



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL SISTEMA
SEROTONINÉRGICO EN LAS FUNCIONES DEL
TESTICULO DE LA RATA MACHO EN LA
ETAPA JUVENIL.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A
MIRIAM MARÍN TÉLLEZ

DIRECTORA: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR.

MÉXICO, D.F. JUNIO 15 DEL 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza"

**EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL SISTEMA
SEROTONINÉRGICO EN LAS FUNCIONES DEL TESTÍCULO DE
LA RATA MACHO EN LA ETAPA JUVENIL**

Tesis que para obtener el título de biólogo presenta: Miriam Marín Téllez

Directora de Tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

Tesis realizada en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción,
Laboratorio de Pubertad de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA
clave 210500

DEDICATORIAS

A mis padres:

Juan y María por su amor incondicional y porque sé que siempre han querido lo mejor para mí. Pero en especial a ti mamá por apoyarme en todo y estar siempre a mi lado, recuerda que cada uno de mis logros es un logro tuyo también.

A mis hermanos:

Gelo, Lorena, Gerardo, Claudia, Pablo, Eduardo, Aurora y David, porque sé que siempre podré contar con ustedes.

A mis sobrinos:

*Claudio-Alberto, Erick, Hakcel, Brandon, Betito, Alexis y Edson
Alí, por alegrar mi vida.*

A mis tías:

Quito y Celi por ser ambas una segunda mamá y amiga y por sus valiosos consejos en todo momento.

A mis amigas:

*Inés, Lilo, Jacqueline, Gladys, Liz, Sra. Ely, Sra. Rosario, Aranza y
Gema por todos los momentos agradables y desagradables
compartidos, gracias por dejarme conocerlas y compartir parte
de su vida conmigo.*

¡LOS QUIERO!

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena por su valiosa enseñanza, apoyo y consejos brindados, pero sobre todo por aguantarme durante todo este tiempo, muchas gracias profesora.

Al Dr. Andrés Aragón Martínez por sus enseñanzas, conocimientos y apoyo aportado para la realización de este estudio.

A los miembros del jurado:

Dra. María Elena Ayala Escobar.

Dr. Roberto Domínguez Casalá.

Dra. Leticia Morales Ledesma.

M. en ISBH Angélica Flores Ramírez.

M. en C. Luis Sánchez Sánchez.

Por sus valiosas sugerencias en la revisión de este trabajo.

A tí Juanita por tu ayuda académica, pero sobre todo por tu apoyo personal brindado en todo momento.

A mis compañeros del laboratorio de pubertad, especialmente a Eloir y Selene por los momentos agradables compartidos.

A mis profesores de la carrera que con sus enseñanzas han contribuido a mi formación.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

Resumen	I
Introducción	1
Aparato Reproductor Masculino.....	1
Espermatogénesis y Ciclo del epitelio seminífero.....	6
Esteroidogénesis.....	12
Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo.....	15
Pubertad en el Macho.....	18
Apoptosis y Testículo.....	19
Serotonina y Testículo.....	22
Justificación	28
Hipótesis	29
Objetivos	29
Materiales y Métodos	31
Procedimiento de la autopsia.....	31
Estudio histológico.....	32
Cuantificación de Esteroides.....	32
Cuantificación de gonadotropinas.....	33
Cuantificación de catecolaminas y serotonina.....	33
Análisis Estadístico.....	34
Resultados	35
Discusión	58
Conclusiones	67
Perspectivas	68
Bibliografía	69
Apéndice	80

RESUMEN

La secreción de las gonadotropinas es modulada por diferentes sistemas de neurotransmisión, entre los que se encuentra el sistema serotoninérgico. Sin embargo, hasta el momento existen evidencias controversiales que señalan que este sistema de neurotransmisión puede participar de manera estimulante o inhibitoria en la modulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y a su vez de las gonadotropinas. También se sugiere que la serotonina puede actuar directamente en el testículo, regulando las funciones del órgano. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos del bloqueo del sistema serotoninérgico inducido por la administración de la p-cloroanfetamina (PCA) en la etapa juvenil (30 días) sobre la producción de gonadotropinas, hormonas esteroides, ciclo del epitelio seminífero, apoptosis en el testículo y cambios en la actividad del sistema serotoninérgico en el hipotálamo anterior (HA), medio (HM) y posterior (HP), rafé dorsal (RD) y rafé medial (RM).

En comparación con el grupo de animales que recibieron solución salina (VH), en los animales que recibieron la PCA el peso testicular disminuyó (1.1046 ± 0.1382 g vs. 1.8567 ± 0.0625 g, $p < 0.05$). La concentración de testosterona en suero presentó tendencia a disminuir (211 ± 25.6 pg/ml vs. 879 ± 468.4 pg/ml, no significativo) y la de la hormona folículo estimulante (FSH) presentó un comportamiento inverso (13.6736 ± 1.616 ng/ml vs. 7.6576 ± 2.088 ng/ml, no significativo).

En los animales tratados con PCA se presentó un incremento en el número de túbulos seminíferos anormales, los cuales contenían tipos celulares atípicos y una mayor incidencia en el proceso de apoptosis en comparación al grupo testigo absoluto.

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto o tratado con VH, en los animales que recibieron PCA la concentración de serotonina disminuyó

INTRODUCCIÓN

Las funciones del sistema reproductor están encaminadas a garantizar la supervivencia no del individuo, sino de la especie (Parker y Thibodeau, 1983). Los mecanismos que controlan el funcionamiento del aparato reproductor dependen de las interacciones neuroendócrinas entre el sistema nervioso central y el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Norman y Litwack, 1997).

Aparato Reproductor Masculino

El aparato reproductor masculino está constituido por los testículos, los epidídimos, los conductos deferentes y las glándulas sexuales anexas (las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales) (Figura 1) (Geneser, 2000; Ross y col., 1992; Vander y col., 2001).

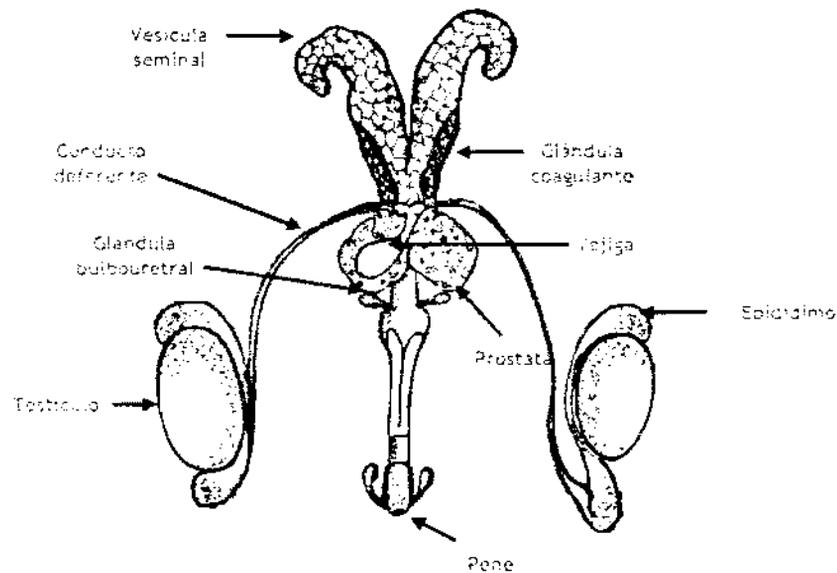


Figura 1. Representación esquemática del aparato reproductor de la rata macho (Modificado de Setchell y col., 1994).

Las funciones del testículo son la formación de los espermatozoides y la secreción de hormonas, de las cuales la que tiene mayor actividad biológica como andrógeno es la testosterona. Es por ello, que los testículos son considerados como los órganos primarios del aparato reproductor, ya que mediante sus secreciones hormonales, regulan el funcionamiento de los órganos sexuales secundarios (Ojeda y Urbanski, 1994; Reyes y col., 1991; Romano y Pedernera, 1991; Sharpe, 1994).

Desde el punto de vista anatómico y funcional, el testículo se puede dividir en dos compartimientos: el compartimiento del túbulo seminífero, formado fundamentalmente por tres tipos celulares: las células mioides peritubulares que delimitan al túbulo seminífero, las células de Sertoli que no se dividen una vez alcanzada la pubertad y las células germinales que están en constante proliferación y diferenciación. El segundo es el compartimiento intersticial, en el que se localizan las células de Leydig, responsables de la producción de andrógenos (Norman y Litwack, 1997; Reyes y col., 1991).

Las secreciones de las células de Leydig junto con las gonadotropinas, proporcionan el medio hormonal esencial para el desarrollo y la maduración de las células espermatogénicas. Además, existen otros tipos de células en el compartimiento intersticial, como por ejemplo: los macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales que pueden producir sustancias que contribuyen al desarrollo adecuado de la espermatogénesis (Dufau y col., 1993).

Las células mioides peritubulares forman una capa que circunda al túbulo seminífero y tienen una doble función: son las responsables de que el túbulo se contraiga y están relacionadas con el transporte metabólico (Gondos y Kogan, 1990). Subyacente a esta capa se localiza la membrana basal constituida principalmente por fibronectina y laminina, inmediatamente después los túbulos están revestidos por un epitelio especializado, el epitelio seminífero, conformado

por células espermatogénicas y células de Sertoli (Geneser, 2000; Reyes y col., 1991; Ross y col., 1992).

Las células de Sertoli se extienden desde la lámina basal hasta la luz del túbulo y presentan numerosas prolongaciones apicales y laterales, que se proyectan hacia los intersticios que existen entre las células espermatogénicas adyacentes. Entre las células de Sertoli adyacentes, existen uniones ocluyentes cerca de la base del epitelio seminífero y por encima de las espermatogonias, estas uniones dividen al epitelio seminífero en dos compartimientos: el basal, que contiene a las espermatogonias y espermatocitos en preleptoteno y el adluminal, que contiene a los espermatocitos en etapas más avanzadas y a las espermátides (Figura 2). Se considera que estas uniones forman una barrera estructural llamada barrera hematotesticular, que regula el paso de moléculas desde el líquido intersticial hacia la luz del túbulo. La formación de esta barrera es de gran importancia, ya que aísla a los espermatozoides y otras células en estadios tempranos de la espermatogénesis en un microambiente privilegiado, evita la liberación de antígenos e impide la entrada de anticuerpos o de células del sistema inmunológico que puedan provocar la autosensibilización y ocasionar el desarrollo de oligospermia o azoospermia (Gondos y Kogan, 1990; Reyes y col., 1991; Setchell, 1978).

Son múltiples las funciones que se le atribuyen a las células de Sertoli, entre ellas están: soporte físico y nutrición de las células germinales, que se encuentran aisladas del riego sanguíneo por las uniones de oclusión entre las células de sostén; protección contra el ataque autoinmunológico por las inmunoglobulinas en la sangre; fagocitosis de cuerpos residuales eliminados por los espermatozoides en maduración; secreción de líquido para el transporte de los espermatozoides, secreción de la proteína fijadora de los andrógenos (ABP), de la activina que actúa sobre la hipófisis y estimula la producción de la hormona foliculo estimulante (FSH) y de la inhibina, que actúa de manera inhibitoria sobre la secreción de la FSH (Paulsen, 1991; Setchell, 1978).

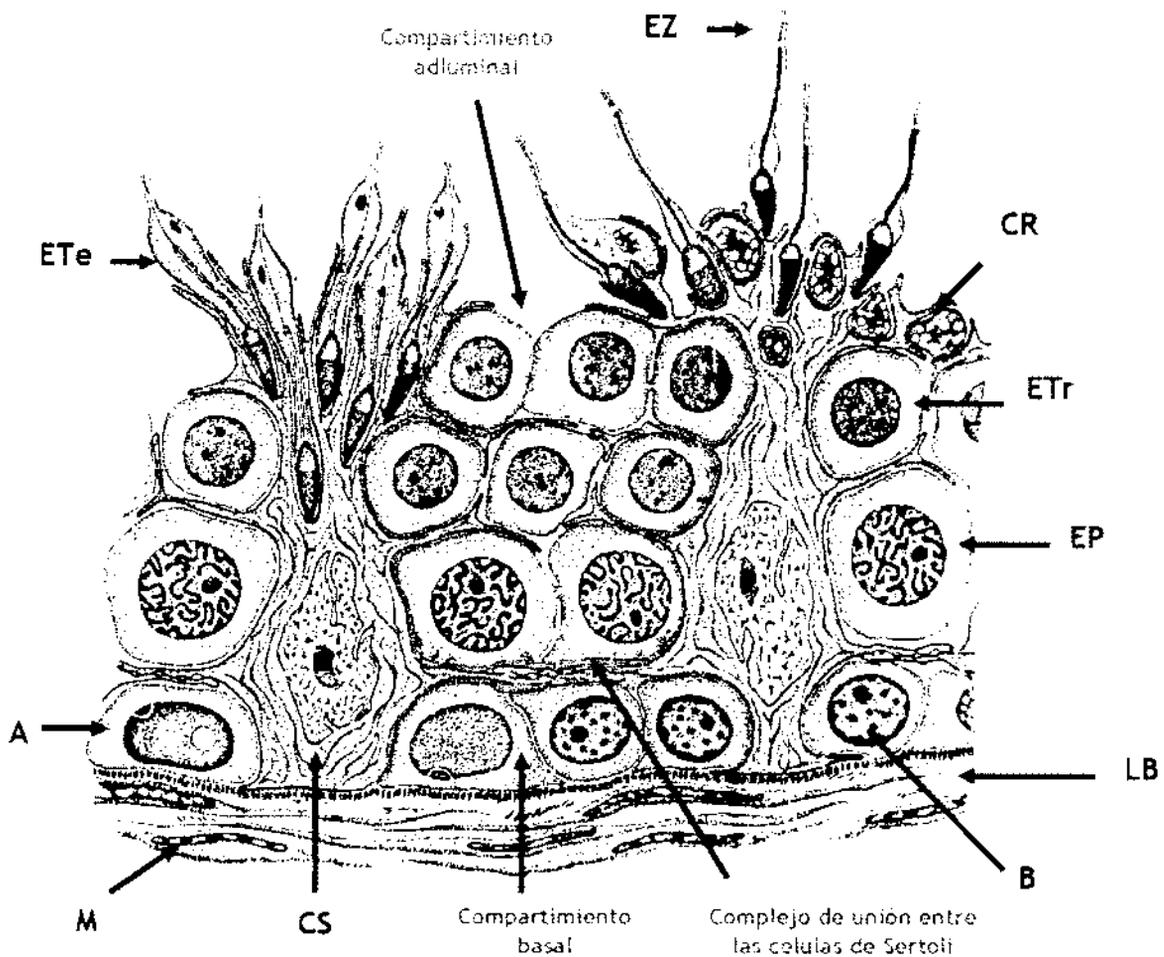


Figura 2. Representación esquemática del epitelio seminífero, que descansa sobre una lámina basal (LB) y las células de Sertoli (CS) y rodeado por una capa de células mioideas peritubulares (M). Se observa las células germinales en sus diferentes etapas de desarrollo como son: las espermatogonias del tipo (A) y (B), los espermatocitos en paquiteno (EP), las espermátides redondas (ETr) y elongadas (ETe), los espermatozoides (EZ) y los cuerpos residuales (CR), así como el compartimiento basal y adluminal y la barrera hematotesticular conformada por las uniones entre las células de Sertoli (Modificado de Ross y col., 1992).

El tejido intersticial que rodea los túbulos seminíferos contiene a las células de Leydig, las cuales son de forma ovoide y con el núcleo excéntrico. Se ubican por lo general alrededor de los vasos sanguíneos, que son la vía para la

obtención del colesterol, sustrato necesario para la síntesis de hormonas esteroideas. La función endocrina de estas células es la de sintetizar y secretar casi toda la testosterona, ya que menos del 5% proviene de las glándulas suprarrenales (Ross y col., 1992; Setchell, 1978).

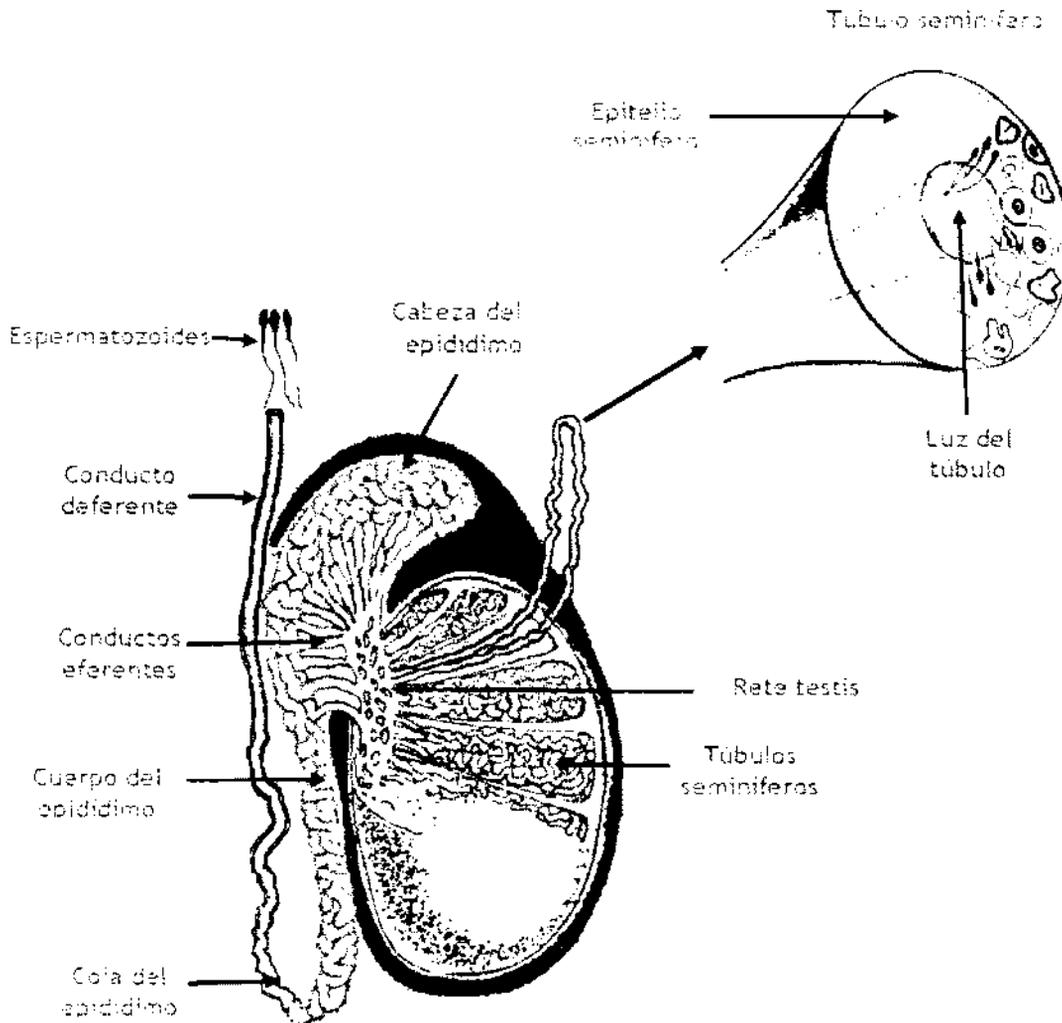


Figura 3. Representación esquemática de un corte longitudinal de testículo donde se muestra la anatomía interna de la gónada, del epidídimo y del túbulo seminífero (Modificada de Bloom y Fawcett, 1975).

Otro componente importante del aparato reproductor es el epidídimo, que se ubica a lo largo de la superficie posterior del testículo. Está conformado por el conducto del epidídimo, el tejido conectivo vascularizado, la musculatura lisa y la túnica de tejido conectivo fibroso asociado. El conducto del epidídimo es un túbulo muy tortuoso; está dividido en una cabeza o segmento principal, un cuerpo o segmento medio y una cola o segmento terminal (Figura 3) y está revestido por un epitelio seudoestratificado. El transporte de los espermatozoides tiene lugar en el segmento inicial y en la primera parte del cuerpo, el segmento medio es asiento de la maduración de los espermatozoides. La porción caudal del conducto o segmento terminal, es el sitio de almacenamiento de los espermatozoides maduros (Geneser, 2000; Parker y Thibodeau, 1983; Ross y col., 1992).

Espermatogénesis y ciclo del epitelio seminífero

El proceso mediante el cual las células germinales inmaduras (las espermatogonias) se convierten en espermatozoides es llamado espermatogénesis (Jones, 1997). Cuando se habla de espermatogénesis, es necesario distinguir entre las tres etapas de desarrollo de las células germinales, las cuales son: iniciación, mantenimiento y reiniciación. La iniciación consta del primer ciclo de espermatogénesis, que es la formación de espermatozoides durante la pubertad. El mantenimiento se refiere al conjunto de eventos necesarios para asegurar la producción de espermatozoides en el organismo sexualmente maduro. La reiniciación se refiere a la producción de gametos una vez que este proceso ha sido interrumpido. Además también se debe hacer una clara distinción entre la espermatogénesis cualitativamente normal, que hace referencia a la presencia de todos los tipos celulares pero en cantidades reducidas y la espermatogénesis cuantitativamente normal, que es el desarrollo de todos los tipos celulares en cantidades completas (Meistrich, 1993).

El ciclo del epitelio seminífero se refiere al desarrollo secuencial de los diferentes tipos celulares en el túbulo seminífero, cuya sucesión es dividida en etapas. En la rata, el ciclo del epitelio seminífero ha sido dividido para su estudio en catorce etapas enumeradas del I a la XIV, cuya duración total de la espermatogénesis es de 51-53 días (Rusell y col., 1990; Weinbauer y Neischlag, 1993).

Cada etapa de desarrollo se caracteriza y clasifica con base en los tipos celulares presentes, así como en la morfología del acrosoma, y de la cabeza de las espermátides jóvenes. En las etapas I a la VIII se encuentran presentes espermatogonias, espermátocitos, espermátides redondas y espermatozoides, mientras que en las etapas IX a la XIV se encuentran espermátocitos y espermátides alargadas en diferentes estados de desarrollo (Rusell y col., 1990).

Las células que se encuentran en el primer estadio de la espermatogénesis son las espermatogonias, que tapizan la membrana basal de cada túbulo seminífero. Las espermatogonias son diploides y están en división continua, algunas de las células producidas por estas divisiones mitóticas permanecen indiferenciadas, mientras que otras se separan de la membrana basal e inician un proceso de diferenciación que da como resultado a los espermátocitos primarios. Los espermátocitos primarios experimentan la primera división meiótica dan origen a los espermátocitos secundarios haploides. Los espermátocitos secundarios experimentan la segunda división meiótica que produce espermátides que también son haploides y redondeadas con una gran cantidad de citoplasma y se localizan cerca de la luz del túbulo seminífero. Las espermátides sufren un proceso de maduración conocido como espermiogénesis y como consecuencia, dan origen a los espermatozoides (Figura 3) (Geneser, 2000; Jones, 1997; Ross y col., 1992).

Durante la espermiogénesis, las espermátides sufren cambios morfológicos y funcionales encaminados al desarrollo de una célula con las características que

le permitan llevar a cabo la fertilización del óvulo. Estos cambios morfológicos ocurren simultáneamente durante la transformación de la espermatide a espermatozoide, incluyendo el desarrollo de un acrosoma y el flagelo, la condensación nuclear, la reorganización mitocondrial y la eliminación de citoplasma residual, lo que da origen a los cuerpos residuales, que son fagocitados y reutilizados por las células de Sertoli (Meistrich, 1993).

Una vez formado el espermatozoide, viaja al epidídimo para madurar funcionalmente, este proceso es conocido como capacitación. Las células epiteliales del epidídimo fagocitan cualquier corpúsculo residual no eliminado por las células de Sertoli. El epidídimo secreta un pequeño volumen de líquido seminal y la mayor parte del líquido que no es absorbido por los conductillos eferentes se reabsorbe en la porción proximal del epidídimo. Durante el pasaje de los espermatozoides por el epidídimo, los espermatozoides también adquieren movilidad y la capacidad para fertilizar al óvulo, esta maduración también depende de los andrógenos (Geneser, 2000; Parker y Thibodeau, 1983; Ross y col., 1992).

La espermatogénesis en los mamíferos es regulada por las gonadotropinas [la hormona luteinizante (LH) y la FSH]; por las aminas biogénicas (noradrenalina, adrenalina y serotonina); por algunos factores de crecimiento como son: el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF α y TGF β), factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I); y por los propios andrógenos (Robertson y col., 1993).

La síntesis y liberación de las gonadotropinas es regulada por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que a su vez, está sujeta a la regulación de la retroalimentación mediada por los esteroides testiculares (testosterona principalmente), inhibinas (A y B) y activinas (heterodímeros y homodímeros de la subunidad β de las inhibinas) (Veldhuis, 2001; Weinbauer y Nieschlag, 1993).

Para la iniciación de la espermatogénesis y el desarrollo de la capacidad reproductiva del macho se requieren altas concentraciones de testosterona y FSH. La FSH es necesaria para que se inicien las divisiones de las células germinales en el testículo de la rata inmadura, y al parecer también estimula las divisiones meióticas, predominantemente de los espermatocitos primarios hasta espermátides. Chandolia y col., (1991) (citado en Weinbauer y Nieschlag, 1993) mostraron que cuando en la rata prepuberal se bloquea la acción de la testosterona, al administrar un antiandrógeno, disminuye el número de células germinales. Además cuando a ratas hipofisectomizadas se les administra testosterona en el día de la cirugía o poco tiempo después, se mantiene la espermatogénesis sólo de manera cualitativamente normal (Sun y col., 1990, citado en Weinbauer y Nieschlag, 1993). Hallazgos similares fueron obtenidos en ratas intactas que recibieron un tratamiento con altas dosis de testosterona (Berndtson y col., (1974); Huang y Nieschlag, (1986) (Citados en Weinbauer y Nieschlag, 1993). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la testosterona en el mantenimiento de la espermatogénesis.

Resultados obtenidos por Sun y col., (1989); Santulli y col., (1990) (citados en Weinbauer y Nieschlag, 1993), muestran que en las ratas hipofisectomizadas, no se lleva a cabo la formación completa del número de espermatozoides. Con base en esta evidencia es posible sugerir que el proceso de espermatogénesis además de requerir de los andrógenos testiculares, también requiere de las gonadotropinas. Sin embargo, la FSH no es suficiente para que se lleve a cabo la formación de los espermatozoides, ya que sólo puede iniciarla. Esta hormona también es necesaria para que se complete el primer ciclo de la espermatogénesis y el testículo adquiera las dimensiones normales en la etapa adulta (Weinbauer y Nieschlag, 1993).

Se ha mostrado que la testosterona participa en la prevención de la degeneración de los espermatocitos, y particularmente en las etapas VII-VIII de la

espermatogénesis donde impide la degeneración de las espermatídes (Figura 4) (McLachlan y col., 1996).

El efecto de la FSH en la espermatogénesis depende también de la disponibilidad de los andrógenos testiculares. Spiteri-Grech y col., (1993) (citado en Weinbauer y Nieschlag, 1993) encontraron que cuando en medios de cultivo se mantienen células germinales de ratas macho tratadas previamente con antagonistas de la GnRH y en ausencia de células de Leydig, el número de células germinales disminuyen significativamente. Esto también observaron cuando bloquearon la acción de los andrógenos testiculares por la administración de antiandrógenos en ratas prépuberales (Chandolia y col., 1991; citado en Weinbauer y Nieschlag, 1993). Estas observaciones permiten a los autores sugerir que la interacción entre las gonadotropinas y los andrógenos testiculares, es necesaria para que se lleve a cabo el desarrollo adecuado de la espermatogénesis (Weinbauer y Nieschlag, 1993).

Al parecer se requiere de la testosterona y la FSH para que se establezca la comunicación entre las espermatídes y las células de Sertoli. Entre ambas hay estructuras proteínicas del citoesqueleto, como la actina y vinculina, encargadas de anclar a las espermatídes con la célula de Sertoli para que se lleve a cabo el intercambio metabólico entre estas células (Weinbauer y Nieschlag, 1993).

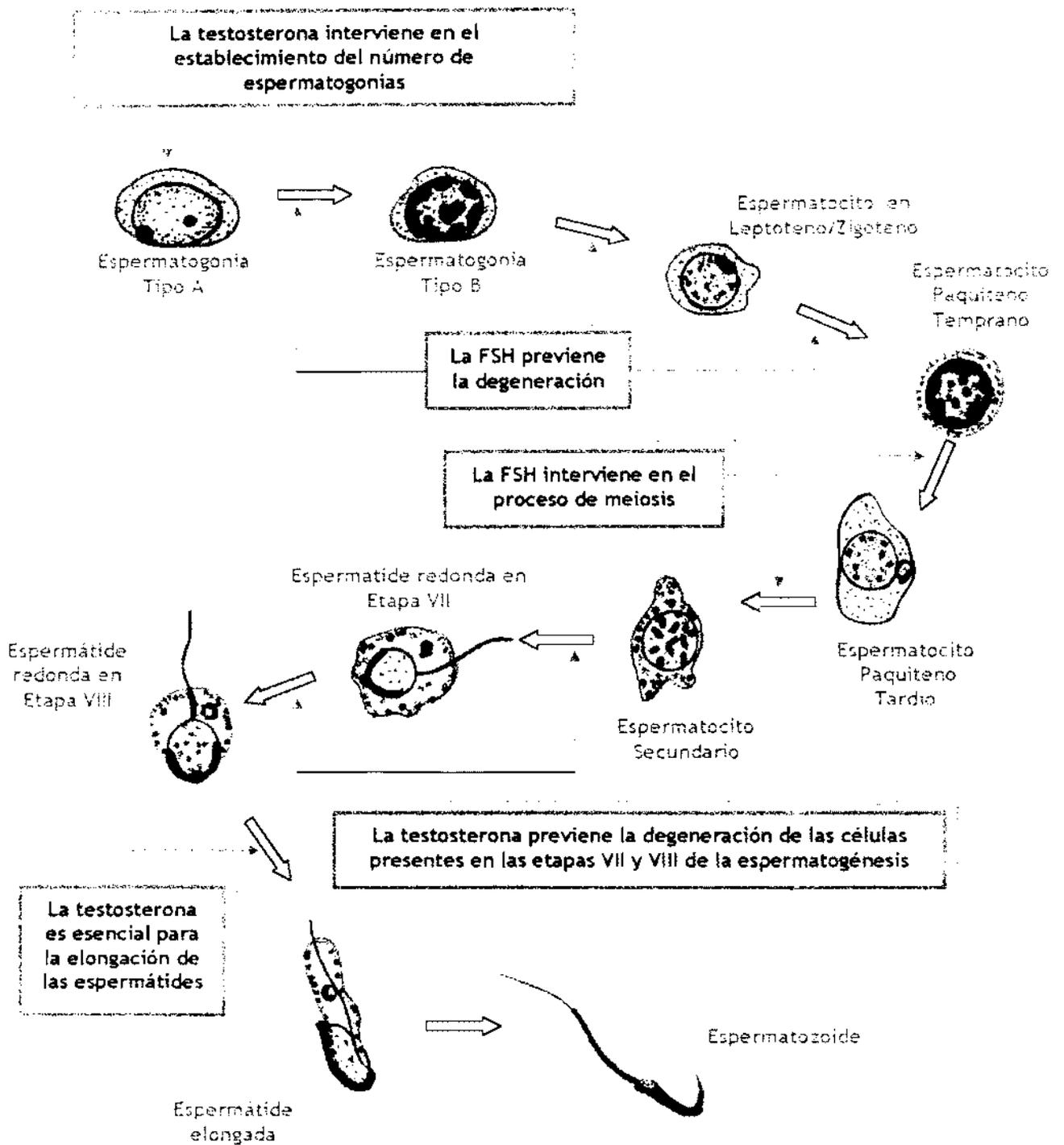


Figura 4. Efecto de la testosterona y de la FSH en el desarrollo de las células germinales en el testículo de la rata adulta (Modificado de McLachlan y col., 1996).

Esteroidogénesis

En los vertebrados las hormonas esteroideas son sintetizadas en varios tejidos endócrinos, como son: las gónadas, las adrenales y la placenta. Además de estos tejidos, hay muchos sitios extraglandulares donde la síntesis de esteroideas puede tener un efecto en la función celular. Estos sitios extraglandulares incluyen al cerebro, el tejido adiposo, la piel, los huesos y numerosos tejidos en el feto (Hinshelwood, 1999; Norman y Litwack, 1997).

El colesterol es el sustrato a partir del cual todas las hormonas esteroideas son sintetizadas. En la célula esteroideogénica el colesterol tiene dos orígenes: se puede formar en la propia célula de Leydig a partir del acetato y también puede ser captado de la sangre por el receptor de las lipoproteínas, que son las que intervienen en el transporte del colesterol circundante. El colesterol puede ser esterificado y almacenado en gotas de lípidos. La hidrólisis de los ésteres del colesterol a colesterol, es catalizada por la esterasa, una enzima que puede ser activada por la LH (Hinshelwood, 1999).

La LH al unirse a la membrana de las células de Leydig, activa el sistema del adenosin monofosfato cíclico (AMPC), el cual inicia la activación de la proteína cinasa, que cataliza la fosforilación de proteínas intracelulares y la movilización de precursores del esteroide, principalmente por la conversión de colesterol a pregnenolona. Esta etapa se realiza en el interior de la mitocondria con la participación de la enzima monooxigenasa P-450_{scc}. Esta reacción constituye el paso limitante de la biosíntesis de los andrógenos. A partir de la pregnenolona hay dos vías alternativas para la síntesis de testosterona. La vía que se conoce como $\Delta 4$ y que requiere el paso a progesterona, 17- α -hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona; y la vía $\Delta 5$ cuyos compuestos formados son la 17- α -hidroxipregnenolona, la dehidroepiandrosterona (DHEA), eventualmente el 5 α -androstenediol y la testosterona. En la rata la vía $\Delta 4$ es la ruta que predomina,

mientras que en el humano se utiliza la vía $\Delta 5$ hasta llegar a la DHEA. Las enzimas que intervienen en ambas vías metabólicas son las mismas, la única diferencia reside en la actividad del complejo 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa $\Delta 5$ -isomerasa que convierte a los compuestos de la vía $\Delta 5$ en compuestos de la vía $\Delta 4$ (Figura 5) (Hinshelwood, 1999; Romano y Pedemera, 1991; Tresguerres, 1999).

El principal andrógeno secretado por el testículo de la rata adulta es la testosterona. Si bien se producen otros andrógenos como la androstenediona, la dehidroepiandrosterona y la 5 α -dihidrotestosterona, la producción de estos últimos es en menor cantidad. Se ha observado que el testículo las células de Leydig secretan estradiol, pero la mayor parte de esta hormona se debe a la transformación periférica de la testosterona y sólo el 10% es de origen testicular. En la gónada también se produce pregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona y sulfato de dehidroepiandrosterona pero en concentraciones muy bajas (Romano y Pedemera, 1991).

El funcionamiento de la célula de Leydig (esteroidogénesis) y de Sertoli (espermatogénesis), es regulada fundamentalmente por la LH y la FSH (Romano y Pedemera, 1991; Tresguerres, 1999). Estas gonadotropinas, junto con la testosterona, modulan el desarrollo de las células germinales (Dufau y col., 1993). Sin embargo, existen otros mensajeros químicos que actúan como moduladores autócrinos o parácrinos en los diferentes compartimentos intratesticulares. Algunos de estos factores son hormonas producidas por las células de Leydig, tales como los estrógenos, angiotensina, el factor liberador de la corticotropina (CRF) y vasopresina y las producidas en el compartimento tubular, como son inhibina y TGF β que modulan la acción de la LH. Mientras que otras hormonas producidas también por las células de Leydig; como los andrógenos, las endorfinas, las encefalinas, la oxitocina y actina, regulan la función tubular (Dufau y col., 1993).

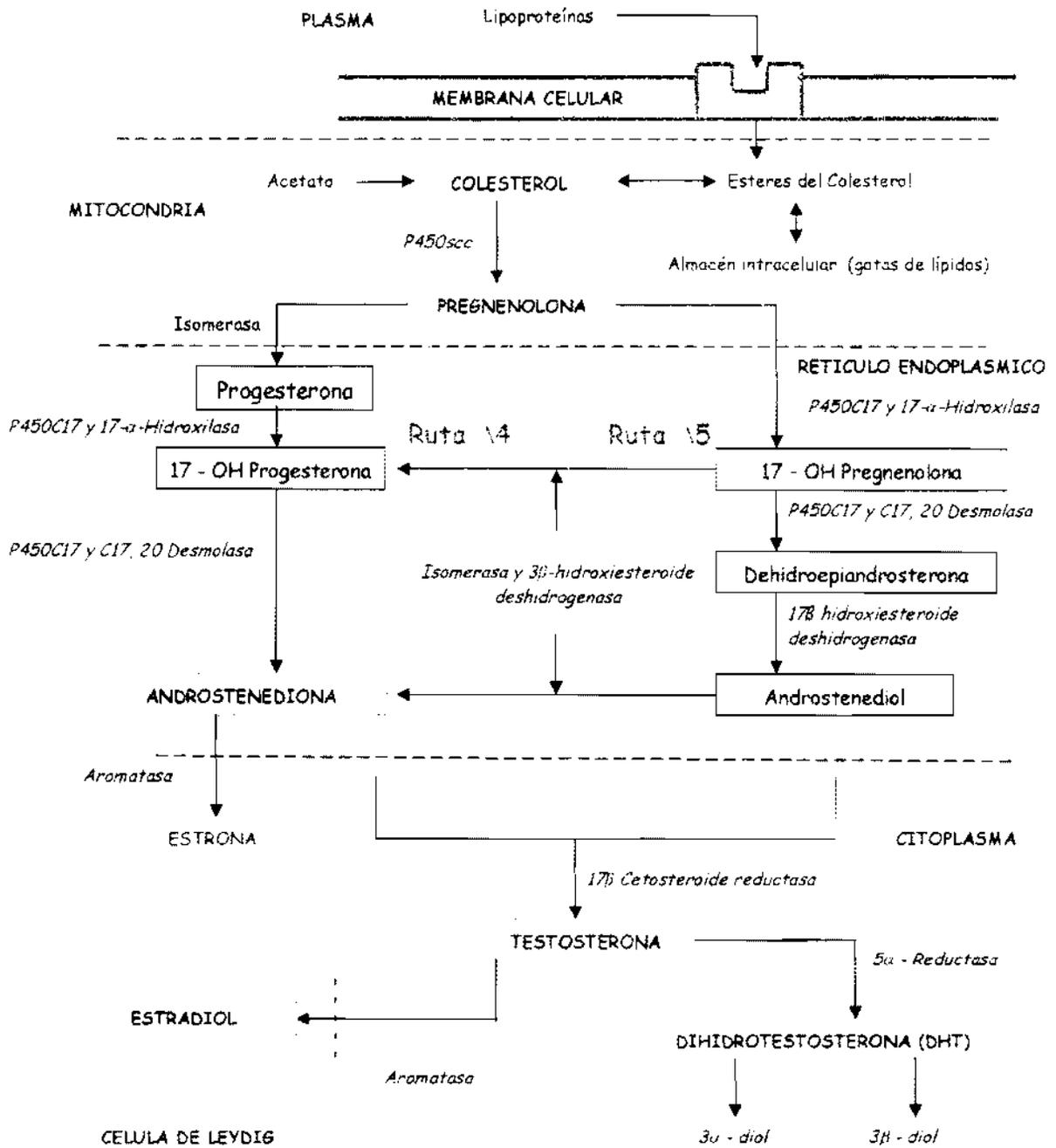


Figura 5. Esquema representativo del proceso de esteroidogénesis en el testículo, la ruta $\Delta 4$ es la más común en la rata, mientras que la ruta $\Delta 5$ lo es en el humano (Modificado de Tresguerres, 1999).

Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

El sistema nervioso central y en particular el hipotálamo, regulan las funciones de diferentes glándulas endocrinas, entre ellas el testículo (Charli y col., 1991; Vander, 2001). Dentro del hipotálamo existen células nerviosas peptidérgicas que comparten características de neuronas y de células endócrinas ya que secretan las hormonas y los factores liberadores e inhibitorios, tales como la GnRH, que modulan la producción de hormonas hipofisarias y responden a señales como los neurotransmisores (Charli y col., 1991; Costanzo, 1998; Geneser, 2000; Silverman y col., 1994).

Para su estudio, el hipotálamo ha sido dividido en tres regiones, con base en los núcleos que lo conforman: hipotálamo anterior, medio y posterior. El hipotálamo anterior está conformado por los núcleos preópticos, el supraquiasmático, supraóptico, paraventricular, periventricular y el núcleo de la estria terminal. En el hipotálamo medio se localizan los núcleos dorsomedial, ventromedial, arcuato, periventricular y la eminencia media. Mientras que el hipotálamo posterior está conformado por los núcleos mamilares y el núcleo posterior (Brown, 1994; Simerly, 1995).

La síntesis y liberación de las gonadotropinas es regulada por el hipotálamo vía la producción de la GnRH, la cual se sintetiza en el soma de neuronas especializadas denominadas GnRHérgicas que se localizan en algunas áreas del hipotálamo como son: el núcleo paraventricular, el área preóptica, el hipotálamo anterior, en el área medio basal del hipotálamo medio, así como en otras estructuras del cerebro (Brown, 1994; Silverman y col., 1994).

A su vez, la síntesis y liberación de la GnRH y de las gonadotropinas es modulada por los esteroides gonadales, los neurotransmisores (catecolaminas,

serotonina, ácido gama-aminobutírico, aminoácidos excitadores) los péptidos opioides, la activina e inhibina, entre otros factores (Pinilla y col., 2003).

Una vez sintetizada la GnRH, es liberada en la eminencia media, donde pasa a la sangre del sistema portal hipofisiario y llega a los gonadotropos localizados en la adenohipófisis, donde estimula la secreción de la FSH y la LH (Figura 6) (Charli y col., 1991; Constanzo, 1998; Geneser, 2000; Counis, 1999; Conn y col., 1999; Silverman y col., 1994).

En las células de Sertoli se encuentran presentes receptores de membrana para la FSH y receptores citoplasmáticos y nucleares para los andrógenos. La FSH estimula el desarrollo de las células de Sertoli y estimula la producción de la proteína unidora de los andrógenos (ABP) en estas células, que se secreta al luz del túbulo seminífero. Al mismo tiempo las células de Sertoli secretan el péptido inhibina que viaja en sangre a la hipófisis, donde inhibe la secreción de la FSH, proceso conocido como retroalimentación negativa (Figura 6) (Griswold, 1998; Jones, 1997; Ross y col. 1992; Schmidts y Thews, 1993; Sharpe, 1994; Vander, 2001).

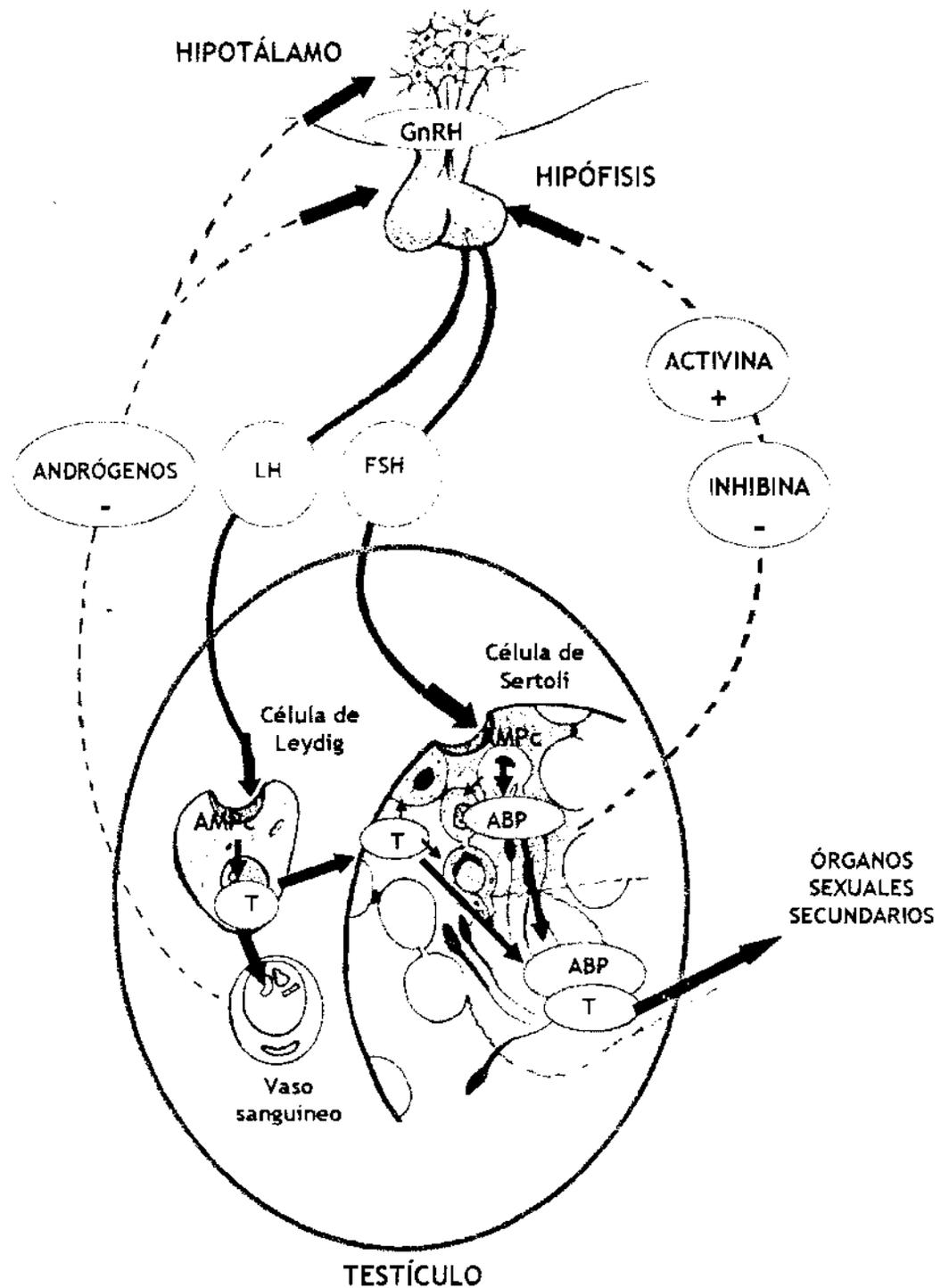


Figura 6. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, donde se representa la interacción hormonal entre sus componentes. Hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), testosterona (T), proteína fijadora de los andrógenos (ABP) y adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (Modificado de Setchell, 1978).

Pubertad en el Macho

La pubertad ha sido definida como la etapa biológica en la cual se llevan a cabo una serie de cambios neuroendócrinos y fenotípicos que marcan el inicio de la actividad reproductiva (Ramaley, 1979). Con base en estos parámetros fisiológicos tales como cambios en las concentraciones de gonadotropinas en la circulación; alteraciones en los mecanismos de retroalimentación positiva o negativa que los esteroides ejercen en el eje hipotálamo-hipófisis y parámetros morfológicos, el desarrollo prepuberal de la rata macho se divide en cuatro fases (Ojeda y Urbanski, 1994). Estas fases son:

Fase neonatal: comprende la primera semana después del nacimiento. Esta etapa se caracteriza por la falta de madurez del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La producción de la GnRH se incrementa y las concentraciones de LH y FSH son altas. En cambio, la concentración de testosterona es baja y en esta fase las células de Sertoli dejan de dividirse (Odell, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Fase infantil: abarca del día 8 al 21 de edad. Se caracteriza porque las concentraciones de FSH y LH continúan en aumento. Además la FSH induce la expresión y aumento de los receptores a la LH en las células de Leydig y como consecuencia se incrementa la producción de la testosterona. En las células de Sertoli se incrementa la producción de la ABP y se alcanza un máximo a la tercera semana del desarrollo (Odell, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Fase juvenil: inicia alrededor del día 22 y finaliza alrededor del día 35. Los receptores a la GnRH en hipófisis aumentan durante las primeras 4 semanas de vida y su número máximo se alcanza a los 30 días, también aumenta el número de receptores de esta hormona en el testículo entre los 30 y 40 días y después disminuyen. La máxima concentración de la FSH se detecta entre los 25 y 35 días. La función de esta hormona es la de inducir la formación de sus receptores y la

expresión de los de la LH. También la FSH actúa en el túbulo seminífero, en particular en las células de Sertoli y favorece la espermatogénesis. Los principales andrógenos producidos por el testículo de la rata inmadura son: androstenediona, 5α -androstenediol y los esteroides 5α reducidos, como la dihidrotestosterona (Odell, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Fase peripuberal: que comprende del día 36 y finaliza entre el día 55 y 60 de edad. Los primeros espermatozoides se observan en el lumen del túbulo seminífero alrededor del día 45 de edad, y estos llegan al conducto deferente 13 ó 15 días después (Ojeda y Urbanski, 1994). La mayor concentración de LH se observa entre los 35 y 45 días de edad. El número de receptores a la GnRH es constante a partir del día 60 (Odell, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994). El principal andrógeno secretado por los testículos en esta etapa es el 5α -androstano- 3β , 17β -diol (α -diol) (Aguilar y col., 1994).

Apoptosis y Testículo

La supervivencia de los seres vivos depende del funcionamiento correcto y coordinado de los diferentes tipos celulares. Durante las etapas iniciales del desarrollo, la viabilidad del organismo depende de la selección y diferenciación de las células en los diferentes tejidos. La muerte celular puede ocurrir por dos vías diferentes, un proceso pasivo que conduce a la necrosis o muerte patológica y un proceso activo denominado apoptosis (Frago y col., 2001; Ramírez y col., 1999).

La muerte celular por apoptosis es el principal proceso que regula el número de células de cualquier tejido. Este número de células está regulado por el balance entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Sin embargo, el equilibrio entre la proliferación y la muerte de una población celular puede estar alterado por el incremento o la disminución de uno de estos procesos (Frago y col., 2001).

El proceso de apoptosis juega un papel importante en el balance de la proporción de las células germinales y de Sertoli durante el desarrollo testicular. En los testículos de la rata prepúber y adulta, la apoptosis es un proceso normal para la eliminación de células con defecto genético o con daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN), causado por la exposición a químicos o a la radiación (Wei Yan y col., 2000).

La apoptosis es un proceso en el cual la propia célula participa de forma activa. La muerte celular por esta vía se puede dividir en dos fases: en un primer estadio, los mediadores génicos y bioquímicos intracelulares se activan para intentar reparar los daños celulares. Si este mecanismo falla, se inicia el proceso de muerte celular y se entra en la segunda fase o fase de ejecución, en donde las células sufren alteraciones estructurales que conducen a la muerte (Ramírez y col., 1999). La apoptosis se activa por la aparición o desaparición de señales de otras células y por estímulos externos, que se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y modificaciones bioquímicas, tales como la fragmentación del ADN, aislamiento y la condensación de la cromatina, encogimiento de la célula y por formación de cuerpos apoptóticos entre otros procesos (Kieiss y Gallaher, 1998).

El proceso de apoptosis es regulado por diversos factores, entre los que se encuentran las proteínas de la familia Bcl-2. Estas proteínas se localizan en la membrana mitocondrial y en el retículo endoplasmático y en la membrana nuclear. Están asociadas con la inhibición de la apoptosis. La expresión de otra proteína intracelular, la Bcl-xl, también relacionada con la familia Bcl-2, se encuentra asociada con la sobrevivencia celular. Mientras que las proteínas Bax, Bak y Bad, pueden inducir la muerte celular. Una alternativa y a menudo una forma más rápida de muerte celular programada es mediada por la vía Fas, una proteína transmembranal que puede iniciar la apoptosis (Woolveridge y col. 1999; Print y col., 1998). La fase de ejecución de la apoptosis está mediada por una

familia de proteasas con residuos cisteína denominados caspasas asociadas a la fragmentación del ADN (Ramírez y col., 1999).

Se ha mostrado que la testosterona y las gonadotropinas así como algunas citocinas y factores de crecimiento inhiben el inicio de la apoptosis. Algunas hormonas tiroideas, la progesterona y algunos factores de crecimiento, inducen la muerte celular programada (Kiess y Gallaher, 1998). Cuando a ratas macho se les administra sulfonato de etano dimetano, producto químico que daña a las células de Leydig y como consecuencia disminuye la producción de los andrógenos, se observa un incremento en el número de núcleos picnóticos y vacuolas citoplasmáticas (ambos marcadores de degeneración celular) en las diferentes etapas del ciclo de epitelio seminífero, particularmente se dañan los espermátocitos en paquiteno y a las espermátides (McLachlan y col., 1996).

Por otra parte, las proteínas Bax, Bad, Bcl-xl y Bcl-2 se expresan en los testículos de roedores, y que juegan un papel importante en la regulación de la espermatogénesis. Al parecer la vía Fas es un importante regulador de la apoptosis testicular, ya que se expresa en los espermátocitos, las espermátides y en las células de Sertoli (Woolveridge y col., 1999).

El fenómeno de apoptosis se presenta de manera normal en las células germinales principalmente en las espermatogonias (Woolveridge y col., 1999). En el testículo de la rata se ha mostrado que la apoptosis ocurre regularmente en las espermatogonias del tipo A2, A3, y A4, mientras que en los espermátocitos secundarios, así como en las espermátides se presenta ocasionalmente. Por otra parte, cuando disminuye la concentración de los andrógenos como resultado de una hipofisectomía, o debido a la administración de antagonistas de la GnRH, o de anticuerpos anti-LH, se observa el aumento en la frecuencia de apoptosis de los espermátocitos en paquiteno y espermátides (Woolveridge y col., 1999).

Serotonina y Testículo

El neurotransmisor serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) participa en el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y el sistema gastrointestinal donde modula los procesos conductuales, la secreción de algunas hormonas hipofisarias y participa en la regulación de la temperatura, del sueño y el apetito (Crowley y Zemlan, 1981). La serotonina participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas (Jorgensen y col., 1993), en particular sobre la LH, sin embargo, no ha sido aclarado si su efecto es de tipo inhibitorio o estimulador (Arias y col, 1990; Watts y Stanley, 1984).

La serotonina es producida en neuronas denominadas serotoninérgicas, cuyos cuerpos neuronales se localizan en el núcleo del rafé que se localiza en el cerebro medio. El núcleo del rafé está conformado por nueve grupos celulares, los cuales han sido designados del B1 al B9. Con base en la distribución de estos grupos celulares el núcleo del rafé se divide en: dorsal, medial y del puente (Frazer y Hensler, 1999). Estas neuronas proyectan sus fibras hacia varias áreas del sistema nervioso, entre ellas el hipotálamo (Figura 7). Este neurotransmisor también se encuentra en la glándula pineal y tejidos periféricos incluyendo las células cromáfines de la mucosa gastrointestinal, las plaquetas, los mastocitos, el páncreas, el pulmón, el timo, la tiroides y el tracto urogenital (Azmitia, 2001; Crowley y Zemlan, 1981; Takeuchi, 1988; Tinajero y col., 1993).

Además existen cuatro tipos de receptores a la serotonina: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ y 5-HT₄, cuyo número varía en las diferentes regiones del cerebro y los cuales están relacionados con diferentes funciones. Cada receptor tiene diferentes subtipos que se designan con una letra (Frazer y Hensler, 1999).

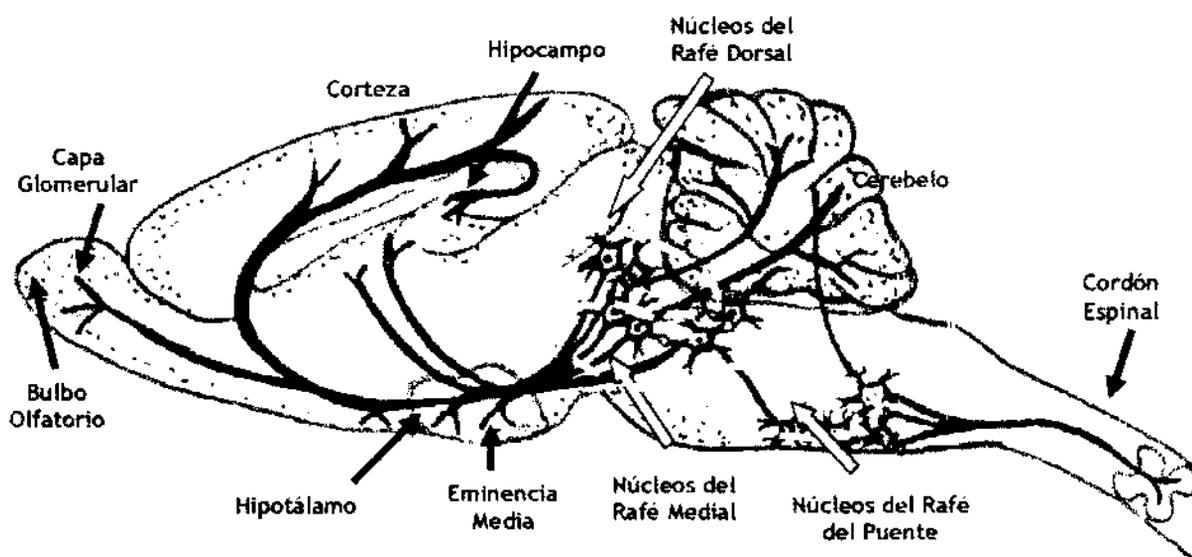


Figura 7. Representación esquemática que ilustra la distribución de las neuronas serotoninérgicas y sus proyecciones a las diferentes zonas del cerebro (Modificado de Frazer y Hensler, 1999).

El paso inicial en la síntesis de serotonina es el transporte del aminoácido L-triptofano, que viaja en la sangre, a través de la barrera hematoencefálica. Las neuronas serotoninérgicas contienen la enzima triptofano hidroxilasa, la cual convierte el triptofano en 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Esta enzima es sintetizada en el cuerpo de la neurona serotoninérgica. Otra enzima involucrada en la síntesis de serotonina es la descarboxilasa de los aminoácidos L-aromáticos (AADC), la cual convierte al 5-HTP a 5-HT. Una vez liberada la serotonina a la hendidura sináptica, parte de la 5-HT es reincorporada a la terminal de la neurona y por acción de la enzima monoaminoxidasa (MAO), es metabolizada para formar el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), que es el principal metabolito de la serotonina (Azmitia, 2001; Frazer y Hensler, 1999; Ganong, 1996).

La administración de la p-cloroanfetamina (PCA) o p-clorometanfetamina (PCPA), ambos antagonistas en la síntesis de serotonina, provoca la disminución en las concentraciones de 5-HT en el cerebro así como también del ácido 5-HIAA, como resultado de la inhibición de la enzima triptofano hidroxilasa (Arias y col, 1990; Costa y Revuelta, 1972; Sanders-Bush y Sulser, 1970; Sanders-Bush y Sulser, 1972). Cuando la PCA se administra por vía sistémica, llega hasta el cerebro y se distribuye en las diferentes regiones del mismo. También incrementa la liberación de la 5-HT almacenada en las neuronas, posiblemente debido al daño de las terminales nerviosas. Este incremento en la liberación se acompaña de la disminución de serotonina en la terminal nerviosa (Crowley y Zemlan, 1981).

La 5-HT participa en la modulación de la secreción de las gonadotropinas, tanto en la rata hembra como en el macho. Justo y col. (1989) sugieren que el 5-hidroxitriptofano, precursor de la serotonina, no modifica la secreción de la FSH en la rata hembra, mientras que estimula su liberación en ratas macho intactas a los 16, 26 y 30 días de edad, así como también en el adulto.

Pinilla y col. (2003) encontraron que cuando ratas prepuberales son tratadas con aminoácidos excitadores de los receptores del sistema serotoninérgico, se bloquea la secreción de la LH en ambos sexos, y concluyen que la activación de los receptores del sistema serotoninérgico disminuye el efecto estimulante sobre la secreción de LH en ratas macho prepuberales.

Al parecer la serotonina interviene en la modulación de la secreción de las gonadotropinas debido a que en la eminencia media existe contacto axo-axonal entre las terminales de las neuronas que producen la GnRH y las que producen la serotonina (Frazer y Hensler, 1999; Takeuchi, 1988). Así mismo, por medio de técnicas de inmunocitoquímica se ha demostrado que en los diferentes núcleos hipotalámicos existe serotonina y que en el área preóptica existe comunicación

entre las terminales nerviosas de las neuronas productoras de la GnRH y las neuronas productoras de serotonina (Jennes y col., 1985).

Cuando a ratas macho prepúberes se les inyecta por vía intraventricular 5,6-dihidroxitriptamina, fármaco que provoca la degeneración selectiva de las terminales nerviosas serotoninérgicas, se observa que a la primera semana después de realizar la microinyección, la concentración de la FSH en sangre son indetectables, mientras que a la segunda y cuarta semana se reestablecen las concentraciones de la hormona. Además de los cambios en la concentración de la FSH, el análisis histológico del testículo mostró que aún en la cuarta semana (día 51 de edad), el proceso de espermatogénesis se bloqueaba en la etapa de espermatoцитos en paquiteno. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que en la rata macho la serotonina modula de manera inhibitoria la producción de la FSH y como consecuencia la espermatogénesis (Collu y col., 1974). Sin embargo, otros autores sugieren que la serotonina puede jugar un papel estimulante en la secreción de la FSH (Brown y Fawke, 1972; Fajer y col., 1970, citados en Collu y col., 1974).

Por otra parte se ha observado que cuando ratas hembras prepúberes de 16 y 18 días son tratadas con 5-hidroxitriptofano, se observa que se estimula la secreción de LH y no se modifica la de FSH (Moguilevsky y col., 1987). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que este mismo tratamiento en machos castrados, incrementa la producción de FSH y no se modifica la de LH (Becú-Villalobos y col., 1989). Estos resultados nos llevan a pensar que el sistema serotoninérgico participa de manera diferencial en la hembra y en el macho, en la modulación de la secreción de las gonadotropinas durante el desarrollo del animal prepúber.

Shishkina y Dygalo (2000), mostraron que cuando ratas macho de 30 ó 34 días de edad son tratadas con PCPA (un inhibidor de la síntesis de serotonina), no se modifican las concentraciones de testosterona a los 60 días. Sin embargo,

cuando se tratan a los 40 ó 44 días de edad, disminuye las concentraciones de testosterona en plasma, el peso testicular y el de las vesículas seminales, y el número de espermatozoides en el epidídimo. Por otra parte, cuando se administra el 5-hidroxitriptofano en los días 30, 32, 34, 36 y 38 y los animales se sacrifican a los 60 días de edad, se observa un incremento en las concentraciones de testosterona en plasma, así como del peso de los órganos sexuales. Estos resultados permiten sugerir que durante el periodo prepuberal de la rata macho el sistema serotoninérgico participa de manera estimulante en el desarrollo sexual.

Estudios realizados en cricetos (hámster), han mostrado que cuando el animal es mantenido en un fotoperiodo de iluminación corto (8 horas luz/16 horas oscuridad) se observa una disminución en el peso testicular y en las concentraciones de LH en plasma y estos cambios se ven acompañados por un incremento en la síntesis de serotonina en el hipotálamo medio (Steger y col., 1990). Por otra parte, Frungieri y col. (1999) encontraron que cuando cricetos de 36 días de edad o adultos de 60-90 días son sometidos a fotoperiodos de iluminación cortos (6 horas luz/18 horas oscuridad) o largos (14 horas luz/10 horas oscuridad) se incrementan las concentraciones de serotonina y su metabolito 5-HIAA en la cápsula testicular, así como la concentración de la LH y esto se acompañó del incremento en la concentración de andrógenos (3α -androstano y 17β -diol) en suero. Estos resultados permitieron a los autores sugerir que este neurotransmisor puede actuar como importante modulador a nivel central en la regulación de la secreción de LH o localmente en el testículo sobre la acción de las gonadotropinas y modular la esteroidogénesis gonadal durante el desarrollo sexual.

En la rata macho adulta (75 días de edad), cuando se administra un agonista de los receptores 5-HT₁ de serotonina, se observa una marcada distensión de los túbulos seminíferos, los conductos deferentes y la rete testis y un incremento en el peso testicular. La distensión de los túbulos se debe a la expansión del lúmen, lo cual se observó en los túbulos seminíferos de todas las

etapas del ciclo de espermatogénesis. Los autores no descartan la posibilidad de que estas alteraciones estén asociadas con los procesos de reabsorción de fluidos, lo que afecta directamente el epitelio seminífero (Piner y col., 2002).

Estudios previos realizados por Collin y col., (1996) y Tinajero (1993), han demostrado que la serotonina es secretada por células de Leydig en cultivo, y que estas células poseen la maquinaria enzimática para la síntesis *de novo* de la 5-HT. También está presente en la cápsula testicular y en el fluido intersticial. En la rata, la serotonina testicular es sintetizada por el nervio espermático superior, y en su mayor parte por las células de Leydig. Estudios realizados en ratas macho han mostrado que las células de Leydig en cultivo secretan cantidades considerables de 5-HT, y que ésta actúa como un regulador autócrino de estas células vía los receptores 5-HT₂ localizados sobre la membrana celular. Los receptores 5-HT₂ inician una cascada de eventos en los que se incluye la estimulación de la producción del CRF, la inhibición de la producción de AMPc y la esteroidogénesis. También es posible que la 5-HT liberada por las células de Leydig actúe como mediador en los cambios vasculares, al modificar la permeabilidad vascular y como consecuencia influya en el acceso de las hormonas y nutrientes a las células testiculares y en el volumen y composición del fluido intersticial. Con base a estas evidencias es posible sugerir que la serotonina modula las funciones del testículo al actuar directamente en la gónada.

JUSTIFICACIÓN

Con base en los antecedentes antes presentados podemos decir que el sistema serotoninérgico regula la secreción de las gonadotropinas. Estas hormonas intervienen en conjunto con la testosterona para dar inicio a la espermatogénesis. Sin embargo, hasta el momento existe poca información sobre la participación de este sistema de neurotransmisión en la rata macho prepúber, y la información existente es controversial. Por lo que, en el presente estudio se decidió analizar los efectos del bloqueo del sistema serotoninérgico sobre las funciones del testículo en la etapa juvenil, para lo cual se utilizaron ratas macho de 30 días de edad como modelo experimental.

HIPÓTESIS

Dado que la síntesis y liberación de la GnRH y de las gonadotropinas es modulada por diferentes sistemas de neurotransmisión, entre ellos el serotoninérgico, y que las gonadotropinas modulan la función testicular, el bloqueo del sistema serotoninérgico inhibirá la esteroidogénesis y como consecuencia la espermatogénesis en la rata prepúber.

OBJETIVO GENERAL

- Analizar los efectos del bloqueo del sistema serotoninérgico en la etapa juvenil, sobre la espermatogénesis y esteroidogénesis del testículo en la rata prepuberal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar los efectos de la administración intraperitoneal de PCA en la concentración sérica de hormonas esteroides testiculares (progesterona, testosterona y 17β -estradiol).
- Analizar los efectos de la administración intraperitoneal de PCA en las concentraciones de FSH y LH en suero.
- Analizar los efectos de la administración intraperitoneal de PCA en el ciclo del epitelio seminífero.
- Analizar los efectos de la administración intraperitoneal de PCA en el proceso de apoptosis en el testículo.

- Evaluar los efectos de la administración intraperitoneal de PCA en la concentración de 5-HT, 5-HIAA y la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ en el hipotálamo anterior, medio, posterior y en los núcleos dorsal y medial del raquídeo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho de 30 días de edad de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de iluminación, 14 h luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 hrs.), con libre acceso a la madre hasta el destete (21 días) y posteriormente al agua y al alimento hasta el sacrificio.

Los animales fueron tratados entre las 10:30 a 11:30 hrs., con 10 mg/Kg de peso corporal (p.c.) de p-cloroanfetamina (PCA, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) por vía intraperitoneal (i.p.), cada 8 días hasta cumplir 45 días de edad. Otro grupo de animales recibieron solución salina al 0.9% (grupo vehículo). Como grupo de comparación se utilizaron animales sin tratamiento (testigo absoluto) de la misma edad.

Procedimiento de la autopsia

Los animales de los diferentes grupos se sacrificaron por decapitación al día 45 de edad entre las 12:30 y 13:30 hrs. Se extrajeron y disecaron los testículos, el epidídimo, la próstata, las vesículas seminales, las glándulas coagulantes y se pesaron en una balanza de precisión. El peso de los órganos se expresó en mg; posteriormente los testículos extraídos se fijaron en paraformaldehído y se incluyeron en parafina. Se colectó la sangre del tronco y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y se colectó el sobrenadante (suero), que se almacenó a -20°C para la posterior cuantificación de hormonas esteroideas y gonadotropinas por radioinmunoanálisis.

Estudio histológico

Los testículos de los diferentes grupos experimentales se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes seriados de 7 μm de grosor, y se colectaron cada 28 μ . Los cortes histológicos del testículo izquierdo fueron teñidos con la técnica de PAS-hematoxilina, para el posterior análisis y clasificación de las etapas del ciclo del epitelio seminífero siguiendo el criterio descrito por Rusell y col. (1990), aquellos túbulos que no pudieron ser clasificados en alguna etapa, se consideraron como túbulos anormales. En los cortes histológicos del testículo derecho, se identificó el fenómeno de apoptosis mediante la técnica de TUNEL, que consiste en el marcaje de los fragmentos de ADN utilizando la enzima deoxinucleótido terminal transferasa con dUTP-fluoresceína u otro marcador que permita el análisis por microscopía de fluorescencia o confocal (Alfaro y col., 2000; Frago y col., 2001; Negoescu y col., 2001; Negoescu y col., 1998). Los túbulos seminíferos se evaluaron al azar siguiendo un barrido en forma de zig-zag.

Cuantificación de esteroides

La cuantificación de progesterona, testosterona y 17 β - estradiol se realizó por medio de la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, para lo cual se utilizó un kit comercializado por Coat-A-Count (USA). La concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/ml, mientras que la concentración de 17 β - estradiol en pg/ml. Los coeficientes interensayo e intraensayo para progesterona fueron de 9.87 y 5.3; para el 17 β - estradiol de 10.8 y 6.9 y para la testosterona de 8.1 y 4.1, respectivamente.

Cuantificación de gonadotropinas

La cuantificación de la concentración de FSH y LH en suero se realizó por medio de la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo. Los anticuerpos empleados fueron rFSH-RP2 y rLH-RP3, respectivamente. La concentración de ambas hormonas se expresó en ng/ml. Los coeficientes interensayo e intraensayo para la FSH fueron de 9.3 y 5.74 y de 6.82 y 7.9 respectivamente para la LH (The National Hormone and Pituitary Programs, USA).

Cuantificación de catecolaminas y serotonina.

Al momento de la autopsia se extrajo el cerebro, se colocó en solución salina fría (4°C) y se congeló en nitrógeno líquido, posteriormente se realizó la disección del hipotálamo anterior, medio y posterior; y los núcleos dorsal y medio del rafe para lo cual se siguieron las coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson (1982) (apéndice A). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta la cuantificación de catecolaminas [noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT)] y sus principales metabolitos [(4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (MHPG), 3-4-dihidroxifenilacético (DOPAC), y el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), respectivamente].

La cuantificación de catecolaminas y serotonina se realizó por la técnica de cromatografía de líquidos de alta precisión, que está constituido de una bomba isocrática (modelo L-250 Perkin Elmer), un sistema degasificador de solventes Degassit (modelo 6322 MetaChem), una columna C-18 fase reversa de 25 cm, 300 Å de tamaño de poro, 4.6 mm de diámetro interno (marca VYDAC-IECSA), un detector electroquímico amperométrico LC-AC (BAS) y un integrador Nelson 1020 (Perkin Elmer). En el día de la cuantificación las muestras de hipotálamo se pesaron y homogenizaron en 300 µL de ácido

perclórico al 0.1 N, se centrifugaron a 12,500 rpm, a -4 °C durante 30 minutos, el sobrenadante se filtró usando filtros de celulosa regenerada de tamaño de poro de 0.2 µm, y se inyectaron 20 µL del filtrado al sistema de cromatografía (Byoanalytical System).

La sensibilidad del ensayo para la detección de cada uno de los neurotransmisores y sus metabolitos fue de 0.01 ng. Las monoaminas y sus metabolitos fueron identificados y cuantificados por un integrador Nelson 1020 (Perkin Elmer, México). El equipo identificó a los neurotransmisores por sus tiempos de retención y se realizó el cálculo, al comparar el área bajo la curva de los picos de la muestra problema con el área bajo la curva de sus respectivos estándares. La concentración de los neurotransmisores se expresó en ng/mg de tejido y la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión se calculó siguiendo la relación de Kerdelhué y col. (1989) y Shannon y col. (1986).

$$\text{Actividad neuronal} = [\text{metabolito}]/[\text{neurotransmisor}]$$

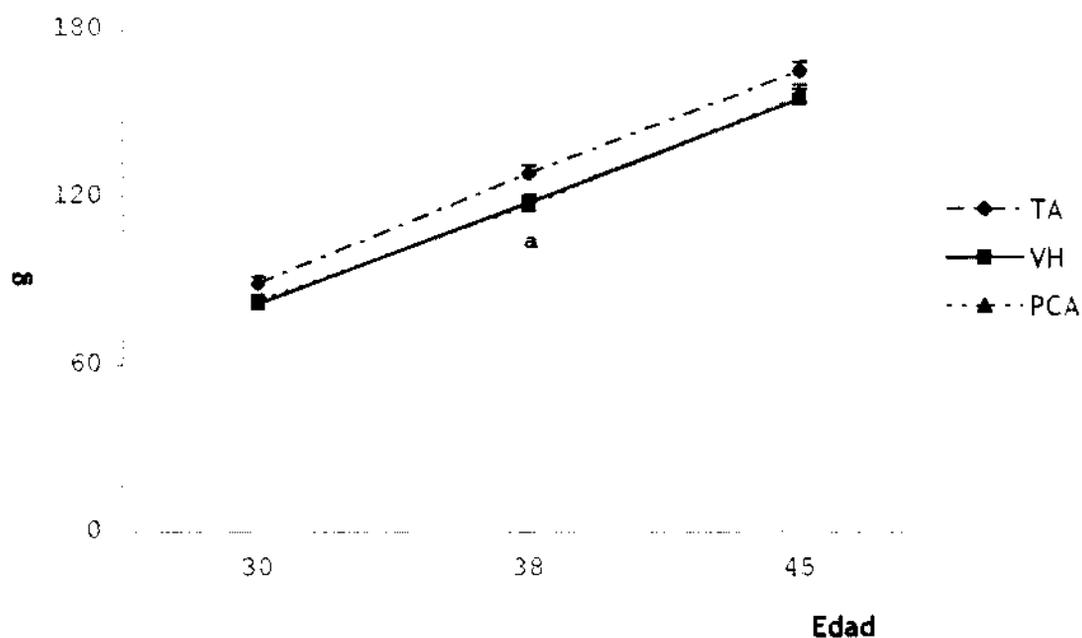
Análisis estadístico

Los resultados del peso de los órganos, las concentraciones de monoaminas, metabolitos y la actividad neuronal, así como las concentraciones de las hormonas esteroideas sexuales, gonadotropinas y ciclo del epitelio seminífero fueron analizados por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. En todos los casos sólo se consideró como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor a 0.05.

RESULTADOS

Peso Corporal y de Órganos

En la Figura 8, se presentan los resultados del peso corporal de los animales tratados con solución salina (VH) o con p-cloroanfetamina (PCA). En ambos grupos de animales se observó la disminución del peso corporal sólo en el día de la segunda aplicación del fármaco (38 días). En el día del sacrificio no se observaron cambios.

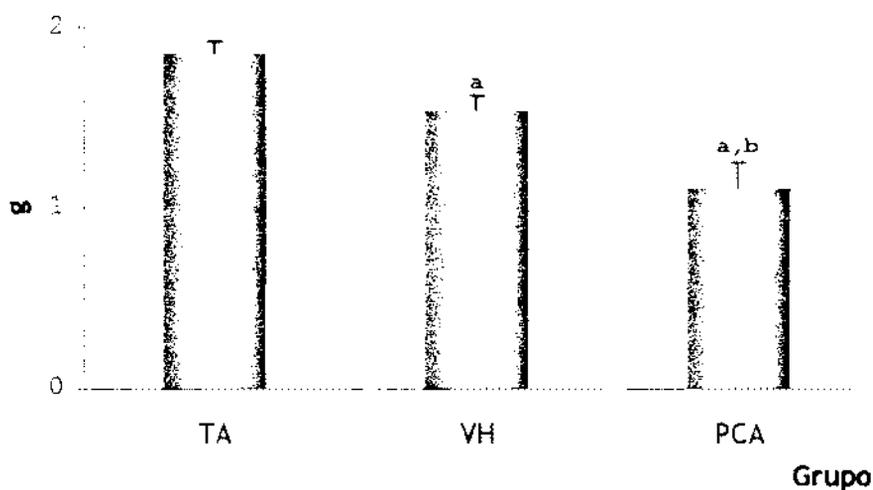


a, $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA, seguida de Tukey)

Figura 8. Peso corporal (media \pm e.e.m.) de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.

El peso testicular de los animales que recibieron VH disminuyó de manera significativa en relación con el grupo TA. Este mismo comportamiento se observó

en el grupo de animales que recibieron p-cloroanfetamina en comparación al grupo TA o con VH (Figura 9).



a, $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA, seguida de Tukey)

b, $p < 0.05$ vs. VH (ANDEVA, seguida de Tukey)

Figura 9. Peso testicular (media \pm e.e.m.) de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con vehículo (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.

La masa del epidídimo, el peso de la próstata, de la vesícula seminal y de las glándulas coagulantes, no se modificó en los animales que recibieron solución salina o p-cloroanfetamina en comparación al grupo testigo absoluto o vehículo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Peso del epidídimo, próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes (media \pm e.e.m.), de ratas macho testigo absoluto (TA) tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la etapa juvenil, y sacrificadas a los 45 días de edad.

Grupo	n	Masa del epidídimo (mg)	Peso de la próstata (mg)	Peso de la vesícula seminal (mg)	Peso de las glándulas coagulantes (mg)
TA	10	19.5 \pm 0.02	13.6 \pm 0.02	7.9 \pm 0.005	2.6 \pm 0.003
VH	14	19.5 \pm 0.01	14.0 \pm 0.01	7.7 \pm 0.008	2.9 \pm 0.004
PCA	10	19.5 \pm 0.004	13.6 \pm 0.01	6.4 \pm 0.005	2.9 \pm 0.002

Concentración de hormonas esteroides y gonadotropinas

En comparación al grupo de ratas testigo absoluto o vehículo, en los animales tratados con p-cloroanfetamina se observó la tendencia a la disminución en la concentración de progesterona y testosterona, sin embargo, esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa. La concentración de 17 β -estradiol no se modificó en ninguno de los grupos antes mencionados (Figura 10).

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto o vehículo, en los animales tratados con p-cloroanfetamina se observó un incremento en la concentración de FSH, sin embargo esta diferencia no es significativa, mientras que la concentración de LH en suero, no se modificó (Figura 11).

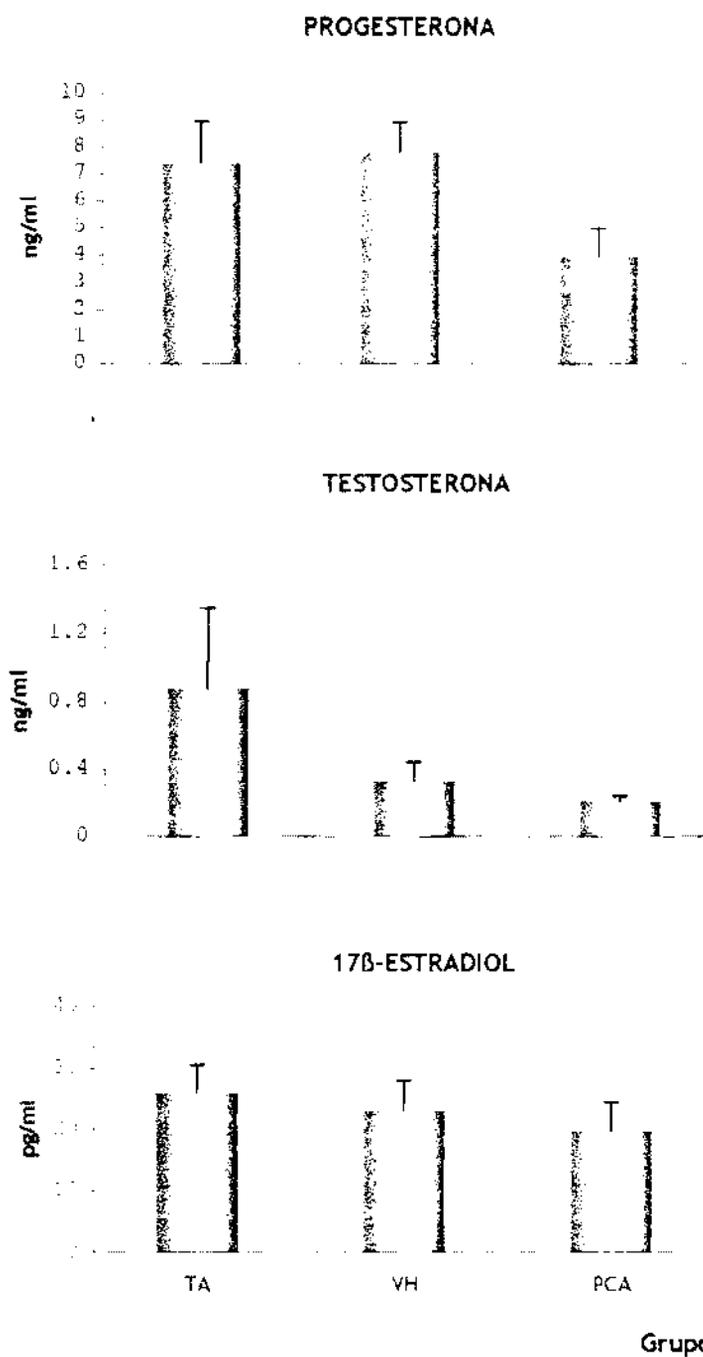


Figura 10. Concentración de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol (media \pm e.e.m.) en suero, en ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.

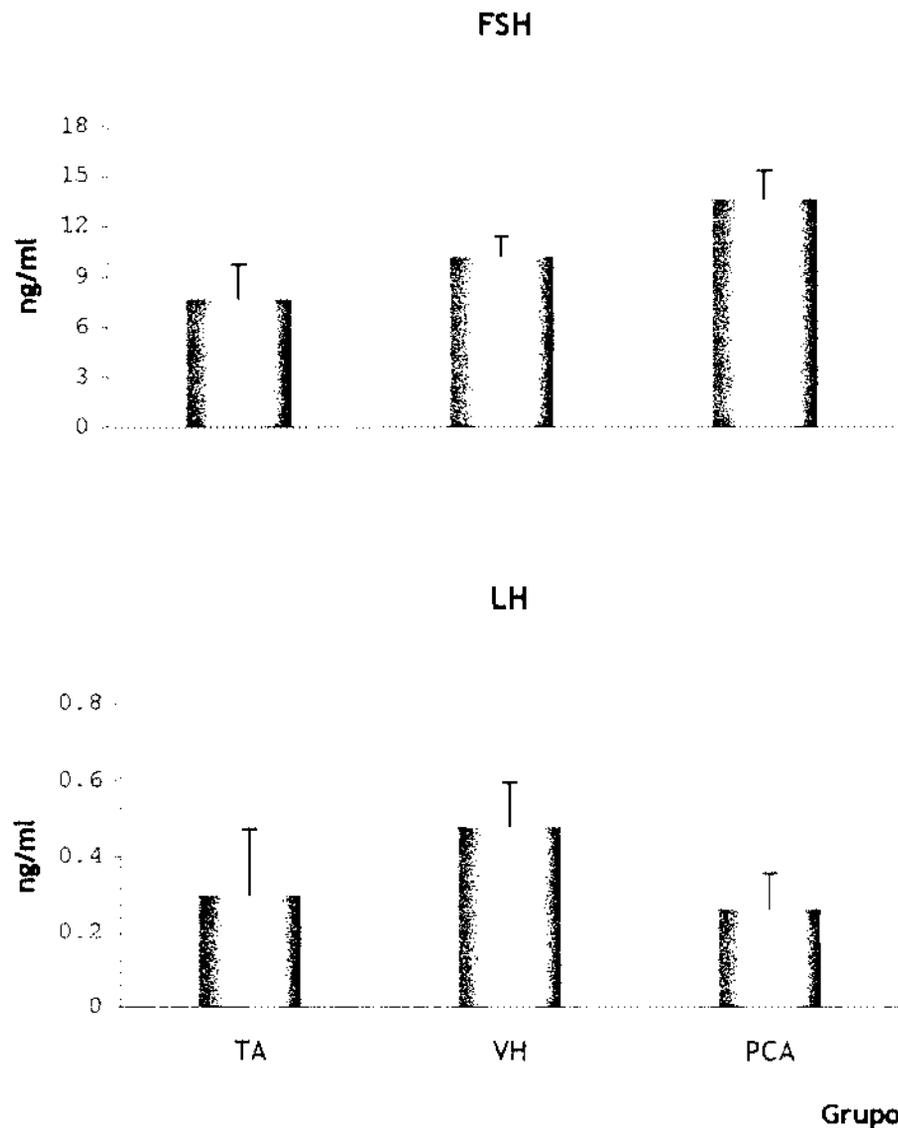


Figura 11. Concentración de la hormona foliculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (media \pm e.e.m.) en el suero de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.

Análisis histológico de las etapas del Ciclo del Epitelio Seminífero

Cuando se analizaron los túbulos seminíferos en función de la etapa del ciclo del epitelio seminífero que presentaban, se observó que en el grupo TA, se identificaron las XIV etapas propuestas en la clasificación descrita por Russell y col., (1990) (Figura 12). Todos los túbulos seminíferos evaluados en los testículos de los animales TA correspondieron a alguna de las XIV etapas del ciclo del epitelio seminífero de la clasificación antes mencionada, por ello los túbulos se consideraron como normales (Figura 12). En el grupo tratado con solución salina no se observaron cambios en comparación al grupo TA. Todos los túbulos seminíferos en estos animales presentaron un arreglo celular normal (Figura 12).

En comparación con los grupos de animales TA o VH, en el grupo de animales tratados con p-cloroanfetamina, se observa una disminución en el porcentaje de túbulos seminíferos normales y por lo tanto en el porcentaje de las etapas del ciclo presentes, incluyendo la etapa VIII, que es la etapa en la cuál se observan los espermatozoides en el lumen del túbulo. Sin embargo, se observó un incremento de la etapa XIV (conformada por espermatocitos en meiosis y espermátides alargadas) (Figura 12). Los túbulos anormales se caracterizaron por presentar alteraciones tanto en la forma como en el contenido de los tipos celulares (espermátides y espermatozoides principalmente), así como también una alteración en el diámetro tubular y de la luz del mismo o en algunos casos ausencia de esta cavidad.

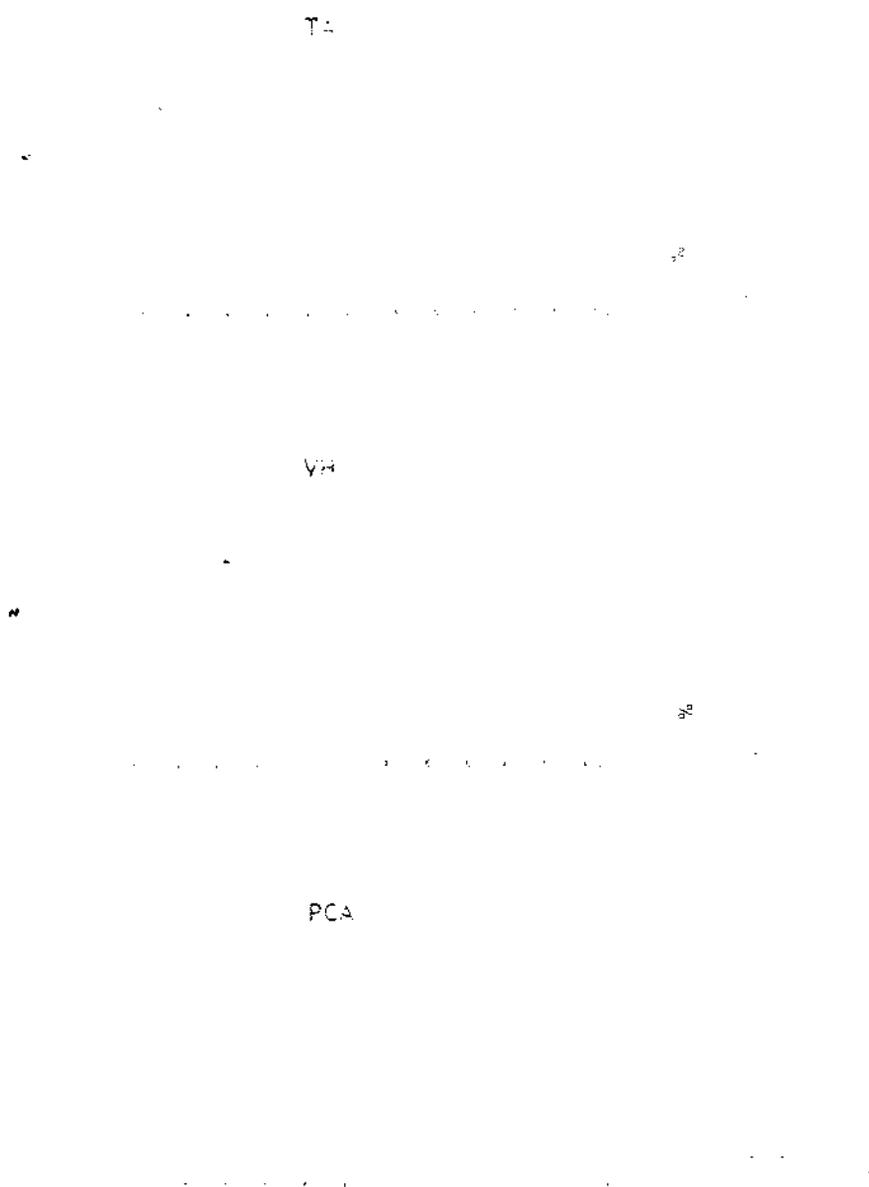


Figura 12. Media \pm e.e.m. del porcentaje de etapas del ciclo del epitelio seminífero y de los túbulos normales y anormales de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.

Estudio Histológico del Testículo

En los animales testigo absoluto se observan túbulos seminíferos con un arreglo celular normal, los cuales se caracterizan por presentar una forma circular, así como sus diferentes tipos celulares en diferentes etapas de desarrollo como son: las espermatogonias, los espermatocitos, las espermátides y los espermatozoides (Figuras 13A y B). En comparación al grupo de animales testigo absoluto, los animales tratados con solución salina no presentaron diferencias en el arreglo de los tipos celulares en el túbulo (Figuras 14A y B).

En los animales tratados con la PCA se observaron túbulos seminíferos anormales, caracterizados por la ausencia de algunos tipos celulares, principalmente espermátides y espermatozoides. En este compartimiento del testículo se observaron espermatozonias y espermatocitos, y en algunos casos se identificaron también células multinucleadas en el interior del lumen. En algunos túbulos se observó un lumen prominente, y en algunos casos la ausencia de esta cavidad (Figuras 15A y B).

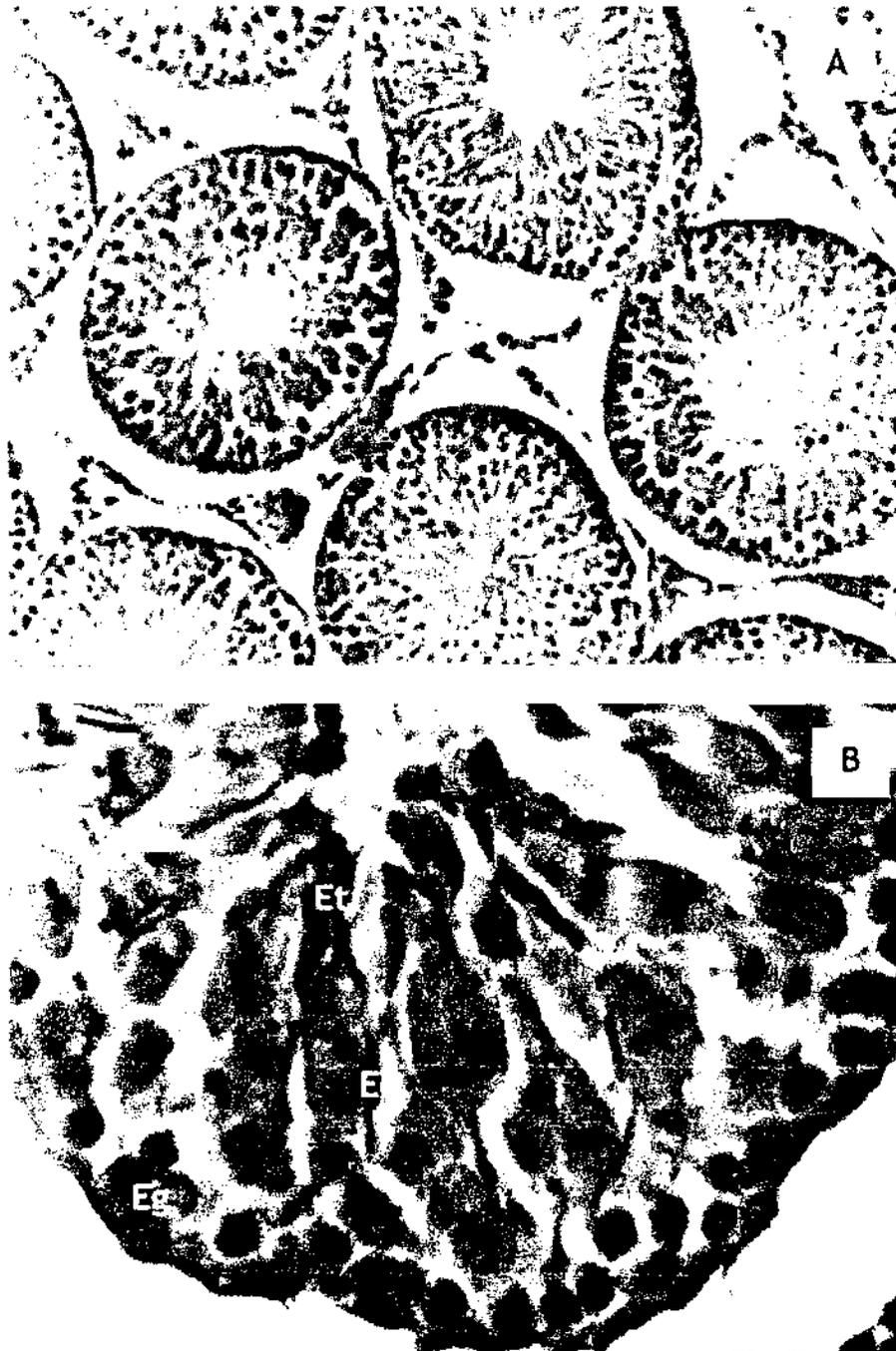


Figura 13. Fotomicrografías de un corte histológico de testículo de rata testigo absoluto (TA) de 45 días de edad donde se observan túbulos seminíferos (Ts) a 10X (A), en los que se aprecian las células de Leydig (CL) y el lumen del túbulo seminífero (L); a 40X (B) donde se aprecia un túbulo seminífero en la etapa XIV donde se distinguen las espermatogonias (Eg), espermatocitos en división meiótica (Ec) y espermátides tempranas (Et).



Figura 14. Fotomicrografías de corte histológico de testículo de rata de 45 días tratada con solución salina, donde se aprecian túbulos seminíferos (Ts) a 10X (A); (B) túbulo seminífero en la etapa VII donde se distinguen las espermatogonias (Eg), espermatocitos (Ec), espermátides orientadas hacia la membrana basal (Et) y espermatozoides (Ez) en movimiento hacia el lumen (Lu), aumento a 40X.



Figura 15. Fotomicrografías de corte histológico de testículo rata tratada con p-cloroanfetamina (PCA) de 45 días de edad donde se aprecian túmulos seminíferos normales (N) y anormales (An) a 10X (A); (B) túbulo seminífero anormal donde se distinguen solo espermatogonias (Eg) y espermatocitos (Ec), así como una alteración en el diámetro y forma del túbulo, aumento 40X.

Identificación del proceso de Apoptosis en Testículo

En la Figura 16A y 16B. se presentan cortes histológicos de testículos de animales testigo absoluto en los que se observaron túbulos seminíferos y no se distinguieron células germinales positivas a TUNEL, es decir, células que presenten coloración fluorescente característica de la técnica de TUNEL, que nos indica que la célula es apoptótica. Los cortes histológicos de las gónadas de los animales que recibieron solución salina presentaron una apariencia similar (Figuras 17A y B). Sin embargo, en los animales que se trataron con p-cloroanfetamina se observaron túbulos seminíferos con un gran número de células espermatogénicas positivas a TUNEL, la mayoría de estas células son espermátides (Figuras 18A y B).

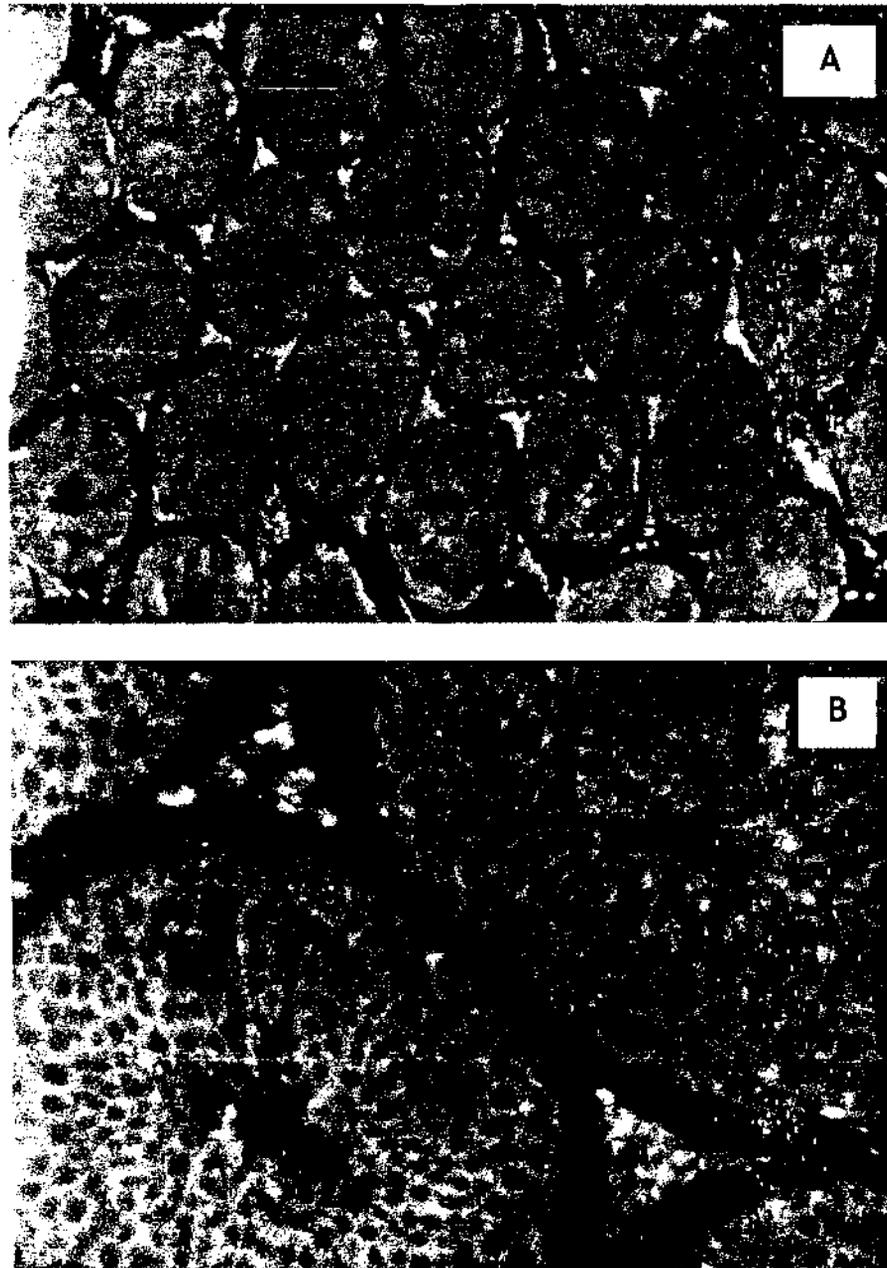


Figura 16. Fotomicrografías de corte histológico de testículo de rata macho sin tratamiento (TA) de 45 días de edad, teñidos con la técnica de TUNEL donde se aprecian túbulos seminíferos normales (A) aumento de 10X, y (B) aumento (40X), en ambos casos se aprecian células sanas.

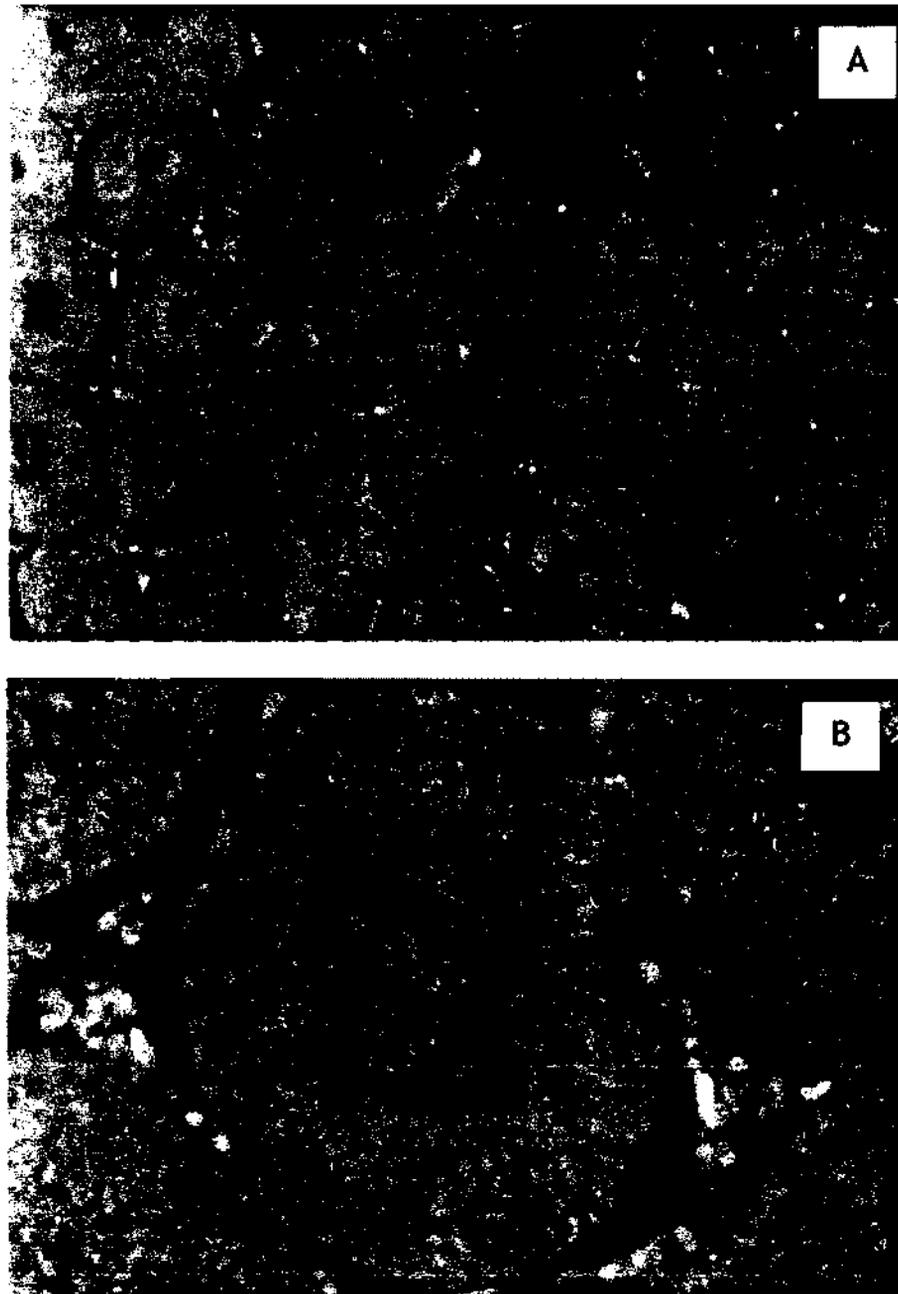


Figura 17. Fotomicrografías de corte histológico de testículo de rata macho tratada con solución salina (VH) en la etapa juvenil (30 días) y sacrificada a los de 45 días de edad, teñidos con la técnica de TUNEL donde se observan túbulos seminíferos normales (A) observados a un aumento de 10X, y (B) a un mayor aumento (40X), en ambos casos se aprecian células sanas.

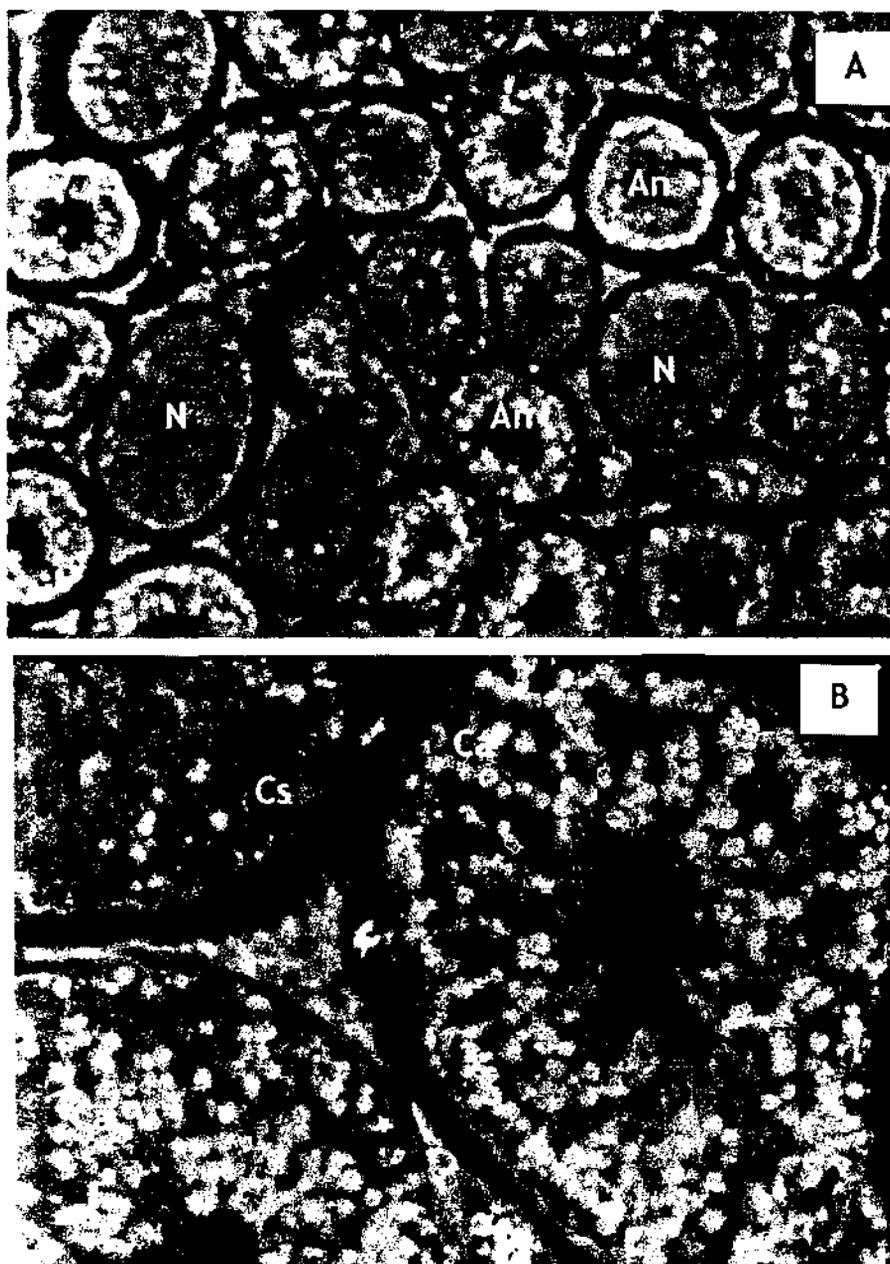


Figura 18. Fotomicrografías de un corte histológico de testículo de rata macho tratada con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la etapa juvenil (30 días) y sacrificada a los 45 días de edad, en las que se aprecian (A) túbulos seminíferos normales (N) y anormales (An) con células sanas (Cs) y en apoptosis (Ca) positivas a TUNEL (aumento a 10X), y (B) aumento (40X) donde se distinguen una mayor proporción de células en apoptosis, así como la alteración en la forma y diámetro del túbulo seminífero.

Concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético

En el hipotálamo anterior de los animales que recibieron solución salina (VH), no se modificaron las concentraciones de serotonina y su metabolito ni la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$. En el grupo de animales que recibieron PCA la concentración de la amina y de su metabolito, así como de la actividad de la neurona serotoninérgica, disminuyeron de manera significativa en comparación con el grupo TA o VH (Figura 19). Un comportamiento similar se observó en el hipotálamo medio, sin embargo, la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ no se modificó (Figura 20).

En el hipotálamo posterior de los animales que recibieron solución salina no se modificaron las concentraciones de serotonina y 5-HIAA. Sin embargo, se observó la tendencia a la disminución en la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$. En el grupo de animales inyectados con la PCA se observó la disminución significativa en las concentraciones de serotonina y de su metabolito en comparación al grupo de ratas testigo absoluto o vehículo. Un comportamiento similar se observó en la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ aunque este no llegó a ser significativo (Figura 21).

En comparación con los animales TA o VH, en el rafé dorsal de los animales tratados con el fármaco, la concentración de serotonina y de su metabolito disminuyó ligeramente, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, mientras que en la actividad de la neurona serotoninérgica se observó un incremento no significativo (Figura 22). En relación con el grupo de animales TA, en el rafé medial de los animales que fueron tratados con solución salina, la concentración de serotonina y del 5-HIAA disminuyó ligeramente, pero este cambio fue estadísticamente significativo únicamente en la concentración del metabolito. En la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ no se observaron cambios. Estos tres parámetros no se modificaron en los animales que recibieron el tratamiento con el fármaco (Figura 23).

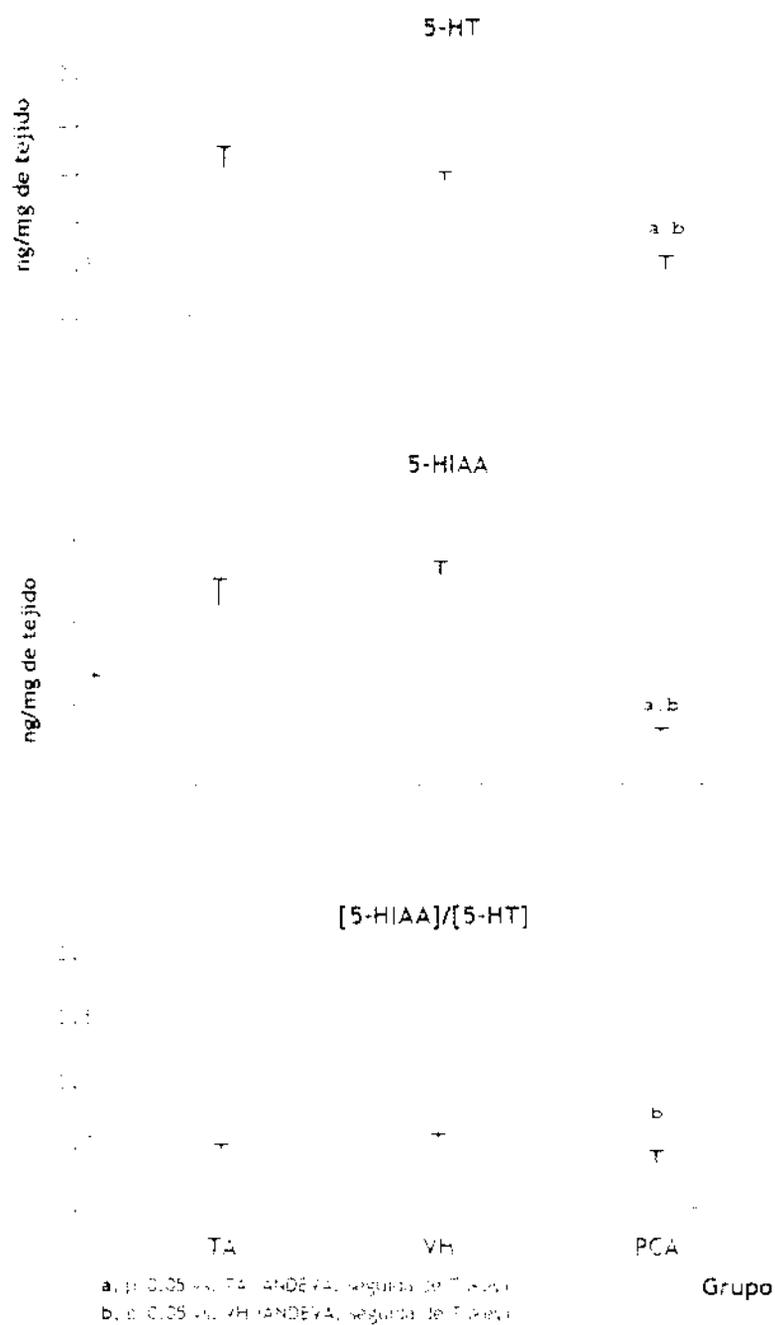


Figura 19. Concentración de la serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y relación [5-HIAA]/[5-HT] (media \pm e.e.m.) en el hipotálamo anterior de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.

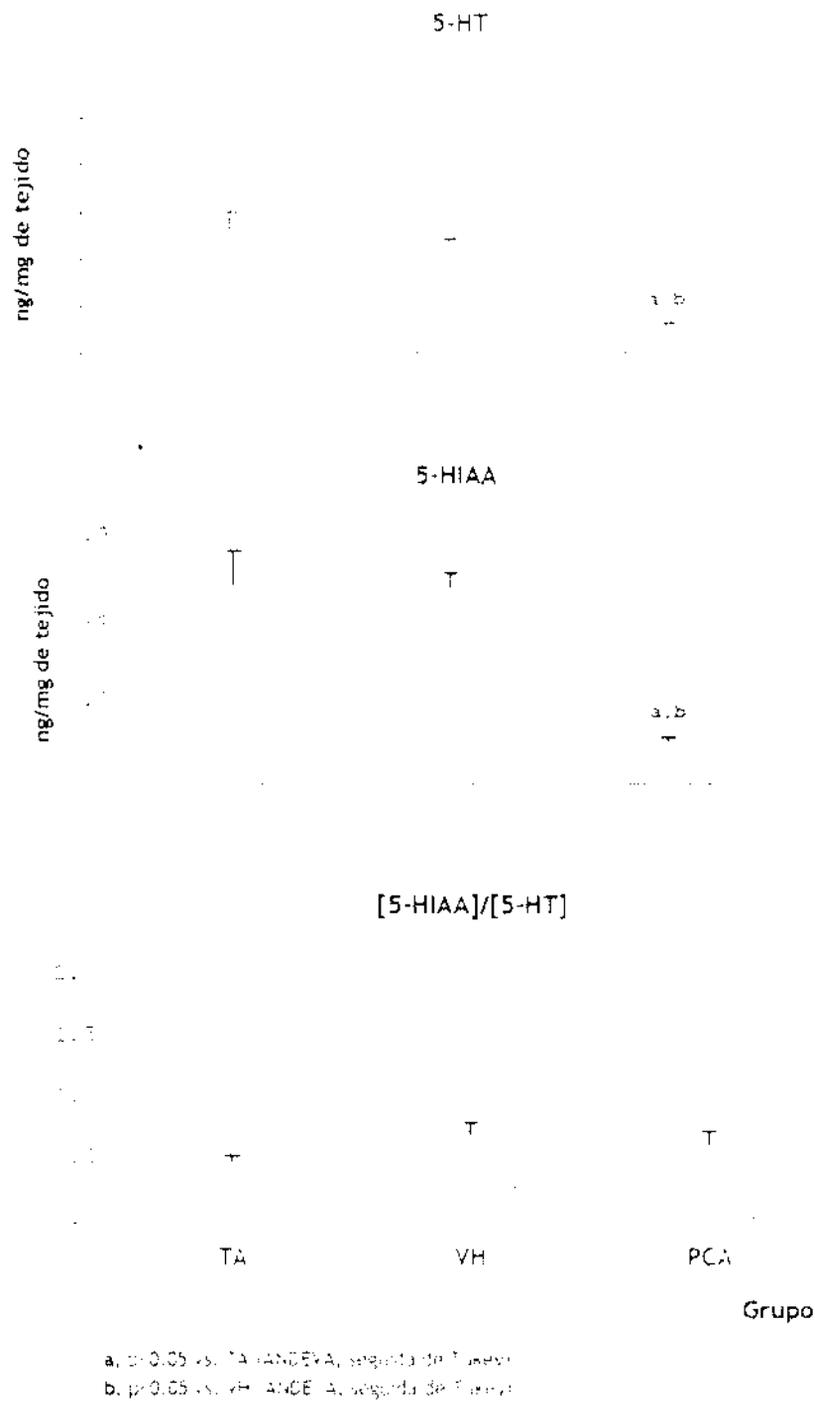


Figura 20. Concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (media \pm e.e.m.) en el hipotálamo medio de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.

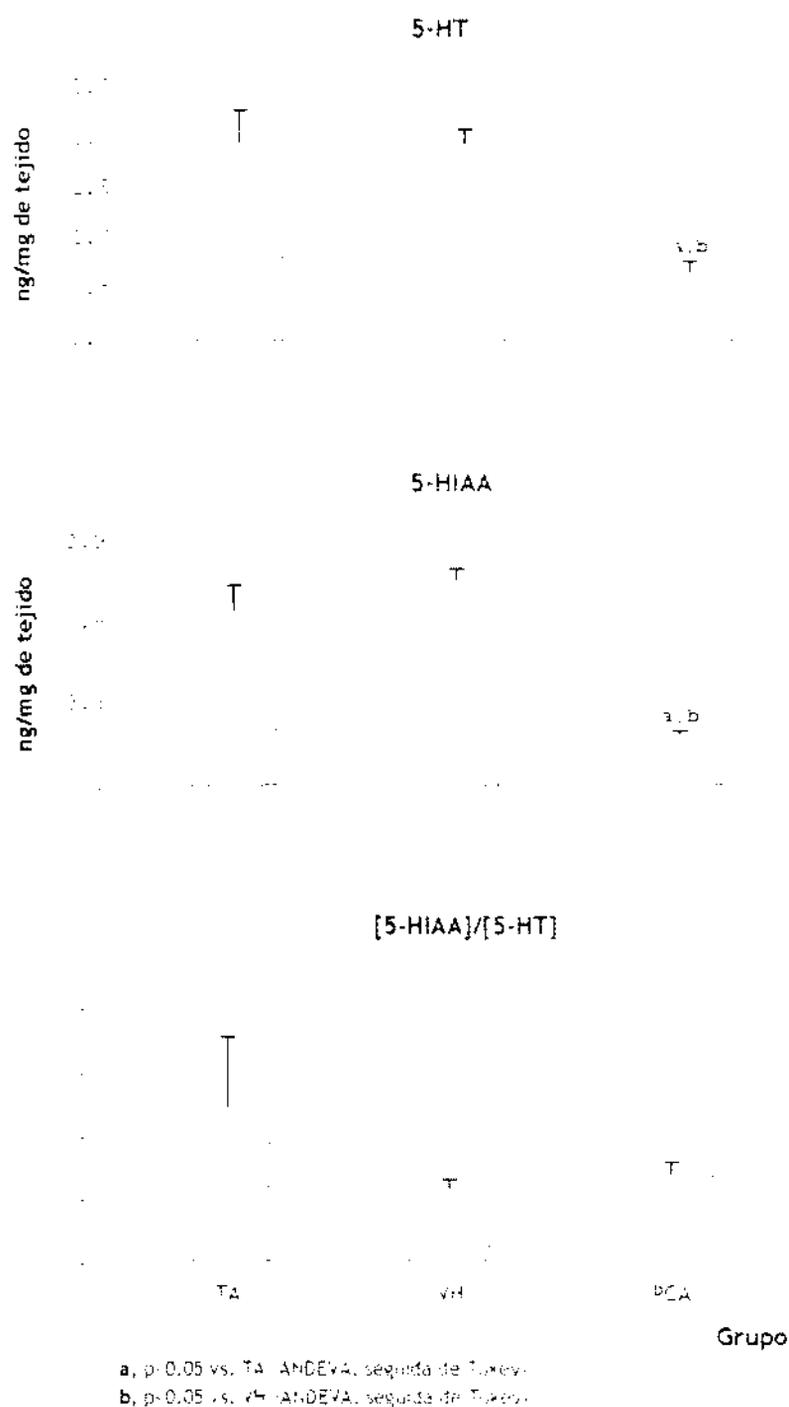


Figura 21. Concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ (media \pm e.e.m.) en el hipotálamo posterior de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.

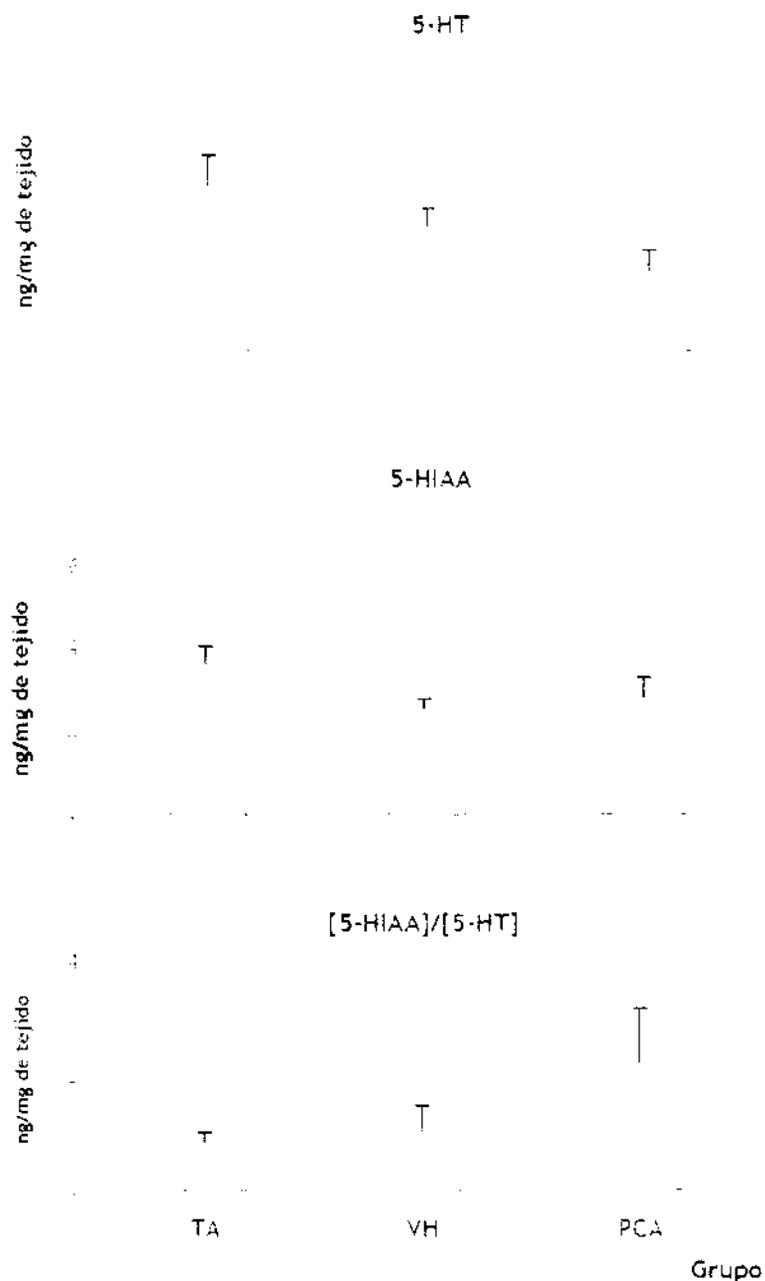
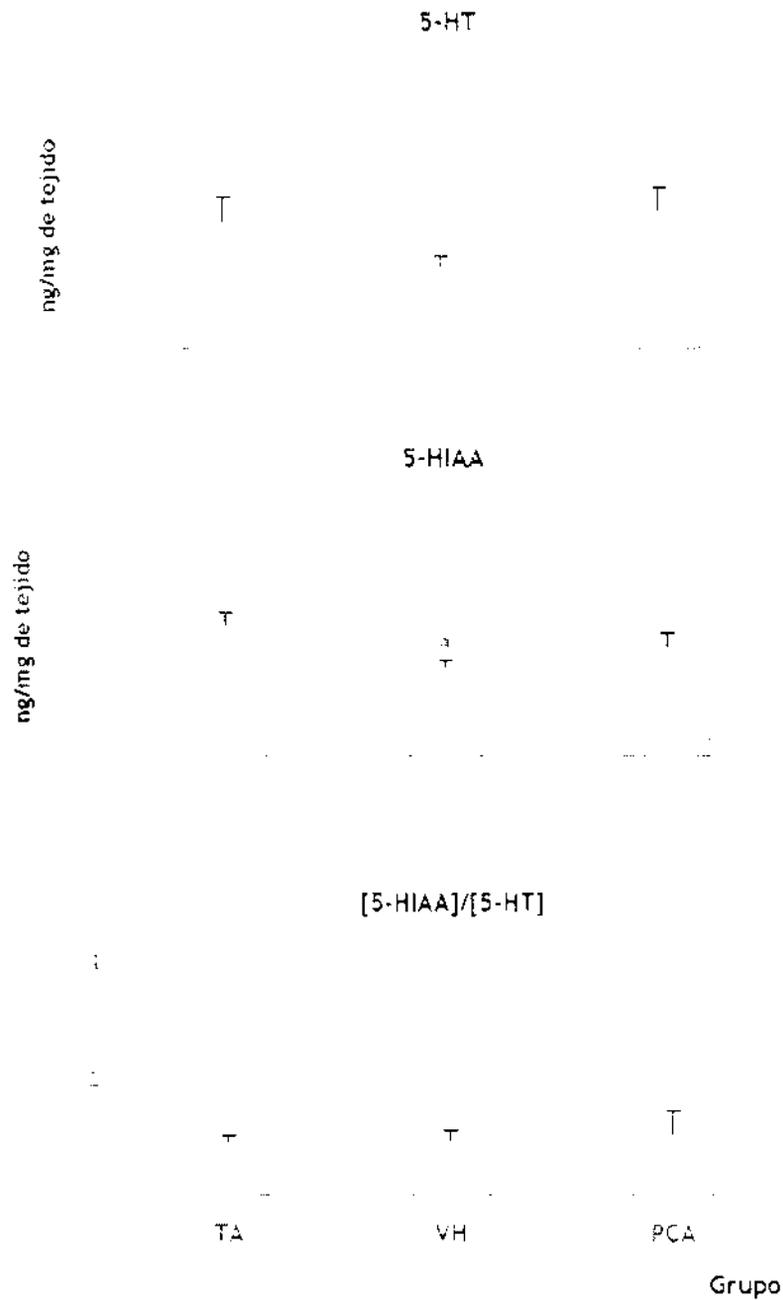


Figura 22. Concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ (media \pm e.e.m.) en el rafe dorsal de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.



a, p < 0,05 vs. TA (ANOVA, segunda etapa de Tukey)

Figura 23. Concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (media ± e.e.m.) en el rafé medial de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la fase juvenil (30 días) y sacrificadas a los 45 días de edad.

Concentración de catecolaminas y sus metabolitos

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la cuantificación de noradrenalina (NA) y dopamina (DA) y sus metabolitos, el 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (MHPG) y 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) respectivamente, así como de la actividad neuronal. En el grupo de animales que recibió la PCA se observaron modificaciones en la actividad del sistema noradrenérgico y dopaminérgico en el HA en comparación al grupo TA o VH.

En el HM se observaron también modificaciones en las concentraciones de DOPAC y la actividad del sistema dopaminérgico en los animales que recibieron el tratamiento con PCA, ya que sólo se detectó el valor de dos animales.

Mientras que en el HP se observaron diferencias en los animales tratados con VH o con PCA en las concentraciones de MHPG, DOPAC y en la actividad de los sistemas noradrenérgico y dopaminérgico en comparación al grupo TA.

Tabla 2. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y dopamina (DA) y sus metabolitos: el ácido 4, hidroxí-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) y el ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC) respectivamente; así como la relación metabolito/neurotransmisor (actividad neuronal), en el hipotálamo anterior (HA), medio (HM) y posterior (HP) de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina (PCA) en la etapa juvenil, y sacrificadas a los 45 días de edad.

	GRUPO	NA	MHPG	MHPG/NA	DA	DOPAC	DOPAC/DA
HA	TA	2.41 \pm 0.34	0.38 \pm 0.09	1.15 \pm 0.04	0.33 \pm 0.04	0.09 \pm 0.02	0.28 \pm 0.04
	VH	1.88 \pm 0.20	0.44 \pm 0.04	0.56 \pm 0.39 a	0.43 \pm 0.08	0.1 \pm 0.02	0.26 \pm 0.0
	PCA	2.2 \pm 0.115	0.38 \pm 0.1	0.19 \pm 0.05 b	0.37 \pm 0.0	0.07 \pm 0.0	0.15 \pm 0.01 a, b
HM	TA	2.55 \pm 0.57	0.86 \pm 0.24	0.37 \pm 0.08	0.78 \pm 0.4	0.2 \pm 0.07	0.2 \pm 0.03
	VH	2.56 \pm 0.17	1.08 \pm 0.19	0.4 \pm 0.05	0.59 \pm 0.06	0.13 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02
	PCA	2.5 \pm 0.13	0.85 \pm 0.12	0.34 \pm 0.04	0.55 \pm 0.01	0.16, 0.01 (2)	0.32, 0.16 (2)
HP	TA	1.03 \pm 0.11	0.84 \pm 0.10	0.99 \pm 0.2	0.25 \pm 0.03	0.23 \pm 0.01	1.32 \pm 0.25
	VH	1.11 \pm 0.15	1.8 \pm 0.3 a	1.8 \pm 0.13	0.25 \pm 0.04	0.1 (1)	0.27 (1)
	PCA	1.14 \pm 0.10	0.17 \pm 0.19 b	1.06 \pm 0.17 b	0.19 \pm 0.01	0.1 (1)	0.45 (1)

(1), valor de un solo animal.

(2), valor de dos animales.

a. $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA, seguida de Tukey).

b. $p < 0.05$ vs. VH (ANDEVA, seguida de Tukey).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el sistema serotoninérgico participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan las funciones del testículo en la rata macho durante la etapa juvenil.

El bajo peso del testículo observado en los animales que fueron tratados con p-cloroanfetamina coincide con lo ya reportado por Shiskina y Dygalo. (2000), quienes mostraron que cuando a ratas macho se les administra p-clorometanfetamina via intraperitoneal, el peso testicular disminuye y que este efecto se revierte cuando se administra 5-hidroxitriptamina (un precursor en la síntesis de serotonina). Por otra parte, también se ha demostrado que cuando se administra un agonista de los receptores a serotonina, se induce un marcado incremento en el peso de los testículos (Piner y col., 2002).

La disminución en el peso de la gónada se acompañó por la alteración en el contenido de los diferentes tipos celulares presentes en los túbulos seminíferos. Estos resultados coinciden con lo reportado previamente por Piner y col., (2002) quienes encontraron que al administrar un agonista de los receptores a serotonina del tipo 5-HT₁ se observa distensión de los túbulos seminíferos, como consecuencia del aumento en la talla del lumen del túbulo seminífero.

Otra posible explicación del bajo peso testicular puede ser la falta de tipos celulares presentes en el túbulo seminífero debido a una alteración en el proceso de diferenciación de las células germinales; esta idea es apoyada por los resultados reportados por Collu y col. (1974), quienes mostraron que la administración de la 5,6-hidroxitriptamina (un neurotóxico específico de las neuronas serotoninérgicas) a ratas macho, bloquea el proceso de espermatogénesis debido a que en estos animales el proceso se detiene en el estadio de espermatoцитos en paquiteno.

En los animales tratados con p-clorcanfetamina, la tendencia a la disminución en la concentración de testosterona en suero, es similar a lo ya observado por Shiskina y Dygalo (2000). Estos autores previamente reportaron que cuando se administra un antagonista de la síntesis de serotonina se observa una disminución de la concentración de testosterona en plasma. Estos hechos ponen de manifiesto que el sistema serotoninérgico participa en la modulación de la esteroidogénesis en el testículo. En relación a esto se ha demostrado que las células de Leydig secretan serotonina y que su liberación es estimulada por las propias gonadotropinas. Esta idea es apoyada por Tinajero (1993), Campos y col., (1990) quienes encontraron que la serotonina actúa como modulador autócrino de las células de Leydig, mostrando que la 5-HT inicia una cascada de eventos que incluye la estimulación del CRF y la inhibición del AMPc, con lo cual se inhibe el proceso de la esteroidogénesis.

La concentración de la FSH en el suero de los animales tratados con la PCA mostró una tendencia al incremento, aunque no llegó a ser significativo, mientras que la de LH no mostró diferencias. Sin embargo, difieren a lo reportado previamente por Collu y col (1974) quienes observaron que la depleción de serotonina en el cerebro durante el desarrollo prepuberal del macho inhibe la secreción de gonadotropinas y en particular de la FSH; y por lo sugerido por Brown y Fawke (1972); Fajer y col. (1970) (citados en Collu y col., 1974), quienes señalan que la serotonina puede estimular la secreción de la FSH. Las diferencias observadas entre nuestro estudio al de los autores antes mencionados puede deberse a que se trabajó con animales de diferentes edades. Esta idea es apoyada por las evidencias que señalan que la serotonina participa en los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas de manera diferente durante el desarrollo prepuberal del animal (Justo y col., 1989; Becú-Villalobos y Libertum, 1986).

Diversas evidencias apoyan a la idea de que el sistema serotoninérgico modula la secreción de las gonadotropinas vía la síntesis o liberación de la GnRH, ya que se ha reportado que este sistema de neurotransmisión inerva el hipotálamo, donde se encuentran las neuronas productoras de GnRH (Van de Kar y Lorens, 1979). Se ha sugerido también que el sistema serotoninérgico modula la secreción de las gonadotropinas por la interacción de este sistema con las neuronas GnRHérgicas. Por medio de técnicas de inmunohistoquímica se ha mostrado que las fibras serotoninérgicas hacen sinapsis con el soma de las neuronas productoras de GnRH, y a su vez las fibras serotoninérgicas y las fibras que liberan la GnRH interactúan en la eminencia media (Jennes y col., 1982; Kiss y Halász, 1985). En conjunto estos resultados y los reportados en nuestro estudio apoyan la idea de que la serotonina modula la síntesis y liberación de la GnRH y de las gonadotropinas, en particular de la FSH.

El incremento en la concentración de FSH observado en el suero de los animales que recibieron p-cloroanfetamina puede ser el resultado de una alteración en el proceso de retroalimentación que ejercen los esteroides gonadales e inhibinas en el hipotálamo y la hipófisis. En relación a esto se ha mostrado que la inhibina al actuar en hipófisis disminuye la secreción de FSH (Pinilla y col., 2003). Por lo tanto, es posible que al disminuir la producción de testosterona no se secretara la concentración suficiente de inhibina, y como consecuencia se incrementara la producción de la FSH (Charli y col., 1991; Silverman y col., 1994; Geneser, 2000; Costanzo, 1998; Counis, 1999). Esta idea es apoyada por Allenby y col. (1991) (citado en Sharpe, 1994), quienes señalan que el incremento en la concentración de la FSH en sangre, se correlaciona con la disminución en la producción de la inhibina.

Se ha mostrado que en la rata macho adulta, la secreción de la inhibina está asociada a la presencia de determinados tipos celulares en el túbulo seminífero, principalmente a las espermatídes alargadas, ya que cuando

disminuye este tipo celular, la producción de la inhibina disminuye y la de la FSH se incrementa (Allenby y col., 1991; citado en Sharpe, 1994).

La disminución de algunos tipos celulares en los túbulos seminíferos (espermátides alargadas y espermatozoides) de los animales que se inyectaron con la p-cloroanfetamina, se asocian con la disminución del lumen de estas estructuras del testículo y en algunos casos la falta total de dicha cavidad. Posiblemente estos cambios están vinculados con la producción de hormonas esteroideas, principalmente la testosterona y la hormona estimulante del folículo, ya que como se ha reportado que en la rata inmadura, la iniciación de la espermatogénesis es un proceso hormona-dependiente y que estas hormonas actúan de manera sinérgica en la regulación del proceso de la espermatogénesis (Weinbauer y Nieschlag, 1993).

Las poblaciones celulares más afectadas fueron las espermátides y por ende los espermatozoides, que no se observaron en la mayoría de los túbulos de los animales tratados con PCA. Este hecho posiblemente se deba a la disminución de la concentración de testosterona. Esta idea es apoyada por Chandolia y col., (1991) (citado en Weinbauer y Nieschlag, 1993), quienes demostraron que cuando se bloquea la acción de la testosterona en la rata prepuberal, disminuye el número de células germinales, principalmente de las espermátides, donde la testosterona es esencial en altas concentraciones para la diferenciación y para prevenir la degeneración de este tipo celular (McLachlan y col., 1996).

Así mismo, también se ha observado por otros autores que, cuando se degeneran las terminales nerviosas de serotonina en el cerebro mediante la administración de 5, 6-hidroxitriptamina, la espermatogénesis en la rata adulta se bloquea en el estadio de espermatoцитos en paquiteno (Collu y col., 1974), que fue el tipo celular más observado en los túbulos de los animales tratados con p-cloroanfetamina.

Otra posible explicación es que la disminución en la concentración de testosterona, pudo haber afectado la función de las células de Sertoli, que son el sustento de las células germinales. Esta idea es apoyada por Weinbauer y col., (1996), quienes reportan que al parecer se requiere de esta hormona y de la FSH para establecer la comunicación entre las células de Sertoli y las células germinales para que se lleve a cabo el intercambio metabólico necesario para el desarrollo adecuado de la espermatogénesis, incluso se piensa que la testosterona incrementa estas uniones.

Otro evento que posiblemente contribuyó a las modificaciones en la diferenciación de las células germinales posiblemente fue la falta de acción de las gonadotropinas en el testículo. Estas hormonas junto con los nutrientes llegan a la gónada por medio del torrente sanguíneo (Collin y col., 1996). En relación a esto se ha mostrado que la serotonina actúa como un mediador de la vasoconstricción y en el flujo de sangre hacia el testículo (Collu y col., 1996). Por lo antes mencionado es posible que en los animales que recibieron PCA, la disminución en la concentración de serotonina en el testículo influyera en el paso de la FSH y la LH y como consecuencia se modificara la esteroidogénesis y la espermatogénesis.

Otros autores sugieren que posiblemente estas alteraciones estén asociadas con los procesos de reabsorción de fluido vía los conductos eferentes y la rete testis (Piner y col., 2002). Sin embargo, estos resultados parecen ser contradictorios en comparación a los observados por Davis (1992), quien encontró que la administración de serotonina en la arteria testicular subcapsular ejerce un efecto de vasoconstricción de esta vía en el testículo.

En los animales tratados con la p-cloroanfetamina, se observa un incremento en la incidencia de apoptosis en las células germinales presentes, posiblemente relacionado a la disminución de la testosterona, la cual es el

principal estimulador parácrino en el desarrollo de las células germinales (Dufau y col. 1993) y actúa como un factor de sobrevivencia de las mismas en el testículo (Kiess y Gallaher 1998). Esta disminución afectó principalmente a las espermátides, que no se observaron. Estudios realizados en rata donde se suprime la producción de testosterona, se observa un agudo incremento en la degeneración de células germinales principalmente de los espermátocitos en paquiteno y de las espermátides (Print y col 1998; McLachlan y col., 1996; Woolveridge y col., 1999).

Otra posible explicación de las modificaciones observadas en los procesos de esteroidogénesis y espermatogénesis, puede deberse a diversos factores de crecimiento como son: el TGF α y TGF β , el FGF, el IGF-1 entre otros, ya que se ha mostrado que estos se expresan en las células de Leydig, células de Sertoli, en las células germinales y en las células peritubulares para el control de la función testicular, sin embargo, la función que desempeñan cada uno aún no ha sido bien establecida (Robertson y col., 1993).

El hecho de que en los animales que recibieron vehículo o p-cloroanfetamina se presentaran alteraciones en los sistemas noradrenérgico y dopaminérgico, nos permite sugerir que estos cambios sean el resultado del estrés que provocó la manipulación de los animales por la inyección. Esta afirmación es apoyada por las evidencias reportadas previamente, en las que se mostró que el factor liberador de la corticotropina (CRF) es liberado en situaciones de estrés (Plotsky y Vale 1984; Rivier y Rivest 1991) y activa al sistema noradrenérgico bajo estas condiciones. Además debe considerarse que las neuronas que producen el CRF activan a las neuronas noradrenérgicas en el locus ceruleus, las cuales están en estrecha proximidad en esta estructura (Butler y col., 1990), la cual envía inervación noradrenérgica a algunos núcleos hipotalámicos como el área preóptica medial (Swason y col., 1983).

En nuestros resultados no se observaron modificaciones en la concentración de serotonina en los núcleos dorsal y medial del rafé, posiblemente a la plasticidad de las neuronas serotoninérgicas, debido a la habilidad de estas neuronas para incrementar la tasa de síntesis del neurotransmisor, así como su liberación en respuesta al incremento de la actividad neuronal. También puede deberse a la interacción entre estos núcleos del rafé, principalmente entre el dorsal y el medial que son los que inervan el hipotálamo (Frazer y Hensler, 1999).

En los animales tratados con p-cloroanfetamina, se observó una disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior, medio y posterior, ya que este fármaco inhibe la actividad de la enzima limitante de la síntesis de serotonina que es producida en el soma de la neurona serotoninérgica y como consecuencia la producción de la amina en la terminal nerviosa que inerva los núcleos productores de GnRH en el hipotálamo (Crowley y Zemlan, 1981), esta idea es apoyada por Sanders-Bush y col. (1970), quienes observaron que la administración de PCA administrada a ratas, disminuye las concentraciones de serotonina en el sistema nervioso central y en órganos periféricos a las 24 hrs. de administrado el fármaco.

En resumen, la administración sistémica de p-cloroanfetamina a ratas macho prépuberales conduce a una cascada de eventos que afectan el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Figura 25). En este estudio se demostró que la p-cloroanfetamina no solo disminuye las concentraciones de 5-HT en el hipotálamo, afectando posiblemente la secreción de GnRH y por lo tanto la síntesis o liberación de FSH. Sino que posiblemente se modificó directamente el funcionamiento de la gónada alterando los procesos de esteroidogénesis y espermatogénesis. La disminución en la concentración de testosterona en suero fue un factor que influyó en la inducción de la muerte celular por apoptosis de las células espermatozógenas y como consecuencia modificó la diferenciación de

las mismas, ya que esta hormona se considera como un factor de sobrevivencia de las células germinales. En conjunto los resultados antes mencionados nos permiten plantear que el sistema serotoninérgico participa de manera estimulante en la modulación de los mecanismos neuroendocrinos que regulan las funciones del testículo.

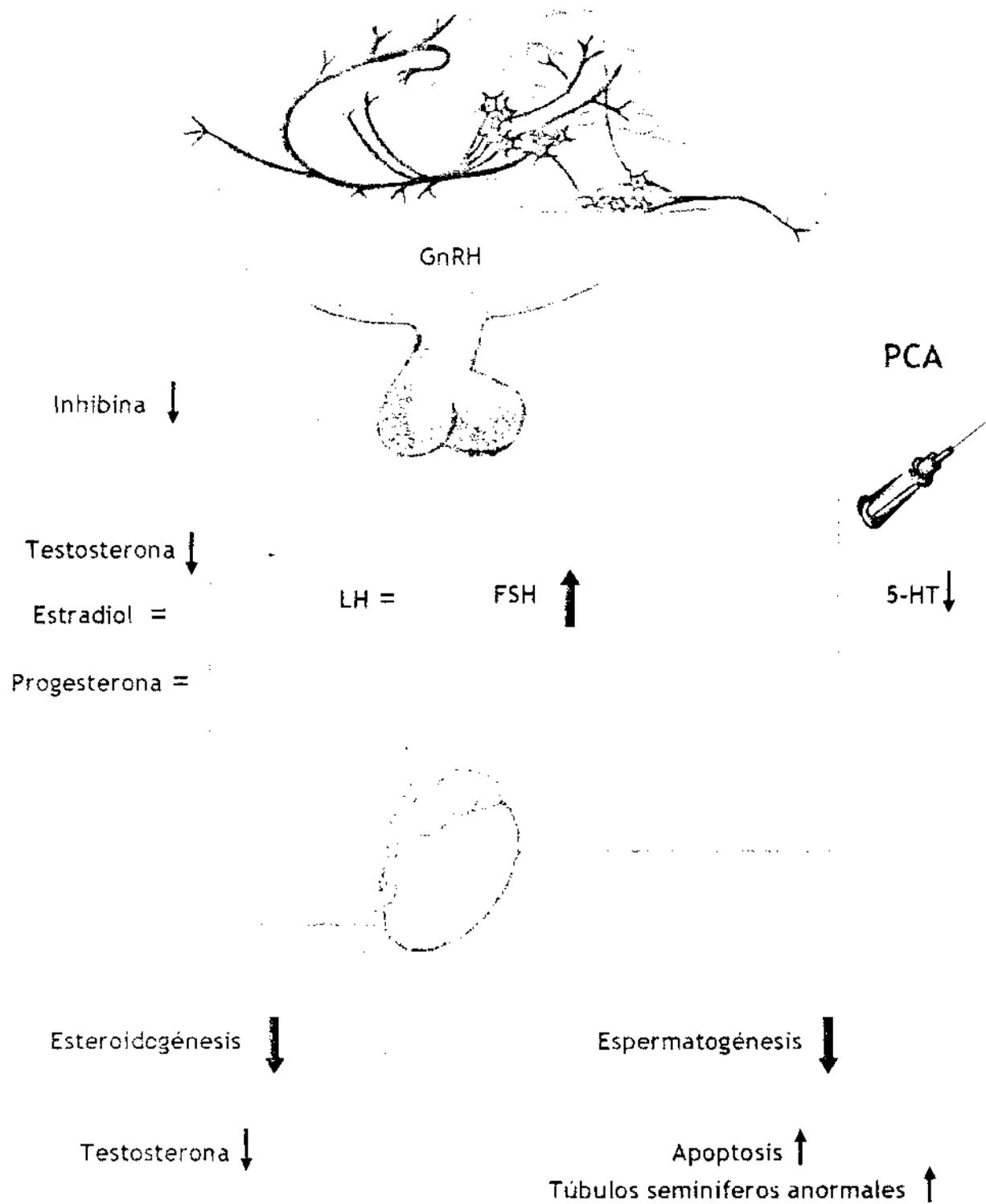


Figura 25. Eventos que se presentan después de la administración de 10mg/kg de p.c. de p-cloroanfetamina en ratas macho en la etapa juvenil (30 días de edad) y sacrificadas a los 45 días de edad.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que:

- Durante el desarrollo prepuberal de la rata macho, el sistema serotoninérgico participa en la modulación de los mecanismos neuroendocrinos que regulan el desarrollo del testículo.
- En la rata macho prepúber la serotonina modula de manera diferencial la secreción de la FSH y de la LH.
- El papel del sistema serotoninérgico en la secreción de la FSH en la rata macho durante la etapa juvenil es de tipo inhibitorio.
- La serotonina actúa directamente en el testículo modulando la esteroidogénesis.
- La disminución en la síntesis de serotonina resulta en la muerte celular por apoptosis en las células espermatogénicas.

PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos en este estudio nos surgen algunas interrogantes:

¿Es la serotonina producida en el cerebro la que actúa vía el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, o es realmente la que se produce en el mismo testículo, la que modifica la función gonadal?

¿Si fuese por la acción de la serotonina producida en la propia gónada, a qué nivel y de qué manera estaría actuando?

¿De qué manera actúa el sistema serotoninérgico sobre la secreción o liberación de la GnRH, para que esta hormona actúe de manera diferente en la síntesis o secreción de las gonadotropinas?

¿Que punto de la síntesis o liberación de testosterona sufrió alteraciones?

¿Se produjeron alteraciones morfológicas en las células de Leydig o de Sertoli?

¿Existe alguna relación directa entre la serotonina y el proceso de apoptosis?

¿En caso de suspenderse el tratamiento, podrá el animal recuperar sus funciones normales?

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar E., Ranchal A., Tena-Sempere M., Pinilla L. (1994). Serotonergic control of prolactin secretion in prepubertal male rats. *European Journal of Endocrinology*, **131**: 547-554.

Alfaro ME., García CC., Dueñas GA. (2000). Métodos de detección de la apoptosis. aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Cancerol (Mex)* **46**: 275-280.

Arias P., Szwarcfarb B., De Rondina D., Carbone S., Sverdlik R., Moguilevsky AJ. (1990). *In vivo* and *in vitro* studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in prepubertal and peripubertal female rats. *Brain Research*. **523**: 57-61.

Azmitia CE. (2001). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin*. **56**: 413-424.

Becú-Villalobos D., Lacau-Mengido IM., Libertun C. (1989). Developmental changes in FSH secretion induced by 5-hydroxytryptophan, naloxone and haloperidol in male and female rats. *Developmental Brain Research*. **47**: 181-136.

Billig H., Furuta I., Hsueh AJ. (1993). Estrogen inhibit and androgen enhance ovarian granulose cell apoptosis. *Endocrinology*. **133**: 2204-2212.

Bloom W., Favcett DW. (1975). *A Textbook of Histology*, 20th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp: 805-857.

Boccabella VA., Salgado DE., Alger AE. (1962). Testicular Function and Histology Following Serotonin Administration. *Anat. Rec.* 71: 827-837.

Brown ER. (1994). *Neurotransmitters*. En: An introduction to Neuroendocrinology. Cambridge University Press. pp. 40-87.

Butler PD., Weiss JM., Stour JC., Nemeroff CB. (1990). Corticotropin-releasing factor Produces Fear-enhancing and behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. *J. Neurosci.* 10: 176-183.

Campos MB., Vitale ML., Calandra RS., Chiochio SR. (1990). Serotonergic innervation of the rat testis. *J. Reprod. Fert.* 88: 475-479.

Charti JL., Ponce G., Joseph-Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHGH-érgicas hipotalámicas. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. (Ed.) R. Dominguez. UNAM-Purrua. México, D.F. pp. 58-82.

Collin O., Damber JE., y Bergh A. (1996). 5-Hydroxytryptamine a local regulator of testis blood flow and vasomotion in rats. *Journal of Reproduction*. 106: 17-22.

Collu R., Jéquier JC., Letarte J., Leboeuf G., y Ducharme JR. (1974). Endocrine Effects of Brain Serotonin Depletion by 5,6-Dihydroxytryptamine in Prepuberal Male Rats. *Neuroendocrinology*. 14: 139-150.

Conn P. Michael, Jennes L., Janovick JA. (1999). GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone). En: **Encyclopedia of Reproduction**. (Eds) E. Knobil, J. Neill. Vol 2. Academic Press, New York, pp: 464-477.

Costa E., Revuelta A. (1972). (-)-p-chloroamphetamine and serotonin turnover in rat brain. *Neuropharmacology*, 11: 291-295.

Costanzo SL. (1998) *Fisiología*. McGraw-Hill. Interamericana. México, D.F. pp. 468.

Counis R. (1999). Gonadotropin Biosynthesis. En: **Encyclopedia of Reproduction**. (Eds) E. Knobil, J. Neill. Vol 2. Academic Press, New York, pp: 507-520.

Crowley WR., Zemlan FP. (1981). Neurotransmitter Systems. Anatomy and Pharmacology. En: **Neuroendocrinology of Reproduction**. (ed.) N. Adler Physiology and Behavior. Edit. Plenum Press, New York, USA. pp. 65-85.

Davis JR. (1992). Comparison of Norepinephrine and Serotonin Vasoconstriction of the Rat Isolated Testicular Subcapsular Artery at Physiological and Elevated Transmural Pressures. *Biology of Reproduction*, 47: 692-697.

Dufau ML., Tinajero JC., Fabbri A. (1993). Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J*. 7: 299-307.

Frago LM., Arroba A., Chowen JA. (2001). Fundamentos de la apoptosis celular: interés en endocrinología. *Endocrinología y Nutrición*. 48(9): 272-280.

Frazer A., Hensler JG. (1999). Serotonin. En: G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R.W. Albers y P.B. Molinoff (eds). *Basic neurochemistry*. Raven Press, New York. pp: 283-308.

Frungieri BM., Gonzales-Calvar SI., Rubio M., Ozu M., Lustig L., Calandra SR. (1999). Serotonin in Golden Hamster Testes: Testicular Levels, Immunolocalization and Role during Sexual Development and Photoperiodic Regresión-Redcrudescence Transition. *Neuroendocrinology*, 69: 299-308.

Ganong WF. (1996). *Fisiología Médica*. 5ª edición. Edit. Manual Moderno, S.A. México, D.F. pp. 962.

Geneser F. (2000). *Histología*. 3ª edición. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. pp. 638-663.

Griswold DM. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **9**: 411-416.

Gondos B., Kogan SJ. (1990). Testicular Development during Puberty. En: **Control of the Onset of Puberty**. (Eds.) M. M. Grumbach, P. C. Sizonenko, M. L. Albert Williams & Wilkins, USA. pp. 183-210.

Hinshelwood M. Margaret (1999). Steroidogenesis, Overview. En: **Encyclopedia of Reproduction**. (Eds) E. Knobil, J. Neill. Vol 4. Academic Press, New York. pp: 644-653.

Jennes L., Beckman WC., Stumpf WE., Grzanna R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH systems in the septum and hypothalamus. *Exp. Brain Res.* **46**: 331-338.

Jennes L., Stumpf WE., Sheedy ME. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *J. Comp. Neurol.* **232**: 534-547.

Jones ER. (1997). **Human Reproductive Biology**. 2ª edición. Academic Press, Inc. USA. pp. 90-101.

Jorgensen H., Knigge U., Warberg J. (1993). Effect of Selective Serotonin Receptor Agonists on Prolactin Secretion in Male Rats. *Neuroendocrinology*. **57**: 401-407.

Justo Sli., Rossano GL., Szwarcfarb B., Rubio MC., Moguilevzky JA. (1989). Effect of Serotonergic System on FSH Secretion in Male and Female Rats: Evidence for Stimulatory and Inhibitory Actions. *Neuroendocrinology*, **50**: 382-386.

Kerdelhué B., Bojna F., Lesieur P., Pasqualini C., El Abad A., Lenoir B., Doviller P., Chiueh M C., Palkovits M. (1989). Median eminence dopamine and serotonin neural activity. *Neuroendocrinology.*, **49**: 176-180.

Kiess W., Gallaher B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology*. **138**: 482-491.

Kiss T., Halász B. (1985). Demonstration of serotonergic axons terminating on luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography. *Neuroscience*. **14**: 69-78.

McLachlan RI., Wreford NG., O'Donnell L., De Krester DM., Robertson DM. (1996). The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology*, **148**: 1-9.

Meistrich LM. (1993). Nuclear Morphogenesis during Spermiogenesis. En: *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. (Ed.) De Krester D. Academic Press, Inc. USA. pp. 67-97 .

Moguilevsky JA., Faigon MR., Rubio M., Scacchi P., Szwarcfarb B. (1985). Sexual differences in the effect of serotonin on LH secretion in rats. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. **109**: 320-325.

Moguillevsky JA., Faigon MR., Rubio M., Scacchi P., Szwarcfarb B. (1987). The role of sexual differentiation of the hypothalamus in the differential effect of the serotonergic system on LH in prepubertal male and female rat. *Neuroendocrinology*. 45: 274-278.

Negoescu A., Lorimier P., Labat-Moleur F., Azoti L., Robert C., Guillermet C., Brambilla C., Brambilla E. (1997). TUNEL : Improvement and Evaluation of the Method for *In Situ* Apoptotic Cell Identification. *Biochemica*. 2: 12-17.

Negoescu A., Gguillermet C., Lorimier P., Robert C., Lantuejoul S., Brambilla E., Labat-Moleur (1998). Tunel Apoptotic Cell Detection in Archived Paraffin-embedded Tissues. *Roche Molecular Biochemicals*. 3: 36-47.

Norman WA., Litwack G. (1997). **HORMONES**. Second edition. Academic Press, New York, pp. 341-360.

Odell DW. (1990). Sexual Maturation in the Rat. En: **Control of the Onset of Puberty**. (Eds.) M. M. Grumbach, P. C. Sizonenko. ML. Albert Williams & Wilkins. USA. pp. 183-210.

Ojeda RS., Urbansky FH. (1994). Puberty in the Rat. En: **The physiology of Reproduction**. (eds) E. Knobil, J. Neill. Raven Press, New York pp: 363-404.

Parker CA., Thibodeau GA. (1983). **Anatomía y Fisiología**. 10ª edición. Interamericana Mc Graw Hill. México. D.F. pp. 606-618.

Paulsen DF. (1991). **Histología Básica**. Manual Moderno. México. D.F. pp. 446-466.

Paxinos G., Watson C. (1982). **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press Australia.

Piner J., Sutherland M., Millar M., Turner K., Newall D., Sharpe RM. (2002). Changes in vascular dynamics of the adult rat testis leading to transient accumulation of seminiferous tubule fluid after administration of a novel 5-hydroxytryptamine (5-HT) agonist. *Reproductive Toxicology*. **16**: 141-150.

Pinilla L., Gonzales L.C., Tena-Sempere M., Aguilar E. (2003). 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor activation reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-stimulated LH secretion in prepubertal male and female rats. *European Journal of Endocrinology*. **148**: 121-127.

Plotsky PM., Vale W. (1984). Hemorrhage-induced secretion of corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology*. **114**: 164-169.

Print GC., Loveland LK., Gibson L., Meehan T., Stylianou A., Wreford N., de Krester D., Metcalf D., Köntgen F., Adams MJ., Cory S. (1998). Apoptosis regulator Bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Genetics*. **95**: 12424-12431.

Ramaley JA. (1979). Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. *Biology of Reproduction*. **20**: 1-31.

Ramírez CR., Carracedo AJ., Moreno AC., y Guerra PF. (1999). Apoptosis y enfermedad. *Alergol Inmunol Clin*. **14(6)**: 367-374.

Reyes FA., Martínez ZR., Luna MM., Chavarría OME. (1991). La Bioquímica de la Función Testicular el Túbulo Seminífero. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. (Ed.) R. Domínguez. UNAM-Purrua. México. D.F. pp. 193-230.

Rivier C., Rivest S. (1991). Effect of stress on activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. *Biology of Reproduction*. **45**: 523-532.

Robertson DM., Risbridger GP., Hedger M., McLachlan RI. (1993). Growth Factors in the Control of Testicular Function. En: **Molecular Biology of the Male Reproductive System**. (Ed.) De Krester D. Academic Press, Inc. USA. pp. 411-438.

Romano CM., Pedernera E. (1991). La glándula intersticial del testículo. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. (Ed.) R. Domínguez. UNAM-Purnua. México, D.F. pp. 231-254.

Ross HM., Romrell LJ., Kaye GI. (1992). **Histología Texto y Atlas Color**. 3ª edición. Médica Panamericana. México, D.F. pp. 634-673.

Rusell LD., Sinha Hikim A.P., Ettlin RA., Clegg ED. (1990). **Histological and Histopathological Evaluation of the Testes**. Ed. Cache River Press. U.S.A., pp. 63-120.

Salve ML., Amich S., Prietos, Casas A. (1994). **Laboratorio Clínico, Bioquímica**. Ed. McGraw-Hill. USA. pp. 496.

Sanders-Bush E., Sulser F. (1970). p-chloroamphetamine: in vivo investigations on the mechanism of action of the selective depletion of cerebral serotonin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **175**(2): 419-426.

Sanders-Bush E., Bushing JA., Sulser F. (1972). p-chloroamphetamine-inhibition of cerebral tryptophan hydroxylase. *Biochemical Pharmacology*. **21**: 1501-1510.

Swanson LW., Sawchenko PE., Rivier J., Vale WW. (1983). Organization of corticotrophin releasing factor (CRF)-immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. **36**: 165-186.

Setchell BP. (1978). *The Mammalian Testes*. Cornell University Press. New York, pp: 450.

Setchell BP., Maddocks S., Brooks DE. (1994). Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids of the Male Reproductive Tract. En: *Encyclopedia of Reproduction*. (Eds) E. Knobil, J. Neill. Vol . Second Edition. Academic Press. New York, pp: 1063-1175.

Schmidts RF; Thews G. (1993). *Fisiología Humana*. 24ª edición. Interamericana Mc Graw Hill. Madrid, España. pp. 906.

Shannon NJ., Gunnet JW., Moore KE. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *Journal Neurochemical*. **47**: 958-965.

Sharpe MR. (1994). Regulation of spermatogenesis. En: *The physiology of Reproduction*. (Eds) E. Knobil, J. Neill. Raven Press, New York pp: 1363-1434.

Shishkina GT., Dygalo NN. (2000). Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **125**: 45-51.

Silverman AS., Liune I., Witki JW. (1994). The gonadotrophin-releasing-hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry. En: *The physiology of Reproduction*. (Eds) E. Knobil, J. Neill. Raven Press, New York pp: 1683-1710.

Simerly BR. (1995). Anatomical substrates of hypothalamic integration. En: **The Rat Nervous System**. (Edits) Paxinos, G. Academic Press, New York. pp. 353-390.

Steger RW., Dennis C., Van AA., Gay-Primer E. (1990). Alterations in hypothalamic serotonin metabolism in male hamsters with photoperiod-induced testicular regresión. *Brain Research*, **514**: 11-14.

Takeuchi Y. (1988). Distribution of serotonin in the mammalian brain. En: **Neuronal Serotonin**. (Eds.) MN Osborne, M. Hamon. John Wiley & Jons. New York, USA. pp. 25-56.

Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca DR., Dufau ML. (1993). Serotonin Secretion from Rat Leydig Cells. *Endocrinology*, **133**(6): 3026-3029.

Tresguerres JFA. (1999). **Fisiología Humana**. McGraw-Hill. Madrid, España. pp. 1033-1047.

Van de Kar LD., Lorena SA., (1979). Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and medial midbrain raphe nuclei. *Brain Res.*, **162**:45-54.

Vander A., Sherman J., Luciano D. (2001). **Human Physiology**. The mechanisms of Body Function. 8ª edición. McGraw-Hill Higher Education, New York. pp. 636-647.

Veldhuis JD. (2001). Eje hipotalámico-hipofisario-gonadal masculino. En: **Endocrinología de la Reproducción**. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. Cuarta edición. (Eds.) Yen SSC., Jaffe RB., Barbieri RL. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, pp. 664-673.

Vitale ML., Parisi MN., Chiochio SR., Tramezzani JH. (1986). Serotonin induces gonadotrophin release through stimulation of LH-releasing hormone release from the median eminence. *J. Endocr.* **111**: 309-315.

Watts GA., Stanley FH. (1984). Indolamines in the Hypothalamus and Area of the Midbrain in Raphe Nuclei of Male and Female Rats throughout Postnatal Development. *Neuroendocrinology*. **38**: 461-466.

Wei Yan, Jaén Suominen, Jorma Toppari. (2000). Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *Journal of Cell Science*. **113**: 161-168.

Weinbauer FG., Nieschlag E. (1993). Hormonal Control of Spermatogenesis. En: **Molecular Biology of the Male Reproductive System**. (Ed.) De Krester D. Academic Press, Inc. USA. pp. 99-142 .

Woolveridge I., de Boer-Brouwer M., F. Taylor M., J. Teerds Katja, CW. Wu F., D. Morris I. (1999). Apoptosis in the Rat Spermatogenic Epithelium Following Androgen Withdrawal: Changes in Apoptosis-Related Genes. *Biology of Reproduction*. **60**: 461-470.

APÉNDICE

Apéndice A

El cerebro se extrajo y se colocó en solución salina fría (0 C) e inmediatamente después se congeló con nitrógeno líquido. En la disección del hipotálamo anterior se consideró como límite rostral el quiasma óptico y la comisura anterior, como límite lateral los surcos hipotalámicos laterales y como límite caudal el área retroquiasmática y el tracto mamilotalámico. El hipotálamo medio se delimitó rostralmente por el tracto mamilotalámico y por el fornix, lateralmente por los surcos hipotalámicos y caudalmente por los cuerpos mamilares. En el hipotálamo posterior se consideró como límite rostral los cuerpos mamilares, como límite lateral los surcos hipotalámicos y como límite caudal la fosa interpeduncular y el área tegmental ventral. La profundidad del corte para la disección de cada una de las regiones del hipotálamo fue 3 mm aproximadamente (Figura 26).

Para la región del núcleo dorsal y medial del rafé se consideraron como límite anterior el lóbulo pituitario, el núcleo pontine y el tronco piramidal, como límite lateral la sustancia gris periacueductal y como límite posterior el núcleo del puente del rafé y el subpedúnculo cerebral de acuerdo a el atlas de Paxinos y Watson (1982). El núcleo dorsal fue obtenido mediante un sacabocado de 2 mm de diámetro y el núcleo medial del rafé se obtuvo al realizar un corte dorsal en la región de la decusación cerebelar peduncular y un corte ventral en el área del núcleo reticulotegmental y lateralmente al tracto tectoespinal (Figura 26).

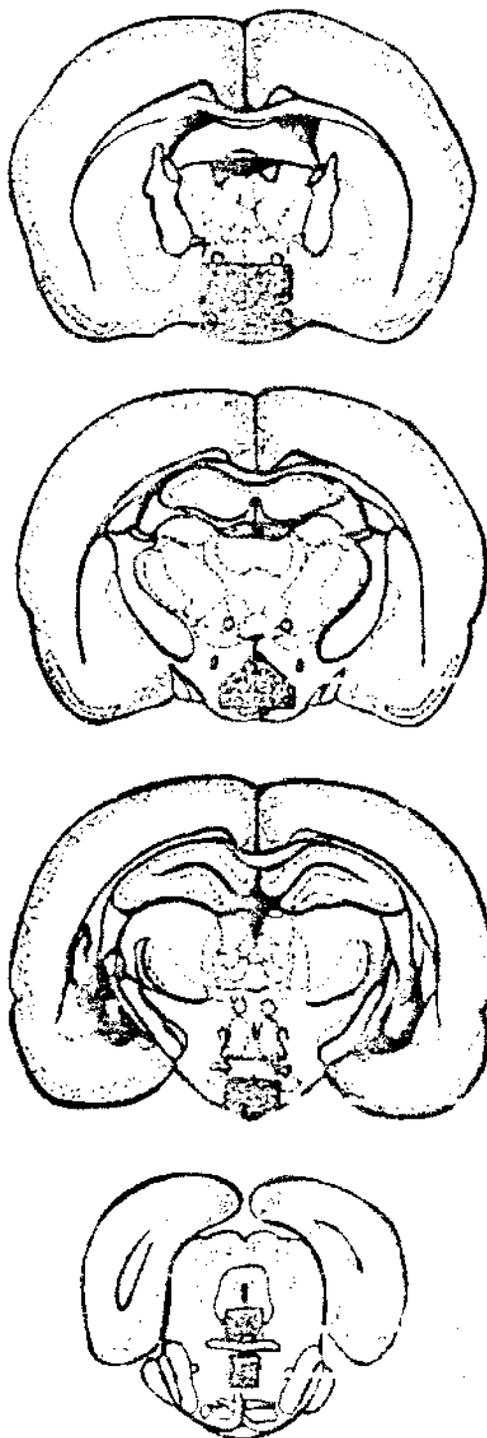


Figura 26. Esquema de cortes coronales de cerebro de la rata, en el que se muestra la localización del hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM), hipotálamo posterior (HP) y rafé dorsal (RD) y medial (RM) (Modificado de Paxinos y Watson, 1982).