



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**EFECTO DE LA LESIÓN QUÍMICA DEL NÚCLEO DORSAL
DEL RAPE EN LA APOPTOSIS EN EL TESTÍCULO Y EN LA
SECRECIÓN DE LH Y TESTOSTERONA EN LA RATA
MACHO PREPÚBER**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
MARISOL MORALES TOVILLA**

DIRECTORA DE TESIS: Dra. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2010



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

**EFECTO DE LA LESIÓN QUÍMICA DEL NÚCLEO DORSAL DEL
RAFÉ EN LA APOPTOSIS EN EL TESTÍCULO Y EN LA
SECRECIÓN DE LH Y TESTOSTERONA EN LA RATA MACHO
PREPÚBER**

Tesis que presenta: Marisol Morales Tovilla

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

Realizada en el Laboratorio de Pubertad de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DAGAPA-PAPIIT Convenio IN-219408.

ÍNDICE

RESUMEN	í
INTRODUCCIÓN	1
REPRODUCCIÓN.....	1
PUBERTAD.....	1
APARATO REPRODUCTOR MASCULINO.....	1
TESTÍCULOS.....	2
CÉLULAS DE LEYDIG.....	4
FUNCIONES DEL TESTÍCULO.....	5
ESTEROIDOGÉNESIS.....	5
ESPERMATOGÉNESIS.....	9
REGULACIÓN HORMONAL DE LAS FUNCIONES DEL TESTÍCULO.....	14
APOPTOSIS.....	18
ASE DE INICIACIÓN.....	19
FASE DE EJECUCIÓN.....	23
FASE DE ELIMINACIÓN.....	23
REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS.....	23
FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS BCL-2.....	25
HORMONAS Y APOPTOSIS.....	26
SEROTONINA 5-HT.....	29
SEROTONINA, SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y FUNCIONES DEL TESTÍCULO.....	32
5, 6- DIHIDROXITRIPTAMINA (5, 6 DHT).....	33
JUSTIFICACIÓN	35
HIPÓTESIS	36

OBJETIVO GENERAL.....	37
OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
RESULTADOS	
EFFECTO DE LA LESIÓN QUÍMICA DE LA 5,6 DIHIDROXYTRIPTAMINA EN EL NDR	
CONCENTRACIÓN DE 5-HT Y SU METABOLITO.....	42
CONCENTRACIÓN DE LH.....	48
CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA.....	48
EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE TÚNEL.	50
EXPRESIÓN DE BCL-2 Y BAX.....	57
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69
APENDICE.....	81

Resumen

La serotonina (5-HT) es un neurotransmisor que se produce en el sistema nervioso central en el núcleo dorsal del raquí (NDR) y es la fuente principal de la amina, la cual se sugiere participa de forma estimulante o inhibitoria en la modulación de la secreción de las gonadotropinas (hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH), éstas a su vez regulan funciones del testículo como la esteroidogénesis (producción de andrógenos como la testosterona) y la espermatogénesis. Tanto las gonadotropinas y la testosterona son factores que regulan el proceso de muerte por apoptosis en las células germinales en el testículo.

Por lo que en este estudio fue de nuestro interés analizar el efecto de la lesión del NDR en la concentración de serotonina en el hipotálamo, en las concentraciones de LH y testosterona en el suero y en el proceso de apoptosis en el testículo, evaluado por la técnica de TUNEL y la expresión de los genes bax y bcl-2. Para ello se utilizaron ratas de la cepa CII-ZV, a las cuales se les realizó a los 30 días de edad la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6 DHT), neurotóxico selectivo de las neuronas serotoninérgicas, en el NDR. A otro grupo de animales se les realizó la microinyección de ácido ascórbico (grupo vehículo, VH) y se conto con un grupo de animales que no recibieron ningún tratamiento (grupo TA). Los animales de los diferentes grupos se sacrificaron a los 45 ó 65 días de edad.

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto o con microinyección de ácido ascórbico (VH) en el NDR, en los animales con microinyección de 5, 6 DHT y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad la concentración de 5-HT disminuyó en el hipotálamo anterior (5,6 DHT 45 días de edad: 0.58 ± 0.05 vs. TA: 1.92 ± 0.05 ; VH: 1.96 ± 0.05 , $p < 0.05$) (5, 6 DHT 65 días de edad: 0.52 ± 0.05 vs. TA: 1.22 ± 0.05 ; VH: 1.18 ± 0.05 , $p < 0.05$) hipotálamo medio (5, 6 DHT 45 días de edad: 0.54 ± 0.05 vs. TA: 2.33 ± 0.05 ; VH: 1.99 ± 0.05 , $p < 0.05$) (5, 6 DHT 65 días de edad: 0.57 ± 0.05 vs. TA: 1.83 ± 0.05 ; VH: 1.43 ± 0.05 , $p < 0.05$).

La concentración de LH en el suero de los animales con microinyección de 5,6 DHT en el NDR disminuyó a los 65 días de edad (5,6 DHT 65 días de edad:

0.32±0.05 vs. TA: 0.40±0.05; VH: 0.45±0.05, p<0.05), mientras que a los 45 días no se presentaron cambios (5, 6 DHT 45 días de edad: 0.33±0.05 vs. TA: 0.59±0.05; VH: 0.69±0.05, p<0.05).

Mientras que en los animales con microinyección de la 5, 6 DHT en el NDR, la concentración de testosterona en el suero disminuyó, pero esta disminución fue estadísticamente significativa a los 45 días de edad, en comparación con los animales VH, (5,6 DHT 45 días de edad: 0.56±0.05 vs. TA: 1.52±0.05; VH: 1.81±0.05, p<0.05) y (5, 6 DHT 65 días de edad: 2.81±0.05 vs. TA: 4.07±0.05; VH: 3.33±0.05, NS).

En la evaluación de la apoptosis por la técnica de Túnel, se observó que los animales con microinyección de 5, 6 DHT, el total de túbulos con células en apoptosis disminuyó a los 45 días de edad (5,6 DHT 45 días de edad: 43 vs. TA: 54; VH: 61, p<0.05) esto en comparación con el grupo con VH, mientras que a los 65 días, aumentó en comparación con el grupo con Vh o TA (5,6 DHT 65 días de edad: 54 vs. TA: 27; VH: 27, p<0.05).

En los animales sacrificados a los 45 días de edad, la expresión del gen bcl-2, (5,6 DHT 45 días de edad: 217.24±0.05 vs. TA: 267.53±0.05; VH: 140.70±0.05, p<0.05) fue menor que en los animales con microinyección de la 5,6 DHT en el NDR, esta tendencia a la disminución no llegó a ser estadísticamente significativa, mientras que el gen bax, (5,6 DHT 45 días de edad: 9.10±0.05 vs. TA: 8.44±0.05; VH: 7.37±0.05, p<0.05) fue mayor, comparación con los animales TA, pero esta tendencia al aumento no llegó a ser estadísticamente significativo.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten sugerir que en el animal prepúber la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe, participa de manera estimulante en la secreción de LH y testosterona, hormonas que inhiben el proceso de apoptosis y son esenciales para el mantenimiento de las células germinales en el epitelio seminífero del macho.

INTRODUCCIÓN

La reproducción, es el proceso por el cual se asegura la continuidad de la especie desde los organismos unicelulares hasta el hombre el cual inicia en la pubertad (Prieto y Paniagua, 2002).

La pubertad es el resultado de la integración de un conjunto de señales del medio ambiente y del propio organismo por el cerebro, que permiten la maduración de las gónada (Prieto y Paniagua, 2002). Esta es una etapa de transición del desarrollo de un individuo durante la cual se adquiere la capacidad reproductiva. El inicio de la pubertad en la rata macho se caracteriza porque se produce la primera ola de espermatogénesis, es decir, cuando se producen los espermatozoides. En el testículo de la rata a los espermatozoides se les identifica alrededor de los 45 a 50 días de edad y en el día 65, ya se encuentran en el conducto deferente (Malkov y col., 1998).

El aparato reproductor masculino esta constituido por (Gartner, 2008) (Fig. 1):

- a) Testículos. Son órganos ovals pares, encargados de la formación de espermatozoides, células sexuales haploides y de la secreción de hormonas masculinas o andrógenos, como la testosterona.
- b) Sistema de conductos. Estructuras tubulares responsables de la conducción de los espermatozoides hacia el exterior y comprenden los túbulos rectos, red testicular (rete testis), conductos eferentes, epidídimo, conductos deferentes, conducto eyaculador y la uretra.
- c) Glándulas anexas. Estructuras glandulares encargadas se sintetizar y secretar componentes del líquido seminal (semen) que junto con los espermatozoides serán expulsados hacia el exterior durante la eyaculación en el acto sexual. Entre estas glándulas se encuentran la próstata, las vesículas seminales y las bulbouretrales o de Cowper.

d) Pene. Órgano encargado de depositar el semen en la vagina durante la cópula o coito.

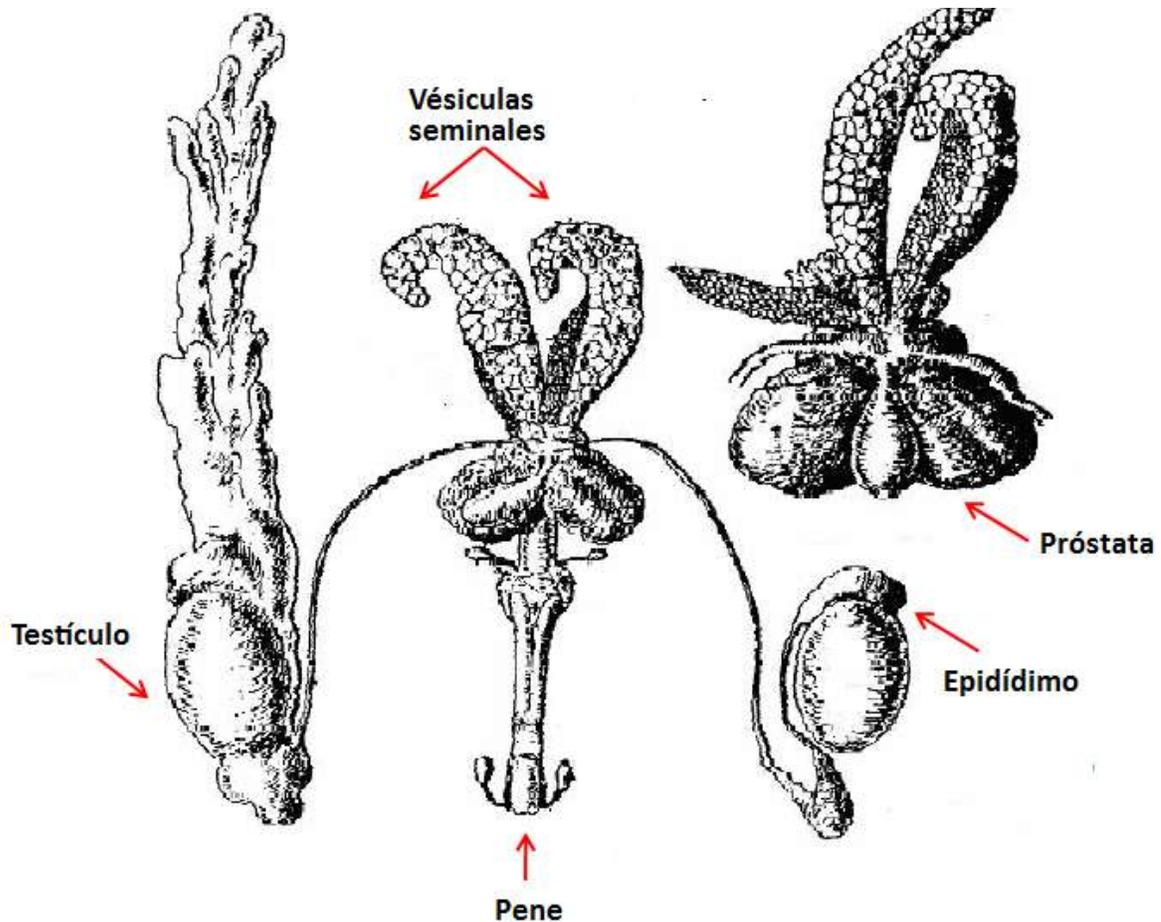


Figura 1. Esquema del aparato reproductor de la rata macho (Modificado de Setchel y col., 1994).

Los testículos son los órganos reproductores primarios, están protegidos por una cápsula blanca de tejido conectivo fibroso, la túnica albugínea. El tejido testicular está conformado de los túbulos seminíferos, los cuales se encuentran inmersos en el tejido conectivo intersticial (Gartner, 2008) (Fig. 2).

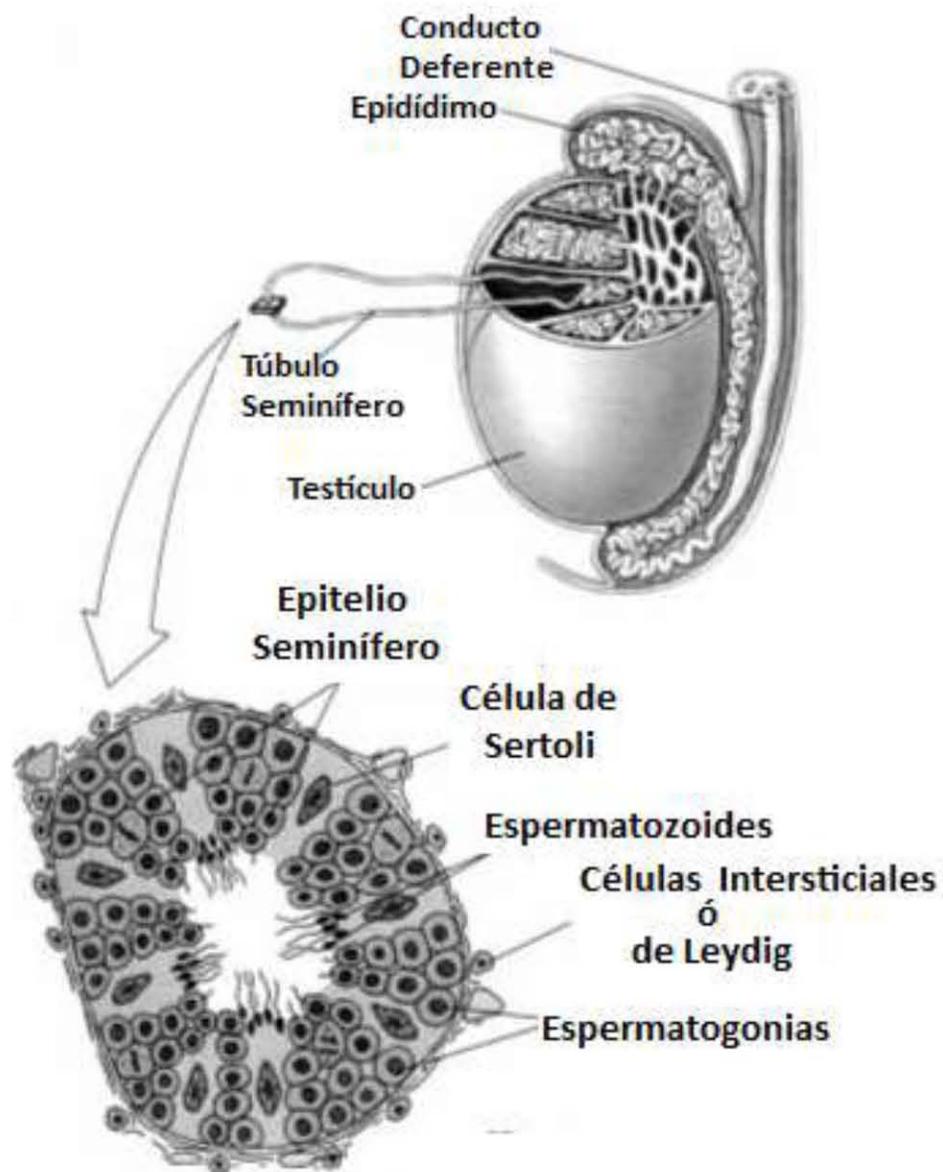


Fig. 2. Componentes del Testículo (Revilla, 2005).

El testículo está conformado de dos compartimientos funcionales (Amann y Schanbacher, 1983):

- a. El compartimiento intersticial, representa el 15% del volumen total del órgano, rodea los túbulos seminíferos y contiene las células de Leydig, vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas, fibroblastos y macrófagos.
- b. El compartimiento del túbulo seminífero que incluye las células de Sertoli, espermatogonias, espermatoцитos y espermátides. En la luz de éste se localizan los espermatozoides. Las células de Sertoli se comunican entre sí por uniones gap que ayudan a la formación de una barrera fisiológica, la hematotesticular, que permite el libre intercambio de sustancias hidrosolubles entre los diferentes tipos celulares que constituyen al túbulo seminífero.

En el hombre los túbulos seminíferos son contorneados, de 30 a 70 cm de largo y 150 a 250 μm de diámetro, encargados de la producción de espermatozoides. Externamente el túbulo se encuentra rodeado de células alargadas peritubulares denominadas mioideas. Internamente se encuentra el epitelio seminífero (o epitelio germinal) que comprende varias capas de células y se compone de dos tipos de células: Sertoli y espermatógenas. Estas últimas se encuentran en diversas etapas de maduración y es una población mitóticamente activa (Gartner, 2008) (Fig. 3).

Células de Leydig

Este tipo celular forma parte del tejido intersticial (Fig. 3), de forma poliédrica, su citoplasma contiene abundante retículo endoplásmico liso y vacuolas que almacenan lípidos. Los productos de secreción de estas células son las hormonas esteroides como la progesterona y testosterona principalmente (Gartner, 2008).

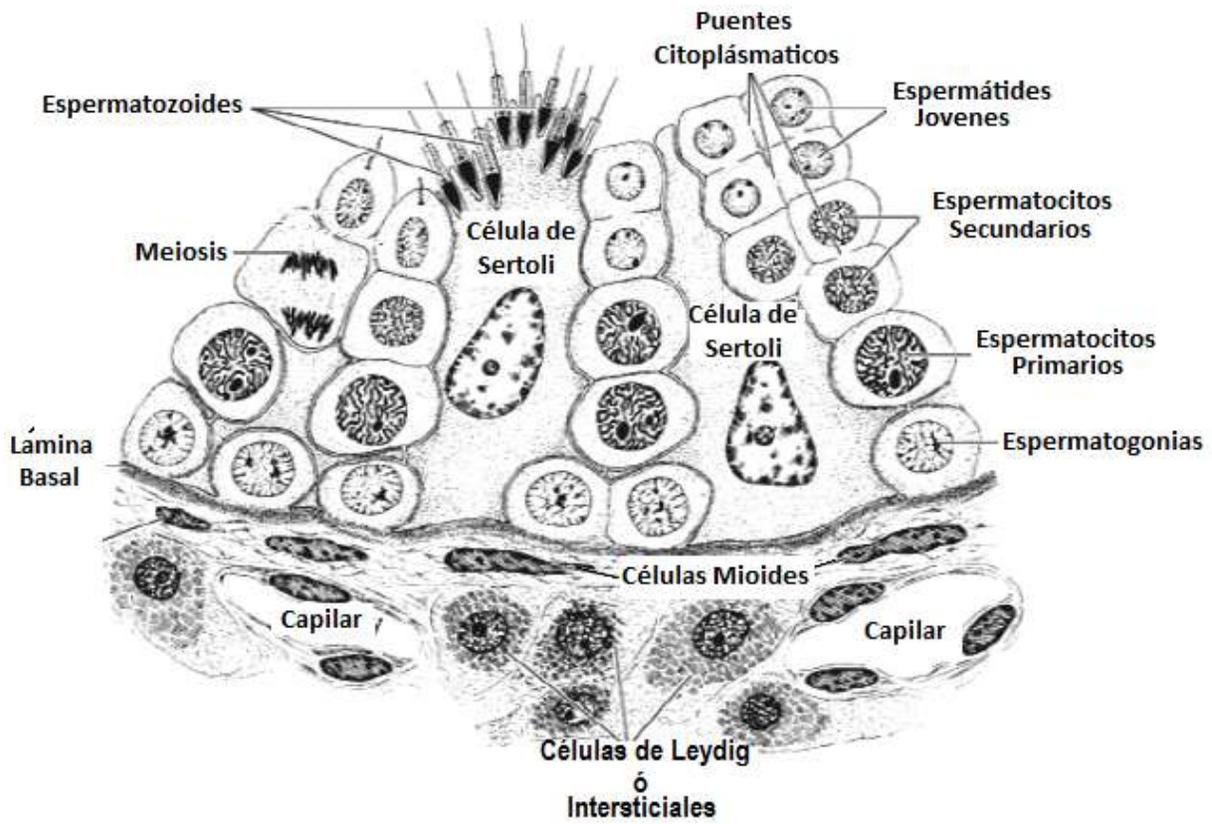


Fig. 3. Organización estructural del túbulo seminífero (Modificado de Colón, 2007).

Funciones del testículo

El testículo cumple dos funciones, producción de espermatozoides y hormonas esteroideas (testosterona), proteicas (inhibina, activina) y factores de crecimiento. Mediante sus secreciones hormonales, mantiene la estructura y funcionamiento del resto de los componentes del aparato reproductor (Gartner, 2008).

Esteroidogénesis

Las células de Leydig sintetizan que se encuentran en el túbulo seminífero, secretan diferentes hormonas esteroideas que se conocen como andrógenos testosterona, dihidrotestosterona y androstenediona, que estimulan y mantienen la

estructura y funcionamiento de los componentes del tracto reproductor masculino (Tresguerres, 1999). Estas células producen los andrógenos a partir del colesterol en respuesta a la estimulación por parte de la hormona luteinizante (LH) secretada por la hipófisis.

Las células de Leydig, pueden sintetizar colesterol a partir del acetil-CoA, o lo obtienen del plasma a partir de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL entran a la célula por endocitosis mediada por un receptor. El colesterol se almacena en el citoplasma de la célula en forma de ésteres de colesterol y por la acción de una esterasa se lleva a cabo la hidrólisis de éstos y el colesterol queda libre para ser utilizado en la síntesis de hormonas esteroideas (Tresguerres, 1999).

La separación de la cadena lateral del colesterol permite la transformación a pregnenolona (Fig. 4), es el paso limitante de la ruta de síntesis de las hormonas esteroideas y se realiza en la mitocondria, por lo que el colesterol debe ser transportado e internalizado en la mitocondria. El colesterol se une a la proteína transportadora de esteroides (SCP2) y este complejo viaja desde la cara externa de la membrana de la mitocondria hasta la interna, donde se realiza la transformación del colesterol a pregnenolona (Tresguerres, 1999).

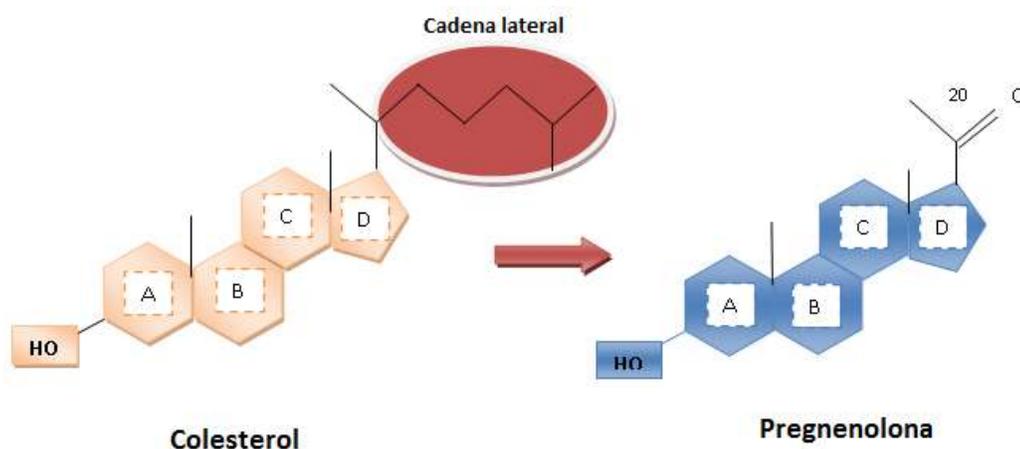


Fig. 4. Separación de la cadena lateral del colesterol, para la síntesis de pregnenolona (Granner, 1988).

La pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa al retículo endoplásmico liso, donde se completa la esteroidogénesis. Dos rutas metabólicas conducen a la síntesis de testosterona en el testículo, una a partir de 17-hidroxi-pregnenolona, conocida como la ruta $\Delta 5$, y otra a partir de 17-hidroxi-progesterona o $\Delta 4$; los esteroides intermedios de la ruta $\Delta 5$ pueden convertirse en el $\Delta 4$ correspondiente (Fig. 5). La importancia relativa de estas dos rutas varía según la especie; en el testículo humano la más importante es la $\Delta 5$, mientras que en los roedores es la $\Delta 4$ (Tresguerres, 1999).

La testosterona puede seguir dos rutas metabólicas y transformarse en otros esteroides biológicamente activos. Por la ruta de la 5α - reductasa se transforma primero en dihidrotestosterona (DHT) y a continuación en 5α -androsteno- 3α , 17-diol o 5α -androsteno- 3β , 17 β -diol, y por la ruta de la aromatasa, se transforma en estradiol y la androstenediona en estrona (Tresguerres, 1999).

La LH se une a los receptores de membrana y estimula la formación del adenosin monofosfato cíclico (AMPc), que actúa como segundo mensajero y desencadena una serie de reacciones intracelulares que activan el complejo enzimático P450ssc, y como consecuencia la conversión del colesterol en testosterona. Ya sintetizados, los andrógenos se difunden a sangre y a linfa y se une a la proteína unidora de los andrógenos (ABP), que se produce en las células de Sertoli (Tresguerres, 1999).

En el túbulo seminífero, las células blanco de la testosterona son las mioides peritubulares y las de Sertoli, estas últimas ayudan al mantenimiento de las células de la línea germinal en transformación. La (ABP) que secreta la célula de Sertoli, facilita el transporte de la testosterona desde los testículos hasta el epidídimo, donde modula la maduración de los espermatozoides y su tránsito en el epidídimo (Tresguerres, 1999).

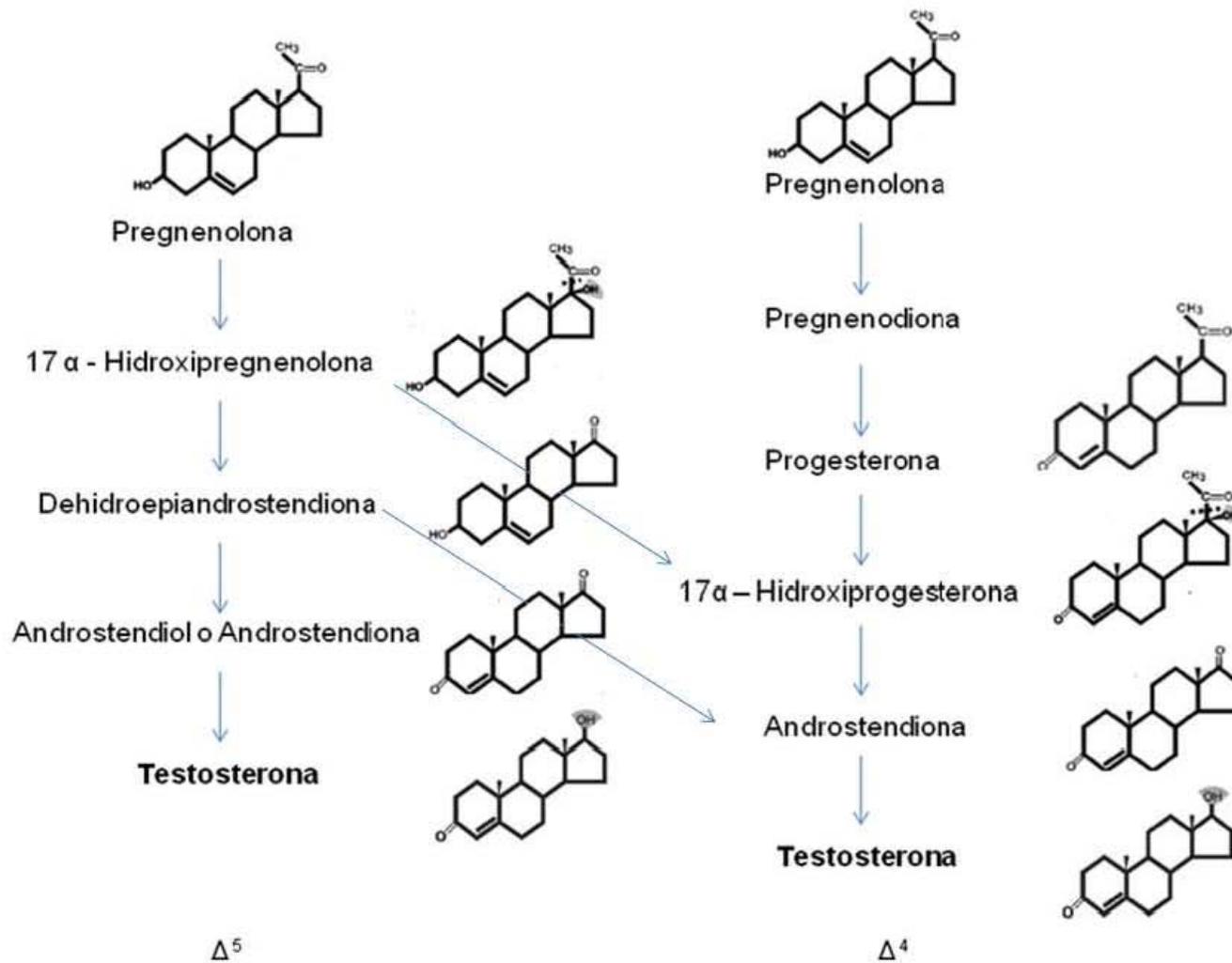


Fig. 5. Vías de síntesis de la testosterona (Modificado de Granner, 1988)

Espermatogénesis.

La espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos y consiste en una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias y posteriormente dos divisiones meióticas de los espermatocitos para dar origen a las espermatídes que se transforman en los espermatozoides (Miller, 1979; Geneser, 2000) (Fig. 6). Las células germinales o espermatogonias se forman durante la vida fetal y su transformación a espermatozoide comienza al inicio de la pubertad. Este proceso incluye cuatro pasos básicos:

Espermatogonias

Estas revisten el túbulos seminífero cerca de la membrana basal. La espermatogonia se divide por mitosis, este proceso tiene una doble función, producir espermatocitos primarios y mantener el número de espermatogonias (Miller, 1979; Geneser, 2000; Molina, 2008).

Espermatocitos

Los espermatocitos primarios duplican su ácido desoxirribonucleico (ADN) poco después de formarse y antes de que inicie la meiosis y en el se inicia la primera división meiótica y como resultado se forman los espermatocitos secundarios, en los que se completa la meiosis. Se forman dos espermatídes redondas por cada espermatocito secundario (Miller, 1979; Geneser, 2000; Molina, 2008).

Espermiogénesis

Esta fase se caracteriza por cambios nucleares y citoplásmicos para formar los espermatozoides a partir de las espermatídes redondas. Los principales eventos en esta fase incluyen condensación del material nuclear de las espermatídes, formación del acrosoma, la formación de la espiral mitocondrial y la remoción del citoplasma (Miller, 1979; Geneser, 2000; Molina, 2008).

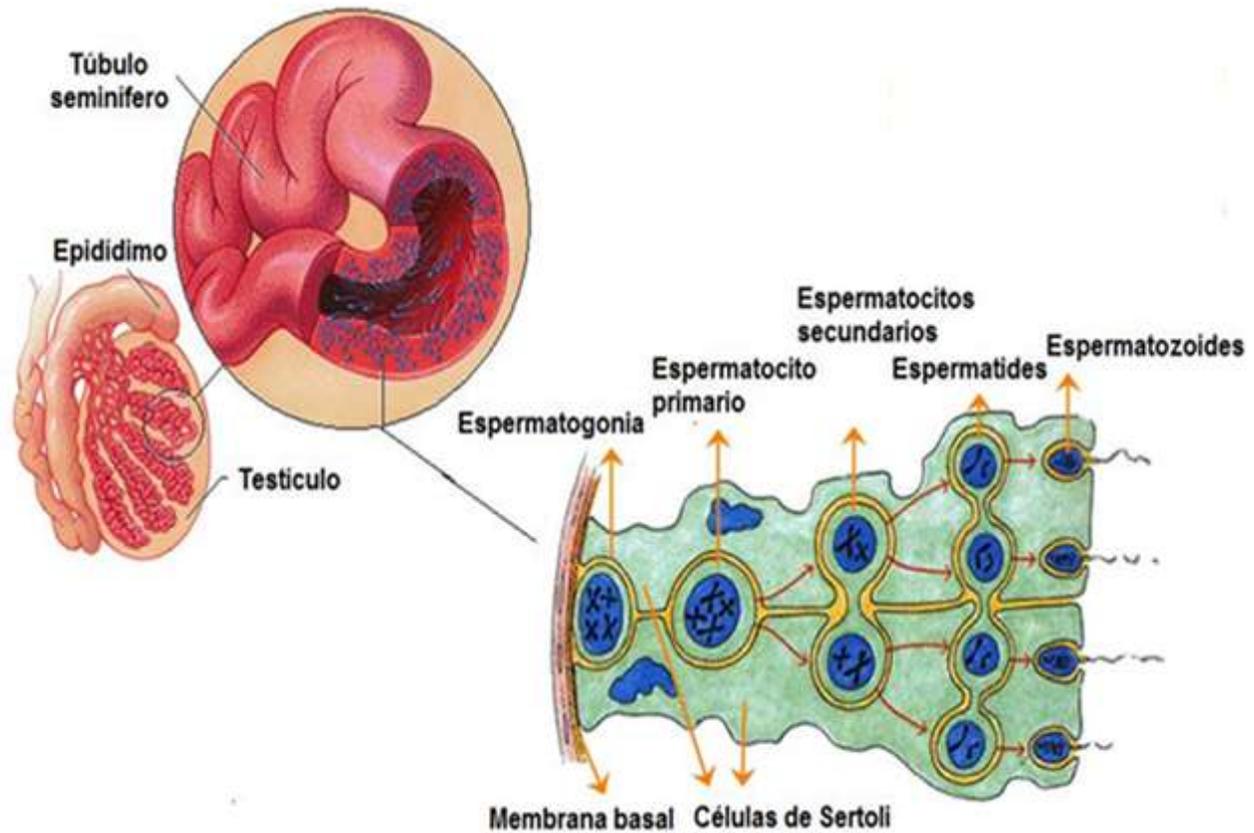


Fig. 6. Espermatogénesis, en los túbulos seminíferos, donde se produce la diferenciación de las células germinales a espermatozoides (Modificado de Rodríguez, 2008; Naveda, 2007).

Espermiación

Es el proceso final de la liberación del espermatozoide maduro de las células de Sertoli hacia la luz del túbulo. A lo largo de este proceso, las células germinales se mueven de la región basal a la adluminal del túbulo seminífero y se depositan en el compartimiento protegido por la barrera hematotesticular. La fase mitótica se presenta en el compartimiento basal, en tanto que la meiótica y las posmeióticas ocurren en el compartimiento luminal (Miller, 1979; Geneser, 2000; Molina, 2008).

Los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero y transportados al epidídimo, de aquí a los conductos deferentes donde se almacenan la mayoría de ellos. Estos conductos desembocan en los conductos excretores de la vesícula seminal. El conducto deferente de cada testículo entra en la próstata y se unen en la uretra que se prolonga internamente por el pene (Molina, 2008; Geneser, 2000).

Esta serie de fases que permiten la diferenciación a espermatozoide en el túbulo seminífero se conoce como el ciclo del epitelio seminífero, el cual está dividido en catorce etapas (Fig. 7). Los túbulos seminíferos que se encuentran entre la etapa I a la VII están conformados por espermatogonias, espermatocitos, espermátides redondas y espermatozoides, mientras que de la etapa IX a la XIV se observan espermatocitos y espermátides alargadas con acrosoma (Russell y col., 1990).

El cuello es muy corto y se fija a la placa basal. Está rodeado por citoplasma residual, denominado gota citoplasmática. Contiene 9 columnas segmentadas de las cuales se originan las fibras densas externas, detrás de la placa basal se encuentra el centríolo proximal (Molina, 2008; Geneser, 2000).

La cola o flagelo está formada por la pieza intermedia, contiene dos microtúbulos centrales rodeados por nueve pares de túbulos periféricos formados por tubulina y actina, a esta estructura se le denomina axonema o complejo axonémico. Estas fibras gruesas que se unen a las columnas segmentadas, acompañan los túbulos dobles del complejo axonémico. Las mitocondrias se encuentran dispuestas alrededor de las fibras densas externas y del complejo axonémico, las cuales proveen la energía para el movimiento del espermatozoide. La pieza principal; contiene la vaina fibrosa por fuera de las fibras gruesas y del complejo axonémico. Pieza terminal; contiene el complejo axonémico (Molina, 2008; Geneser, 2000).

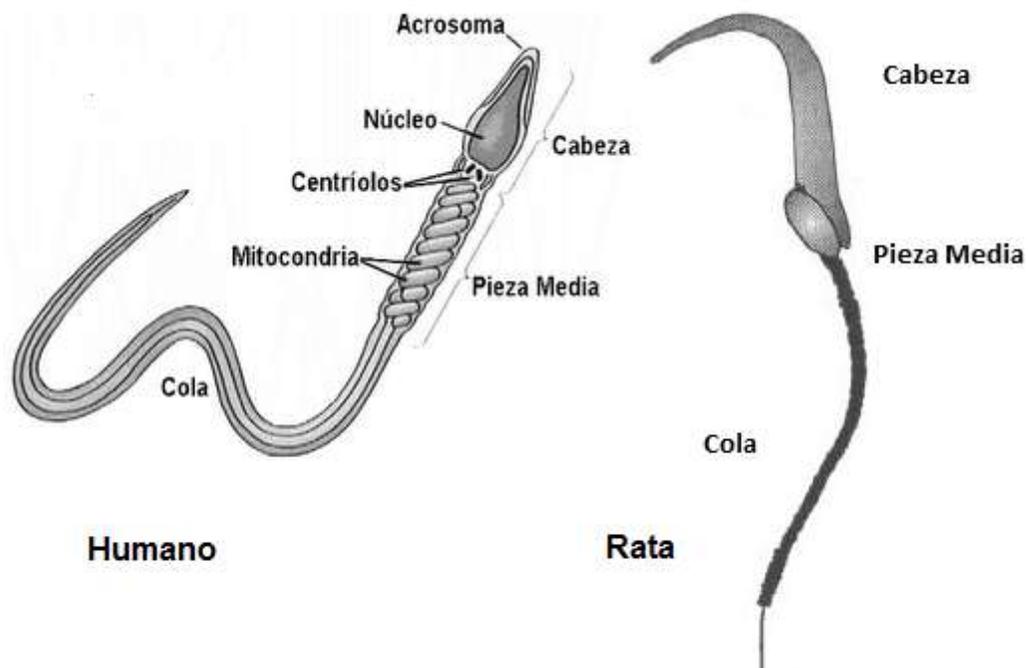


Fig. 8. Estructura del espermatozoide de humano y de la rata. Se observa la diferencia entre la forma de la cabeza (Requena y García, 2007; Mclachlan, 2009).

Regulación Hormonal de las Funciones del Testículo

Las gonadotropinas hormona folículo estimulante FSH y LH son glicoproteínas producidas y liberadas por la hipófisis anterior, la síntesis y la liberación de estas hormonas, es regulada por la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH). Las gonadotropinas se vierten al torrente sanguíneo para así alcanzar sus órganos blanco, las gónadas, donde mantienen su estructura y regulan su funcionamiento (Prieto y Velázquez, 2002).

La modulación de las funciones del testículo depende de la comunicación química entre el hipotálamo, la hipófisis y la gónada misma (Fig. 9). La producción de espermatozoides está regulada por la FSH cuyo blanco es la célula de Sertoli y por la LH que actúa en la célula de Leydig y estimula la esteroidogénesis (Mclachlan y col., 2009).

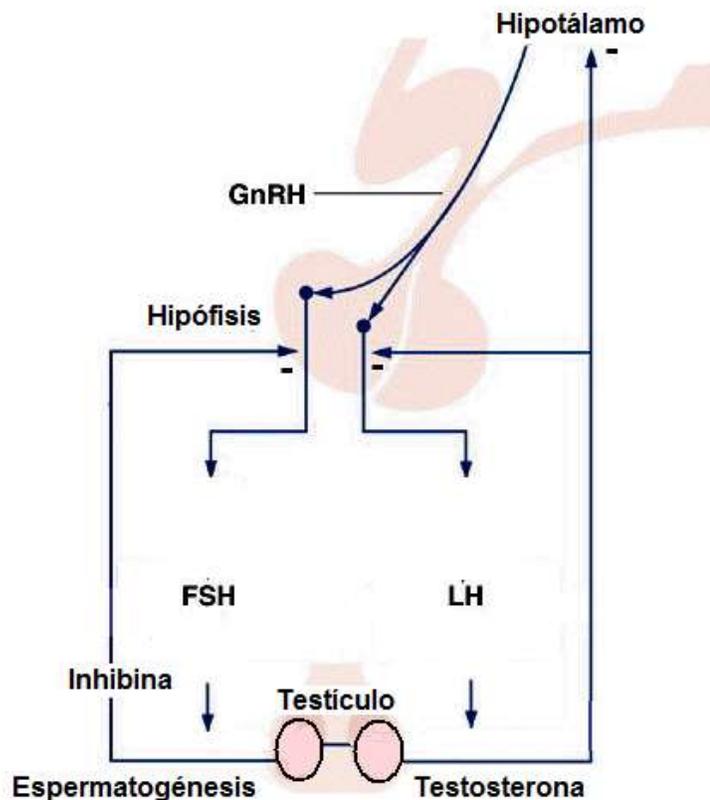


Fig. 9. Comunicación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. (Modificado de Rodríguez, 2008).

Otros factores que están implicados en la regulación de estas hormonas, son las inhibinas A y B. Las cuales son producidas por las células de Sertoli en respuesta a la estimulación de FSH. Esta hormona al actuar en la hipófisis inhibe la secreción de la FSH. La activina, un péptido producido por la célula de Sertoli antagoniza la acción de la inhibina, y por lo tanto estimula la liberación de la FSH. También los andrógenos gonadales vía un mecanismo de retroalimentación negativa contribuye a la regulación de la liberación de las gonadotropinas (Molina, 2008).

La FSH estimula la división, diferenciación y maduración de las espermatogonias, así como la transformación de las espermátidas a espermatozoides. El efecto que ejerce la FSH es el resultado de su acción en la célula de Sertoli, quien proporciona el soporte, protege y nutre a las espermatogonias (Gartner, 2008).

Bajo el control de la LH, las células de Leydig secretan la testosterona, hormona que también es esencial para que se lleve a cabo la espermatogénesis, debido a que inhibe la degeneración de los espermatoцитos y estimula la transformación de la espermátida redonda a espermatozoide (McLachlan, 1996; Prieto y Velázquez, 2002). Se considera que la LH y FSH son hormonas tróficas debido a que estimulan al crecimiento del testículo, entre otras hormonas tróficas que mantiene el tamaño de la gónada, se encuentra la hormona de crecimiento (Malgor y Valsecia, 2003).

En la etapa postnatal de las ratas, la FSH mantiene la división de las células de Sertoli y el desarrollo testicular. Cuando se administra FSH a ratas en el día 1, 5, 10, 15 ó 20 de edad, aumenta el peso testicular, así como la longitud y diámetro de los túbulos seminíferos, al igual que el número de células de Sertoli solo a los 10, 15 ó 20 días. Después del día 15 el número de espermatogonias y espermatoцитos se incrementa. También se mostro que cuando la administración de la FSH se realiza durante los primero 10 ó 15 días y los animales se sacrifican en la etapa adulta, 90 días de edad, se presenta hipertrofia testicular y aumenta número de células de Sertoli y el volumen de los túbulos seminíferos. Estos resultados permitieron a los

autores mostrar que la FSH es esencial para mantener el desarrollo de uno de los componentes del testículo, los túbulos seminíferos y como consecuencia en espermatogénesis (Meachem y col. 1996).

En diversos estudios se ha mostrado la importancia de las gonadotropinas y de la testosterona en el mantenimiento de la estructura y funciones del testículo Madhwa Rak y Martin (1976) mostraron que cuando a ratas macho a partir de los 20 días de edad se le administra diariamente un antisuero contra LH y se sacrifican 14 días después, se altera la morfología de las células de Leydig, disminuye el peso del testículo y la concentración de testosterona en el suero. Con base en estos resultados los autores sugieren que la LH es un factor importante en el mantenimiento y funcionamiento de las células de Leydig, lo que se refleja en la producción de testosterona.

Las gonadotropinas conjuntamente con la testosterona mantienen la estructura del testículo, debido a que funcionan como factores de supervivencia de las células de la línea germinal. Cuando hay deficiencia en la producción de estas hormonas antes mencionadas se induce la apoptosis en la gónada. Durante el desarrollo normal de las gónadas de ambos sexos se produce la muerte celular masiva. En los testículos, hasta el 75% de las células germinales también mueren por apoptosis, posiblemente este sea un mecanismo para eliminar las células germinales defectuosas (Hsueh y col., 1996).

Entre los estudios encaminados a analizar la participación de las gonadotropinas y de los andrógenos en la regulación de la función testicular se encuentra el de Russell y col. (1998), quienes realizaron la hipofisectomía a ratas macho de 25 días de edad y posteriormente le administraron un antagonistas de los andrógenos, la flutamida, y los sacrificaron a los 35 días. Se observó que tanto en las ratas con hipofisectomía o hipofisectomía más flutamida la concentración de testosterona en suero, el peso del testículo y el diámetro de los túbulos seminíferos disminuyo. Cuando a estos animales se les administra FSH, se observó una recuperación de

los parámetros antes mencionados y en los túbulos seminíferos se presentó la recuperación de los diferentes tipos celulares. Con base en estos resultados los autores sugieren la FSH y testosterona son esenciales para mantener la viabilidad de las células germinales y como resultado para la espermatogénesis.

Cuando las ratas inmaduras son tratadas diariamente con un antisuero para la FSH a partir del día 1 al 32 de edad y se sacrificaron al día 33 se observa la disminución en el diámetro del túbulo seminífero y en este compartimento no se modifica el número de espermatogonias tipo A, pero si disminuyen los espermátocitos en paquiteno y las espermátides. Cuando se administra el antisuero de LH se presenta la atrofia de las células de Leydig, disminuye la concentración de testosterona y en el túbulo seminífero se observa la suspensión de la espermatogénesis antes de que concluya la meiosis, por lo que no se observan espermátides. Cuando se administra LH más propionato de testosterona se presenta la regresión de los túbulos seminíferos, debido a que altas concentraciones del andrógeno ejerce un efecto inhibitorio en la producción de FSH y LH (Chemes y col., 1979). Un efecto similar en el peso del testículo, en el diámetro del túbulo seminífero y en las células de la línea germinal se muestra cuando a ratas macho se les administra dihidrotestosterona (DHT) o 5α -androsteno- 3β , 17β -diol, y se sacrifican a los 35 días de edad (Kennedy y col., 1985). Estos resultados apoyan la idea de que la FSH y LH son esenciales para que se lleven a cabo las primeras etapas de la espermatogénesis.

Al igual que en el animal prepúber en el adulto la FSH y la testosterona son esenciales para que se desarrolle la espermatogénesis. Se ha observado que en ratas adultas con hipofisectomía no se observan espermátides alargadas y se reduce el número de espermátocitos y espermátidas redondas y la concentración de andrógenos. Mientras que, cuando a estos animales se les administra testosterona se mantiene la formación de espermátidas alargadas en la mayoría de los túbulos seminíferos. Cuando animales hipofisectomizados son estimulados con

FSH, aumenta el número de espermátidas redondas y espermaticitos en paquiteno. Además cuando junto con la FSH se administra testosterona, en el 80 % de los animales se mantiene el número de espermaticitos en paquiteno y espermátidas (Bartlett y col., 1989).

Se ha observado que en las ratas adultas a las que se les suprime la producción de gonadotropinas como resultado de la hipofisectomía, se observó la degeneración de los espermaticitos en paquiteno y de las espermátidas que están presentes en las etapas VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero. Cuando a estos animales se les administra FSH no se observa recuperación, mientras que cuando se administra la LH sola o en combinación con la FSH disminuye la degeneración de las células germinales presentes en las etapas VII y VIII del ciclo del epitelio del túbulo seminífero. Conjuntamente estos resultados permiten apoyar la idea que las gonadotropinas son esenciales para el mantenimiento de la sobrevivencia de las células germinales (Russell y Clermont 1976).

Apoptosis

La supervivencia de un organismo multicelular depende de un sofisticado balance entre la vida y la muerte de sus células. Esta última puede ocurrir mediante dos procesos esencialmente diferentes llamados: necrosis y apoptosis. La necrosis es el resultado del daño celular masivo caracterizado por la liberación de enzimas lisosomales (Samali, 1996).

El término de apoptosis describe una forma característica de muerte, regulada por un programa genético común en varios tipos celulares (Arends y col., 1990). La apoptosis, afecta a células individuales, más que a todas las células de un tejido.

Este proceso se considera como una medida fisiológica de remoción celular, en la cual las células muertas experimentan cambios fisicoquímicos en sus membranas que permiten que sean reconocidas y fagocitadas por las células normales adyacentes (Penninger y Kroemer, 1998).

La apoptosis o muerte celular programada, es una característica del desarrollo animal. Es un mecanismo de regulación en la eliminación de las células no deseadas y abundantes durante el desarrollo embrionario, el crecimiento y la diferenciación. Este proceso es tan importante como la división. La muerte celular ocurre bajo condiciones fisiológicas normales, y no sólo cuando la célula está dañada por alguna sustancia química o atacada por los virus. El balance entre la tasa de apoptosis y la proliferación asegura la homeostasis del organismo (Derradji, 2003).

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de ejecución, se producen cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, y por último, en la tercera etapa o de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Hengartner, 2000) (Fig. 10).

Fase de iniciación

La muerte por apoptosis puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares, las primeras son en muchos casos originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación del citocromo C en la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas de las señales extracelulares mediada por receptores desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca) (Hengartner, 2000; Nagata, 1999) (Fig. 11). La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica, química o física (Thompson, 1995).

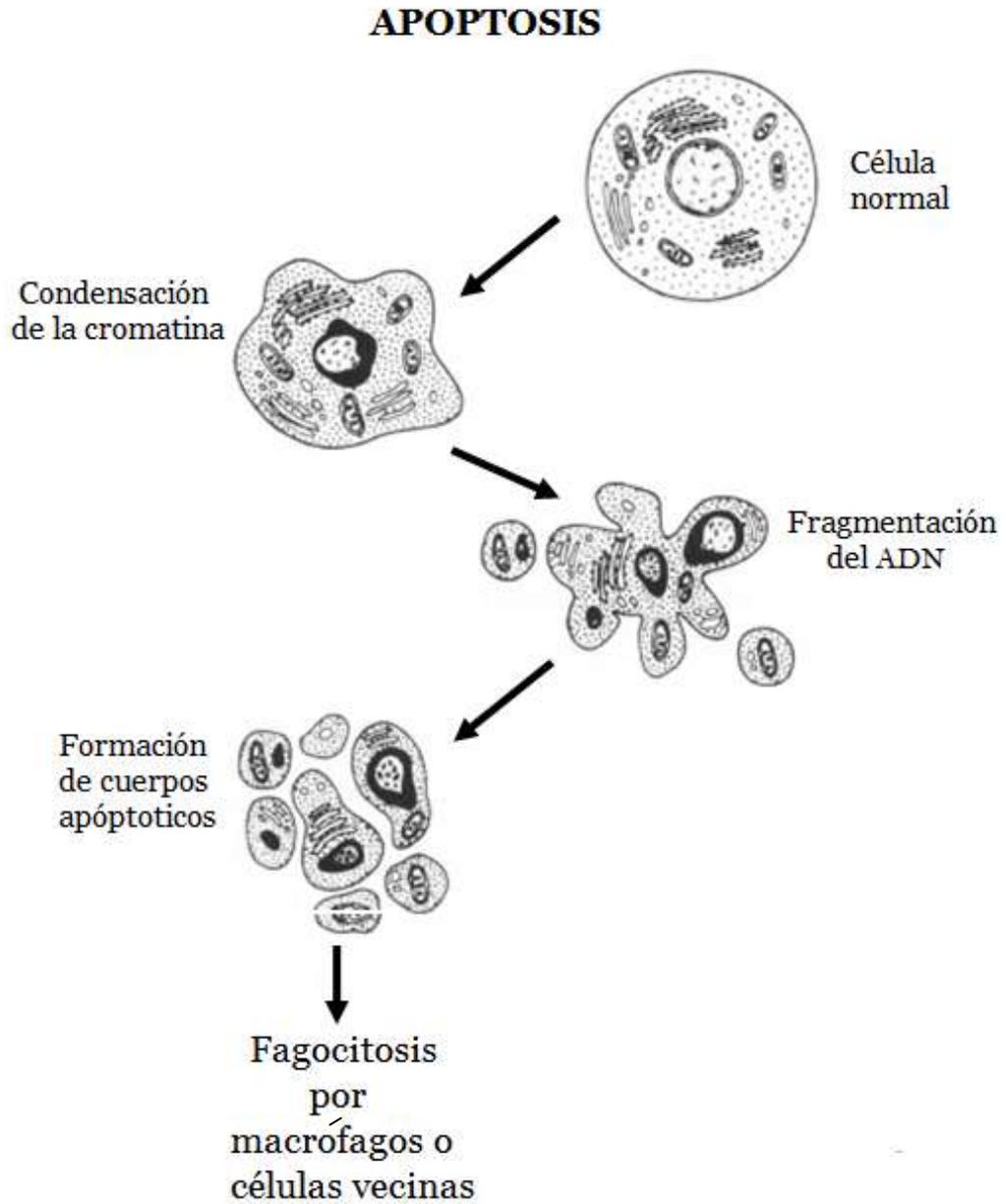


Fig. 10. Esquema del proceso de Apoptosis. Célula normal. Cambios nucleares y cuerpos apoptóticos, que van hacer fagocitados por células vecinas. Ácido desoxiborrinucleico (ADN) (Majno y Joris 1995).

La muerte celular apoptótica se inicia tanto por la vía extrínseca (mediada por un receptor), como por la vía intrínseca (mediada por las mitocondrias, permitiendo la liberación del Citocromo C). En la vía de receptor de muerte, los receptores como TNFR1, Fas, DR-3, DR-4 o DR-5, interactúan con sus respectivos ligandos específicos o en su defecto se presenta una disminución de los factores de crecimiento u hormonales, los que activan la cascada de señalización que proceden el evento de muerte celular (Hengartner, 2000).

Esta unión permite el reclutamiento intracelular de varias moléculas efectoras que inducen la activación de caspasas. En la vía mitocondrial, una señal de muerte (tal como drogas, luz UV, radiación ionizante, entre otras) induce la liberación del citocromo c del espacio intermembranal de la mitocondria, por medio de la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2. El citocromo c liberado se une a (factor 1 que activa a proteasas) Apaf-1 para formar un complejo multimérico denominado apoptosoma que recluta y activa a la procaspasa-9. La caspasa 9 activa la cascada de señalización que a su vez activa a las procaspasas 3 y 7 que lleva a la muerte de la célula (Hengartner, 2000).

Aunque estas vías pueden activarse de manera independiente, puede existir una intercomunicación entre ellas por medio de la caspasa 8, debido a que una baja concentración de esta en la célula activa la cascada de señalización por medio de la vía extrínseca, pero un aumento de la concentración de la caspasa 8 que participa en la vía de receptor de muerte, puede fragmentar y cortar a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. Bid cortado se transloca del citosol a la membrana externa mitocondrial e induce cambios en la permeabilidad de la membrana que promueven la liberación del citocromo c del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol. De esta manera se conectan las vías extrínseca e intrínseca. La actividad proteolítica de las caspasas proporciona las bases bioquímicas de la apoptosis (Martínez, 2004).

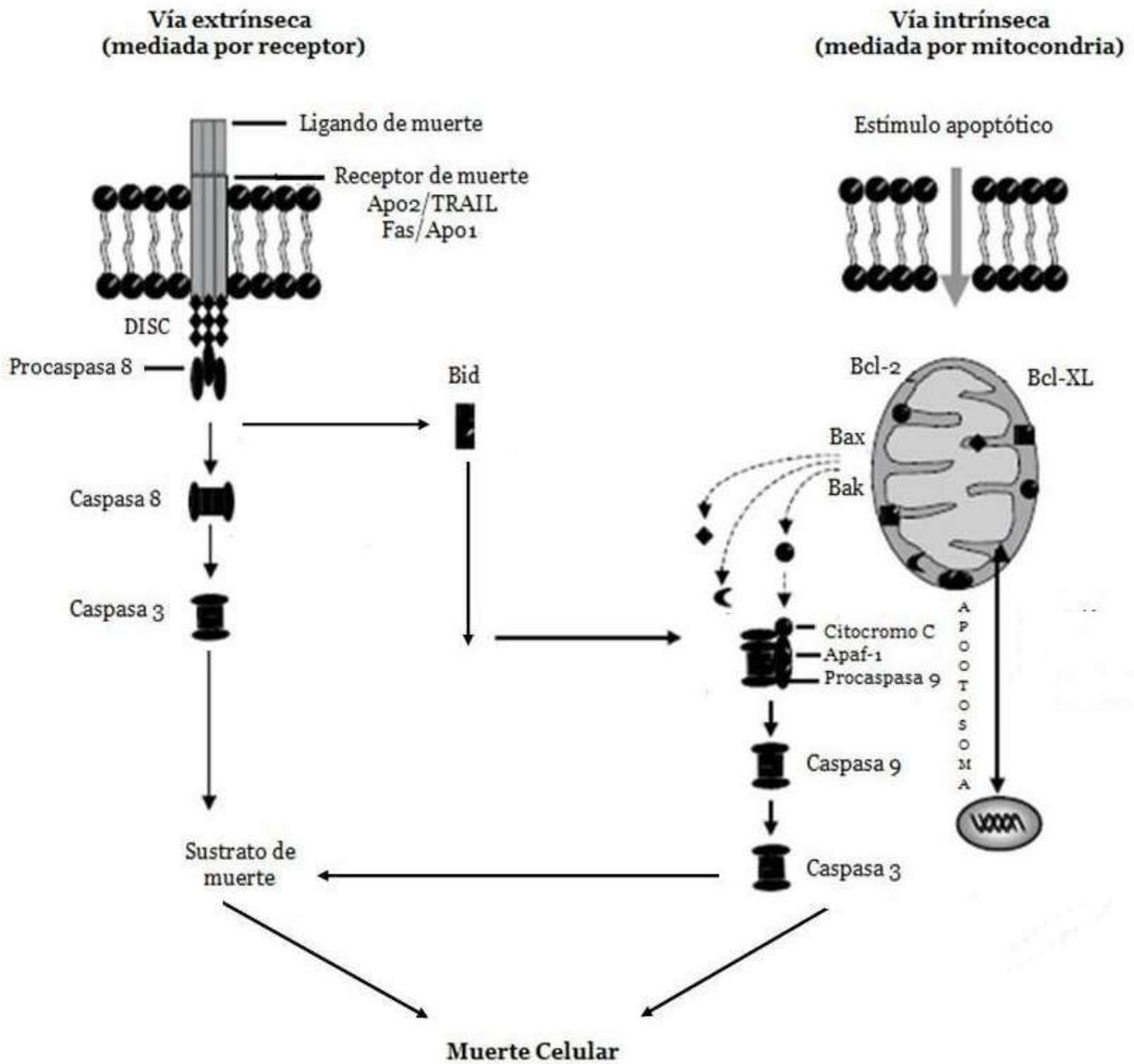


Fig. 11. Vías de muerte celular. Vía extrínseca (Apo2/TRAIL, Fas/Apo1; receptores de muerte), Complejo de iniciación de señalización de muerte (DISC); Vía intrínseca (Bcl-2, Bax, Bak, Bcl-XL) miembros de la Familia Bcl-2 (Modificado de Velásquez y col., 2004).

Fase de ejecución

La célula que ha recibido una señal apoptótica, pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando la disminución en el tamaño celular. Los organelos citoplasmáticos permanecen intactos, sin embargo, en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno (Kroemer, 1997). En etapas posteriores, la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se fragmenta. Finalmente la célula apoptótica genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática íntegra, que contiene parte de la cromatina y de los organelos celulares. Estas vesículas se conocen como cuerpos apoptóticos (Cohen, 1993).

Fase de eliminación

Aunque la muerte celular ocurre de manera constante en un organismo, las células que están muriendo por apoptosis son rara vez vistas *in situ* debido a que son rápidamente removidas por las células fagocíticas (Cohen, 1992; Savill, 1993). Este hecho diferencia a la apoptosis de la necrosis, ya que en esta última, hay liberación del contenido citoplasmático, lo que desencadena un proceso inflamatorio y daña a las células vecinas (Kerr, 1972).

Los responsables de retirar la mayoría de las células apoptóticas son los fagocitos, pero existe evidencia de que las células dendríticas, epiteliales y fibroblastos también participan en la remoción de células apoptóticas (Gregory, 2000).

Regulación de la apoptosis

En ratas inmaduras la disminución en la secreción de gonadotropinas induce la fragmentación del (ADN) en los testículos. Ya que cuando se administra un antagonista de GnRH, incrementa la fragmentación de ADN entre los 16-28 días de edad, pero no en ratas adultas, el tipo de células que mueren por apoptosis durante

el desarrollo testicular depende de la gonadotropina que disminuye (Billig y col., 1995).

Se ha observado que alrededor del 25 al 75 % de las células germinales se mueren por apoptosis durante la espermatogénesis normal. Esta muerte es regulada por las gonadotropinas y los andrógenos intratesticulares. Este proceso es esencial en el túbulo seminífero para el mantenimiento del balance entre el número de células germinales y de Sertoli, para que se lleve a cabo normalmente la espermatogénesis. Además, es un mecanismo de remoción de células germinales dañadas (Print y Loveland, 2000; Tanaka y col., 2002). En el túbulo seminífero, los tipos celulares que presentan esta degeneración son las espermatogonias, espermatoцитos y las espermátidas (Henriksen y Parvinen, 1998).

La primera oleada de espermatogénesis en la rata ocurre aproximadamente a la sexta semana de vida posnatal y es fundamental para el desarrollo del testículo y la maduración sexual del animal (Clermont, 1957). En los testículos de ratas adultas, la apoptosis ocurre principalmente en la etapas XII-XIV y I de la espermatogénesis (Allan, 1992).

Los andrógenos, las gonadotropinas y los factores de crecimiento inhiben la apoptosis y son esenciales para que se lleve a cabo la multiplicación y diferenciación de las células germinales. Mientras que, las hormonas tiroideas y la progesterona inducen la muerte celular programada (Tanaka, 2002). Cuando a ratas macho se les realiza la hipofisectomía, o se administra un antagonista de la GnRH o un anticuerpos contra la LH, se observa la disminución en la secreción de testosterona y el aumento en la apoptosis de los espermatoцитos en paquiteno y espermátidas (Woolveridge y col., 1999).

Entre las proteínas inductoras de apoptosis, una de las primeras descritas fue Fas, que es una proteína de superficie de 48 kD de peso molecular. La unión de Fas con su ligando (FasL) induce apoptosis en diferentes tipos de células. También se ha

descrito un grupo de receptores que presentan homología con la molécula Fas y el receptor para el factor de necrosis tumoral (TNF).

Los reguladores clave en el proceso de apoptosis son las proteínas de la familia Bcl-2 y que incluyen a Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1, y A1, se localizan en la membrana de la mitocondria, en el retículo endoplasmático y en la membrana del núcleo. Esta familia de proteínas son inhibidores de la apoptosis debido a que promueven la supervivencia celular, mientras que otras proteínas, Bax, Bak, Bad y Bid, inducen la muerte celular, por lo que se consideran pro-apoptóticas (Print, 1998; Oldereid, 2001). Cuando se aumentan las concentraciones de proteína Bcl-2 se retrasa o bloquea la apoptosis en diferentes tipos celulares. La proteína Bax es homóloga con Bcl-2 y funciona como su principal inhibidor (Tanaka y col., 2002)

Familia de las proteínas Bcl-2

La Familia Bcl-2 está compuesta por más de una docena de proteínas, que ha sido clasificada en tres grupos funcionales. Los miembros del primer grupo, tales como Bcl-2 y Bcl-XL se caracterizan por contener los cuatro dominios (BH1-BH4) (Fig. 12). También poseen una cola hidrofóbica C-terminal, que se localizan en la superficie externa de la mitocondria y en ocasiones del retículo endoplásmico con la mayor parte de la proteína que se enfrenta al citosol. La característica clave de los miembros del grupo I es que todos ellos poseen la actividad anti-apoptóticos, y protegen las células de la muerte (Tabla 1). En contraste, el grupo II se compone de miembros de la familia Bcl-2 con la actividad pro- apoptótica. Entre estos se incluye Bax y Bak, que tienen una estructura general similar a las proteínas del grupo I. El Grupo III consiste de un conjunto grande y diverso de proteínas cuya única característica común es la presencia de los (12-16-aminoácidos) del dominio BH3 (Michael, 2000).



Fig. 12. Esquema que presenta los dominios que contiene cada uno de los miembros de la familia Bcl-2 (Hengartner, 2000).

Familia de proteínas Bcl-2	
Por- apoptóticas	Anti- apoptóticas
Bax, Bak, Bik, Bad, Bid	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-2w

Tabla 1. Familia de proteínas Bcl-2, reguladores del proceso de apoptosis.

Las proteínas de la familia Bcl-2 proporcionan una vía de señalización que parece ser esencial para la homeostasis de células germinales masculina. En los sistemas de cultivos *in vitro* se ha demostrado que las espermatogonias en etapa avanzada de diferenciación poseen mecanismos específicos de regulación que controlan su sobrevivencia o muerte (Sofiktis y col., 2008).

Hormonas y apoptosis

La muerte celular es un proceso que ocurre de forma espontánea en el testículo, pero también se presenta en respuesta a estímulos específicos como en la concentración de las gonadotropinas o testosterona. Cuando en la rata macho adulta se administra por 2 ó 5 días el antagonista de GnRH, Nal-GluGnRHA, se

observa degeneración, en los espermatoцитos etapa 7 del ciclo del epitelio seminífero y en las espermátides en la etapa 7 y 19, a los cinco días después de haber iniciado el tratamiento. Con base en estos resultados los autores proponen que el proceso de apoptosis en las células germinales esta regulado hormonalmente (Hikim y col., 1995).

Cuando se realiza la hipofisectomía en la rata macho se observa la disminución del peso de los testículos y se induce la fragmentación del ADN en los túbulos seminíferos y en el tejido intersticial, cuando a estos animales se les administra durante dos días un agonista de FSH, el FSH-CTP o la gonadotropina coriónica humana (hCG), se inhiben los efectos de la hipofisectomía. Estos resultados permiten mostrar que las gonadotropinas inhiben el proceso de apoptosis en el testículo (Tapanainen y col., 1993).

Los cambios de la concentración de las gonadotropinas y testosterona también se les ha asociado con la expresión de los genes bcl-2 y bax. Cuando se administra a ratas y ratones dos agonistas de la GnRH, cetrorelix y acyline por separado, disminuye FSH y testosterona y esto se acompaña de la disminución en la expresión del gen bcl-2, mientras que fas y bax se incrementa significativamente. Esto último se acompaña de la liberación del citocromo C, y del aumento en la actividad de las caspasas 8 y 3, (Pareek y col., 2007), enzimas que forman parte de la cascada de señalización que culmina con la activación de las DNAsas que favorecen la fragmentación del ADN y la muerte celular por apoptosis.

La proteína Bcl-2 se le ha relacionado con la supervivencia de las células durante el proceso de apoptosis, otro gen que involucrado es Bax. Cuando se sobre expresa Bax se acelera la muerte por apoptosis inducida por la ausencia de gonadotropinas, testosterona y citoquinas entre otros. También este mismo puede ser un inhibidor de la actividad de bcl-2. Esto llevo a los autores a sugerir que la relación de estos dos genes determina la muerte o supervivencia de las células (Zoltán y col., 1993).

Los andrógenos son hormonas esenciales durante el desarrollo de la espermatogénesis y es un regulador de la sobrevivencia de las células germinales. Se ha mostrado que cuando a machos sexualmente inmaduros se les administra testosterona por vía subcutáneamente disminuye el proceso de apoptosis y de la expresión del gen Bax, esto se acompaña de un bajo conteo de espermatozoides (Rodríguez, 1997). En la rata macho los estrógenos se consideran inductores de la muerte por apoptosis de las células germinales. Cuando se administra una dosis diaria de benzoato estradiol a ratas macho adultas por 5, 10 ó 15 días se induce la degeneración de células germinales por apoptosis, en particular las etapas IV-X son mas sensibles a estos cambios hormonales, debido a que el tratamiento con estradiol incrementa la muerte por apoptosis presentes en esta etapa. Estos resultados llevan a los autores a sugerir que las hormonas esteroides son importante en el control de la espermatogénesis y sobrevivencia de las células (Rodríguez, 1996).

Cuando se mantienen *in vitro* espermatoцитos en paquiteno y se cocultivan con células de Sertoli y al medio se le adiciona FSH o testosterona se inhibe la muerte por apoptosis de las células germinales. Además el número de espermátides redondas en el medio se incrementa en presencia de ambas hormonas. Por lo que se sugiere que la FSH y testosterona son esenciales para que finalice la meiosis de las células germinales, reduciendo el proceso de apoptosis (Vigier y col., 2004).

En la regulación del proceso de apoptosis además de participar las gonadotropinas y los esteroides sexuales, también participan otros mensajeros químicos, como la serotonina. En relación a esto se ha observado que la serotonina participa en la regulación de la apoptosis en pulmón, riñón, las células endoteliales, neuronas, entre otros (Whitaker y col., 2001). La serotonina para ejercer sus funciones se une a su receptor, para esta amina se ha identificado siete familias de receptores. De estos dos receptores, el 5-HT1A y 5-HT2A, los cuales participan en una variedad de funciones celulares. Cuando la serotonina se une a su receptor 5-HT1A se

genera un efecto protector, debido a que cuando en neuronas que se mantienen en cultivo se les administra el agonista de los receptores 8-OH-DPAT, disminuye la apoptosis, también se sugiere que el receptor 5-HT_{2A} tiene un papel de supervivencia, debido a que al aplicar un antagonista la ketarensina, preserva a las células e impide que mueran por apoptosis, mientras que cuando se estimula este receptor induce apoptosis (Azmitia, 2001).

Serotonina 5 – HT

La serotonina es una monoamina cuya estructura es un anillo indólico y una cadena lateral etilamino. Se identificó en 1948 y sintetizó en 1951 (Whitaker y Azmitia, 1999). Se le encuentra en los mastocitos, las plaquetas, en las células enterocromafines del intestino, en el testículo, epidídimo y en el sistema nervioso central (Amenta y col., 1992; Amireault y Dubé, 2005; Tinajero y col., 1993).

En el sistema nervioso es producida en el núcleo del rafé, hipotálamo y la glándula pineal. El núcleo del rafé se localiza en el cerebro medio y está constituido por nueve paquetes de neuronas que se identifican con la letra B seguida de un número. Este núcleo se divide en dorsal (NDR), medial (NMR) y del puente (NPR) Fig. 13.

Las neuronas que conforman el NDR y NMR proyectan sus axones a diferentes regiones del encéfalo, e incluyen la corteza, la amígdala, el hipocampo y los diferentes núcleos hipotalámicos. A partir del núcleo paraventricular (NPR) se origina la inervación serotoninérgica del cerebelo y de la médula espinal (Brailowsky, 1995).

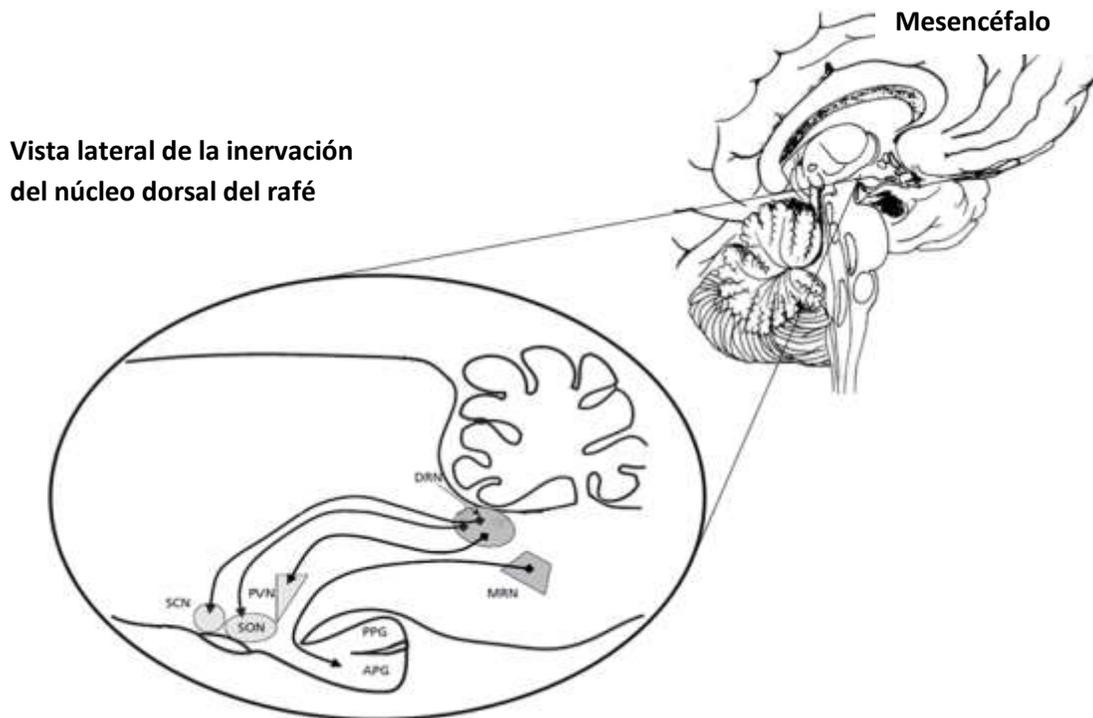


Fig. 13. Corte sagital de un cerebro de rata, se muestra la localización del rafe medio y dorsal (MRN; DRN) y la innervación que se proyecta a los núcleos del hipotálamo: paraventricular (PVN), supraquiasmático (SCN), supraóptico (SON) y la glándula pituitaria anterior (APG) (Jørgensen, 2007).

La 5-HT es sintetizada en las células enterocromafines y las neuronas a partir del triptófano, aminoácido esencial ingerido en la dieta, que es transformado en 5-HTP mediante la enzima triptófano hidroxilasa. Una vez formado el 5-HTP se transforma rápidamente en 5-HT mediante la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa, que también participa en la biosíntesis de las catecolaminas (Brailowsky, 1995). (Fig. 14).

La 5-HT se degrada a 5-HIAA mediante la acción de la monoaminoxidasa. Las concentraciones de 5-HIAA en el cerebro y el líquido cefalorraquídeo (LCR) son reflejo de la liberación y recambio de la 5-HT (Brailowsky, 1995).

La 5-HT se libera a la hendidura sináptica y se une a receptores postsinápticos. Se han determinado varios receptores de la serotonina los que se dividen en siete tipos (5-HT₁ a 5-HT₇) y 14 subtipos, esta clasificación se basa en sus características estructurales y propiedades farmacológicas (Brailowsky, 1995).

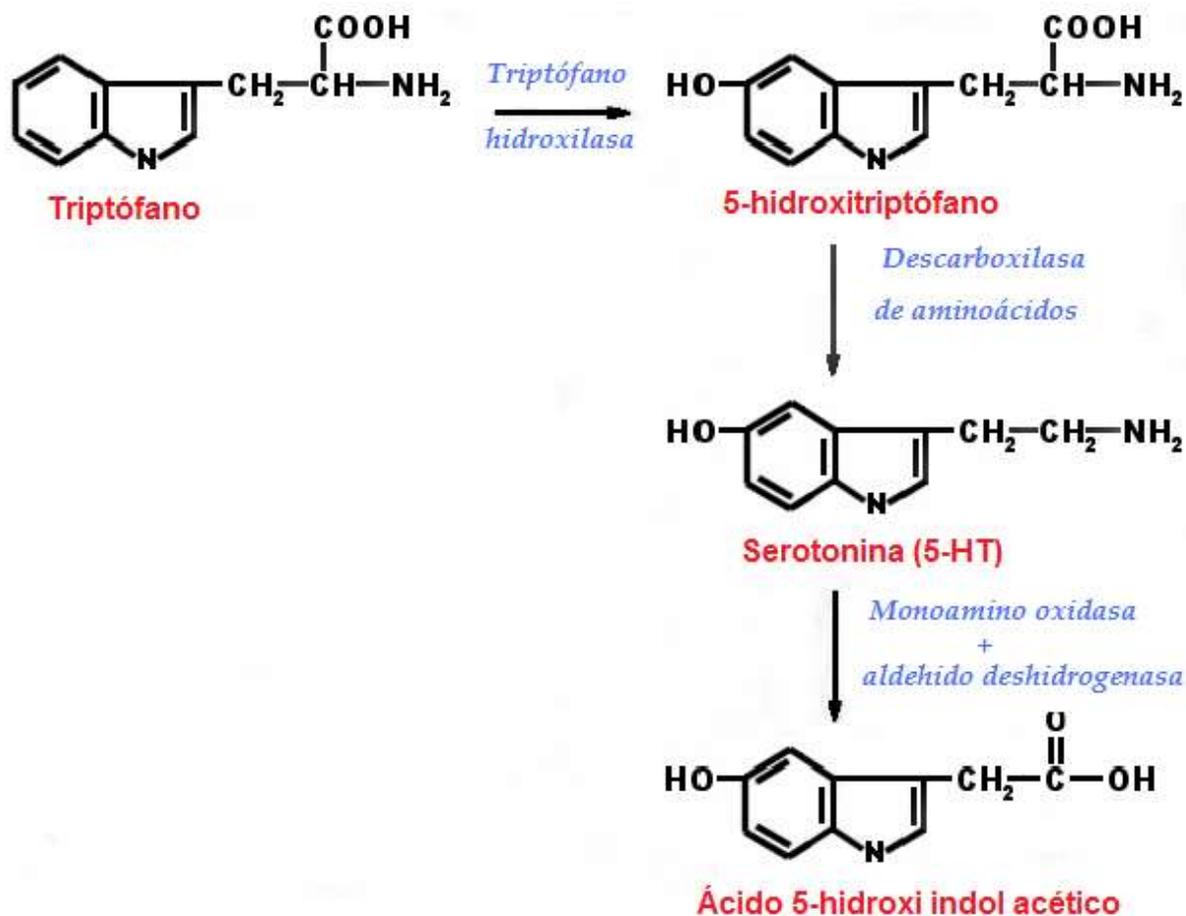


Fig. 14. Síntesis de la Serotonina. El triptófano es hidroxilado por medio de la triptófano-hidroxilasa, generando el L-5-hidroxitriptofano (5-HTP), el cual, tras su descarboxilación se convierte en 5-HT. Esta es almacenada en vesículas las cuales protegen al metabolito de su degradación por monoamino oxidasa (MAO). (Modificado de Frazer y Hensel, 1999; Jørgensen, 2007).

Serotonina, secreción de gonadotropinas y funciones del testículo

La participación de la serotonina en la regulación de la secreción de las gonadotropinas ha sido descrita como estimulante o inhibitoria (Kordon y col., 1994). En relación a esto se ha mostrado que la administración del 5-HTP, precursor de la síntesis de la 5-HT, a ratas macho de 16 ó 30 días de edad, incrementa la concentración de FSH en el suero y no modifica la de LH. Cuando la administración del precursor se realiza en ratas machos castrados a las 48 horas de vida, se observa el incremento en la concentración de LH y no se modifica la FSH (Justo y col., 1989; Moguilevsky y col., 1987). Estos resultados llevaron a los autores a concluir que el papel estimulante de la serotonina o la no participación en la modulación de la secreción de FSH o LH depende del medio ambiente hormonal del animal.

En diversos estudios donde se analiza la participación de la serotonina en la regulación de la secreción de las gonadotropinas se consideran factores como el medio ambiente hormonal y la edad del animal. Cuando a ratas macho intactos de 8 días de edad se les administra el 5-hidroxitriptofano, se estimula la secreción de FSH, cuando se administra este precursor a los 16 días de edad se estimula la secreción de ambas gonadotropinas, mientras que previo a la administración del precursor los animales son castrados, la concentración de FSH y LH disminuye (Pinilla y col., 1994).

En general se acepta que la inervación serotoninérgica del hipotálamo juega un papel en la modulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas tanto en la hembra como en el macho (Moguilevsky y Wuttke, 2001). Los núcleos NDR y NMR son la principal fuente de serotonina del hipotálamo (Frazer y Hensler, 1999). Sin embargo, hasta el momento los resultados que se han generado sobre la interrelación funcional que existe entre este sistema de neurotransmisión y la secreción de la GnRH son contradictorios. Algunos autores consideran que la

serotonina estimula la producción de gonadotropinas (Maekawa y col., 1999), mientras que otros le atribuyen un papel inhibitorio (Kordon y col., 1994).

Das y colaboradores, (1985) trabajaron con machos adultos a los que se realizó la inyección intraventricular de 5,6 DHT, neurotóxico selectivo de las neuronas serotoninérgicas y sacrificados en diferentes periodos 2, 10 ó 21 días después de la inyección y observaron que a los dos días de edad no se modifican los tipos celulares en el túbulo seminífero, mientras que a los 10 días de edad disminuye la concentración de serotonina en el cerebro, de testosterona en el suero y se incrementa el porcentaje de espermátides en degeneración y no hay cambios significativos a los 21 días. Estos resultados muestran que la serotonina del hipotálamo es esencial para el mantenimiento de las funciones del testículo, secreción de testosterona y la espermatogénesis.

5,6 Dihydroxytryptamine (5,6-DHT)

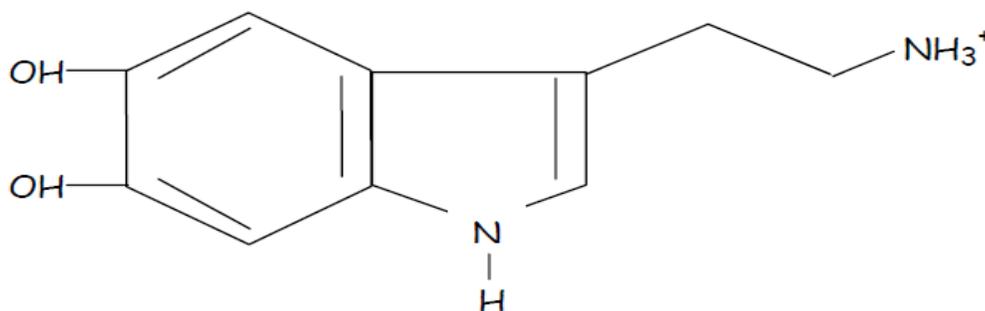


Fig.15. Estructura de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) (Sing y Dryhurst, 1990).

La 5,6-DHT es una herramienta farmacológica utilizada en la lesión química selectiva de las neuronas serotoninérgicas (Baumgarten, 1971) (Fig. 15). El mecanismo molecular por el cual 5, 6- DHT expresa su efecto neurodegenerativo es todavía cuestionado. Sin embargo, el transporte específico de estos agentes en las neuronas serotoninérgicas por las correspondientes bombas de membrana neuronal es un requisito previo a sus efectos neurodegenerativos. Los eventos químicos que ocurren intraneuronalmente para producir la destrucción de las terminaciones nerviosas son iniciados por la autooxidación intraneuronal de las neurotoxinas (Jonsson, 1980). La reacción de oxidación de la 5, 6 DHT es iniciada por la acción directa de oxígeno molecular que tiene como resultado la formación de una quinona y de peróxido de hidrógeno. Existen dos teorías acerca de esta explicación; la primera es que la reacción de autooxidación convierte la indolamina en una electrofílica quinona, que ataca a las proteínas neuronales, lo que pone en peligro el funcionamiento normal de las proteínas, conduciendo a la muerte celular. La segunda teoría propone citotóxicos especies de oxígeno como H_2O_2 y HO, subproductos de la autooxidación del 5,6-DHT y ataca lípidos y proteínas neuronales u otras estructuras susceptibles (Baugmarten, 1972 y Creveling, 1990).

En la rata macho la administración de la 5, 6-DHT en el ventrículo lateral izquierdo induce la destrucción de las terminales nerviosas de las neuronas serotoninérgicas en la médula espinal a los 8, 12 y 14 días después del tratamiento, además a los 14 días disminuye la recaptura de 5-HT. Cuando a los animales 48 horas después del daño en las neuronas serotoninérgicas se les administra la 5-methoxy-N,Ndimethyltryptamine (5-MeO-DMT) por vía sistémica se observa la regeneración de las neuronas serotoninérgicas y de la capacidad de recaptura de $[^3H]$ 5-HT a los 2 ó 3 meses después del tratamiento (Lars-goran y col., 1974).

Justificación

El mantenimiento de la estructura del testículo, epitelio seminífero y la secreción de testosterona depende de la acción de diferentes hormonas entre las que se encuentra la GnRH, LH y la testosterona. En el epitelio seminífero bajo condiciones fisiológicas normales, algunas de las células se mueren por apoptosis, pero se mantiene un balance entre la degeneración y proliferación. Sin embargo, cuando se pierde este balance y se incrementa la muerte de las células germinales se afecta la producción de los espermatozoides. Este proceso de apoptosis es inhibido por la LH y la testosterona.

Se ha observado que en la regulación de la secreción de la GnRH por el hipotálamo y como consecuencia de la LH por la hipófisis, es regulada por diferentes sistemas de neurotransmisión como la serotonina. Sin embargo, se desconoce si la innervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR, es esencial en la modulación de la secreción de la LH y testosterona y en el mantenimiento de la sobrevivencia de las células germinales en el testículo.

Por ello, en el presente estudio se utilizó a las ratas macho prepúber (30 días de edad) y se analizó los efectos de la inyección de la 5,6-dihidroxitriptamina en el NDR, los efectos de la inyección de la 5,6 dihidroxitriptamina (neurotóxico de las células germinales, en la concentración de serotonina en el hipotálamo, en la concentración de LH y testosterona en suero y en el proceso de apoptosis en el testículo a los 45 y 65 días de edad.

Hipótesis

La inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe estimula la secreción de la GnRH, de la LH y como consecuencia de la testosterona, hormona que mantiene la sobrevivencia de las células germinales y estimula la espermatogénesis. Por ello, la lesión del núcleo dorsal del rafe se traducirá en la disminución en la secreción de LH y de testosterona, lo que se reflejará en el aumento en el proceso de la de apoptosis en el testículo de la rata prepúber.

Objetivo general

Evaluar los efectos de la lesión química del núcleo dorsal del rafé inducida por la administración de la 5, 6-dihidroxitriptamina en la secreción de LH y testosterona y en el proceso de apoptosis en el testículo de la rata prepúber.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la administración de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal del rafé en la concentración de serotonina y 5-HIAA en el hipotálamo anterior, medio y posterior de la rata macho prepúber.
- Analizar el efecto de la administración de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal del rafé en la concentración de LH en el suero de la rata macho prepúber.
- Evaluar el efecto de la administración de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal del rafé en la concentración de testosterona en el suero de la rata macho prepúber.
- Analizar el efecto de la administración de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal del rafé en el proceso de apoptosis en el testículo del animal prepúber.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas macho de 30 días de edad de la cepa CII-ZV (Bioterio FES Zaragoza) las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de iluminación, con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, con libre acceso a la madre hasta el destete (21 días) y al agua y el alimento hasta el momento del sacrificio.

Los animales se dividieron al azar en tres grupos: sin tratamiento (TA) que fueron utilizados como testigos absolutos, con vehículo (VH), aquellos a los que se les realizó una microinyección de 2.5 µL de ácido ascórbico en el NDR; a otro grupo de animales se les realizó la microinyección de 10 µg de 5,6-DHT en 2.5 µL de ácido ascórbico.

Lesión Química

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron entre las 10:30 y 12:30 horas. Las ratas de 30 días de edad se anestesiaron con pentobarbital sódico (anestesal, Smith Kline Norden de México) en una dosis de 40 mg/kg por vía intraperitoneal. Se colocó la rata en un aparato estereotáxico para fijar completamente la cabeza del animal. Se realizó una incisión en la piel y en el cráneo se eliminó el tejido con peróxido de hidrógeno, se perforó el cráneo con una fresa odontológica y se introdujo la aguja de microinyección hasta el NDR (Fig. 15). La aguja se conectó a una jeringa Hamilton, la cual a su vez se conectó a una bomba de microdiálisis. Antes de introducir la aguja de microinyección, ésta se inclinó con un ángulo de 30°. Posteriormente se procedió a inyectar 10 µg de 5,6-DHT (Sigma) en un volumen de 2.5 µL de ácido ascórbico al 0.05 % (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) a una velocidad de 1 µL/ minuto. Las coordenadas para introducir la aguja de microinyección se calcularon tomando como referencia las propuestas en el Atlas de Paxinos y Watson (1982). En otro grupo de animales se inyectó exclusivamente el ácido ascórbico en el NDR siguiendo la metodología antes descrita. Como grupo de comparación se utilizó animales sin ningún tratamiento TA.

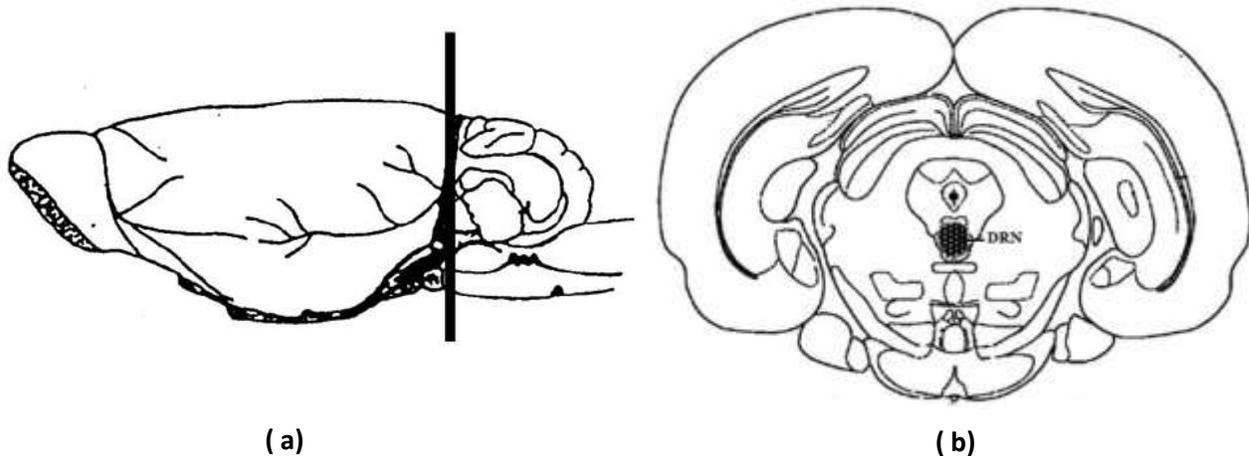


Fig. 15. Esquema de la vista lateral del cerebro de rata (a), y un corte coronal (b), en el que se muestra en zona sombreada el núcleo dorsal del rafé (DRN) (Harsing, 2006).

Procedimiento de Autopsia

Animales de los diferentes grupos se sacrificaron por decapitación a los 45 ó 65 días edad, entre las 12:00 y 13:00 horas. Se colectó la sangre del tronco, la cual se dejó reposar durante 15 minutos y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, posteriormente se colectó el suero y se almacenó a una temperatura de -20°C para la cuantificación de LH y testosterona por el método de radioinmunoanálisis.

Al momento del sacrificio se realizó la disección de los testículos los cuales se fijaron en paraformaldehído al 4% con un $\text{pH} = 7.4$, para su posterior inclusión en parafina.

En el momento de la autopsia también se extrajo el cerebro y se congeló en nitrógeno líquido para realizar la disección del hipotálamo anterior, medio y posterior y se almacenó a una temperatura de -70°C para la posterior cuantificación de 5-HT y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por cromatografía de líquidos. El resto del cerebro se fijó en formol al 10% para la identificación de la zona de lesión (Ver apéndice 1 y 2).

Cuantificación de Gonadotropinas

La evaluación de la concentración de LH en el suero de los diferentes grupos experimentales, se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo y se utilizó el anticuerpo, NIAMDD-Rat-A-LH-RP-3 proporcionado por la National Hormona and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). La concentración de la hormona se expresó en ng/ml.

Cuantificación de hormonas Esteroides

La cuantificación de Testosterona se realizó mediante RIA de fase sólida, para lo cual se empleó un kit Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, USA). La concentración de la testosterona se expresó en picogramos por mililitro (pg/ml).

Evaluación de la Apoptosis por la Técnica de Túnel

Los testículos que fueron fijados en paraformaldehído, se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones (70 °C, 96°C, 100 °C) y a continuación se pasaron a cloroformo puro, posteriormente se incluyeron en parafina, en el micrótopo se realizaron cortes seriados de 5 µm, se colectaron tres cortes después de una serie de diez y se procesaron por la técnica de Túnel, en el cual se utilizó un estuche comercial (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN, USA). Con esta técnica se marca en color café las células en apoptosis. En 100 túbulos por testículo se realizó el análisis del epitelio seminífero y se identificó en que tipo de célula germinal presentaba la coloración café, indicador de la célula en apoptosis.

Cuantificación de 5-HT y su metabolito (5-HIAA)

La concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo anterior, medio y posterior se realizó por la técnica de cromatografía de líquidos (HPLC). Se utilizaron neurotransmisores de concentración conocida (5-HT y 5-HIAA), para la preparación de curvas de calibración de los estándares y posteriormente realizar la cuantificación. Las muestras de hipotálamo se pesaron y homogeneizaron en 300 µl de ácido perclórico ((HClO₄) al 0.1 N, se sonificó y se centrifugó a 12, 500 rpm a -4°C durante 30 minutos, se retiró el sobrenadante de la muestra de hipotálamo y se

filtró, se inyectó 100 µl del filtrado al sistema de cromatografía de líquidos, para su cuantificación, esto procedimiento se realizó para los tres grupos de animales (Ayala y colaboradores, 1997).

La concentración de 5-HT y 5-HIAA se expresó en ng/mg y la actividad de la neurona serotoninérgica se calculó con la fórmula (propuesta por el grupo de Shannon y col., 1986):

$$\text{Actividad serotoninérgica} = \frac{[5\text{-HIAA}]}{[5\text{-HT}]}$$

Análisis del sitio de lesión

Para la identificación del sitio de lesión, la región del cerebro medio y posterior se fijo en formol al 10% durante una semana y posteriormente en el vibratomo se realizaron cortes coronales de la región frontal a la caudal de 100 µm de grosor, los cuales se observaron con ayuda de un microscopio estereoscópico para verificar el sitio de lesión.

Análisis Estadístico de los Resultados

Las concentraciones en el hipotálamo de 5-HT y del 5-HIAA, la de testosterona y LH en suero, así como el número de células apoptóticas en el testículo se analizaron por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey, donde se compararon los diferentes grupos, la prueba de “t” de Student (concentración de LH y testosterona) cuando se realizó la comparación entre dos grupos y para la evaluación de porcentaje de número total de células apoptóticas y expresión de genes bax y bcl-2, se utilizó la prueba de Ji-Cuadrada y Fishers. Únicamente se consideraron significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor del 0.05.

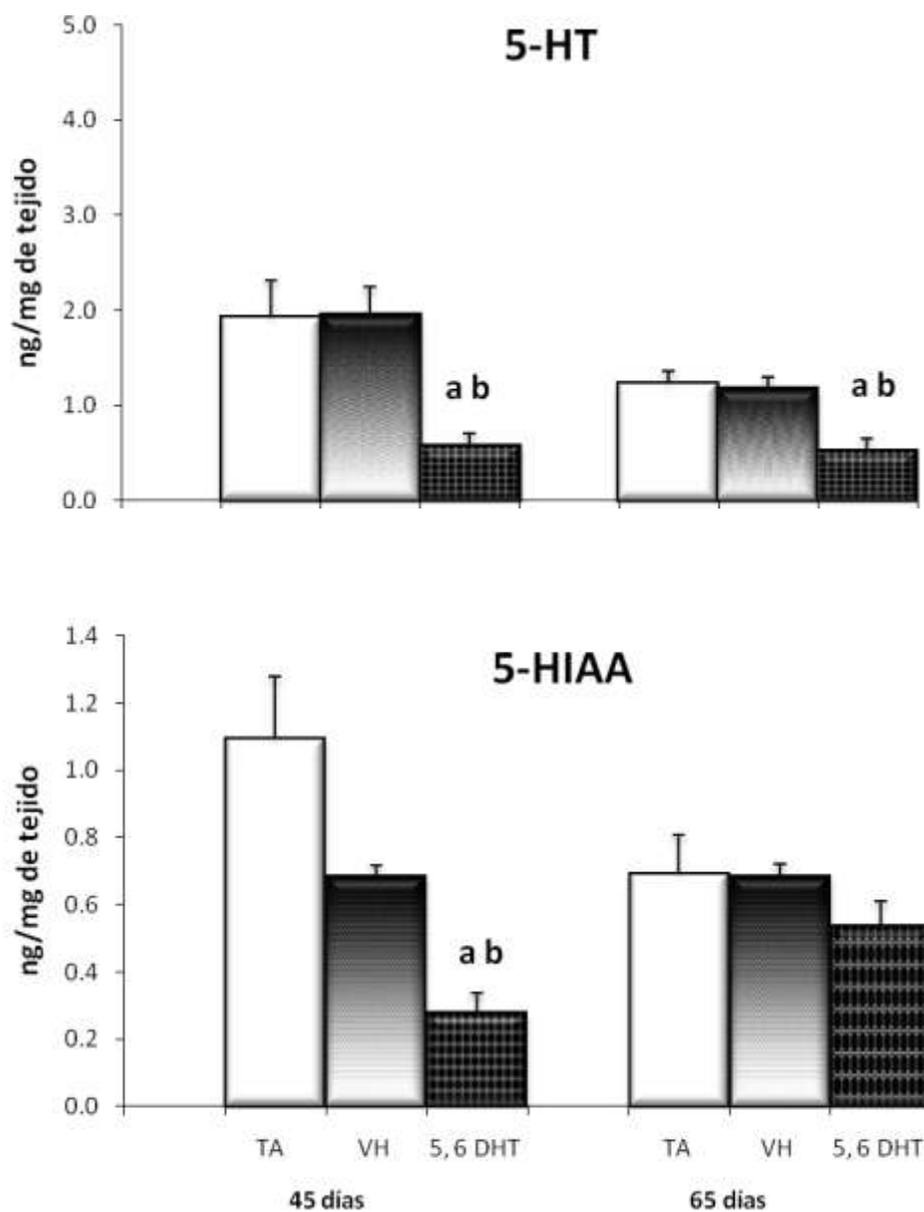
RESULTADOS

Concentración de 5-HT y 5-HIAA

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en los inyectados con VH en el NDR y sacrificados a los 45 ó 65 días no se presentaron cambios significativos en la concentración de 5-HT o 5-HIAA y ni en relación 5-HIAA/5-HT en el HA. Mientras que, en los animales que se les administró la 5,6-DHT, disminuyó la concentración de 5-HT a los 45 ó 65 días de edad en comparación con el grupo TA o que recibió VH. La concentración de 5-HIAA disminuyó en los animales tratados con 5, 6-DHT en relación con los TA o los que recibieron VH. La relación 5-HIAA/5-HT se incrementó a los 65 días de edad y no se modificó en los animales de 45 días (Figuras 14 y 15).

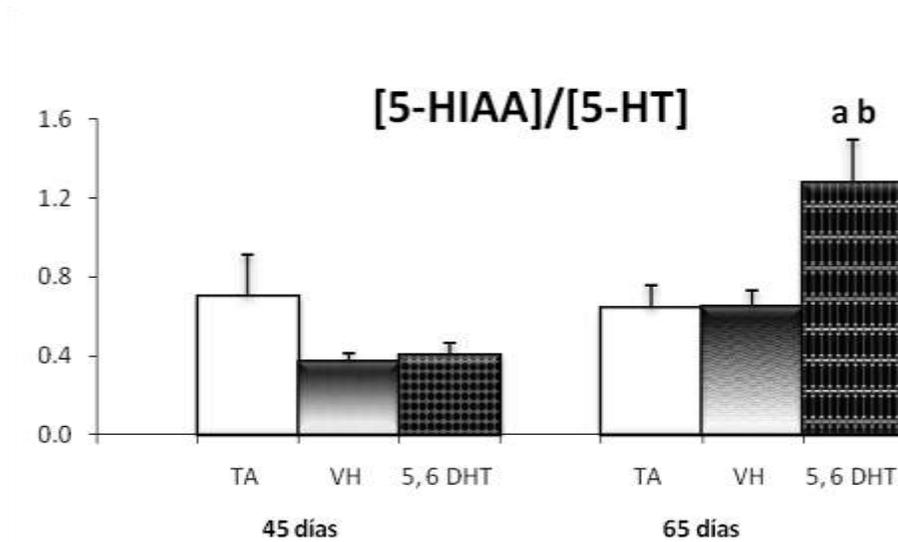
En el HM de los animales que se les realizó la microinyección de ácido ascórbico en el NDR y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad, no se modificó la concentración de 5-HT, 5-HIAA y la relación 5-HIAA/5-HT en comparación con el grupo TA (Figura 16). Mientras que en los que se les administró la 5, 6-DHT, disminuyó en la concentración de 5-HT y 5-HIAA, sin cambios en la relación 5-HIAA/5-HT, con excepción de los animales sacrificados a los 65 días de edad donde incrementó significativo en comparación con los grupos TA (Figura 17).

En comparación con los animales TA, en el HP de los animales a los que se les realizó la microinyección del ácido ascórbico en el NDR, no se modificó la concentración de 5-HT ni de 5-HIAA, mientras que en los que se les administró la 5,6-DHT, disminuyó en la concentración de 5-HT a los 45 y 65 días de edad (Figura 18) y la relación 5-HIAA/5-HT no se modificó en ninguna de las edades estudiadas (Figura 19).



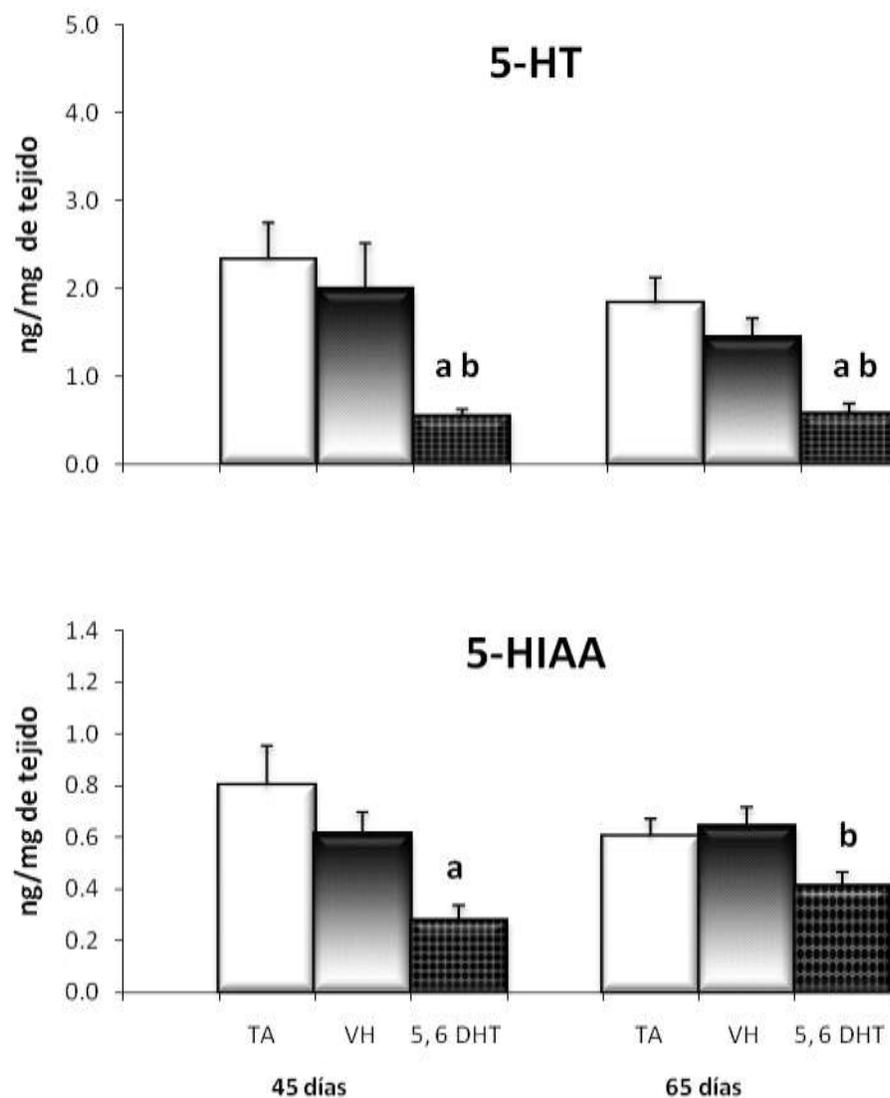
a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de Tukey)
b, $p < 0.05$ vs Vh (ANDEVA seguida de Tukey)

Fig. 14. Concentración de serotonina (5-HT) y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo anterior de animales sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o microinyección de la 5, 6 dihidroxitriptamina (5, 6 DHT) en el día 30 y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.



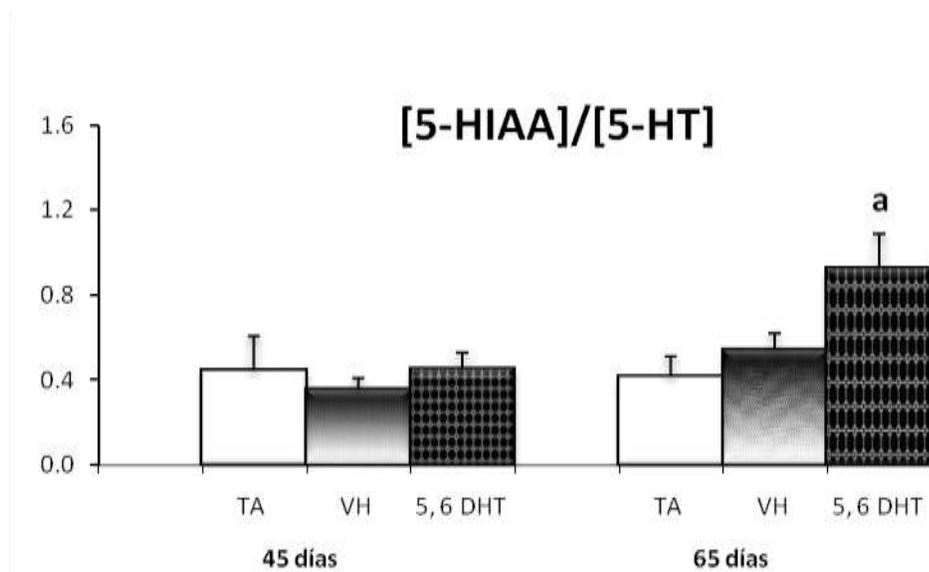
a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de Tukey)
b, $p < 0.05$ vs Vh (ANDEVA seguida de Tukey)

Fig. 15. Relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo anterior de animales sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) ó microinyección de 5, 6 dihidroxitriptamina (5, 6-DHT) en el día 30 y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.



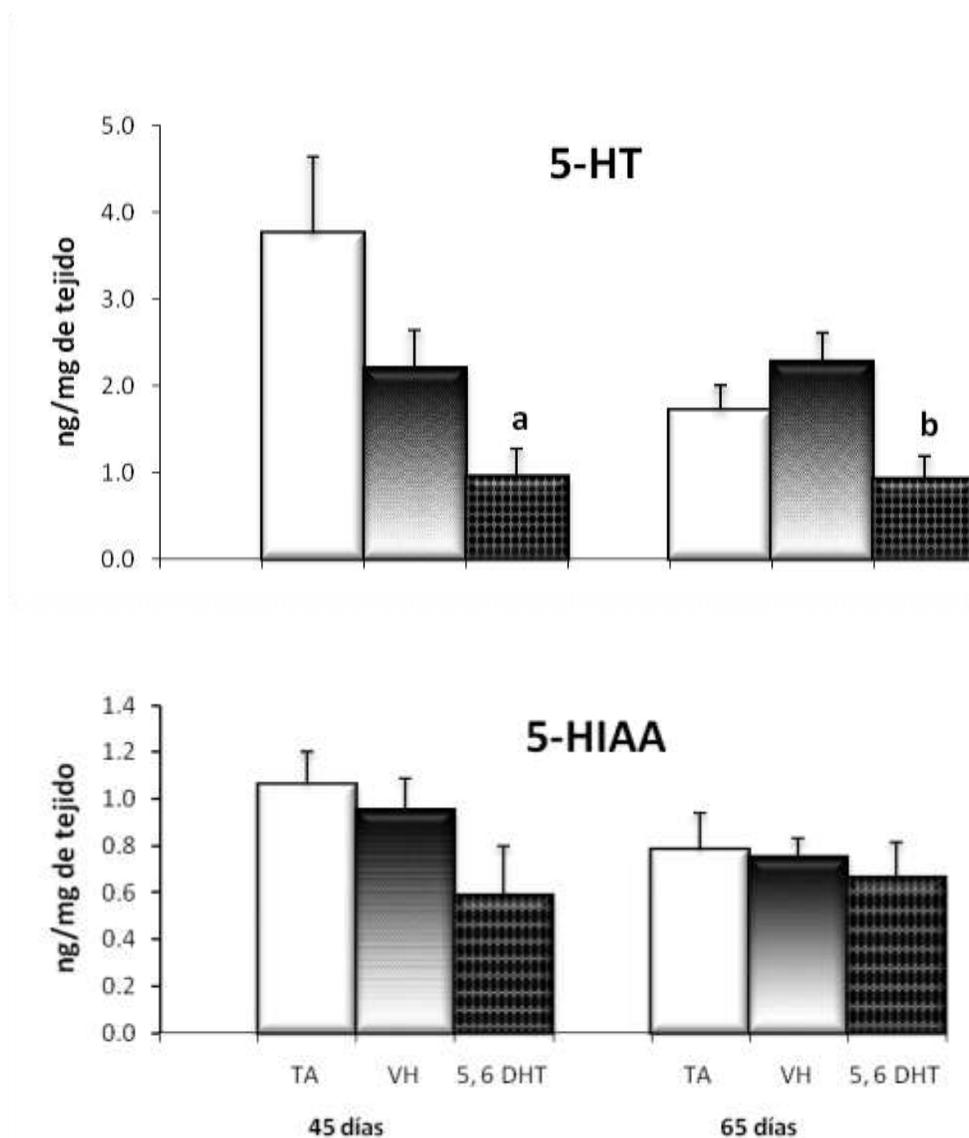
a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de Tukey)
b, $p < 0.05$ vs Vh (ANDEVA seguida de Tukey)

Fig. 16. Concentración de serotonina (5-HT) y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo medio de animales sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o microinyección de la 5, 6 dihidroxitriptamina (5, 6 DHT) en el día 30 y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.



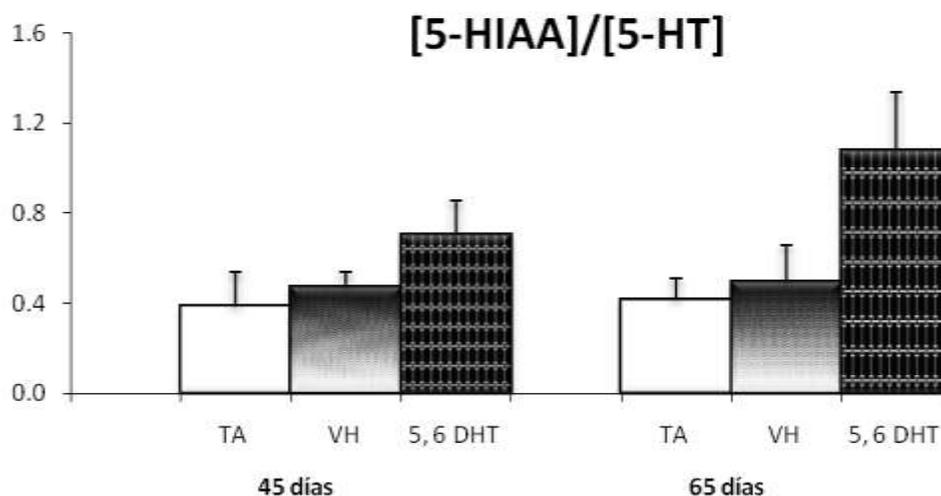
a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de Tukey)
b, $p < 0.05$ vs Vh (ANDEVA seguida de Tukey)

Fig. 17. Concentración de la actividad serotoninérgica en el hipotálamo medio en animales sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) y microinyección de 5, 6 dihidroxitriptamina (5, 6 DHT) en animales de 45 días o 65 días de edad.



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

Fig. 18. Concentración de serotonina (5-HT) y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo posterior de animales sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o microinyección de la 5, 6 dihidroxitriptamina (5, 6 DHT) en el día 30 y sacrificados a los 45 días o 65 días de edad.



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

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

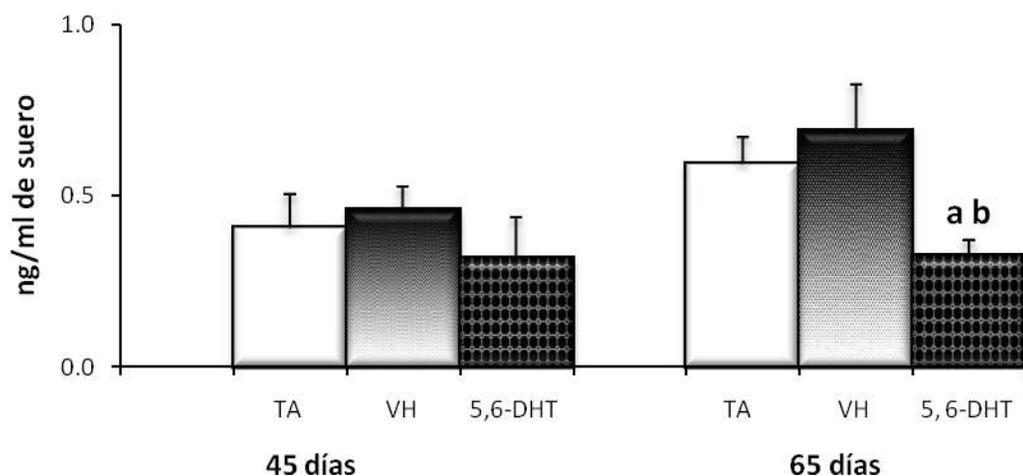
Fig. 19. Concentración de la actividad serotoninérgica en el hipotálamo posterior en animales sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) y microinyección de 5, 6 dihidroxitriptamina (5, 6 DHT) en el día 30 y sacrificados a los 45 días o 65 días de edad.

Concentración de LH

En el suero de los animales que recibieron ácido ascórbico en el NDR no se modificó la concentra de LH en relación con el grupo TA. Cuando se realizó la microinyección de la 5,6 DHT, la concentración de esta gonadotropina disminuyó, pero esta disminución fue estadísticamente significativa a los 65 días, en comparación con el grupo TA o VH (Fig. 20).

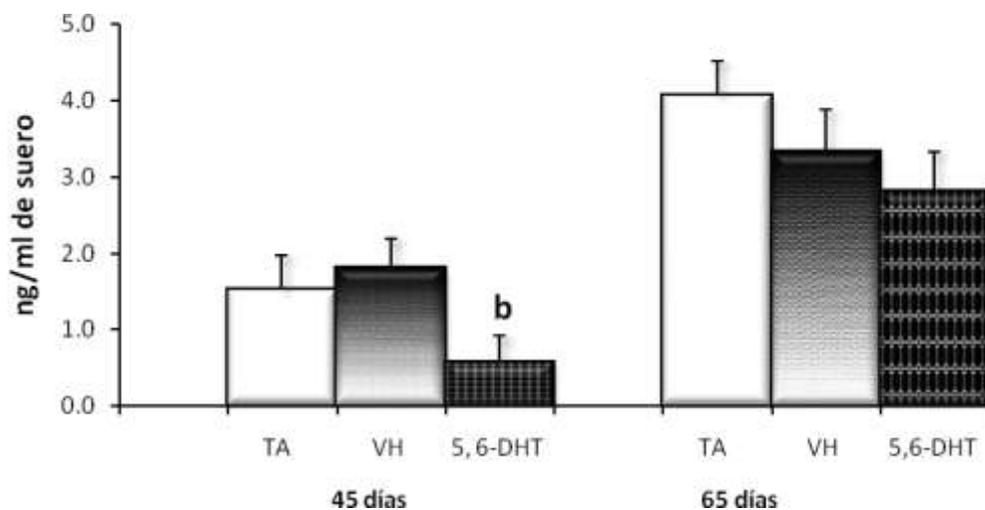
Concentración de Testosterona

La concentración de testosterona en el suero de los animales con microinyección de 5,6 DHT en el NDR disminuyó, pero esta disminución es estadísticamente significativa a los 45 días de edad, en comparación con los TA (Fig. 21).



a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de t-Student)
 b, $p < 0.05$ vs Vh (ANDEVA seguida de t-Student)

Fig. 20. Concentración de LH en animales testigo absoluto (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptamina en el NDR en el día 30 y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.



b, $p < 0.05$ vs Vh (ANDEVA seguida de t-Student)

Fig. 21. Concentración de testosterona en animales testigo absoluto (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptófano en el NDR, en el día 30 y sacrificados a los 45 o 65 días de edad.

Evaluación de apoptosis por la técnica de TUNEL

Total de túbulos con células en apoptosis

La técnica de Túnel permite la tención en café de las células en apoptosis. En los animales con microinyección de la 5, 6-DHT en el NDR y sacrificados a los 45 ò 65 días de edad, la marca de color café que representan células apoptóticas fue mayor, en comparación con aquellos animales con microinyección de ácido ascórbico o testigo absoluto (Figuras 22 y 23).

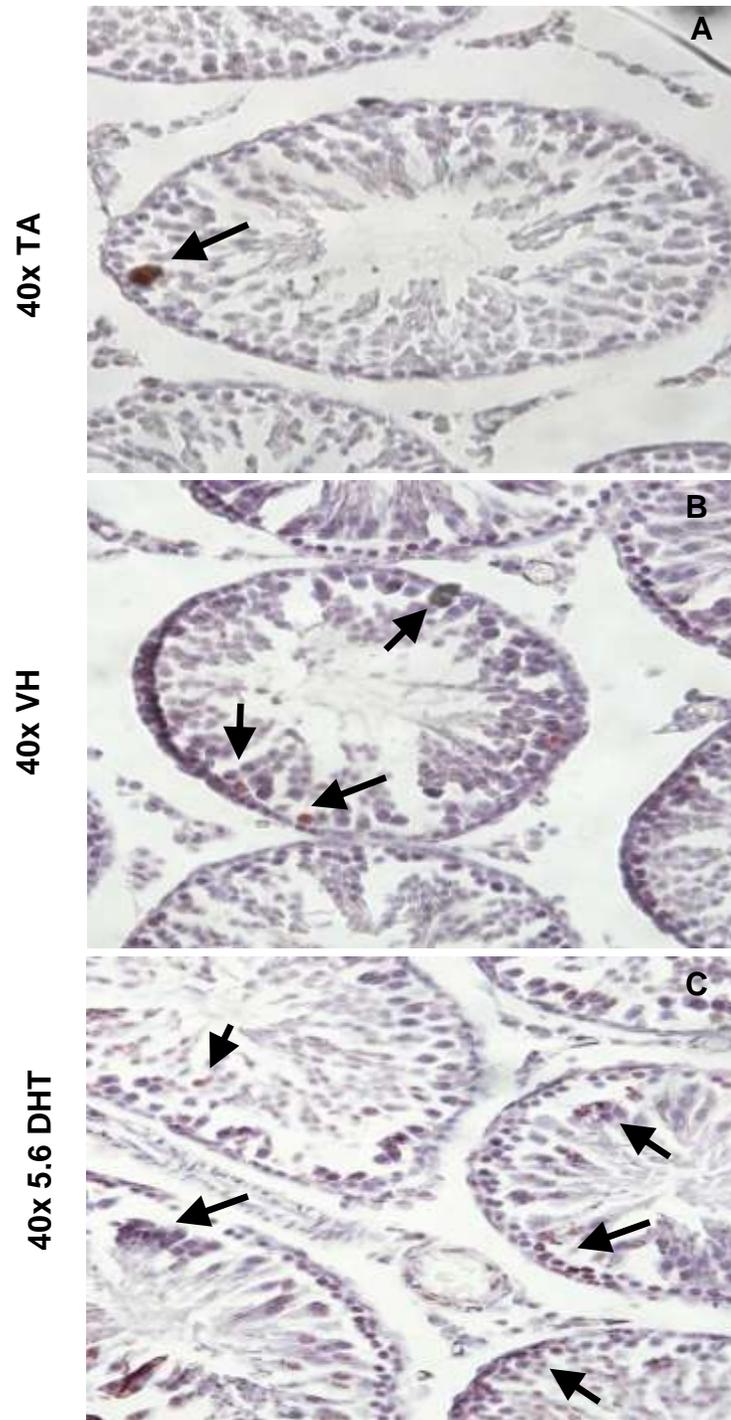


Figura 22. Fotografía de cortes histológicos de testículos teñidos por la técnica de TUNEL de ratas testigos absolutos (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptamina (5,6 DHT) en el núcleo dorsal del raquí (NDR) en el día 30 y sacrificados a los 45 días de edad, donde se observa el arreglo de los túbulos seminíferos. Las células teñidas en café representan muerte por apoptosis (A, B y C).

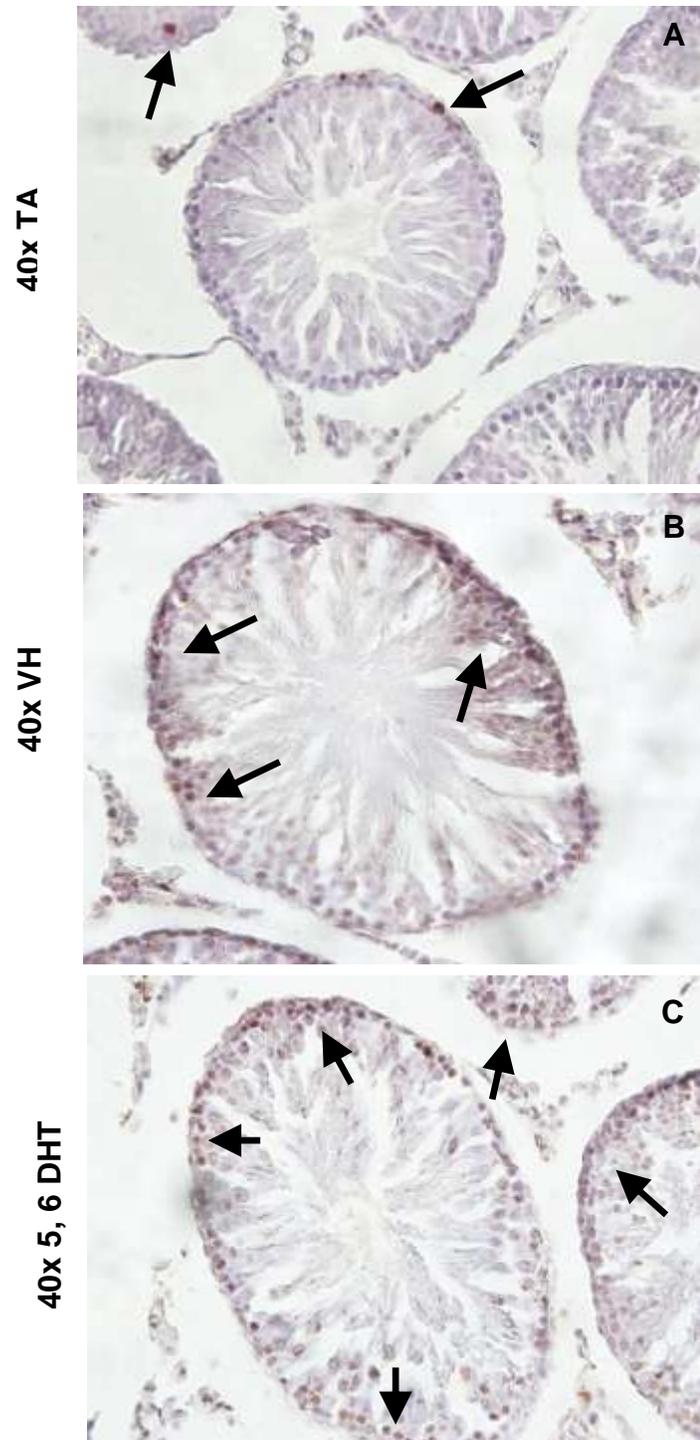
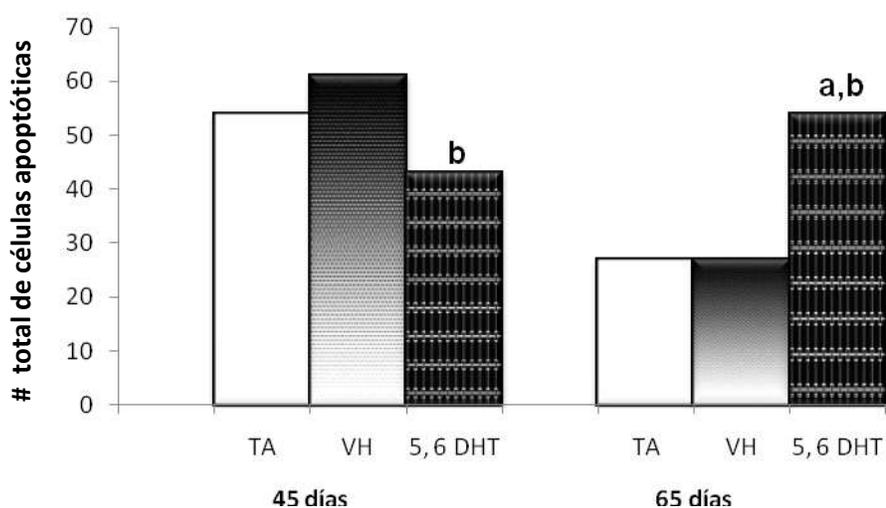


Figura 23. Fotografía de cortes histológicos de testículos teñidos por la técnica de TUNEL de ratas testigos absolutos (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptamina (5,6 DHT) en el núcleo dorsal del raquí en el día 30 y sacrificados a los 65 días de edad, donde se observa el arreglo de los túbulos seminíferos. Las células teñidas en café representan muerte por apoptosis (A, B y C).

Total de túbulos con células en apoptosis

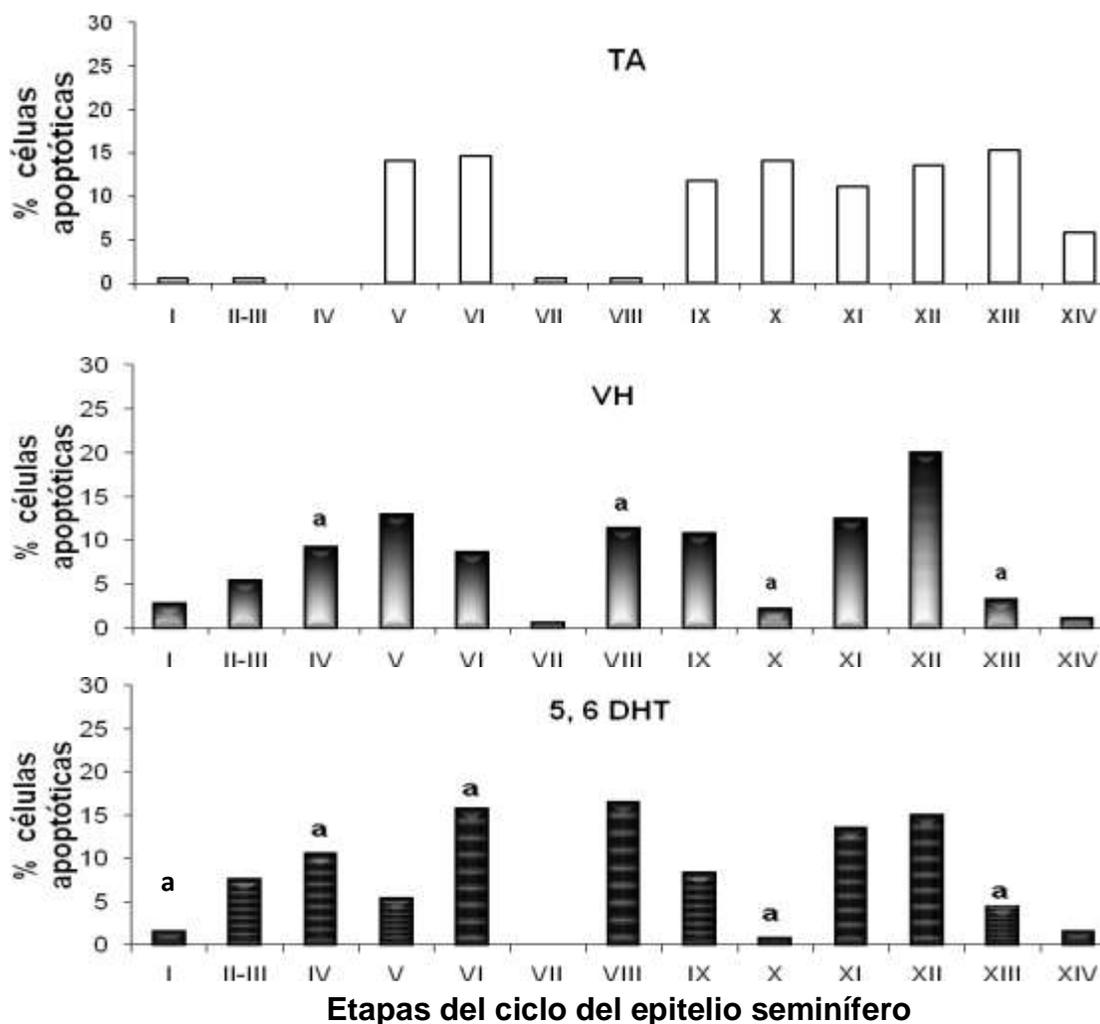
En comparación con el grupo de TA, en los animales que se les realizó la microinyección de vehículo en el NDR y se sacrificaron a los 45 ó 65 días de edad, no se presentaron cambios en el número total de túbulos con células en apoptosis. Cuando se realizó la microinyección de la 5, 6-DHT, disminuyó el número de túbulos con células en apoptosis a los 45 días de edad en comparación con el grupo con VH y un comportamiento inverso a los 65 días (Figura 24).



a, $p < 0.05$ vs TA, b, $p < 0.05$ vs Vh (Prueba de Fisher's)

Fig. 24. Total de túbulos con células apoptóticas en las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero de ratas testigos absolutos (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptamina (5,6 DHT) y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.

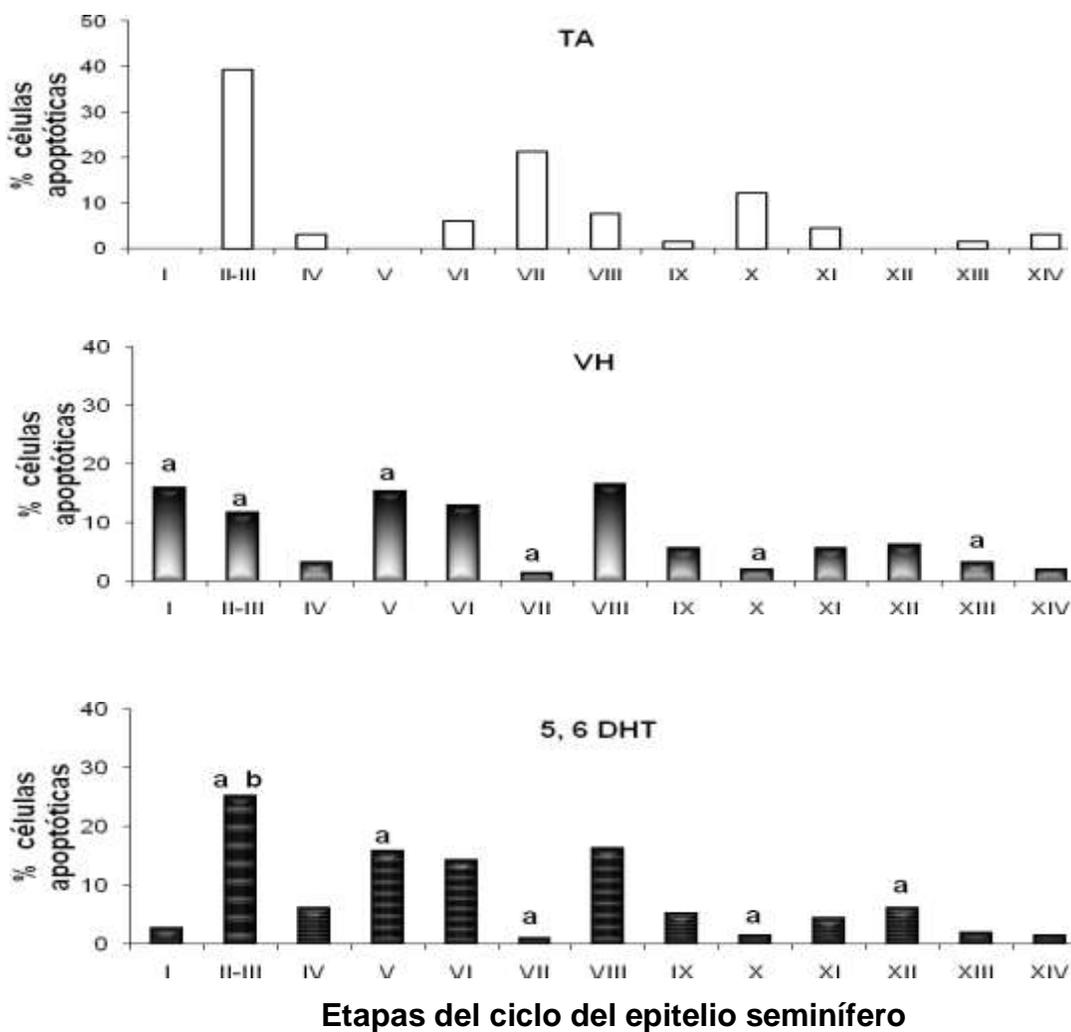
En los animales con microinyección de ácido ascórbico en el NDR y sacrificados a los 45 días, aumentó el número de células en apoptosis en los túbulos en el estadio IV y VIII y disminuyó en la etapa X y XIII en comparación con el grupo TA. En los animales a los que se les realizó la microinyección de la 5,6-DHT se observó un comportamiento similar y también aumento la apoptosis en los túbulos en la etapa VI (Figura 25).



a, $p < 0.05$ vs TA, (Prueba de ji cuadrada)

Fig. 25. Porcentaje de células apoptóticas en los túbulos en las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero de ratas testigos absolutos (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptamina (5,6 DHT) en el día 30 y sacrificados a los 45 días de edad.

En comparación con el grupo TA, en los animales que se inyectó ácido ascórbico y sacrificados a los 65 días de edad, el porcentaje de células en apoptosis aumentó en los estadios I, V y XII y disminuyó en las etapas II-III, VII y X. En los animales con microinyección de 5, 6-DHT aumentó en el estadio I y disminuyó en el II-III (Figura 26).



a, $p < 0.05$ vs TA, b, $p < 0.05$ vs Vh (Prueba de ji cuadrada)

Fig. 26. Porcentaje de células apoptóticas en las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero de ratas testigos absoluto (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptamina (5,6 DHT) en el NDR, en el día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

En comparación con el grupo TA, en los animales con microinyección de ácido ascórbico y sacrificados a los 45 días de edad no se modificó el porcentaje de células en apoptosis en el compartimiento basal y adluminal del túbulo seminífero, mientras que a los 65 días de edad se observó la disminución en el compartimiento adluminal (Figura 27). En los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR y sacrificados a los 45 días, aumentó el porcentaje de células en apoptosis en el compartimiento basal y disminuyó en el adluminal (Figura 25).

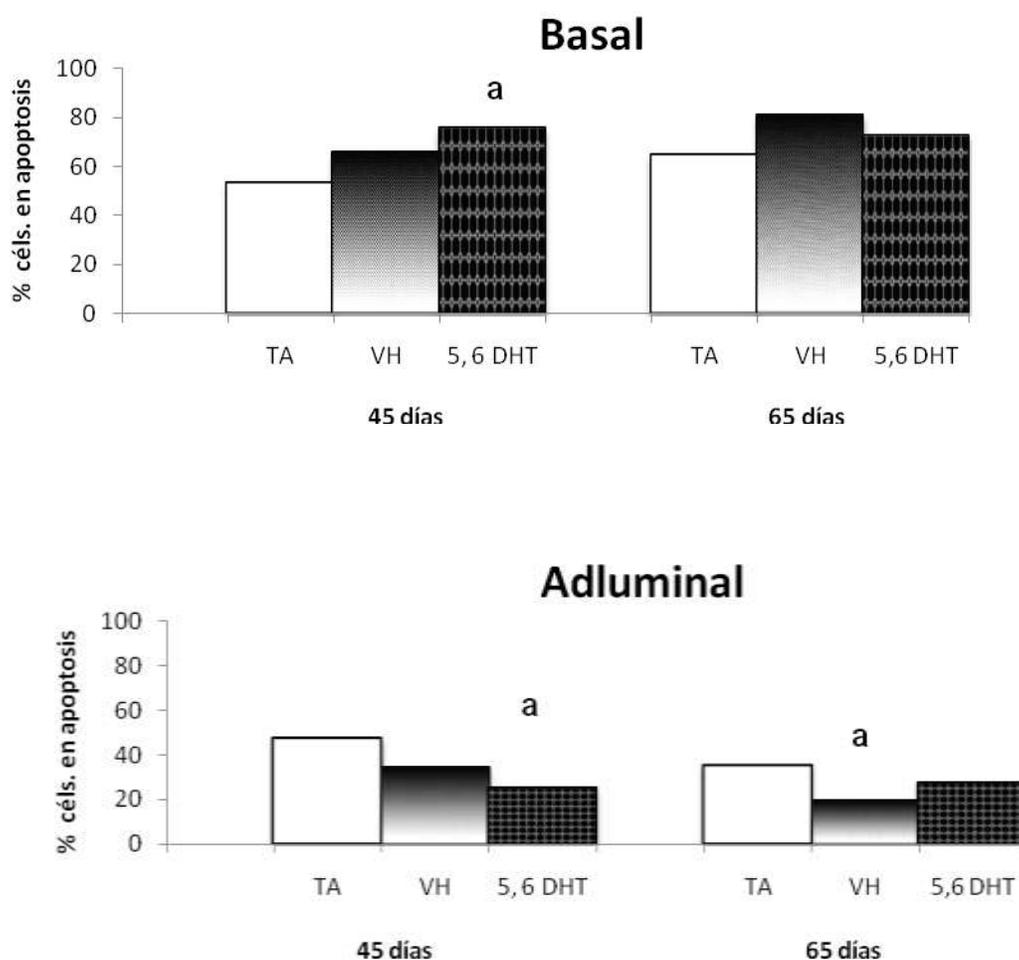


Fig. 27. Porcentajes de células en apoptosis en el compartimiento basal y adluminal de los túbulos seminíferos de testículos de ratas testigos absolutos (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptamina (5,6 DHT) en el NDR, en el día 30 y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.

En la figura 28 se muestran los resultados de la expresión de bcl-2 y bax. En comparación con el grupo de animales TA, en los animales con microinyección de la 5, 6-DHT en el NDR y sacrificados a los 45 días de edad, disminuyó la expresión de bcl-2 y aumento en el gen bax, pero no llegó a ser estadísticamente significativo (Figura 29).

Debido a que los cambios en la expresión de los genes bcl2 y bax, inducidos por cualquier manipulación que modifique el medio hormonal del animal se reflejan en periodos de tiempos cortos (Vilagrasa y col., 1998), no se realizó la evaluación de bcl2 y bax en los animales de los diferentes grupos experimentales y sacrificados a los 65 días de edad.

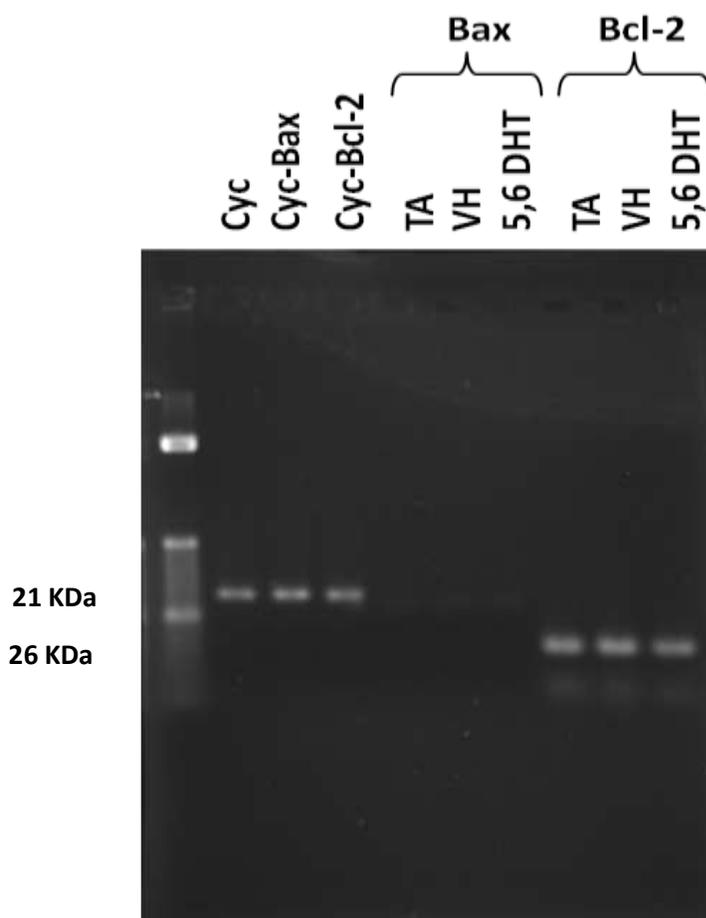
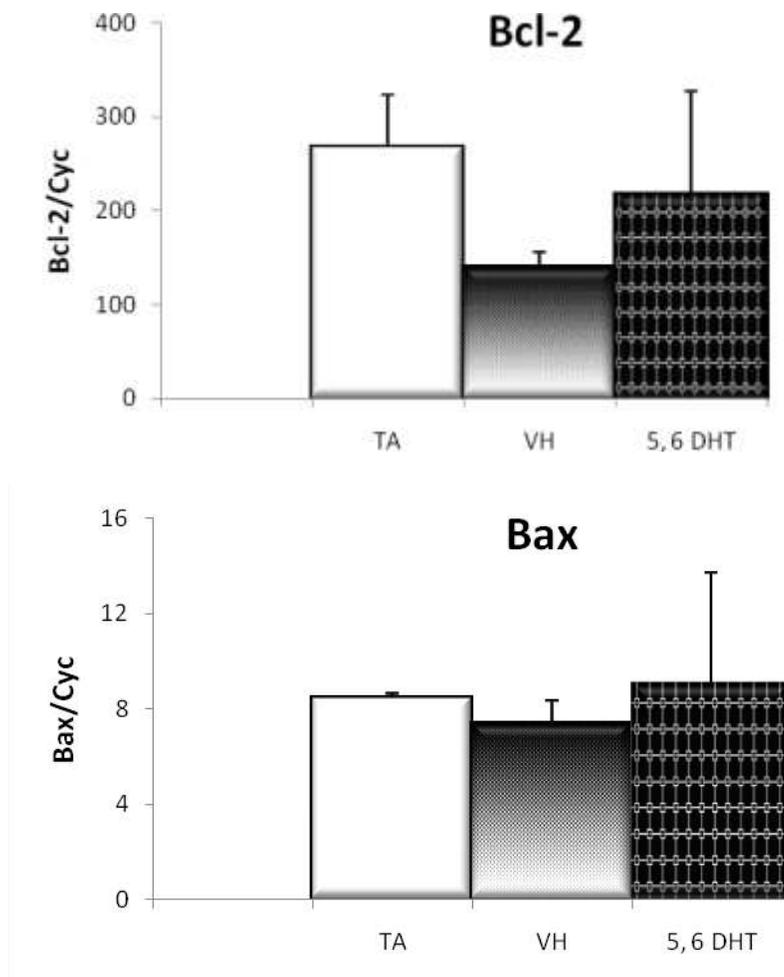


Figura 28. Placa de gel donde se muestra la expresión de genes bax y bcl-2 en ratas testigos absolutos (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptamina (5,6 DHT) en el NDR, en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 días.



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

Fig. 29. Expresión del ARNm de los genes Bcl-2 y Bax (media \pm eem) en testículos de ratas testigos absolutos (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5, 6 dihidroxitriptamina (5,6 DHT) en el NDR, en el día 30 y sacrificados a los 45 días de edad.

Discusión

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se muestra que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR estimula la secreción de la testosterona y como consecuencia la sobrevivencia de las células que constituyen el epitelio seminífero. La disminución en la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio de los animales prepúberes de 45 y 65 días de edad con microinyección de la 5,6 DHT en el NDR, así como de la concentración de testosterona en el suero y del incremento en la muerte celular por apoptosis sustentan esta idea.

La 5, 6-DHT es una herramienta farmacológica que se ha utilizado para inducir el daño selectivo de las neuronas serotoninérgicas (Baumgarten, 1971; Baumgarten, 1972), en nuestro estudio observamos que en los animales con microinyección de este fármaco en el NDR se observó la disminución en la concentración de la serotonina en el hipotálamo anterior, medio y posterior, lo cual coincide con lo reportado en la bibliografía, debido a que se ha mostrado que después de la administración de la 5,6-DHT, se produce la incorporación del fármaco a la terminal serotoninérgica y su autooxidación, lo que induce la formación de especies reactivas de oxígeno, como H_2O_2 , O_2 y HO , estos a su vez provocan la oxidación de lípidos y proteínas y como consecuencia se induce la destrucción de las terminales de las neuronas, lo que se refleja en la menor capacidad de síntesis de este tipo de neuronas (Jonsson, 1980 y Sinhababu, 1985).

La idea de que la 5,6-DHT disminuye la síntesis de 5-HT fue mostrada por Das (1985), cuando realizó la inyección intraventricular de la 5, 6- DHT a ratas machos adultas se y observa una disminución en la concentración de serotonina a los 2, 10 y 21 días de edad. En otro estudio se muestra que después de inyectar la 5,6-DHT en el ventrículo lateral izquierdo, se presenta la degeneración de las terminales nerviosas serotoninérgicas en médula espinal a los 8, 12 y 14 días después del tratamiento (Lars-goran, 1974). Estos resultados conjuntamente con los obtenidos

en el presente estudio muestran el efecto selectivo del fármaco sobre las neuronas serotoninérgicas.

En nuestro estudio no se eliminó por completo la 5-HT en el hipotálamo de los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR, esto puede deberse a que como se ha mostrado, además de este núcleo, el rafe medial y del puente también inervan algunas regiones del encéfalo, entre ellas diferentes núcleos hipotalámicos. (Jacobs, 1974). Esta idea se apoya en el estudio que muestra que después de realizar la lesión electroquímica del NDR ó NMR a ratas macho adultas, la concentración de la 5-HT disminuye en la corteza cerebral, el hipotálamo y el cuerpo estriado cinco días después de la lesión (Jacobs, 1974).

La disminución en la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio de los animales con lesión del NDR, también se acompañó de una menor concentración del metabolito (5-HIAA). Esto posiblemente se deba a que al disminuir la concentración de 5-HT, su recaptura por las terminales nerviosas también, así como su transformación al principal metabolito, 5-HIAA, por acción de la enzima monoaminoxidasa (MAO).

Lo observado en la concentración de 5-HT y 5-HIAA, mostró un comportamiento inverso en la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$, ya que se incrementó en las tres regiones del hipotálamo en los animales de 65 días de edad. Este hecho se debe a que en los animales con microinyección de 5,6-DHT disminuyó la síntesis y metabolismo de la 5-HT, pero no existe un paralelismo entre estos dos procesos debido a que el primer proceso se afectó de forma más marcada. Además es posible que como se eliminó una fuente de 5-HT. Además es posible que como se eliminó, las neuronas serotoninérgicas que conforman al NDR, las que quedan y constituyen el NMR e inervan diferentes núcleos hipotalámicos, aumentan su actividad, tratando de mantener el equilibrio en el sistema serotoninérgico.

La disminución de la concentración de LH en el suero de los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR y sacrificados a los 65 días de edad no se presentó a los 45 días. Esto posiblemente está relacionado con la participación diferencial que tiene la 5-HT en la regulación de la secreción de las gonadotropinas a lo largo del desarrollo del animal. Estudios realizados por otros autores han mostrado que el sistema serotoninérgico ejerce un efecto estimulante, inhibitorio o no participa en la regulación de la secreción de estas hormonas dependiendo de la edad del animal o del medio ambiente hormonal prevaleciente (Vitale y col., 1986; Arias y col., 1990; Justo y col., 1989). Además también se ha mostrado que la administración de p-cloroanfetamina (PCA), una neurotoxina selectiva de las neuronas serotoninérgicas en ratas hembras adultas, induce el incremento en la secreción de LH, pero no en machos. Estos resultados indican que existen diferencias sexuales en la participación de la 5-HT en la regulación de la secreción de la LH en ratas prepúberes y adultas (Moguilevsky, 1985; Kordon, 1994; Maekawa, 1999).

En la rata macho se considera que la 5-HT no participa en la regulación de la secreción de LH, mientras que si la de FSH (Moguilevsky y col., 1987). Con base en esto, los resultados observados en este estudio, la disminución en la concentración de LH que se presentó en los animales con lesión del NDR y sacrificados a los 65 días de edad, no coincide con lo reportado en bibliografía. Estas discrepancias posiblemente estén relacionadas al modelo de estudio utilizado. Es importante señalar que cuando este precursor se administra por esta vía, llega a las diferentes regiones del encéfalo y estimula la síntesis de la amina en todas las regiones que posean la maquinaria enzimática para transformar al precursor en 5-HT. Sin embargo, en nuestro estudio, el neurotóxico se administró de forma localizada en el NDR y no se dañan las neuronas serotoninérgicas que se encuentran en el núcleo medial o del puente, así como las que se encuentran en el propio hipotálamo. Por lo tanto la inervación serotoninérgica del hipotálamo remanente posiblemente regula de forma diferencial la secreción de la LH en la rata macho.

La posibilidad de que la innervación del hipotálamo que se origina en los núcleos NDR y NMR participan de forma diferencial en la regulación de la secreción de gonadotropinas se apoya en las evidencias que muestran que cuando en la rata macho adulta se realiza la microinyección en el NDR de la 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT), neurotóxico de las neuronas serotoninérgicas, la concentración de 5-HT disminuye en las diferentes regiones del hipotálamo, así como en el área preóptica, el núcleo arcuato y ventromedial, esto se acompaña de la disminución en la secreción de LH, por el contrario cuando se lesiona el NMR, también disminuye la concentración de 5-HT en las regiones antes mencionadas, pero no se modifica LH, con base en estos resultados los autores concluyen que el NMR no participa en la secreción de LH, en contraste el NDR ejerce un efecto inhibitorio en la modulación de la secreción de LH (Van de Kar, 1980).

La disminución de la concentración de testosterona que se observó en los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR y sacrificados a los 45 o 65 días de edad, se relaciona con la menor concentración de LH. Estos resultados coinciden con lo reportado por el grupo de Das, (1985), quienes mostraron que después de realizar la microinyección intraventricular de 5,6-DHT en ratas macho adultas, las concentraciones de 5-HT en el cerebro y testosterona en el suero disminuyen, 2, 10 y 21 días después de la inyección. Con base en nuestros resultados y los de otros autores se sugiere que la 5-HT participa de forma estimulante en la modulación de la secreción de la testosterona.

En apoyo a la idea antes mencionada se ha mostrado que la síntesis de testosterona por las células de Leydig, se encuentran bajo la regulación directa de factores hormonales, como la LH (Andrew y col., 2007). Existen evidencias que muestran que cuando disminuye la secreción de LH se afecta la producción de testosterona por el testículo. Madhwa y Martin (1976) mostraron que cuando a ratas macho, a partir de los 20 días de edad se les administra diariamente un antisuero contra LH y se sacrifican 14 días después, se altera la morfología de las células de

Leydig, disminuye el peso del testículo y la concentración de testosterona en el suero. Otro estudio que apoya la interrelación que existe entre la LH y el mantenimiento de la estructura y funcionalidad de la célula de Leydig es el realizado por Chemes y col., (1979), quienes mostraron que cuando a ratas inmaduras se les administra diariamente un antisero contra LH, disminuye el tamaño de las células de Leydig y estas se atrofian lo que se acompaña de la disminución de la concentración de testosterona en el suero. Con base en estos resultados los autores proponen que la LH es un factor importante en el mantenimiento y funcionamiento de las células de Leydig, lo que se refleja en la producción de testosterona.

La LH se une a sus receptores de membrana de las células de Leydig, lo que activa los complejos enzimáticos que participan en la síntesis de testosterona (Greenwald y Roy, 1994). Por ello, si disminuye esta gonadotropina, se refleja en una menor concentración de testosterona. Esto coincide con los resultados del presente estudio, ya que después de realizar la microinyección de la 5, 6-DHT en el NDR, la concentración de LH disminuyó, así como la concentración de testosterona en los animales de 65 días de edad,

Otra posible explicación a la disminución en la concentración de testosterona observada en los animales con lesión del NDR, es que disminuyera el número de receptores a la LH en las células de Leydig, ya que ha mostrado que esta hormona induce la expresión de sus propios receptores en las células de Leydig por un mecanismo de regulación homólogo o de autorregulación Huhtaniemi, (1981).

El hecho de que la disminución en la concentración de testosterona en el suero de los animales de 65 días de edad con lesión del NDR no se acompañara de la disminución en la concentración de LH, posiblemente es el resultado de que en estos animales se modificó una vía de comunicación neural que regule el funcionamiento del testículo. En relación a esto existen evidencias anatómicas en las que se ha mostrado que entre el testículo y diferentes regiones del cerebro, entre ellas los núcleos hipotalámicos, existe una comunicación neural (Gerendai y

col., 2000). En otro estudio también se mostró que cuando en ratas macho adultas se lesiona el núcleo paraventricular, la concentración de testosterona disminuye y no se modifica LH, como lo observado en nuestro estudio (Selvage y col., 2003; Lee y col., 1997).

El hecho de que en los animales con microinyección de la 5,6-DHT en el NDR se incrementara el número de túbulos con células en apoptosis nos indica que aumentó la muerte de las células germinales que conforman el epitelio seminífero. La apoptosis es un proceso común que se da en el ciclo del epitelio seminífero durante la espermatogénesis y es un proceso altamente regulable por hormonas. Entre estas se encuentran la testosterona y las gonadotropinas (FSH y LH) entre otras (Chun y col., 1994). Cuando disminuye la concentración de testosterona, resulta en el aumento de la apoptosis en las células germinales en diferentes etapas del desarrollo (Henriksen y col., 1995).

El aumento en el número de células en apoptosis observado en el testículo de los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR en los animales de 65 días de edad, se asocia a la disminución en la concentración de testosterona, ya que este esteroide es un factor de supervivencia de las células germinales, tanto en el animal prepúber como en el adulto. En apoyo a esta idea se ha observado que cuando en ratas adultas se realiza la hipofisectomía, la concentración de testosterona disminuye y aumenta la muerte de células germinales, mientras que cuando se les administra testosterona se mantiene la sobrevivencia y diferenciación de las células germinales en los túbulos seminíferos (Bartlett y col., 1989).

La disminución en el total de túbulos con apoptosis en los animales de 45 días de edad con microinyección de la 5,6 DHT en el NDR, no se relaciona con la baja en la concentración de testosterona, esto puede deberse a que además de este andrógeno, la FSH es necesaria para el inicio de la pubertad ya que actúa sobre células de Sertoli y estimula la producción de los diferentes factores de crecimiento esenciales para la multiplicación de las células germinales y su transformación a

espermatozoides, pero una vez que este proceso ha sido establecido puede mantenerse por la acción de la testosterona (Sharpe, 1994; Tresguerres, 2003)

Con juntamente con base en nuestros resultados y los reportados en la bibliografía es posible sugerir que la disminución en la concentración de testosterona se traduce en la muerte celular por apoptosis en la mayoría de las etapas del ciclo del epitelio seminífero Henriksen y colaboradores (1995).

El proceso de apoptosis esta caracterizado por diferentes eventos morfológicos. Inicialmente se produce la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) en secciones de 180 a 120 pares de bases, que al observarse en geles de agarosa, se aprecian bandas en escalera (Kroemer y col., 1995). Se ha mostrado que cuando en ratas inmaduras, disminuye la secreción de gonadotropinas, se estimula la fragmentación del ADN en los testículos. Cuando a ratas machos se les administra un antagonista de GnRH, azaline, entre los 8-70 días de edad, se observa la disminución en la concentración de la FSH y LH, y aumenta la fragmentación del ADN a partir de los 16-28 días de edad. En las ratas de 16-24 días de edad, incrementa la fragmentación del ADN en los espermatoцитos de los túbulos. Entre los 24-32 días de edad el daño se presenta en las espermátides. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que la FSH y LH son indispensables en el desarrollo y diferenciación de las células germinales y que el daño que se presenta en los diferentes tipos celulares del ciclo del epitelio seminífero depende de la edad del animal (Billig y col, 1995).

Cuando se administra el antisuero contra la LH en la rata macho adulta, se presenta la atrofia de las células de Leydig, disminuye la concentración de testosterona y en el túbulo seminífero se observa la inhibición de la espermatogénesis (Chemes y col., 1979). En nuestro estudio observamos que en los animales con microinyección de 5, 6-DHT en el NDR, la disminución en la concentración de testosterona se acompañó del aumento en la muerte por apoptosis en los túbulos seminíferos en los estadios IV, VI y VII a los 45 días de edad, en donde se observan espermatogonias, espermatoцитos, espermátides y espermátides redondas o

espermatozoides, mientras que en los animales de 65 días de edad se presentó en las etapas V y XII, en la última etapa se presentan espermatocitos y espermátides alargadas. El incremento en el número de células en apoptosis en algunas etapas del ciclo del epitelio seminífero, se puede deber a la disminución en la secreción de la testosterona, ya que se ha mostrado que este andrógeno participa en las diferentes etapas del ciclo del epitelio como son prevención de la degeneración de células en etapas VII y VIII y además estimula la elongación de espermátides (Billig, 1995). Además nuestros resultados coinciden con lo reportado en bibliografía, ya que se ha mostrado que los tipos celulares que presentan degeneración en el túbulo seminífero son principalmente las espermatogonias, espermatocitos y las espermátidas (Henriksen y Parvinen, 1998).

En los mamíferos existe una familia entera de proteínas llamada la familia Bcl-2. Algunos miembros de la familia Bcl-2 inhiben la apoptosis y otros favorecen la muerte de la célula. Los genes que codifican para la síntesis de esta familia de proteínas se han clasificado en dos grandes grupos, anti-apoptóticos y pro-apoptóticos. El gen bcl-2 es un factor importante de supervivencia de las células y se le considera un gen anti-apoptótico, mientras que a bax se le considera miembro del grupo de genes inductores de apoptosis (Antonsson y Martinou, 2000; Hsu y Hsueh, 2000).

En la rata macho, la expresión bax es estimulada por la disminución en la concentración de testosterona. Sin embargo, en los animales con microinyección de la 5,6-DHT en el NDR la disminución en la concentración de testosterona y el aumento en el número de células germinales en apoptosis no se acompañó del un incremento en la expresión del gen bax, 15 días después de haber realizado la microinyección. Esto posiblemente sea el resultado de que la evaluación se realizó después de un periodo de tiempo prolongado. En relación a esto se ha mostrado que cuando disminuye la concentración de las hormonas que favorecen la sobrevivencia de las células germinales, el incremento en la expresión del gen bax se presenta en periodos de tiempos muy cortos, horas (6, 12, 24 ó 48 horas) (Woolveridge y col., 1999)

Otra posible explicación a la falta de cambios en la expresión del gen *bax* en los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR, posiblemente se deba a que existen otras señales bioquímicas o receptores que regulan el proceso de apoptosis y los cuales activan los mecanismos de señalización que determinan el destino de las células. Uno de las vías de muerte celular es la inducida a través del receptor Fas que se localiza en la membrana citoplasmática, la cual recibe señales desde el exterior, y debido a estos estímulos es activada la vía de comunicación, y transfiere la información al interior de la célula, se activa la cascada de señalización que llevan a la muerte de la célula, ya que conduce a la ruptura de diversos sustratos celulares y la fragmentación de ADN (Jordán, 2003; Nagata, 1999).

CONCLUSIONES

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

- Durante la etapa prepúber de la rata macho, la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR participa de manera estimulante en la modulación de la secreción de LH.
- La inervación del sistema serotoninérgico del hipotálamo que se origina en el NDR participa en la regulación de la síntesis de testosterona de una forma estimulante en la rata macho prepúber.
- En la rata macho prepúber, la incidencia del proceso de apoptosis en células germinales, no es regulada por la expresión de los genes bcl-2 y bax, debido a que no es la única vía de señalización que determina la muerte celular.

Bibliografía

Allan DJ., Harmon BV., Kerr JF.(1992). Cell death in spermatogenesis. In: Potten CS, **Perspectives on Mammalian Cell Death**; 229–258.

Amann RP., Schanbacher BD. (1983). Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*; Vol. 57, Suppl. 2:380-403.

Amenta F., Vega A., Ricci A., Collier L. (1992). Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. **Anatomical Record**, 233;3: 478-484.

Amireault P., Dubé F. (2005). Serotonin and antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. **Biology of Reproduction**; 73: 358-365.

Andrew S., Liu J., Barry R., Zirkin, Chen H. (2007). Effect of Myxothiazol on Leydig Cell Steroidogenesis: Inhibition of Luteinizing Hormone-Mediated Testosterone Synthesis but Stimulation of Basal Steroidogenesis. **Endocrinology** 148;6 :2583–2590.

Antonsson B., Martinou J. (2000).The Bcl-2 protein family. **Experimental Cell Research**; 256: 50-57.

Arends JM., Morris GR., Wyllie AH. (1990). The role of the endonuclease. **American Journal of Pathology**; 136:593-608.

Arias P., Szwarcfarb B., Rondina D., Carbone S., Sverdlik R., Moguilevsky J. (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;1: 57-61.

Ayala E., Monroy J., Morales L., Castro E., Dominguez R. (1997). Effects of a lesión in the dorsal raphe nucleus performed during the juvenile period the female rat, on puberty. **Brain Research Bulliten**; 47: 211-218

Azmitia, EC. (2001). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. **Brain Research Bulletin**; 56, 5: 413-424.

Bakalska M., Atanassova N., Koeva Y., Nikolov B., Davidoff M. (2004). Induction of male germ cell apoptosis by testosterone withdrawal after ethane dimethanesulfonate treatment in adult rats. **Endocrine regulations**; 38: 103-110

Bartlett S., Weinbauer F., Nieschlag E. (1989). Differential effects of FSH and testosterone on the maintenance of spermatogenesis in the adult hypophysectomized rat. **Journal of Endocrinology**; 121, 49.

Baumgarten G., Björklund A., Lachenmayer L., Nobin A., Stenevi U. (1971). Long-lasting selective depletion of brain serotonin by 5, 6-dihydroxytryptamine. **Acta physiologica Scandinavica. Supplementum**; 373:1-15.

Baumgarten H., Björklund A., Holstein A., Nobin A. (1972). Chemical Degeneration of Indolamine Axons in Rat Brain by 5,6-Dihydroxytryptamine. **Cell and Tissue Research**; 129: 256-271.

Billig H., Furuta I., Rivier C., Tapanainen., Parvinen M., Hsueh A. (1995). Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. **Endocrinology**; 136:5-12.

Brailowsky S. (1995). Las sustancias de los sueños. Neuropsicofarmacología. Ed. **Fondo de Cultura Económica**, México; 66-84.

Chemes H., Dym M., Raj M. (1979). The Role of Gonadotropins and Testosterone on Initiation of Spermatogenesis in the Immature Rat. **Biology of reproduction**; 21: 241-249.

Chun S., Billig H., Tilly J., Furuta I., Tsafiri A., Hsueh J. (1994). Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like factor I. **Endocrinology**; 137: 1845-1853.

Clermont Y., Perey B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules of immature rats. **American Journal Anatomical**; 100:241–268.

Cohen JJ. (1993). Apoptosis. **Immunol Today** ; 14:126-130.

Cohen JJ., Duke RC., Fadok VA., Sellins KS. (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Annual Review of Immunology**; 10:267-293.

Colón E. (2007). Autocrine and paracrine regulation of Leydig cell survival in the postnatal testis. **Karolinska Institutet**. 13pp.

Das T., Mazumder R., Biswas N. (1985). Effect of intraventricular injection of 5, 6-dihydroxytryptamine on spermatogenesis and plasma testosterone levels in the rat. **Journal of Endocrinology**; 106: 395-400.

Derradji H., Baatout S. (2003). Apoptosis: a mechanism of cell suicide. **In Vivo**; 17, 2:185-92.

Frazer A., Hensler J. (1999). Serotonin. En: Basic neurochemistry, molecular, cellular, and mediagal aspects. Edits. **Raven Press**, New York, EUA, 263-292.

Gartner LP., Hiatt JL. (2008). Texto Atlas de Histología. 3ª ed. Edit. **Mc Graw-Hill Interamericana**. México, D. F. 489-510 pp.

Geneser F. (2000). Órganos de la reproducción. En: Histología. F. Geneser (Edit.). Editorial **Medica Panamericana**, tercera edición, Argentina, 639-663.

Gerendai I., Toth IE., Boldogkoi Z., Medveczky I., Halasz B. (2000). Central Nervous System Structures Labelled from the Testis using the Transsynaptic viral Tracing Technique. **Jornal of Neuroendocrinology** 12: 1087 – 1095.

Granner DK., Harper. RK., Murray DK., Garnner PA., Mayes VW., (1988). Hormonas de las gonadas. Rodwell Edits. **Manual Moderno**, décimo primera edición, México, 530-546.

Greenwald G, Roy SY (1994). Follicle development and its control. In: Knobil E, Neill J. **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, 629–724.

Gregory CD. (2000). CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. **Current Opinion in Immunology**; 12:27-34.

Harsing, LG. (2006). The Pharmacology of the Neurochemical Transmission in the Midbrain Raphe Nuclei of the Rat. **Current Neuropharmacology**, 4: 313-339.

Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407: 770-776.

Henriksen K., Hakovirta H., Parvinen M. (1995). Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stagespecific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. **Endocrinology**: 136: 3285–3291.

Henriksen K., Parvinen M. (1998). Stage-specific apoptosis of male germ cells in the rat, mechanisms of cell death study by supravital aquash preparation. **Tissue Cell**, 30: 692-701.

Hergartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407:770-776.

Hikim AP., Swerdloff RS. (1995). Temporal and stage-specific effects of recombinant human follicle- stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated rat. **Endocrinology**; 36: 253-261.

Hsu SY., Hsueh AJ. (2000). Tissue-specific Bcl-2 partners in apoptosis: an ovarian paradigm. **Physiological Reviews** 80: 593-614.

Hsueh AJ., Eisenhauer K., Chun SY., Hsu SY., Billig H. (1996). Gonadal cell apoptosis. **Recent Program Hormonal Res**; 51:433-455.

Huhtaniemi T., Katikineni M., Chan V., Catt J. (1981). Gonadotropin-Induced Positive Regulation of Testicular Luteinizing Hormone Receptors. **Endocrinology**; 108, 1: 58-65.

Jacobs, I., Taylor B., William D., Wise, kenneth M. (1974). Differential behavioral and neurochemical effects following lesions of the dorsal or median raphe nuclei in rats. **Brain Research**; 79:353 -361

Jonsson, G. (1980). Chemical Neurotoxins as Denervation Tools in Neurobiology. **Annual Review of Neuroscience**; 3:169-87.

Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. **Bioquímica**; 22, 6: 100-106.

Jørgensen HS. (2007). Studies on the neuroendocrine role of serotonin. **Danish Medical Bulletin**; 54, 4: 266-288.

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

Kennedy RI., Rawlings NC., Murphy BD.(1985). The Effects of Androgens and Gonadotropins on Testicular Development in the Prepubertal Rat. **Canadian Journal of Comparative Medicine**; 49: 333-336.

Kerr JF., Wyllie AH., Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**; 26:239-257.

Kordon C., Drouvas SV., Martínez EG., Weiner RI. (1994). The Physiology of Reproduction. Segunda Ed. **Raven Press**, New York, EUA; 1621-1681.

Kroemer G., Petit PX., Zamzami N., Vayssiere JL., Mignotte B. (1995). The biochemistry of apoptosis. **The Federation of American Societies for Experimental Biology publishes The Journal**; 9:1277– 87

Kroemer G., Zamzami N., Susin SA. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol Today**; 18:44-51

Lars-goran N., Fuxe K., Jonsson G., Olson L. (1974). Functional regeneration of 5-hydroxytryptamine nerve Terminals in the rat spinal cord following 5,6-dihydroxytryptamine Induced degeneration. **Brain Research**; 78: 377-394.

Lee J., Richburg JH., Younkin SC., Boekelheide K. (1997). The Fas System is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. **Endocrinology** 138: 2081-2088.

Madhwa Raj HG., Martin D. (1976). The effects of selective withdrawal of FSH or LH on spermatogenesis in the immature rat. **Biology of reproduction**; 14: 489-494.

Maekawa F., Tsukahara S., Tsukamura H., Maeda KI., Yamanouchi K. (1999). Prevention of inhibitory effect of dorsal raphe nucleus lesions on ovulation and LH surge by 5-HT 2A/2C receptor agonists in female rats. **Neuroscience research**; 35: 291-298.

Majno G., Joris I. (1995). Apoptosis, Oncosis, and Necrosis An Overview of Cell Death. **American Journal of Pathology**; 146, 1: 3-15.

Malgor., Valsecia. (2003). Hormonas Sexuales Masculinas. **Farmacología**; 211-219.

Malkov M., Fisher Y., Don J. (1998). Developmental Schedule of the Postnatal Rat Testis Determined by Flow Cytometry. **Biology of reproduction**; 59: 84–92.

Martínez O., Morámn J., Velázquez M., Andrade M., Lagunas V., Meléndez J. (2004). Smac/diablo y su papel en la Regulación de la apoptosis. **REB**; 23 (2):64-70.

Mclachlan RI., O'donnell I., Meachem SJ., Stanton PG., Kretser DM., Pratis K., Robertson DM. (2009). Identification of Specific Sites of Hormonal Regulation in Spermatogenesis in Rats, Monkeys, and Man.

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

Meachem SJ., Robert I., McLachlan M., Kretser DM., Robertson DM., Nigel G. (1996). Neonatal Exposure of Rats to Recombinant Follicle Stimulating Hormone Increases Adult Sertoli and Spermatogenic Cell Numbers. **Biology of reproduction** 54: 36-44.

Michael O. Hengartner. (2000). The biochemistry of apoptosis. **Nature**; 407, 12: 770-776.

Miller L., Kimber G. (1979). Manual de anatomía y fisiología. Segunda edición. Ed. **La Prensa Médica Mexicana**, México; 734-741.

Moguilevsky JA., Faigón MR., Scacchi F., Szwarcfarb B. (1987). Role of Sexual Differentiation of the Hypothalamus in the Differential Effect of the Serotonergic System on LH in Prepubertal Male and Female Rats. **Acta endocrinologica**; 45, 4:

Moguilevsky JA., Faigón MR., Rubio MC., Scacchi P. and Szwarcfarb B. (1985). Sexual differences in the effect of serotonin on LH secretion in rats. **Acta endocrinologica**; 109:320-325.

Moguilevsky JA., Wuttke W. (2001). Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes :official journal**; 109: 188-95.

Molina EP. (2008). Fisiología Endocrina. Ed. 2da. **Mc Graw Hill**, México. 198-201.

Nagata S. (1999). Fas ligand induced apoptosis. **Annual Review of Genetics**; 33:29-55

Ojeda RS., Urbanski FH. (1994). Puberty in the rat. En: **The physiology of reproduction**. E. Knobil, JD Neill. Raven Press, New York, EUA, 363-404.

Oldereid NB., Angelis P., Wiger R., Clausen OP. (2001). Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. **Molecular Human Reproduction**; 7:403-408.

Pareek, TK., Ayesha R. Joshi., Sanyal A., Rajan RD. (2007). Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. **Apoptosis**; 12:1085–1100.

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

Penninger MJ., Kroemer G. (1998). Molecular and cellular mechanisms of T lymphocyte apoptosis. **Advances in Immunology**; 68: 51-144.

Pinilla L., Ranchal A., Aguilar R., Aguilar E. (1994). Role of the serotonergic system in the control of gonadotropin secretion in prepubertal male rats. **Europea Journal of Endocrinology**; 130:617-624.

Prieto G. Paniagua V. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. Rev **Facultad de Medicina, UNAM**; 45, 6: 252-257.

Prieto GB., Velázquez PM. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. **Facultad de Medicina, UNAM**; 45, 6: 252-257.

Print C., Kate I., Loveland, Gibson L., Meehan T., Stylianou A., Wreford N., Kretser D., Metcalf D., Adams J., Cory A. (2000). Apoptosis regulator Bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. **Genetics**; 95: 12424–12431.

Print CG., Loveland KL. (1998). Germ cell suicide, new insights into apoptosis during spermatogenesis. **Biology Essays**; 22, 5; 423-430.

Rea MA., Marshall GR., WeinbauerGF., Neischlag E. (1986). Testosterone maintains Pituitary and serum FSH and spermatogenesis in gonadotropin-releasing hormone antagonist-suppressed rats. **Journal of Endocrinology**; 108: 101-107.

Requena G., García E. (2007). Ciencia Tecnología y Ambiente. Consultada Mayo 2008.

Rodríguez JB., García CM. (1996). Induction of apoptotic cell death in the seminiferous tubule of the adult rat testis: assessment of the germ cell types that exhibit the ability to enter apoptosis after hormone suppression by oestradiol treatment. **International Journal of Andrology**; 19: 237-247.

Rodriguez I., Ody C., Araki K., Garcia I., Vassalli P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. **The EMBO Journal**; 16, 9: 2262–2270.

Russell LD., Alger LE., Nequin L. (1987). Hormonal control of pubertal spermatogenesis. **Endocrinology**; 120: 1615–1632.

Russell LD., Clermont Y. (1976). Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. **Anatomical Record**; 187:347-366.

Russell LD., Ettlin RA., Sinha H., Clegg ED. (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **Cache River Press**; 41-118.

Russell LD., Kershaw M., Kurt E., Shennawy A., Rulli SS., Gates RJ., Calandra RS. (1998). Hormonal Regulation of Spermatogenesis in the Hypophysectomized Rat: FSH Maintenance of Cellular Viability During Pubertal Spermatogenesis. **Journal of Andrology**; 19, 3: 308-319.

Samali A., Gorman AM., Cotter TG. (1996). Apoptosis the story so far. **Experientia**; 52:933-941.

Savill J., Fadock V., Henson P., Haslett C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergo apoptosis. **Immunol Today**; 14:131-136.

Selvage JD., Rivier C. (2003). Importance of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus as a component of a neural Pathway Between the brain and the

testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary. **Endocrinology** 144: 594- 598.

Setchel B., Maddocks S., Brooks DE. (1994). Anatomy, vasculature, innervations, and fluids of the male reproductive tract. Chapter 18. En: The physiology of reproduction. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). **Raven Press, New York**; 1063-1170.

Shannon N.J., Gunnet JW., Moore KE. (1986). A Comparison of Biochemical Indices of 5-Hydroxytryptaminergic Neuronal Activity Following Electrical Stimulation of the Dorsal Raphe Nucleus. **Journal of Neurochemistry**; 47, 3: 958-965.

Sharpe RM. (1994). Regulation of spermatogenesis. En: **The physiology of reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.) Raven Press, New York, EUA, 1363-1434.

Sing. S., Dryhurst G. (1990). Further insights into the oxidation chemistry and biochemistry of serotonergic neurotoxin 5, 6-dihydroxytryptamine. **Journal of Medicinal Chemistry**; 33: 3035-3044.

Sinhababu AK., Ghosh AK., Borchardt RT. (1985). Molecular mechanism of action of 5,6- Dihydroxytryptamine. Synthesis and biological evaluation of 4-methyl-, 7-methyl-, and 4, 7-dimethyl- 5, 6- Dihydroxytryptamines. **Journal of Medicinal Chemistry**; 28: 1273-1279.

Sofikitis N., Giotitsas N., Tsounapi P., Baltogiannis D., Giannakis D., Pardalidis N.(2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. **Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology**; 109, 5:323-30.

Tanaka H., Fujisawa M., Tanaka H., Okada H., Kamidono S. (2002). Apoptosis-related proteins in the testes of infertile men with varicocele. **BJU International**; 89: 905–909.

Tapanainen JS., Tilly JL., Vihko KK., Hsueh AJ. (1993). Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. **Molecular Endocrinology**; 7: 643-650.

Thompson CB. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**; 267:1456-1462

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

Tresguerres, J. A. F., colab. (1999) Fisiología humana. 2ª ed. Edit. **Mc Graw-Hill Interamericana**, Madrid. 1181pp.

Van de Kar L.D., Lorens SA., Vodraska A., Allers G., Green M., (1980).Effect of Selective Midbrain and Diencephalic 5,7-Dihydroxytryptamine Lesions on Serotonin Content in Individual Preopticohypothalamic Nuclei and on Serum Luteinizing Hormone Level. **Neuroendocrinology**; 31:309-315.

Velázquez MM., Andrade JM., Lagunas VM., Zajgla JM. (2004). Smac/diablo y su papel en la Regulación de la apoptosis. **REB**; 23, 2:64-70.

Vigier MM., Weiss MH., Perrard M., Godet., Durand P. (2004). The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an in vitro study. **Journal of Molecular Endocrinology**; 33: 729–742

Vitale ML., Parisi MN., Chiocchio SR., Tramenzani JH. (1986). Serotonin induces gonadotrophin release through stimulation of LH-releasing hormone release from the median eminence. **Journal of Endocrinology**; 111: 309-315.

Whitaker M., Azmitia PD. (1999). The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. **Neuropsychopharmacology**; 21: 2.

Whitaker PM. Azmitia (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain Research Bulletin**; 56: 479-485.

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

Zoltán N., Oltval., Curt L., Milliman, Stanley J., Korsmeyer. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Vol. 74, **Issue**; 4:609-619.

Apéndice 1

Para cuantificar la concentración de serotonina (5-HT) y su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Se prepararon soluciones estándares de 0.1, 0.5 y 1 ng para su calibración. La concentración de serotonina y su metabolito se calculó comparando el área bajo la curva de los picos correspondientes del neurotransmisor con la curva de calibración.

Cuadro 1. Solución de muestras estándares para calibración del equipo de cromatografía.

Estándar	Cantidad	Acido perclórico 0.1 N
2 ng	50 µl de solución AA	1200 µl
1 ng	500 µl del estándar 2	500 µl
0.5 ng	500 µl del estándar 1	500 µl
0.1 ng	100 µl de estándar 1	900 µl

En la solución AA se utilizó una serie de estándares de NA, MHPG, DA, DOPAC, 5-HT y 5-HIAA disueltos en ácido perclórico 0.1 N.

En la preparación del estándar de 2 ng se tomaron 50 µl de la solución AA más 1200 µl de ácido perclórico a 0.1 N, para el estándar de 1 ng se agregaron en un tubo eppendor 500 µl del estándar de 2 ng más 500 µl de ácido perclórico a 0.1 N, para la concentración de 0.5 ng, se tomó 500 µl del estándar de 1 ng más 500 µl de ácido perclórico a 0.1 N y finalmente en el de 0.1 se tomó 100 µl de la solución del estándar de 1 ng más 900 µl de ácido perclórico a 0.1 N.

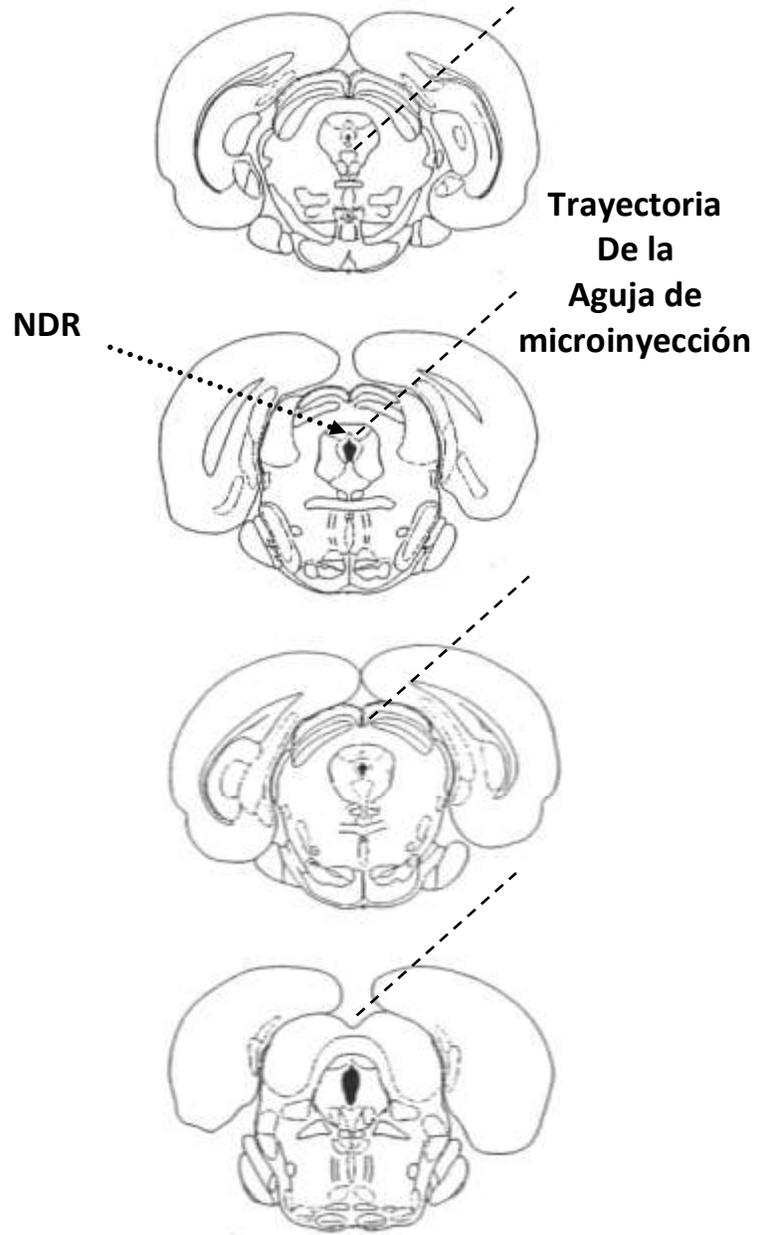


Fotografía del equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución

Apéndice 2

Identificación de la zona de lesión

Se realizaron cortes coronales de la región posterior del cerebro el cual se fijó en formol al 10%, se realizaron cortes de 20 μm y con ayuda de un estereoscopio se realizó la identificación de la zona de lesión.



Localización del núcleo dorsal del rafé NDR