y como regulador de procesos neuroendocrinos, sin embargo, estos efectos no favorecen los parámetros de viabilidad y conteo espermático en los animales del grupo VH+L-CAR, los cuales se mantuvieron por debajo del grupo de CAPS+L-CAR. Esta evidencia sugiere un carácter más versátil de la L-CAR en la fisiología reproductiva y sus mecanismos de acción aún requieren de muchos estudios. Se sabe que un desequilibrio en el ambiente oxidante en las gónadas repercute en las células germinales, por ejemplo las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas de forma normal gracias a la actividad energética celular. Este estado fisiológico “normal” provee un microambiente adecuado para la regulación del estado tónico vascular y la expresión genética en los testículos, además de ser requerido en la maduración, hiperactivación y capacitación del espermatozoide así como en el proceso de quimiotaxia espermática e incluso en la fertilización (Ko, Sabanegh y Agarwal, 2014). En este sentido, dado que la administración de L-CAR podría estar disminuyendo los niveles de ROS en el testículo en los animales “normales” del grupo VH+L-CAR, a través del fomento en la actividad antioxidante, por lo que los efectos inicialmente

estimuladores de la ALCAR sobre la espermatogénesis se podrían perder por la administración crónica (más de 9 semanas) de ALCAR lo que activaría mecanismos de retroalimentación negativa sobre el eje neuroendócrino hipotálamo-pituitaria-testículos e incluso a nivel celular, todo lo anterior explicaría la disminución en el porcentaje de viabilidad y número de espermatozoides con respecto a los animales desnervados sensorialmente y tratados con ALCAR.

Nuestros resultados apoyan las múltiples evidencias de efectos reparadores de la ALCAR a través del eje neuroendócrino H-P-T, en apoyo a lo anterior se ha visto que la administración diaria por 7 semanas de al menos 100 mg/kg de LCAR en ratas macho con inducción de diabetes restablece las concentraciones séricas de las hormonas LH, FSH y T y los parámetros espermáticos en comparación a las ratas control sin diabetes (**Rezaei et al, 2018**). Esta evidencia acompaña la hipótesis de que la administración crónica de ALCAR en animales intactos podría sobrestimular mecanismos que controlan la espermatogénesis provocando respuestas fisiológicas desfavorables para los parámetros de viabilidad y conteo espermático.

Al momento no se tiene una explicación al por qué el grupo VH+ALCAR, cuyas ratas presentaron un aumento significativo en el porcentaje de motilidad esperática respecto a los otros dos grupos evaluados, no se observó una disminución como en el caso de los parámetros de viabilidad y concentración. Lo cual concuerda con otros estudios quienes han mostrado que la administración sistémica de ALCAR y la LCAR representa un tratamiento exitoso ante padecimientos de infertilidad masculina como la astenozoospermia (problemas de motilidad espermática), oligoastenozoospermia (problemas en el conteo espermático) y oligoastenoteratozoospermia (problemas en motilidad, conteo y morfología espermática) idiopática principalmente (**Agarwal y Said, 2004; Zhang, Cui, Dong, Sun y Zhang, 2019**). Estas evidencias nos permiten sugerir que la acción de ALCAR en animales intactos estimula la adquisición de motilidad en los espermatozoides, independientemente si los animales tienen intacta o no su inervación sensorial.

Finalmente, el análisis lateral del conteo espermático mostró un mayor número de espermatozoides obtenidos del epidídimo izquierdo sobre las muestras del derecho, esta evidencia nos permite sugerir que el control sobre este parámetro es asimétrico. Dicha asimetría ya ha sido evidenciada anteriormente en varios componentes dentro del control neuroendócrino de la reproducción, tales como la vascularización, las gónadas y

su inervación (**Gerendai y Halász, 2001**), sin embargo estos reportes indican que el testículo derecho responde mejor que el izquierdo en condiciones de hemicastración y se le ha relacionado además con un aumento en los niveles séricos de testosterona (**Frankel, Chapman y Cook, 1989**), hormona importante en el control de la espermatogénesis.

Estas evidencias parecieran oponerse a nuestros hallazgos en los parámetros espermáticos, principalmente en el conteo espermático, sin embargo, la información antes presentada nos permite considerar lo siguiente; la denervación sensorial con CAPS disminuye la respuesta de ambos testículos en el conteo espermático. El tratamiento con ALCAR en ratas denervadas sensorialmente permite una recuperación de la respuesta de ambos testículos, pero es significativamente mayor en el testículo izquierdo. Se sabe que el ganglio hipogástrico izquierdo en el ratón macho es más grande respecto al derecho (**Gerendai y Halász, 1997; Gerendai y Halász, 2001**) lo cual podría atribuirse a una mayor densidad de neuronas, dentro de las cuales estarían fibras nerviosas sensoriales por lo que la destrucción de estas podría afectar la funcionalidad del testículo y la administración de ALCAR podría estar restableciendo la continuidad de estas fibras nerviosas con sus órganos que inervan como son las gónadas.

10.0 Conclusiones

- La información sensorial participa de manera estimuladora en el control neuroendócrino de la reproducción en la rata macho.
- La administración de ALCAR en la rata macho desnervada sensorialmente estimula mecanismos neuroendócrinos y/o neurales que permiten incrementar los parámetros espermáticos de motilidad, viabilidad y número de espermatozoides.
- El tratamiento crónico y sistémico de ALCAR en ratas macho con inervación sensorial intacta repercute negativamente en los parámetros de viabilidad y conteo espermático, así como en el peso corporal y el peso de las vesículas seminales.

11.0 Perspectivas

- Analizar los parámetros de fertilidad de los tres tratamientos farmacológicos.
- Analizar y comparar los parámetros morfológicos del testículo y el epididimo con base en la técnica de corte histológico pertinente.
- Evaluar el efecto de los tres tratamientos farmacológicos sobre los niveles séricos de testosterona y estradiol, así como la expresión de genes apoptóticos y de proliferación en células que componen el testículo.
- Dilucidar la acción de la capsaicina y de la acetil L-carnitina sobre las fibras sensoriales presentes en el testículo a partir de técnicas de inmunohistoquímica.
- Analizar la recuperación neuronal de los ganglios de la raíz dorsal asociados a las funciones reproductivas según la técnica de corte histológico pertinente.
- Evaluar a nivel del sistema nervioso central la morfología neuronal de las áreas relacionadas de forma clásica y reciente con la reproducción y correlacionarla con los parámetros de espermáticos y de fertilidad.

12.0 Anexos



Figura 12 | Efectos plausibles de la CAPS sobre la sensibilidad cutánea (a), la visión (b) y la capacidad de micción (d). En contraste con los parámetros en condiciones normales (c y e).

13.0 Referencias

- Adebayo, A. O., Akinloye, A. K., Olurode, S. A., Anise, E. O., y Oke, B. O.** (2011). The structure of the penis with the associated baculum in the male greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*). *Folia morphologica*, 70(3), 197-203.
- Adewoyin, M., Ibrahim, M., Roszaman, R., Isa, M. L. M., Alewi, N. A. M., Rafa, A. A. A., y Anuar, M. N. N.** (2017). Male infertility: the effect of natural antioxidants and phytochemicals on seminal oxidative stress. *Diseases*, 5(1), 9.
- Agarwal, A., y Said, T. M.** (2004). Carnitines and male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 8(4), 376-384.
- 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.
- Arellano Hernández, J.** (2019). Contribución del plexo pélvico en el control de funciones urogenitales de la rata macho (tesis doctoral). Universidad Veracruzana, Xalapa, México.
- Arellano, J., Xelhuantzi, N., Mirto, N., Hernández, M. E., y Cruz, Y.** (2019). Neural interrelationships of autonomic ganglia from the pelvic region of male rats. *Autonomic Neuroscience*, 217, 26-34.
- Balercia, G., Regoli, F., Armeni, T., Koverech, A., Mantero, F., y Boscaro, M.** (2005). Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertility and sterility*, 84(3), 662-671.
- Basith, S., Cui, M., Hong, S., y Choi, S.** (2016). Harnessing the therapeutic potential of capsaicin and its analogues in pain and other diseases. *Molecules*, 21(8), 966.
- Bindu, M., Kishore, P. V. S., Raju, N. K. B., Nagamalleswari, Y., & Makkena, S.** (2017). Histochemical studies on the coagulating gland of albino rat (*Rattus norvegicus*). *Indian Journal of Veterinary Anatomy*, 29(1), 56-58.
- Bonduelle, M., Wilikens, A., Buysse, A., Van Assche, E., Wisanto, A., Devroey, P., Van Steirteghem A. C., y Liebaers, I.** (1996). Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Human reproduction*, 11(suppl_4), 131-159.
- Brain, S. D., Tippins, J. R., Morris, H. R., MacIntyre, I., y Williams, T. J.** (1986). Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. *Journal of investigative dermatology*, 87(4), 533-536.

- Bustos Obregón, E., y Torres-Díaz, L.** (2012). Reproducción estacional en el macho. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1266-1279.
- Cheng, C. Y., y Mruk, D. D.** (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, 64(1), 16-64.
- Cheng, C. Y., y Mruk, D. D.** (2015). Biochemistry of Sertoli cell/germ cell junctions, germ cell transport, and spermiation in the seminiferous epithelium. In *Sertoli cell biology* (pp. 333-383). Academic Press.
- Clement, P., y Giuliano, F.** (2015). Anatomy and physiology of genital organs—men. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 130, pp. 19-37). Elsevier.
- Clement, P., y Giuliano, F.** (2016). Physiology and pharmacology of ejaculation. *Basic and clinical pharmacology y toxicology*, 119, 18-25.
- Córdova, A.** (2009). Anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino y femenino. *Revista en línea*.
- Coşkun, N., Hatipoğlu, M. T., Özoğul, C., Korkmaz, C., Akyol, S. N., Mıcılı, S. C., Arik G., S. y Erdoğan, D.** (2013). The protective effects of acetyl L-carnitine on testis gonadotoxicity induced by cisplatin in rats. *Balkan medical journal*, 30(2), 235.
- Creasy, D. M., y Chapin, R. E.** (2018). Male reproductive system. In *Fundamentals of Toxicologic Pathology* (pp. 459-516). Academic Press.
- Danigo, A., Magy, L., y Demiot, C.** (2013). TRPV1 dans les neuropathies douloureuses-Des modèles animaux aux perspectives thérapeutiques. *médecine/sciences*, 29(6-7), 597-606.
- De Kretser, D. M.** (1997). Male infertility. *The lancet*, 349(9054), 787-790.
- DG, H. L. P. R. C., y Smith, C. E.** (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*, 73, 279-319.
- Di Stefano, G., Di Lionardo, A., Galosi, E., Truini, A., y Cruccu, G.** (2019). Acetyl-L-carnitine in painful peripheral neuropathy: a systematic review. *Journal of pain research*, 12, 1341.
- Dohle, G. R., Colpi, G. M., Hargreave, T. B., Papp, G. K., Jungwirth, A., Weidner, W. E. A. U., y EAU Working Group on Male Infertility.** (2005). EAU guidelines on male infertility. *European urology*, 48(5), 703-711.
- Domínguez, A. Q.** (1997). Introducción Al Manejo de Animales de Laboratorio: Roedores Y Pequeñas Especies. UADY: 60-67.
- Elokil, A. A., Bhuiyan, A. A., Liu, H. Z., Hussein, M. N., Ahmed, H. I., Azmal, S. A., y Li, S.** (2019). The capability of L-carnitine-mediated antioxidant on cock during aging:

evidence for the improved semen quality and enhanced testicular expressions of GnRH1, GnRHR, and melatonin receptors MT 1/2. *Poultry science*, 98(9), 4172-4181.)

Faroni, A., Mobasseri, S. A., Kingham, P. J., y Reid, A. J. (2015). Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Advanced drug delivery reviews*, 82, 160-167.

Fecher-Trost, C., Wissenbach, U., y Weissgerber, P. (2017). TRPV6: From identification to function. *Cell Calcium*, 67, 116-122.

Fielding, R., Riede, L., Lugo, J. P., y Bellamine, A. (2018). L-carnitine supplementation in recovery after exercise. *Nutrients*, 10(3), 349.

Fitzgerald, M. (1983). Capsaicin and sensory neurones—a review. *Pain*, 15(1-4), 109-130.

Fitzpatrick D b. (2010). Dolor. En D. Purves. *Neurociencia* (pp. 227-248). Madrid, España: Editorial medica panamericana.

Fitzpatrick D, b (2010). Sistema somatosensitivo. En D. Purves (Ed.), *Neurociencia* (pp. 205-226). Madrid, España: Editorial medica panamericana.

Forloni, G., Angeretti, N., y Smioldo, S. (1994). Neuroprotective activity of acetyl-L-carnitine: Studies in vitro. *Journal of neuroscience research*, 37(1), 92-96.

Frankel, A. I., Chapman, J. C., y Cook, B. (1989). Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *Journal of endocrinology*, 122(2), 485-488.

Franken, J., Uvin, P., De Ridder, D., y Voets, T. (2014). TRP channels in lower urinary tract dysfunction. *British journal of pharmacology*, 171(10), 2537-2551.

Frias, B., y Merighi, A. (2016). Capsaicin, nociception and pain. *Molecules*, 21(6), 797.

Genazzani, A. D., Despini, G., Czyzyk, A., Podfigurna, A., Simoncini, T., y Meczekalski, B. (2017). Modulatory effects of l-carnitine plus l-acetyl-carnitine on neuroendocrine control of hypothalamic functions in functional hypothalamic amenorrhea (FHA). *Gynecological Endocrinology*, 33(12), 963-967.).

Genazzani, A. D., Lanzoni, C., Ricchieri, F., Santagni, S., Rattighieri, E., Chierchia, E., Monteleone P., y Jasonni, V. M. (2011). Acetyl-L-carnitine (ALC) administration positively affects reproductive axis in hypogonadotropic women with functional hypothalamic amenorrhea. *Journal of endocrinological investigation*, 34(4), 287-291.

Georgescu, S. R., Sârbu, M. I., Matei, C., Ilie, M. A., Caruntu, C., Constantin, C., y Neagu, M. (2017). Capsaicin: friend or foe in skin cancer and other related malignancies?. *Nutrients*, 9(12), 1365.

Georgiadis, J. R., Kringelbach, M. L., y Pfaus, J. G. (2012). Sex for fun: a synthesis of human and animal neurobiology. *Nature reviews urology*, 9(9), 486.

- Gerendai I., y Halász B.** (1997). Neuroendocrine asymmetry. *Front Neuroendocrinol* 18: 354–381
- Gerendai, I., Csaba, Z., Vokó, Z., y Csernus, V.** (1995). Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 53(1-6), 299-305.
- 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.
- Gerendai, I., Tóth, I. E., Kocsis, K., Boldogkői, Z., Rusvai, M., y Halász, B.** (2001). Identification of CNS neurons involved in the innervation of the epididymis: a viral transneuronal tracing study. *Autonomic Neuroscience*, 92(1-2), 1-10.
- Gerendai, I., y Halász, B.** (2001). Asymmetry of the neuroendocrine system. *Physiology*, 16(2), 92-95
- Götz, V., Qiao, S., Beck, A., y Boehm, U.** (2017). Transient receptor potential (TRP) channel function in the reproductive axis. *Cell calcium*, 67, 138-147.
- Güler, S., y Zik, B.** (2018). Effects of capsaicin on ovarian granulosa cell proliferation and apoptosis. *Cell and tissue research*, 372(3), 603-609.
- Hart, A. M., Wiberg, M., Youle, M., y Terenghi, G.** (2002). Systemic acetyl-L-carnitine eliminates sensory neuronal loss after peripheral axotomy: a new clinical approach in the management of peripheral nerve trauma. *Experimental brain research*, 145(2), 182-189.
- Hausott, B., y Klimaschewski, L.** (2019). Promotion of peripheral nerve regeneration by stimulation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Pathway. *The Anatomical Record*, 302(8), 1261-1267.
- Hernandez-López G., I.** (2014). Participación de la inervación sensorial sobre la espermatogénesis de la rata. (Tesis de pregrado). Benemerita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México.
- Hill M. A.** (2019). Embryology fertilization. USN. Puebla, Mexico. <https://embryology.med.unsw.edu.au>
- Hiura, A.** (2000). Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. *Archives of histology and cytology*, 63(3), 199-215.
- Holstein, A. F., Schulze, W., y Davidoff, M.** (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 107.
- Holzer, P.** (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, 24(3), 739-768.

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*, 1004130262-1004130262.

Iossa, S., Mollica, M. P., Lionetti, L., Crescenzo, R., Botta, M., Barletta, A., y Liverini, G. (2002). Acetyl-L-carnitine supplementation differently influences nutrient partitioning, serum leptin concentration and skeletal muscle mitochondrial respiration in young and old rats. *The Journal of nutrition*, 132(4), 636-642.

Jeulin, C., y Lewin, L. M. (1996). Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, 2(2), 87-102.

Jones, L. L., McDonald, D. A., y Borum, P. R. (2010). Acylcarnitines: role in brain. *Progress in lipid research*, 49(1), 61-75.

Kareiva K. D. y Rose W. (2014). The reproductive system. *Anatomy and Physiology*. Vol 2. (pp. 1025-1040): Edition T.E.

Kasuga, H., Aigaki, T., y Osanai, M. (1999). Spermatogenesis, Overview. *reproduction*, 21, 199-221

Knoblauch, D. LT. 2012. Male Reproductive System. *Comparative Anatomy and histology: A Mouse and human Atlas*, 285-308.

Ko, E. Y., Sabanegh Jr, E. S., y Agarwal, A. (2014). Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertility and sterility*, 102(6), 1518-1527.

Kumar, A., Dumasia, K., Gaonkar, R., Sonawane, S., Kadam, L., y Balasinor, N. H. (2015). Estrogen and androgen regulate actin-remodeling and endocytosis-related genes during rat spermiation. *Molecular and cellular endocrinology*, 404, 91-101.

Kumar, N., y Singh, A. K. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of human reproductive sciences*, 8(4), 191.

Laudano, M. A., Osterberg, E. C., Sheth, S., Ramasamy, R., Sterling, J., Mukherjee, S., Robinson B., D., Parekattil S., Goldstein M., Schlegel P., N., y Li, P. S. (2014). Microsurgical denervation of rat spermatic cord: safety and efficacy data. *BJU international*, 113(5), 795-800

Li, C., Watanabe, G., Weng, Q., Jin, W., Furuta, C., Suzuki, A. K., Kawaguchi M., y Taya, K. (2005). Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors TrkA and p75 in the reproductive organs of the adult male rats. *Zoological science*, 22(8), 933-937

Li, D., Liu, J., Du, W., Liu, H., Xiao, W., Song, X., Fan Z., Ke C., Yu Q. Qin W., Tang Y y Tang, Y. (2017). Carnitine/organic cation transporter 2 (OCTN2) contributes to rat epididymal epithelial cell growth and proliferation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 444-450.

- Li, S., Wang, X., Ye, H., Gao, W., Pu, X., y Yang, Z. (2010).** Distribution profiles of transient receptor potential melastatin-and vanilloid-related channels in rat spermatogenic cells and sperm. *Molecular biology reports*, 37(3), 1287-1293
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., y Cheng, Y. (2013).** Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504(7478), 107-112.
- Liu, L. (2019).** Applied Anatomy of the Scrotum and its Contents. In *Scroscopic Surgery* (pp. 1-8). Academic Press.
- Liu, Y., y Wang, H. (2020).** Peripheral nerve injury induced changes in the spinal cord and strategies to counteract/enhance the changes to promote nerve regeneration. *Neural regeneration research*, 15(2), 189.
- Lucio, R. A., y Tlachi-López, J. L. (2008).** Análisis de la cópula y el eyaculado en la rata albina (*Rattus norvegicus*): Manual de laboratorio. Tlaxcala, México: Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Luckensmeyer, G. B., y Keast, J. R. (1994).** Projections from the prevertebral and major pelvic ganglia to the ileum and large intestine of the male rat. *Journal of the autonomic nervous system*, 49(3), 247-259.
- Luckensmeyer, G. B., y Keast, J. R. (1995).** Immunohistochemical characterisation of sympathetic and parasympathetic pelvic neurons projecting to the distal colon in the male rat. *Cell and tissue research*, 281(3), 551-559.
- Luckensmeyer, G. B., y Keast, J. R. (1998).** Projections of pelvic autonomic neurons within the lower bowel of the male rat: an anterograde labelling study. *Neuroscience*, 84(1), 263-280.
- Makker, K., Agarwal, A., y Sharma, R. (2009).** Oxidative stress & male infertility. *Indian Journal of Medical Research*, 129(4), 357.
- Manzo, J., Vazquez, M. I., Cruz, M. R., Hernandez, M. E., Carrillo, P., y Pacheco, P. (2000).** Fertility ratio in male rats: effects after denervation of two pelvic floor muscles. *Physiology & behavior*, 68(5), 611-618.
- Mardanshahi, T., Rezaei, N., Zare, Z., Shafaroudi, M. M., y Mohammadi, H. (2019).** Effects of L-Carnitine on the sperm parameters disorders, apoptosis of spermatogenic cells and testis histopathology in diabetic Rats. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 17(5)
- McCann, S. M., Karanth, S., Mastronardi, C. A., Les Dees, W., Childs, G., Miller, B., Sower S. y Wen, H. Y. (2001).** Control of gonadotropin secretion by follicle-stimulating hormone-releasing factor, luteinizing hormone-releasing hormone, and leptin. *Archives of Medical Research*, 32(6), 476-485.
- McGraw, L. A., Suarez, S. S., y Wolfner, M. F. (2015).** On a matter of seminal importance. *BioEssays*, 37(2), 142-147.

McKenna, K. (1999). SSI Grand Master Lecture 3. 'The brain is the master organ in sexual function: Central nervous system control of male and female sexual function'. *International journal of impotence research*, 11(S1), S48.

Nallella, K. P., Sharma, R. K., Aziz, N., y Agarwal, A. (2006). Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and sterility*, 85(3), 629-634.

Nallella, K. P., Sharma, R. K., Aziz, N., y Agarwal, A. (2006). Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and sterility*, 85(3), 629-634.

Notartomaso, S., Mascio, G., Bernabucci, M., Zappulla, C., Scarselli, P., Cannella, M., Imbriglio T., Gradini R., Battaglia G., Bruno V., y Nicoletti, F. (2017). Analgesia induced by the epigenetic drug, L-acetylcarnitine, outlasts the end of treatment in mouse models of chronic inflammatory and neuropathic pain. *Molecular pain*, 13, 1744806917697009.

Onger, M. E., Kaplan, S., Deniz, Ö. G., Altun, G., Altunkaynak, B. Z., Balci, K., Raimondo S., y Geuna, S. (2017). Possible promoting effects of melatonin, leptin and alcar on regeneration of the sciatic nerve. *Journal of chemical neuroanatomy*, 81, 34-41.

Onofrj, M., Ciccocioppo, F., Varanese, S., Di Muzio, A., Calvani, M., Chiechio, S., Osio M., y Thomas, A. (2013). Acetyl-L-carnitine: from a biological curiosity to a drug for the peripheral nervous system and beyond. *Expert review of neurotherapeutics*, 13(8), 925-936.

Pacey, A., y Williams, K. (2018). The Human Spermatozoa. *Clinical Reproductive Science*, 65-71.

Parra, R., y del Sol, M. (2002). Estudios histológico e histoquímico del epidídimo de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). *Revista chilena de anatomía*, 20(3), 269-274.

Pecze, L., Viskolcz, B., y Oláh, Z. (2017). Molecular surgery concept from bench to bedside: a focus on TRPV1+ pain-sensing neurons. *Frontiers in physiology*, 8, 378.

Pena, F. J., Rodríguez-Martínez, H., Tapia, J. A., Ortega-Ferrusola, C., Gonzalez-Fernandez, L., y Macias-Garcia, B. (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 345-349.

Quiroz, U., Morales-Ledesma, L., Morán, C., Trujillo, A., y Domínguez, R. (2014). Lack of sensorial innervation in the newborn female rats affects the activity of hypothalamic monoaminergic system and steroid hormone secretion during puberty. *Endocrine*, 46(2), 309-317.

Reyes-Luna R., López-Morales D., Quiroz-López U. y Flores-Alonso J. C. (2015) Curso – Taller Analisis de semen humano en base a los parametros de la OMS y fragmentación de ADN espermático. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

Rezaei, N., Mardanshahi, T., Shafaroudi, M. M., Abedian, S., Mohammadi, H., y Zare, Z. (2018). Effects of l-carnitine on the follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone, and testicular tissue oxidative stress levels in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of evidence-based integrative medicine*, 23, 2515690X18796053.

Roosen-Runge, E. C. (1977). *The process of spermatogenesis in animals (Vol. 5)*. CUP Archive. p.p: 1-13.

Rosca, M. G., Lemieux., y Hoppel, C., I. (2009). Mitochondrial in the elderly: Is acetylcarnitine a rejuvenator? *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61(4): 1332-1342.

Samimi, M., Jamilian, M., Ebrahimi, F. A., Rahimi, M., Tajbakhsh, B., y Asemi, Z. (2016). Oral carnitine supplementation reduces body weight and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical endocrinology*, 84(6), 851-857.

Schellino, R., Trova, S., Cimino, I., Farinetti, A., Jongbloets, B. C., Pasterkamp, R. J., G Panzica, P., Giacobini, S De Marchis y Peretto, P. (2016). Opposite-sex attraction in male mice requires testosterone-dependent regulation of adult olfactory bulb neurogenesis. *Scientific reports*, 6(1), 1-15.

Sharlip, I. D., Jarow, J. P., Belker, A. M., Lipshultz, L. I., Sigman, M., Thomas, A. J., Schlegel P. N., Howards A. S., Nehra A., Damewood M. D., Overstreet J. W., Overstreet, J. W. y Sadowsky R. (2002). Best practice policies for male infertility. *Fertility and sterility*, 77(5), 873-882.

Sima, A. A., Calvani, M., Mehra, M., y Amato, A. (2005). Acetyl-L-carnitine improves pain, nerve regeneration, and vibratory perception in patients with chronic diabetic neuropathy: an analysis of two randomized placebo-controlled trials. *Diabetes care*, 28(1), 89-94.

Smutzer, G., y Devassy, R. K. (2016). Integrating TRPV1 receptor function with capsaicin psychophysics. *Advances in pharmacological sciences*, 2016.

Sosa, Z. Y., Palmada, M. N., Fóscolo, M. R., Capani, F., Conill, A., y Cavicchia, J. C. (2009). Administration of noradrenaline in the autonomic ganglia modifies the testosterone release from the testis using an ex vivo system. *International journal of andrology*, 32(4), 391-398.

Stark, R., Reichenbach, A., y Andrews, Z. B. (2015). Hypothalamic carnitine metabolism integrates nutrient and hormonal feedback to regulate energy homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology*, 418, 9-16.

Tena-Sempere, M. (2007). Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitamins and Hormones*, 77, 285-300.

Tomassoni, D., Mannelli, L. D. C., Bramanti, V., Ghelardini, C., Amenta, F., y Pacini, A. (2018). Treatment with acetyl-L-carnitine exerts a neuroprotective effect in the sciatic

nerve following loose ligation: a functional and microanatomical study. *Neural regeneration research*, 13(4), 692.

Traina, G. (2016). The neurobiology of acetyl-L-carnitine. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 21, 1314-1329.

Wang, H.-P., Pu, X.-Y., y Wang, X.-H. (2007). Distribution profiles of transient receptor potential melastatin-related and vanilloid-related channels in prostatic tissue in rat. *Asian Journal of Andrology*, 9(5), 634–640

Wilson, A. D., Hart, A., Brännström, T., Wiberg, M., y Terenghi, G. (2007). Delayed acetyl-L-carnitine administration and its effect on sensory neuronal rescue after peripheral nerve injury. *Journal of plastic, reconstructive and aesthetic surgery*, 60(2), 114-118.

Wilson, A. D., Hart, A., Wiberg, M., y Terenghi, G. (2010). Acetyl-l-carnitine increases nerve regeneration and target organ reinnervation—a morphological study. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 63(7), 1186-1195.

Winters, S. J., y Huhtaniemi, I. T. (Eds.). (2017). *Male Hypogonadism: Basic, Clinical and Therapeutic Principles*. Humana Press.p: 1-16

Zhang, X., Cui, Y., Dong, L., Sun, M., y Zhang, Y. (2019). The efficacy of combined l-carnitine and l-acetyl carnitine in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: A systematic review and meta-analysis. *Andrologia*, e13470.

Zhou, X., Liu, F., y Zhai, S. (2007). Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 16, 383.

Zini, A. (2011). Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction (p. 512). A. Agarwal (Ed.). New York, NY: Springer. pp: 19-39.

