



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**SISTEMA SEROTONINÉRGICO DEL
HIPOTÁLAMO, NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ Y
REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS.
LA RATA COMO MODELO DE ESTUDIO.**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO
PRESENTA:**

ERIK DE JESÚS AMBROSIO GARCÍA

Directora: Dra. María Elena Ayala Escobar

MÉXICO, D. F.

Noviembre, 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**SISTEMA SEROTONINÉRGICO DEL HIPOTÁLAMO,
NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ Y REGULACIÓN DE
LA ESPERMATOGÉNESIS. LA RATA COMO MODELO
DE ESTUDIO.**

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta:

Erik de Jesús Ambrosio García.

Directora de Tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar.

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

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

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su ayuda, apoyo, consejos y paciencia que siempre me brindó durante la elaboración de esta tesis, gracias Doctora.

A los miembros del jurado:

Dra. María Elena Ayala Escobar
Dra. María Esther Cruz Beltrán
Dra. Patricia Rosas Saucedo
M. en C. Raúl Zavala Chavero
Biól. Carlos Martínez Montoya

Por su valiosa contribución en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Andrés Aragón Martínez por su colaboración y asesoría en la realización de la evaluación espermática.

A mis compañeras de laboratorio Gabriela y Marisol por crear un ambiente de trabajo agradable y por brindarme su valiosa compañía y confianza.

Al personal del Bioterio de la Fes Zaragoza por su cooperación en el cuidado y mantenimiento de los animales de este estudio.

Hay lugares que recordaré toda mi vida, aunque algunos han cambiado, algunos para siempre, no para mejor, algunos se han ido y otros aun existen. Todos esos lugares tienen sus momentos con amantes y amigos que aun puedo recordar, algunos han muerto y otros viven.

Y aunque sé que nunca perderé el afecto por las personas y cosas que se fueron antes,
se que a menudo pararé y pensaré en ellas,
en mi vida los recordare a todos.

DEDICATORIAS

A mis padres, María y Dionisio, por todo el apoyo que me han dado, porque a pesar de las adversidades siempre me apoyaron, y creyeron en mí en todo momento, y por el gran esfuerzo que han hecho para darme todo lo que necesito y un poco más, gracias a ustedes he llegado hasta donde estoy, y esto es solo el comienzo.

A mis hermanos, Sergio y Betsabe, que siempre están a mi lado en las buenas y en las malas, porque me brindan su apoyo incondicional, por todos esos magníficos momentos que he vivido a su lado y por lo afortunado que soy de tenerlos a mi lado.

A mi familia por todo el apoyo que me ha brindado a lo largo de mi vida.

Hay lugares que recordaré toda mi vida, aunque algunos han cambiado, algunos para siempre, no para mejor, algunos se han ido y otros aun existen. Todos esos lugares tienen sus momentos con amantes y amigos que aun puedo recordar, algunos han muerto y otros viven.

*Y aunque sé que nunca perderé el afecto por las personas y cosas que se fueron antes,
se que a menudo pararé y pensaré en ellas,
en mi vida los recordare a todos.*

ÍNDICE

Resumen	I
Introducción	1
Aparato reproductor masculino.....	1
Células germinales.....	3
Células de Sertoli.....	4
Funciones del testículo.....	5
Espermatogénesis.....	5
El espermatozoide.....	8
Factores que afectan la Espermatogénesis y Espermiogénesis.....	12
Alteraciones en la morfología del espermatozoide.....	13
Viabilidad del espermatozoide.....	15
Esteroidogénesis.....	15
Regulación hormonal de las funciones del testículo.....	17
Eje hipotálamo-hipófisis.....	22
Serotonina ó 5-HT.....	24
Justificación	29
Hipótesis	30
Objetivo general	31
Objetivos particulares	31
Material y método	32
Procedimiento de la lesión del núcleo dorsal del raquídeo.....	32

Procedimiento de autopsia.....	33
Cuantificación de FSH, LH y testosterona en suero.....	33
Cuantificación de serotonina y catecolaminas en el hipotálamo...	33
Evaluación de la espermatogénesis.....	34
Movilidad.....	34
Viabilidad.....	34
Número de Espermatozoides.....	35
Anormalidades.....	35
Análisis estadístico de resultados.....	35
Resultados	40
Concentración de Serotonina y 5-HIAA.....	40
Concentración de catecolaminas.....	44
Concentración de FSH y LH.....	45
Concentración de Testosterona.....	46
Correlación.....	46
Evaluación de la espermatogénesis.....	49
Discusión	55
Conclusiones	63
Bibliografía	64

RESUMEN

La serotonina ó 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una amina biogénica presente en diferentes estructuras del organismo. En el sistema nervioso central es producida por neuronas localizadas en los núcleos del rafé, dorsal y medial, los que inervan el hipotálamo. Esta amina participa en la regulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de las gonadotropinas, hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH), esenciales en la modulación de las funciones del testículo (espermatogénesis y esteroidogénesis). Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias claras que señalen la participación de la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafé en la secreción de las gonadotropinas.

Con base en lo anterior, en éste trabajo experimental se analizó el efecto de la lesión química del núcleo dorsal del rafé (NDR), inducida por la administración de 10µg del neurotóxico selectivo de las neuronas serotoninérgicas, 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT), en ratas macho de 30 días de edad; sobre el sistema serotoninérgico del hipotálamo, la secreción de gonadotropinas y las funciones del testículo (espermatogénesis y secreción de testosterona), 35 días después de la lesión.

En comparación con el grupo testigo absoluto o con el grupo vehículo (inyección de ácido ascórbico en el núcleo dorsal del rafé), en los animales con lesión química del NDR provocada por la 5,6-DHT, y sacrificados a los 65 días de edad, la concentración de serotonina disminuyó significativamente en hipotálamo anterior (HA, 1.31 ± 0.09 , 1.09 ± 0.13 vs 0.55 ± 0.12 ng/mg de tejido, $p < 0.05$), hipotálamo medio (HM, 2.05 ± 0.24 , 1.45 ± 0.21 vs 0.55 ± 0.12 , $p < 0.05$) y posterior (HP, 1.83 ± 0.32 , 2.60 ± 0.30 vs 0.95 ± 0.30 $p < 0.05$). La concentración del metabolito 5-HIAA fue menor en el hipotálamo medio HM (0.66 ± 0.06 , 0.67 ± 0.06 vs 0.37 ± 0.04 $p < 0.05$) y la relación 5HIAA/5-HT se incrementó significativamente en las tres regiones del hipotálamo, HA (0.53 ± 0.11 , 0.66 ± 0.08 vs 2.78 ± 1.31), HM (0.38 ± 0.07 , 0.61 ± 0.17 vs 0.87 ± 0.14), HP (0.65 ± 0.18 , 0.33 ± 0.02 vs 1.02 ± 0.24 $p < 0.05$).

No se presentaron cambios en la concentración de catecolaminas.

En relación con el grupo testigo absoluto o vehículo, los animales en los que se lesionó el NDR, la concentración de LH en suero disminuyó de manera significativa (0.50 ± 0.04 , 0.64 ± 0.10 vs 0.35 ± 0.06 , ng/mL de suero $p<0.05$), por otra parte no se observaron cambios en la concentración de FSH. Mientras la concentración de testosterona presentó una disminución significativa (3.90 ± 0.41 , 3.83 ± 0.46 vs 2.66 ± 0.34 $p<0.05$).

En el análisis de correlación entre la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior, medio y la concentración de gonadotropinas en suero se observó la correlación positiva entre serotonina en hipotálamo anterior y medio con FSH ($r=0.66$ y $r=0.74$, respectivamente); así como de serotonina en el hipotálamo anterior, medio con LH ($r=0.67$ y $r=0.58$, respectivamente). Este mismo comportamiento se observó entre la concentración de LH y testosterona en el suero ($r=0.86$).

En los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR, disminuyó el porcentaje de espermatozoides móviles en comparación con el grupo testigo absoluto o con ácido ascórbico (72.89 ± 5.47 , 69.16 ± 7.05 vs 44.84 ± 7.37 % $p<0.05$). El porcentaje de espermatozoides viables no se modificó, lo mismo sucedió con el número de espermatozoides. Cuando se analizó la morfología de los espermatozoides se observó el incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides anormales (3.11 ± 1.48 , 9.54 ± 4.10 vs 18.38 ± 6.62 , % $p<0.05$).

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se puede 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 regulación de la secreción de LH, testosterona y en el proceso de la espermatogénesis.

INTRODUCCIÓN

El aparato reproductor de la rata macho está constituido por los testículos, el epidídimo, los conductos deferentes las glándulas accesorias (próstata y vesícula seminal) y por el órgano copulador (Curtis y Barnes, 1996) (Figura 1). De ellos los testículos son considerados los órganos primarios del aparato reproductor del macho debido a que mediante sus secreciones hormonales (testosterona principalmente) mantiene la estructura y el funcionamiento del resto de los componentes del aparato reproductor (Audesirk y col., 2003; Bellido, 1999).

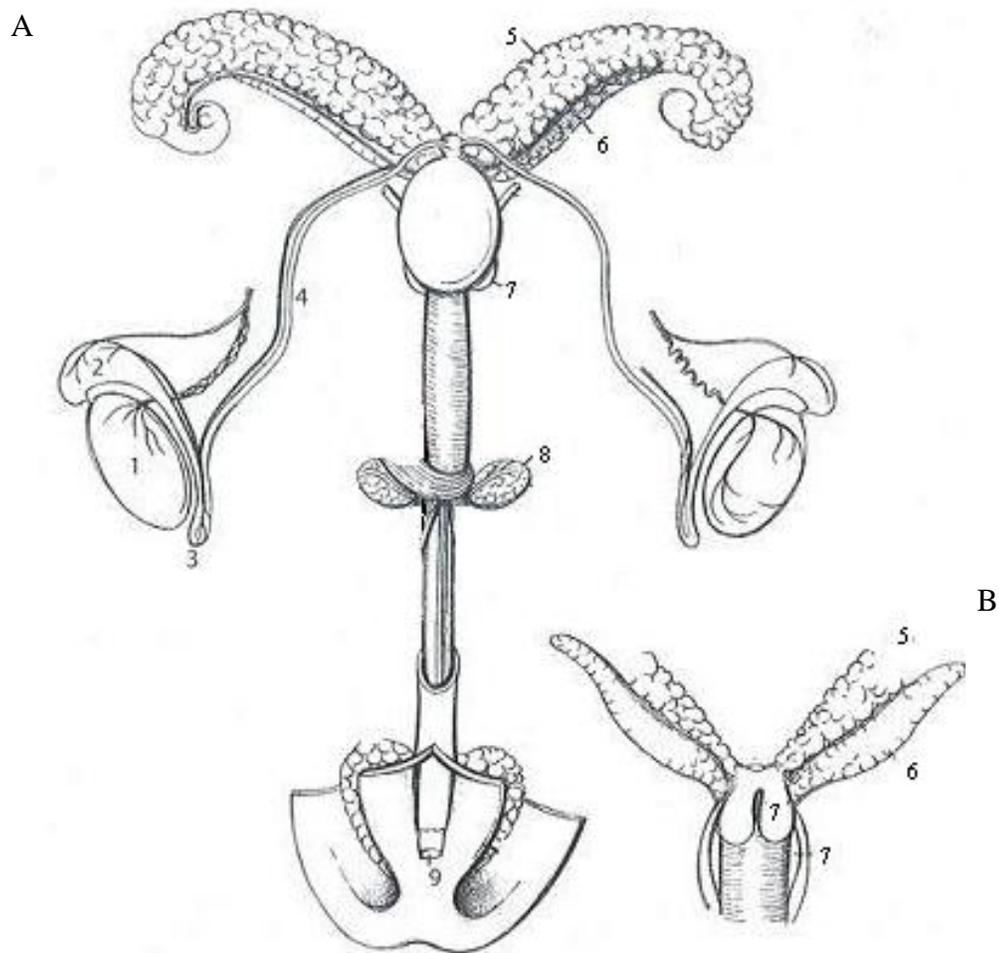


Figura 1. Esquema del aparato reproductor de la rata macho. A vista ventral, B vista dorsal, (1) testículo, (2) cabeza del epidídimo, (3) cola del epidídimo, (4) conducto deferente, (5) vesícula seminal, (6) glándulas coagulantes, (7) próstata, (8) glándulas bulbouretrales, (9) pene (Modificado de Hedrich, 2004).

Los testículos son estructuras pares de forma ovalada, situados en las bolsas escrotales, cada testículo está compuesto por: una capsula de tejido conjuntivo, conocido como túnica albugínea, por los túbulos seminíferos que se comunican con los túbulos rectos que conforman la rete testis y por el tejido intersticial, que representa aproximadamente el 15% del volumen total del órgano, rodea los túbulos seminíferos y está conformado por células intersticiales o células de Leydig (que sintetizan andrógenos), vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas, fibroblastos y macrófagos (Gartner y Hiatt, 2007; Ross y col., 2004; Tresguerres, 1999) (Figura 2).

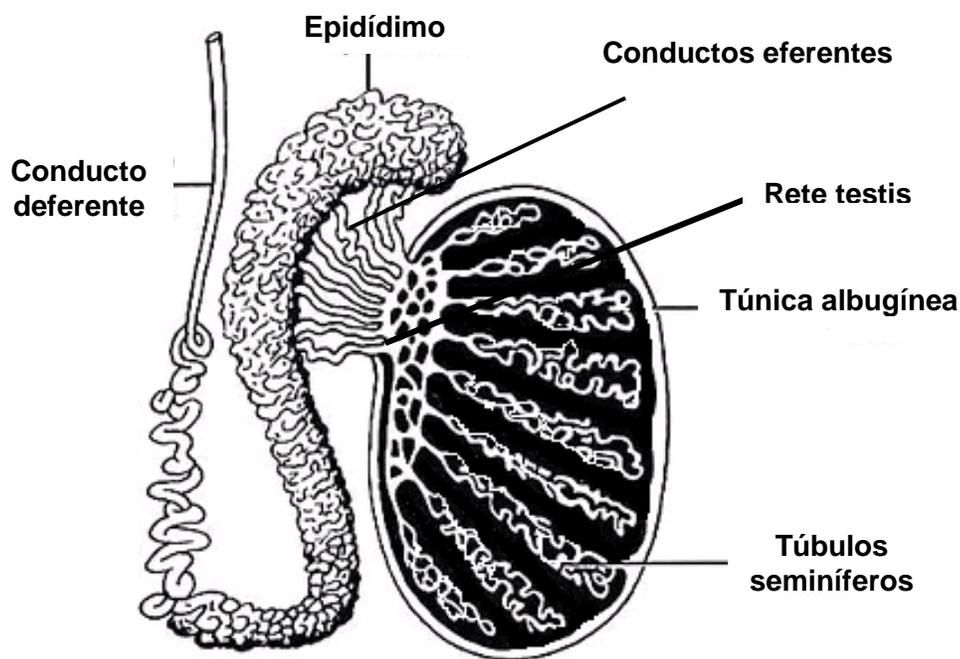


Figura 2. Esquema del testículo (Modificado de Gartner y Hiatt 2007).

Los túbulos seminíferos están rodeados por células alargadas denominadas, mioides que son las responsables de la contractilidad del túbulo, proceso que es necesario en el transporte de los espermatozoides no móviles desde el túbulo seminífero hasta la red testicular, después se encuentra la membrana basal. Internamente se ubican las células de Sertoli y de la línea germinal en diversas etapas de desarrollo (Geneser, 2000; Ross y col., 2004) (Figura 3).

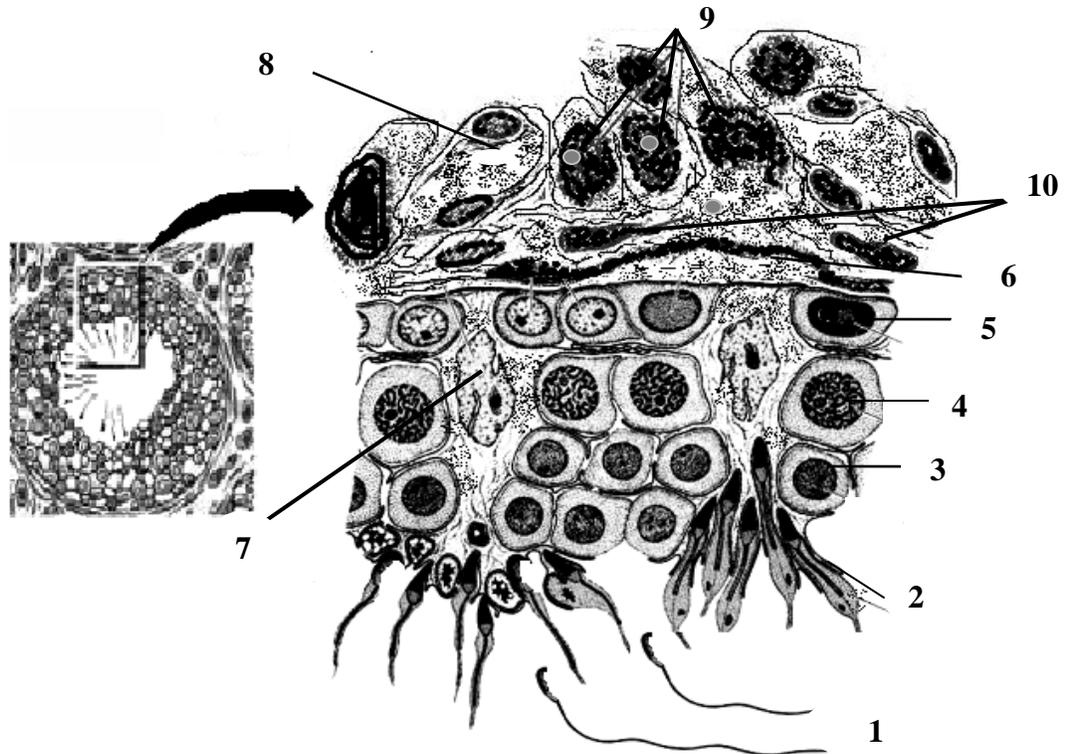


Figura 3. Esquema del túbulo seminífero donde se muestran los diferentes tipos celulares presentes: 1) espermatozoides; 2) espermátides; 3) espermatocito secundario; 4) espermatocito primario; 5) espermatogonia; 6) lamina basal; 7) célula de Sertoli; 8) capilar; 9) células intersticiales; 10) células miodes (Modificado de Ganong, 2006; Gilbert, 2003).

Células Germinales

Las células más inmaduras o espermatogonias, son células germinales diploides situadas en la membrana basal, forman el epitelio germinal y en ellas se lleva a cabo la mitosis. En el túbulo seminífero se encuentran tres tipos de espermatogonias: tipo A oscuras, claras y las tipo B.

- Las **espermatogonias oscuras A**, son células de reserva que no entran al ciclo celular pero que pueden hacerlo. Una vez que se realiza la mitosis, forman tanto espermatogonias tipo A claras y oscuras.
- Las **espermatogonias claras A**, estas células mediante mitosis, dan origen a más espermatogonias claras tipo A o B.
- Las **espermatogonias B**, también se dividen por mitosis para formar los espermatoцитos primarios.

De esta manera el desarrollo del espermatozoide se inicia con las espermatogonias, continua con los espermatoцитos primarios, secundarios y espermátides, en éste último tipo celular se lleva a cabo una serie de cambios que culminan con la formación del espermatozoide, el que se ubica en la luz del túbulo (Gartner y Hiatt, 2007; Geneser, 2000).

Células de Sertoli

Las células de Sertoli forman parte del epitelio seminífero; tienen la función de proporcionar los nutrientes necesarios durante la maduración de las células germinales, también llevan a cabo la función de fagocitar células germinales dañadas y los cuerpos residuales de citoplasma que resultan de la transformación de la espermátide a espermatozoide. Otra función de las células de Sertoli es formar la barrera hematotesticular, la cual divide al epitelio germinal en dos compartimientos, basal y adluminal. Está formada por uniones estrechas entre las células de Sertoli, que crean una barrera permeable, que permite el paso de iones, aminoácidos y proteínas. Por lo que el líquido que se encuentra en los túbulos seminíferos difiere considerablemente de la composición del plasma.

- El compartimiento germinal o basal, se encuentran espermatogonias y espermatoцитos primarios en los estadios tempranos de la meiosis.
- El compartimiento adluminal que contiene el resto de los diferentes tipos celulares que se forman durante la espermatogénesis. Este compartimiento tiene un microambiente adecuado para el desarrollo de las células germinales.

La célula de Sertoli también sintetiza diferentes sustancias que pasan a la luz del túbulo y forman parte del líquido tubular, como son: la proteína unidora de los andrógenos (ABP), necesaria para concentrar la testosterona en el túbulo seminífero, donde la alta concentración de esta hormona es esencial en la maduración del espermatozoide; activina e inhibina que modulan la secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH) por la hipófisis; transferrina que transporta el hierro a las células germinales; hormona antimulleriana que inhibe la diferenciación del conducto de Muller durante la embriogénesis; el factor de crecimiento de los túbulos seminíferos, que regula la proliferación de las células germinales (Audesirk y col., 2003; Gartner y Hiatt, 2007; Geneser, 2000; Ross y col., 2004).

Funciones del testículo

El testículo cumple dos funciones: 1) producción de espermatozoides, y 2) endocrina debido a que secreta hormonas proteicas (inhibina y activina) y esteroides (testosterona principalmente). Los andrógenos, como la testosterona, son esenciales en la producción de los espermatozoides y en la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Curtis y Barnes, 1996; Ganong, 2004; Weichert, 1981).

Espermatogénesis

Es el proceso mediante el cual células germinales inmaduras (diploides) se someten a divisiones mitóticas, meióticas y a una diferenciación, dando lugar a espermatozoides haploides (Audesirk y col., 2003; Schoenfeld y col., 2001). Cada vez que una espermatogonia se divide, puede seguir una de dos vías de desarrollo; en la primera, la célula se divide por mitosis, con esto se garantiza el abasto constante de espermatogonias y como consecuencia de espermatozoides. En la segunda vía, la espermatogonia experimenta una serie de divisiones y cambios que culminan en la producción de los espermatozoides (Audesirk y col., 2003).

La espermatogénesis (Figura 4), se inicia con el incremento y diferenciación de las espermatogonias que darán origen a los espermatocitos primarios, que son células diploides grandes y que entran en meiosis. Al término de la meiosis I, cada espermatocito primario da origen a dos espermatocitos secundarios haploides los que se dividen durante la meiosis II y generan dos espermátidas redondas, de modo que se obtienen cuatro espermátidas por espermatocito primario. Las espermátidas redondas presentan cambios estructurales que las llevan a adquirir la forma característica del espermatozoide, con un flagelo, un núcleo y un acrosoma, a esta secuencia de transformaciones se le denomina espermiogénesis (Audesirk y col., 2003; De Kretser y Kerr, 1994).

Durante la espermiogénesis, el material nuclear se compacta y forma la cabeza del espermatozoide; alrededor de la envoltura nuclear se forma el gránulo acrosómico, a partir del aparato de Golgi, éste gránulo posteriormente se transforma en el acrosoma, que rodea la parte anterior de la cabeza del espermatozoide; los centríolos se reorganizan e inician el armado de nueve dobletes de microtúbulos periféricos y los dos centrales que dan origen al

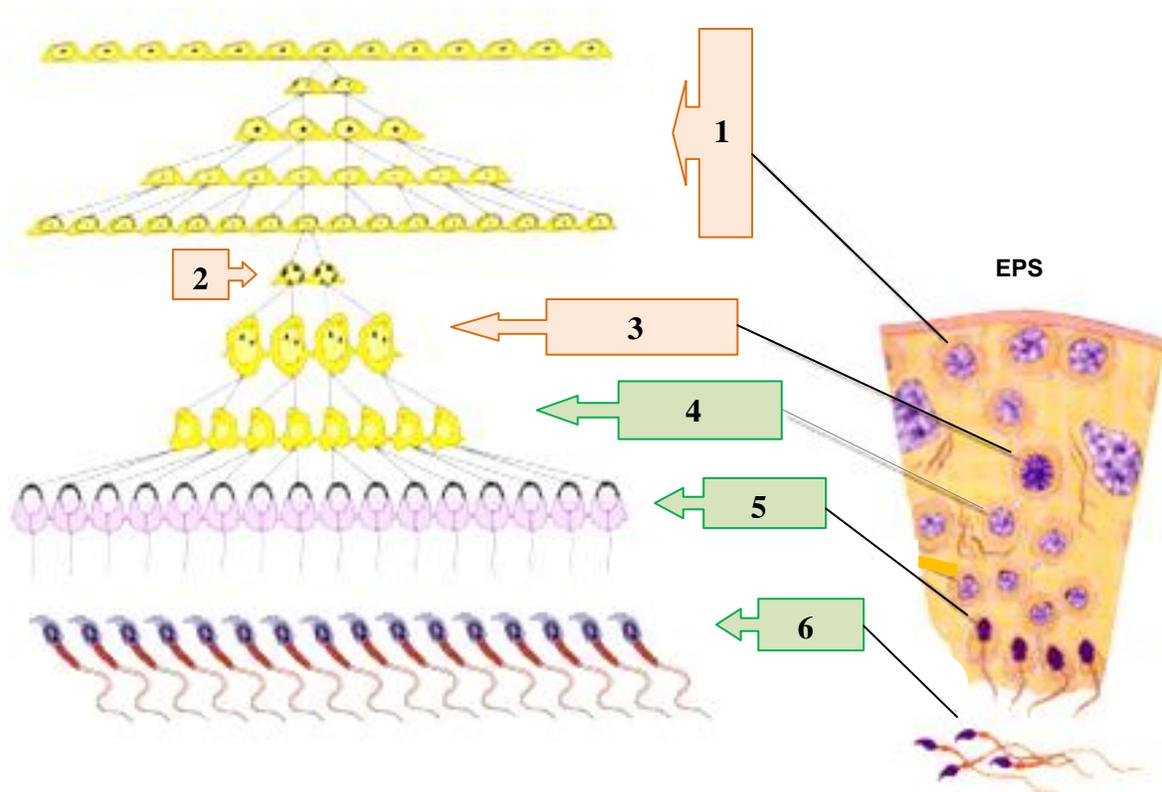


Figura 4. Esquema del proceso de espermatogénesis; 1) espermatogonias tipo A; 2) espermatogonias tipo B; 3) espermatocitos primarios; 4) espermatocitos secundarios; 5) espermátidas; 6) espermatozoides; Epitelio seminífero (EPS); diploide; haploide (Modificado de Audesirk y col., 2003; Ross y col., 2004).

axonema de la cola del espermatozoide, que en conjunto constituyen el flagelo, tras el inicio de la generación de los microtúbulos, los centriolos regresan a la cercanía del núcleo para contribuir a la formación de la pieza conectora o cuello del espermatozoide en desarrollo; Estas estructuras también producen nueve fibras gruesas, fijas al núcleo y constituyen las fibras densas externas periféricas a los microtúbulos del axonema; En la pieza media las mitocondrias se unen en una espiral armando la vaina mitocondrial (Gartner y Hiatt, 2007; Geneser, 2000; Ross y col., 2004) (Figura 5). Finalmente las espermátidas alargadas se liberan en el proceso de espermiación, el cual involucra la remoción del exceso de citoplasma del flagelo, extensión de la espermátide a la luz del túbulo seminífero, retención de la mayor parte del citoplasma que envuelve la cabeza, desprendimiento espermátide-Sertoli y por último los espermatozoides sueltos pasan a la luz del túbulo seminífero y son conducidos al epidídimo (Beardsley y O`Donnell, 2003; Ross y col., 2004) (Figura 6).

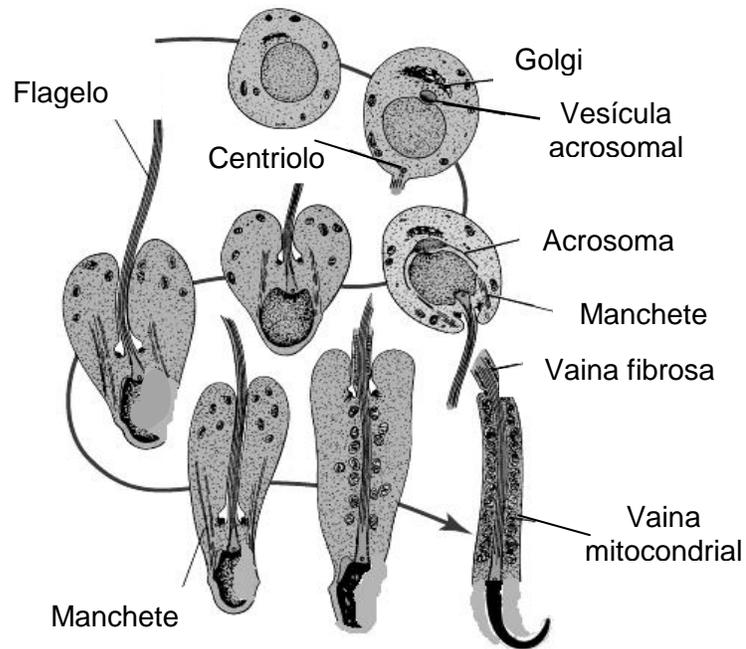


Figura 5. Representación esquemática de la espermiogénesis, se ilustran modificaciones en la estructura de la espermatide (Modificado de Ross y col., 2004).

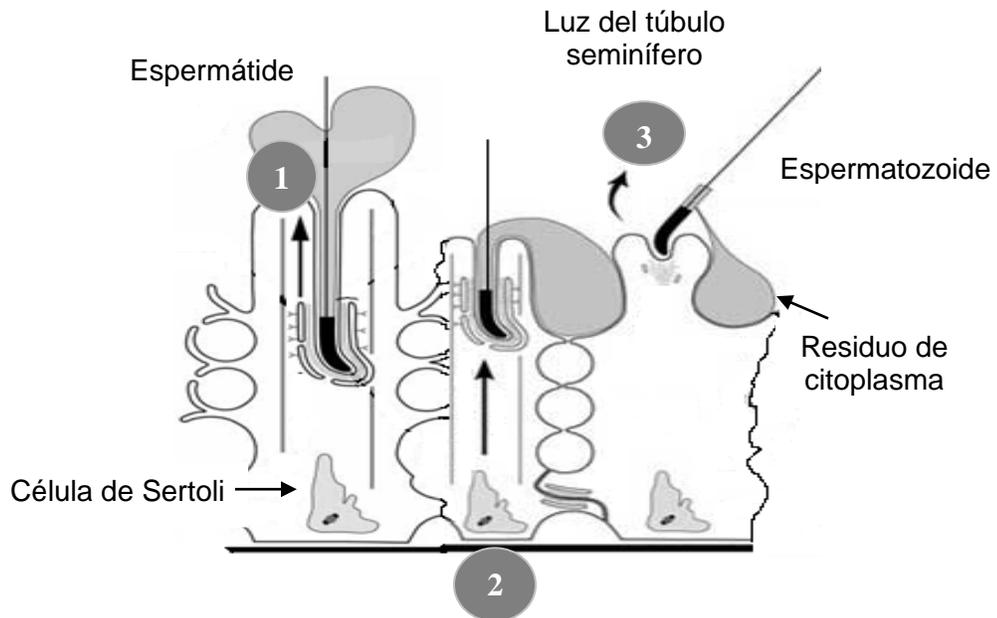


Figura 6. Esquema de la espermiación, 1) separación del citoplasma flagelar; 2) desplazamiento hacia la luz del tubo seminífero; 3) desprendimiento del espermatozoide (Modificado de Guttman y col., 2000).

Espermatozoide

El espermatozoide es el producto final del proceso de espermatogénesis que ocurre en los túbulos seminíferos. Está conformado por dos regiones morfológica y funcionalmente diferentes, rodeadas por una misma membrana plasmática, la cabeza y el flagelo o cola (Audesirk y col., 2003; Ross y col., 2004).

La cabeza contiene un núcleo haploide condensado, debido a que el ácido desoxirribonucleico (ADN) está empaquetado, de modo que el volumen está reducido al mínimo lo que facilita su transporte; éste empaquetamiento puede resultar esencial para evitar el daño al ADN, si los espermatozoides son expuestos a ambientes agresivos, como la elevada acidez del tracto reproductor de la hembra. En el extremo anterior de la cabeza, se encuentra una vesícula que la cubre en su región anterior y que se denomina acrosoma, el cual se origina a partir del aparato de Golgi de la espermátida. Además esta estructura alberga enzimas hidrolíticas que ayudan al espermatozoide a atravesar la envoltura externa del óvulo. Por último el citoesqueleto, se encuentra en el espacio que hay entre el acrosoma y la membrana plasmática, tiene una función estructural, ya que ayuda a definir la forma de la cabeza, y otra funcional que ayuda a la penetración del espermatozoide en el óvulo durante la fertilización (Eddy y O'Brien, 1994; Eddy, 2006; Ross y col., 2004).

El flagelo impulsa al espermatozoide a través de un medio acuoso lo que le permite llegar al óvulo y lograr la fertilización. Está constituido de un axonema central formado por dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes de microtúbulos, éstos a su vez están envueltos por una funda externa de fibras densas que se extienden desde la cabeza hasta cerca de la parte posterior (pieza media), además ésta parte presenta mitocondrias dispuestas de forma helicoidal alrededor de las fibras densas externas y del complejo axonémico, la pieza principal, contiene la vaina fibrosa que rodea las fibras densas externas; por último la pieza terminal solo consiste del axonema. El movimiento del flagelo está impulsado por la proteína motora dineína, que utiliza la energía de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP) lo que permite deslizar los dobletes microtubulares del flagelo, provocando el movimiento (Eddy y O'Brien, 1994; Eddy, 2006; Geneser, 2000) (Figura7).

Aunque todos los espermatozoides de mamífero tienen estas características generales existen diferencias específicas tanto en el tamaño y forma de la cabeza como en la longitud y tamaño de los componentes del flagelo. Los mecanismos responsables de producir y mantener estas características específicas, a la fecha, han sido poco o nada estudiados (Eddy, 2006).

Los espermatozoides recién liberados son transportados por las contracciones de las células peritubulares, hacia los túbulos rectos, que desembocan en la rete testis, desde ésta pasan a los conductillos eferentes y finalmente llegan a la parte proximal del epidídimo (Comhaire, 1993; Ross y col., 2004).

El epidídimo es un conducto único enrollado que se sitúa en la superficie del testículo, se extiende desde el polo anterior al posterior de la gónada. Este conducto está rodeado de tejido conectivo que contiene fibroblastos, fibras de colágeno, elastina, vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas, macrófagos y capas concéntricas de músculo liso. Las secreciones de los distintos tipos celulares a lo largo del epidídimo son heterogéneas. Ésto propicia que existan diferentes microambientes a lo largo de la luz del órgano. Se considera que esto favorece la maduración de los espermatozoides (Syntin y Robaire, 2001).

Anatómicamente y funcionalmente el epidídimo se divide en cabeza, cuerpo y cola (pieza inicial, media y terminal). En el segmento inicial y medio se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides, mientras que en el segmento terminal se almacenan (Setchell y Breed, 2006). Los espermatozoides que llegan al epidídimo son inmaduros, inmóviles y no pueden fecundar un oocito. Durante su trayecto a través del epidídimo maduran, término que incluye el conjunto de cambios en la composición, organización y función del espermatozoide (Eddy y O'Brien, 1994; Gartner y Hiatt, 2007).

En la membrana plasmática del espermatozoide se producen cambios en la composición de lípidos, glucoproteínas, proteínas y carbohidratos, se forman puentes disulfuro entre las fibras externa y las fibras de la vaina. Diferentes proteínas participan en la maduración de los espermatozoides, entre las que se encuentran glutathion peroxidasa (GPX5), γ -glutamyl transpeptidasa (GGT), inobilina, sulfato glicoproteína 2 (SGP-2) que se sintetizan en la pieza inicial y en la región media del epidídimo se secretan proteína 2D6, p34h, factor de cre-

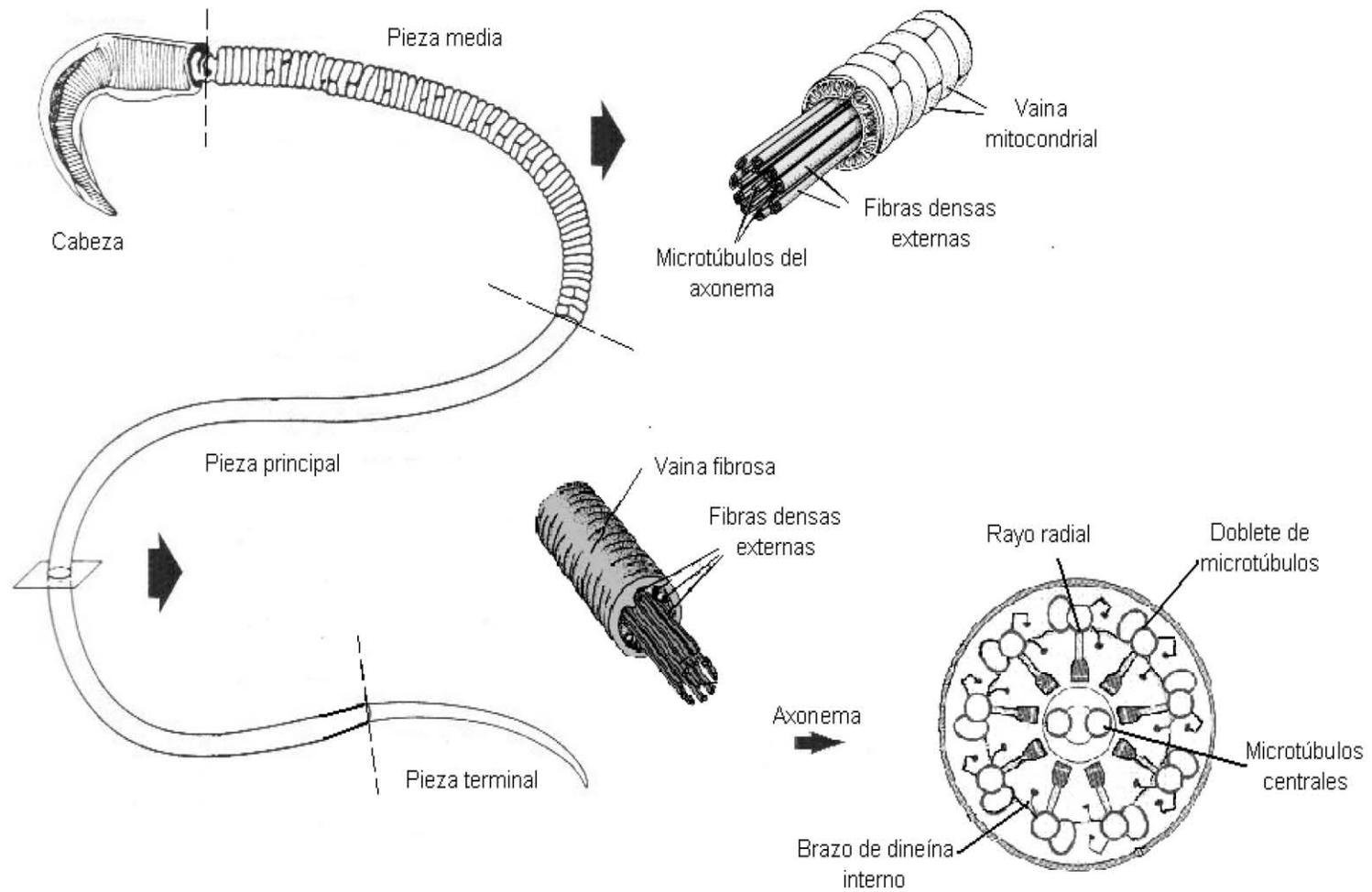


Figura 7. Estructura de un espermatozoide de rata (Modificado de Eddy, 2006; Ross y col., 2004).

cimiento nervioso (β -NGF), que ayudan a la maduración del espermatozoide de la rata y del ratón, durante este proceso los espermatozoides adquieren un movimiento progresivo, considerado como el cambio funcional que presenta el espermatozoide (Cooper, 1999, Eddy y O'Brien, 1994).

Además de las proteínas involucradas en la maduración del espermatozoide, existen evidencias experimentales que sugieren la presencia de un sistema serotoninérgico en la cabeza del epidídimo de rata, específicamente en los mastocitos, células epiteliales y neuroendocrinas, que posiblemente participa en la maduración de los espermatozoides (Jiménez-Trejo y col., 2007; Leung y col., 1999).

De la pieza terminal del epidídimo los espermatozoides, son transportados a los conductos deferentes donde se almacenan la mayoría de ellos. Estos conductos se orientan hacia la base de la próstata, donde se estrecha hasta ser un tubo muy delgado, que se une con el conducto excretor de la vesícula seminal para formar el conducto eyaculador que desemboca en la porción prostática de la uretra, la cual conduce hacia la punta del pene (Audesirk y col., 2003; Geneser, 2000).

Los espermatozoides se capacitan solo después de pasar cierto tiempo en el aparato genital de la hembra (Rathi y col., 2001; Ross y col., 2004). La capacitación es un término que incluye el conjunto de cambios que se presentan en el espermatozoide y que le permiten adquirir el potencial de fertilizar al óvulo (Lewis y Aitken, 2001). Estos cambios incluyen reorganización de las proteínas de membrana, metabolismo de los fosfolípidos de membrana e hiperactivación (Yanagimachi, 1992; Rathi y col., 2001). Esta característica le permite al espermatozoide desplazarse en el oviducto que conjuntamente con la ayuda del epitelio del oviducto permite el transporte del gameto hasta la región de su encuentro con el óvulo (DeMott y Suarez, 1993).

El líquido eyaculado del pene, el semen, consiste de espermatozoides mezclados con las secreciones de las vesículas seminales y la próstata, principalmente. Estas secreciones

proporcionan energía empleada en el movimiento del espermatozoide y neutralizan los líquidos ácidos de la vagina (Audesirk y col., 2003; Ganong, 2004).

Las vesículas seminales son glándulas bilobuladas muy plegadas, con una cubierta muscular y fibrosa, internamente muestra pliegues de forma irregular lo que le confiere una amplia superficie de epitelio secretor. El recubrimiento epitelial está formado principalmente por células cilíndricas altas, que en su citoplasma contiene una gran cantidad de gránulos de secreción, los cuales producen y liberan un líquido alcalino muy viscoso. Así la secreción de las vesículas seminales es una sustancia de color blanco amarillento, el cual contiene fructuosa, fuente de energía de los espermatozoides, prostaglandinas, aminoácidos y fibrinógeno (Audesirk y col., 2003; Ross y col. 2004).

La próstata se encuentra entre la vejiga urinaria y el piso de la pelvis, está compuesta por glándulas periuretrales. Ésta se divide en tres regiones, la zona periférica que representa el 70% de la glándula y comprende la región lateral y posterior del órgano, la zona central que ocupa el 25% y la zona de transición entre la próstata y la uretra, está compuesta por dos pequeños lobulillos y ductos que drenan la parte posterior y lateral de la uretra; produce un líquido que contiene calcio, potasio, cinc, ácido cítrico, enzimas proteicas en particular fosfatasa ácida y fibrinolisisina; éstos últimos dos componentes contribuyen a que el fibrinógeno de la secreción de las vesículas seminales forme en el semen un coágulo débil. Esta secreción prostática es alcalina y ayuda a neutralizar el ambiente ácido del aparato reproductor femenino (Audesirk y col., 2003; Geneser, 2000).

Factores que afectan la Espermatogénesis y Espermiogénesis

Temperatura

Se ha sugerido que la espermatogénesis es afectada por la temperatura, en los mamíferos se presenta un descenso de los testículos hacia el escroto durante el periodo fetal o a principios de la vida post-natal. La situación final de los testículos fuera de la cavidad abdominal, permite que estos órganos permanezcan a una temperatura menor con respecto a la cavidad abdominal. Para lograr esta condición existen por lo menos dos mecanismos, el primero de

ellos, es la acción refrigerante que proporciona la presencia de una gran cantidad de glándulas sudoríparas localizadas en la pared del escroto. El segundo mecanismo, se debe a la acción de un plexo vascular que actúa como un sistema de contracorriente arterial y venosa altamente eficiente que ayuda a disminuir la temperatura de los testículos (Ruiz, 1988).

Agentes biológicos y físicos.

Otros factores que influyen negativamente sobre la espermatogénesis son las deficiencias nutricionales y daño químico asociado a agentes externos (Barrios, 2002). La carencia de vitamina A y sobre todo de vitamina E, altera la espermatogénesis. En la rata la carencia total de vitamina E induce la pérdida completa e irreversible de las espermatogonias. Además cuando el macho es expuesto a radiaciones ionizantes, se destruyen las células sexuales; el daño se observa especialmente en las espermatogonias (Ruiz, 1988).

Regulación endocrina

La regulación de la espermatogénesis requiere la comunicación entre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En la formación de los espermatozoides se requiere de la participación de la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH) y las propias hormonas producidas por el testículo como la testosterona (Audesirk y col., 2003).

Alteraciones en la morfología del espermatozoide

Algunos de los espermatozoides que se forman presentan alteraciones en su funcionamiento y estructura, estas últimas se denominan anomalías espermáticas que se han clasificado en primarias y secundarias (Barrios, 2002). Las anomalías espermáticas primarias se originan dentro del testículo y se deben a fallas en la espermatogénesis. Estos defectos incluyen: espermatozoides con escaso desarrollo, cabeza estrecha o delgada y espermatozoides microcefálicos, macrocefálicos y cabezas libres. La mayoría de los defectos de la cola del espermatozoide también son considerados defectos primarios, entre ellos están el defecto en la pieza media, presencia de gota citoplasmática proximal, cola fuertemente enrollada o doblada y colas accesorias (Chenoweth, 1997, citado en Barrios, 2002) (figura 8).

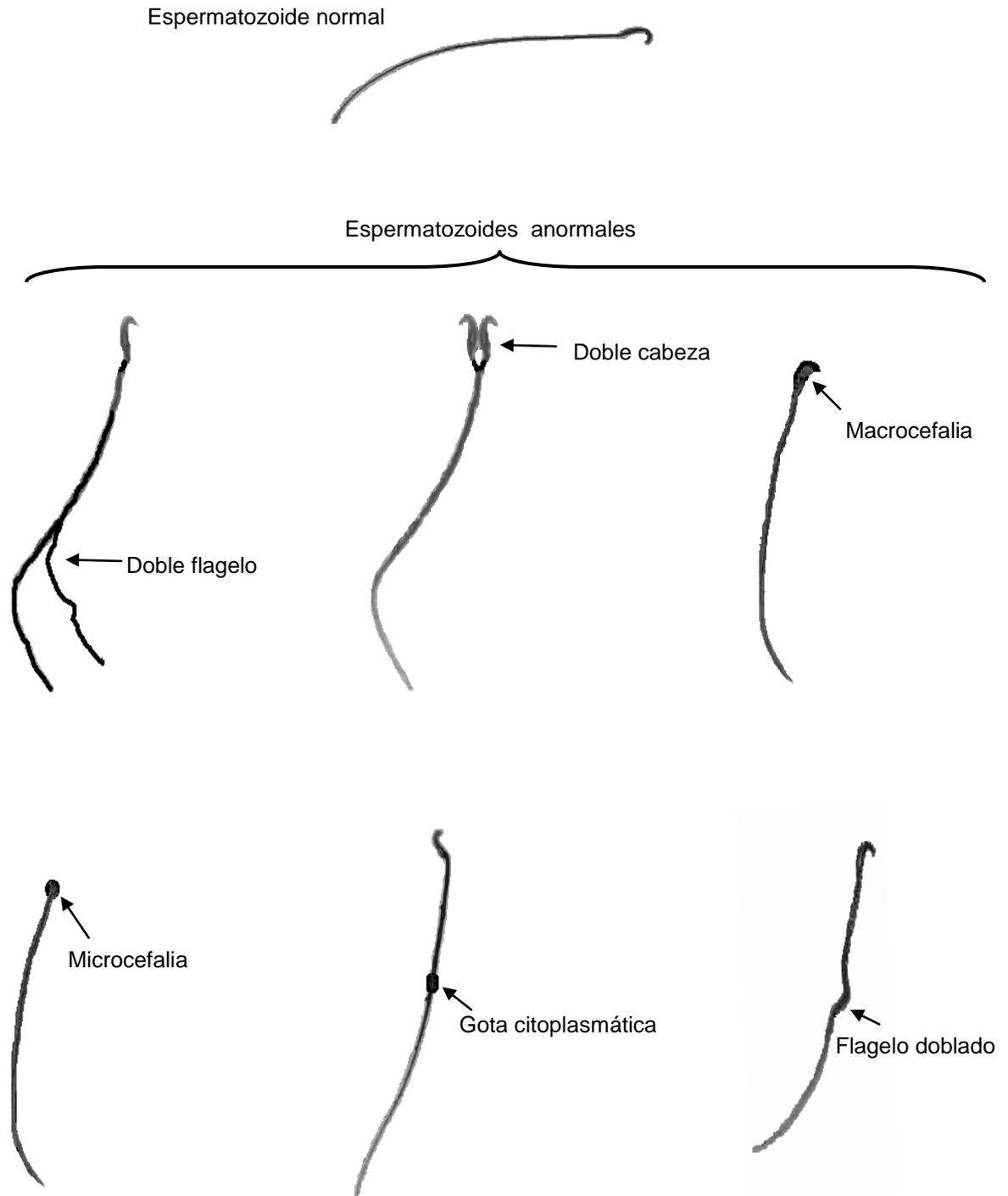


Figura 8. Anormalidades en espermatozoides de rata (Modificado de Nelson, 2002).

Las anomalías espermáticas secundarias son aquellas originadas dentro del epidídimo; entre ellas se encuentran: cabeza ancha, membrana del acrosoma separadas o incompletas, gota citoplasmática distal, colas enrolladas en la porción terminal (Barrios, 2002).

Algunos defectos espermáticos no se pueden definir exactamente como primarios o secundarios, la gota citoplasmática distal y las cabezas sueltas pueden ser defectos originados durante la espermatogénesis (primarios), o como una alteración en la función del epidídimo (Chenoweth, 1997; citado en Barrios, 2002); estos procesos pueden ser alterados por factores como la temperatura escrotal, endocrinopatías, infecciones, toxinas y drogas (Nelson, 2002).

Viabilidad del espermatozoide

El espermatozoide es vulnerable a los factores que ya se mencionaron y estos repercuten no solo en alteraciones morfológicas, también pueden afectar su viabilidad, que se define por el grado de conservación de la membrana espermática que mantiene unidos los componentes intracelulares y la funcionalidad del gameto. Se han desarrollado numerosas técnicas que emplean marcadores para determinar la integridad de la membrana, entre las cuales se encuentra la técnica conocida como *FertiLight*, que utiliza la combinación de dos marcadores, el SYBR-14, que se difunde a través de la membrana celular que tiñe de color verde fluorescente al núcleo, ésta característica permite identificar a los espermatozoides vivos. El segundo marcador es el Ioduro de Propidio (IP) que emite fluorescencia roja cuando se une al ADN de espermatozoides que han perdido la integridad de su membrana, característica de los espermatozoides muertos, y aparentemente reemplaza o desactiva al colorante SYBR-14 (Figura 9); esta técnica es altamente confiable durante la evaluación de espermatozoides viables e inviables en mamíferos (Garner y Johnson, 1995; Silva y Gadella, 2006).

Esteroidogénesis

La esteroidogénesis o síntesis de hormonas esteroideas se lleva a cabo en las células de Leydig. Las principales hormonas producidas por esta célula son los andrógenos que se

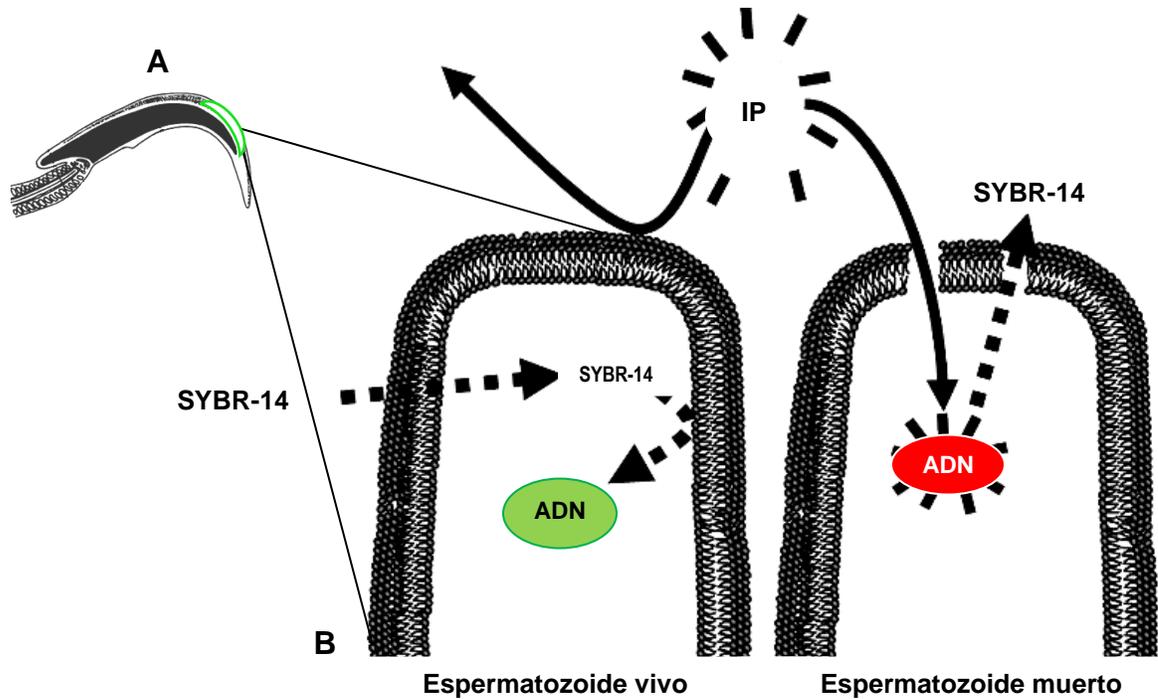


Figura 9. Diferencia entre espermatozoide vivo (viable) con membrana intacta teñido con SYBR-14 y espermatozoide muerto (inviabile) con membrana dañada y teñido con Ioduro de propidio (IP); cabeza de espermatozoide (A), acercamiento a la membrana (B) (Modificado de Silva y Gadella, 2006).

sintetizan a partir del colesterol. Estas células aunque sintetizan el colesterol a partir del Acetil-CoA, lo obtienen fundamentalmente del plasma. A partir de los ésteres de colesterol que forman parte de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se encuentran en circulación y mediante un proceso de endocitosis se incorporan al citoplasma de la célula; los ésteres de colesterol pueden almacenarse en gotas de lípidos o convertirse en colesterol libre que es utilizado en la síntesis. El paso limitante en la esteroidogénesis es la separación de la cadena lateral del colesterol que posteriormente es transformada a pregnenolona. Estas reacciones son estimuladas por la LH (Granner, 1988; Tresguerres, 1999) (Figura 10).

El colesterol es transportado desde la cara externa de la membrana de la mitocondria hasta la interna por la proteína reguladora de la esteroidogénesis, en la mitocondria se realiza la transformación de colesterol a pregnenolona, intervienen los fosfolípidos de membrana y

un péptido activador de la esteroidogénesis. La pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa a 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 $\Delta 4$; La importancia relativa de estas dos rutas varía según la especie (Tresguerres, 1999).

Regulación hormonal de las funciones del testículo

La esteroidogénesis y espermatogénesis son reguladas por las gonadotropinas (FSH y LH) producidas en la hipófisis (Ross y col., 2004; Schoenfeld y col., 2001). La síntesis de las gonadotropinas por la hipófisis es modulada por el hipotálamo vía la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la cual es secretada en el hipotálamo y liberada al sistema porta en la eminencia media. La GnRH se transporta por un sistema de vasos sanguíneos y al unirse a sus receptores de membrana en los gonadotropos, estimula la síntesis de las gonadotropinas (Smith y Jenness, 2001). El blanco de la FSH es la célula de Sertoli y de la LH es la célula de Leydig (Tresguerres, 1999).

La FSH participa en el establecimiento y maduración de las células de Sertoli, también estimula la división de espermatogonias y el inicio de la primera división meiótica, la LH actúa sobre las células de Leydig y estimula la secreción de testosterona, hormona que es esencial para la transformación de las espermátidas redondas a alargadas (elongación) así como en la adecuada adhesión a las células de Sertoli. Estas hormonas no actúan separadamente sino que combinan sus efectos (Figura 11) (Griswold, 1995; McLachlan y col., 1996).

La importancia de las gonadotropinas producidas por la hipófisis en el mantenimiento de la estructura y funciones del testículo se comprobó cuando después de extirpar la hipófisis (hipofisetomía), el revestimiento epitelial de los túbulos seminíferos se desorganiza, los testículos disminuyen de tamaño, retornan a la cavidad abdominal y ya no se producen espermatozoides, lo que llevó a proponer que tanto la FSH, como la LH son necesarios en la producción de espermatozoides (Ruiz, 1988; Audesirk y col., 2003).

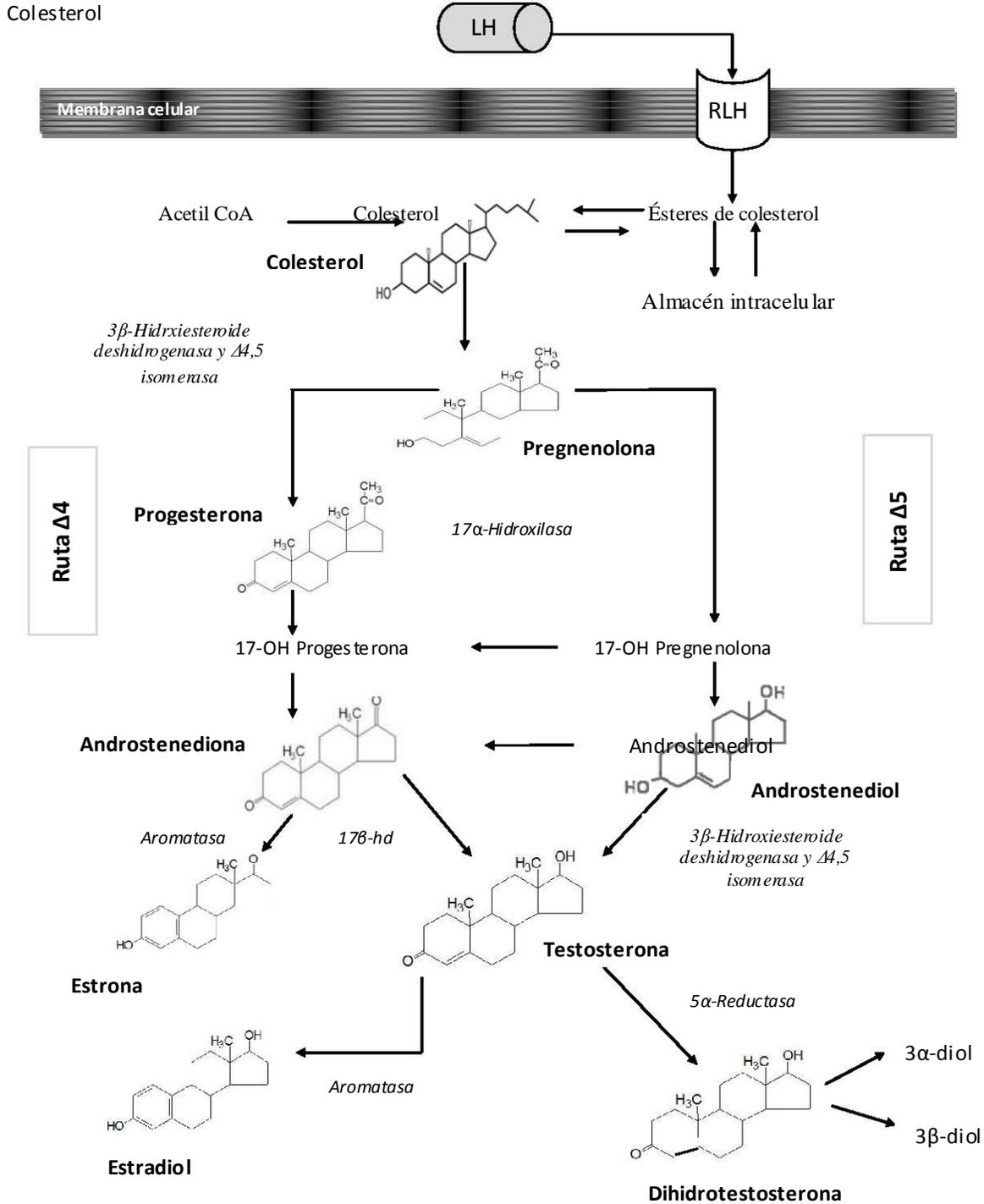


Figura 10. Representación esquemática de la esteroidogénesis; hormona luteinizante (LH), receptor de hormona luteinizante (RLH), coenzima A (CoA), 17 hidroxilasa (17OH), receptor para hormona luteinizante (RLH), coenzima A (CoA), 17 hidroxilasa (17OH), 17-β hidroxiesteroide deshidrogenasa (Modificado de Treguerres, 1999).

En estudios con ratas hipofisectomizadas o con administración de un antagonista para GnRH, el número de células germinales disminuye. El tratamiento con FSH restablece, parcialmente, la espermatogénesis debido a que se observa un incremento en el número de espermatogonias además de promover la subsiguiente maduración hasta la etapa de espermátide redonda, sin embargo, el alargamiento de las espermátides no es restablecido por la FSH, por lo que se sugirió la necesidad de un factor adicional, la testosterona (McLachlan y col., 1995). Se plantea que la recuperación en la producción de espermátides en la rata, después del tratamiento hormona con FSH se asocia con la conservación del citoesqueleto de las células de Sertoli, a la especialización ectoplásmica y a la correcta unión entre éstas y las células germinales (Muffly y col., 1994). Además se sugiere que la FSH actúa como factor de sobrevivencia y como mitógeno (McLachlan y col., 2002).

Beardsley y O'Donnell (2003), mostraron que la liberación de las espermátides elongadas de las células de Sertoli y el paso de los espermatozoides hacia la luz del túbulo seminífero (espermiación) no se presenta cuando disminuye la concentración de FSH y T. Los autores proponen que la falla en el desprendimiento de la espermátida-Sertoli participa la proteína β_1 -integrina que medía el mecanismo de "perdida de adhesión". Durante la falla en la espermiación las espermátidas elongadas son retenidas y fagocitadas por las células de Sertoli. Además, se ha mostrado que sucede un efecto opuesto a lo antes mencionado debido a que en algunas ocasiones se produce el desprendimiento prematuro de las espermátides redondas de la célula de Sertoli (Figura 12), y por lo tanto no continua el desarrollo en el ciclo del epitelio seminífero, ya que no prosiguen las etapas VII y VIII, que se caracterizan por tener un alta expresión de proteína receptora de andrógeno; el evento más importante que tiene lugar en estos estadíos, es la fase de maduración en la cual las espermátidas experimentan diversas modificaciones morfológicas y estructurales que dan lugar a los espermatozoides que se liberan a la luz tubular (Etapa-VIII); se ha sugerido que estos procesos son dependientes de la testosterona (McLachlan y col., 1996; McLachlan y col., 2002; O'Donnell y col., 1996).

Otra hormona que participa en la regulación de la espermatogénesis, es la LH, Madhwa Raj y Martin, (1976) mostraron que tras la administración diaria del antisuero de LH a ratas macho

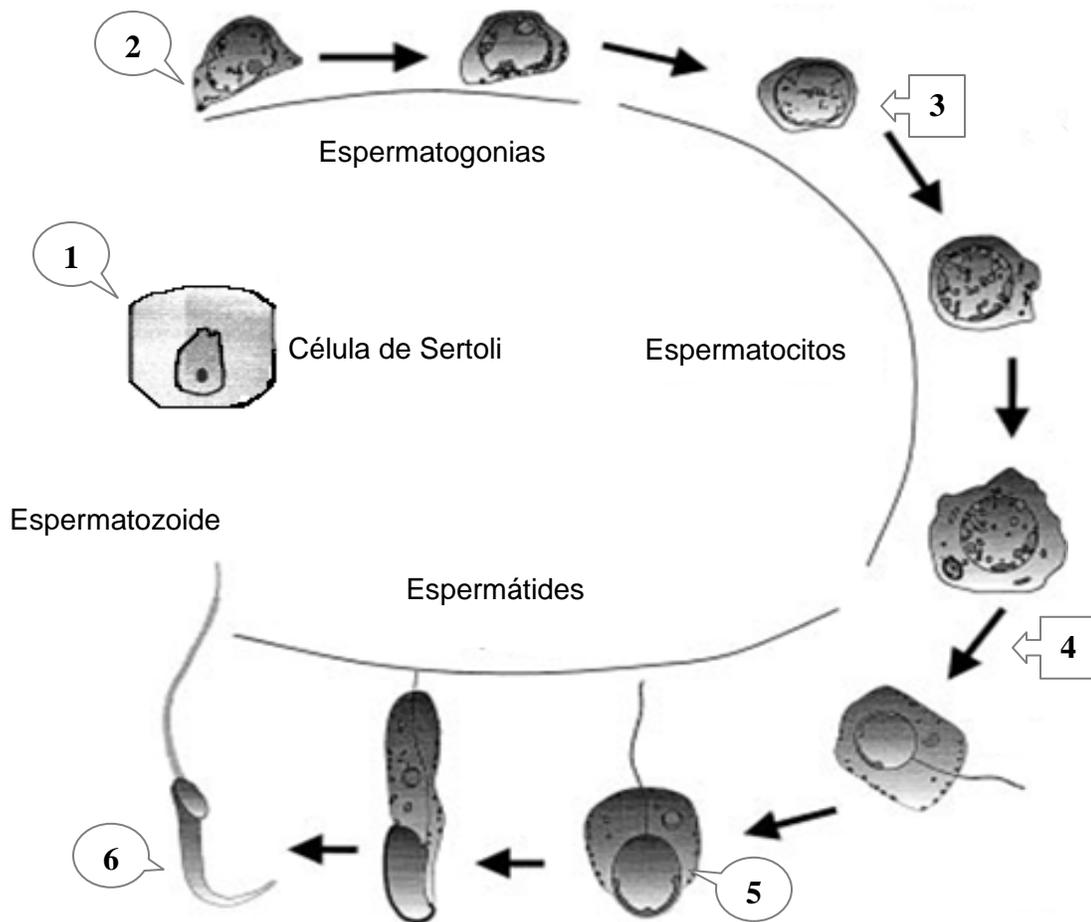


Figura 11. Diagrama que ilustra los sitios de acción de la hormona foliculo estimulante (FSH) y testosterona (T) en la espermatogénesis, se indica en círculos los efectos específicos y las acciones comunes y/o sinérgicas en rectángulos. La FSH se requiere en el establecimiento del número de células de Sertoli (1) y en la multiplicación de las espermatozonias (2). Conjuntamente FSH y T actúan favoreciendo el inicio de la meiosis y supervivencia de espermatozitos (3). La T ayuda en la producción de espermátidas redondas (4), en la adhesión de espermátidas redondas a las células de Sertoli (5) y en la espermiación (6) (Modificado de McLachlan y col., 2002).

de 20 días de edad y sacrificadas 14 días después, se observó la disminución en el tamaño de las células de Leydig, diámetro de los túbulos seminíferos, el número de células germinales y la concentración de testosterona. Por lo que los autores concluyeron que esta gonadotropina, es necesaria para mantener la estructura del testículo y la espermatogénesis de manera indirecta vía la estimulación de la secreción de testosterona.

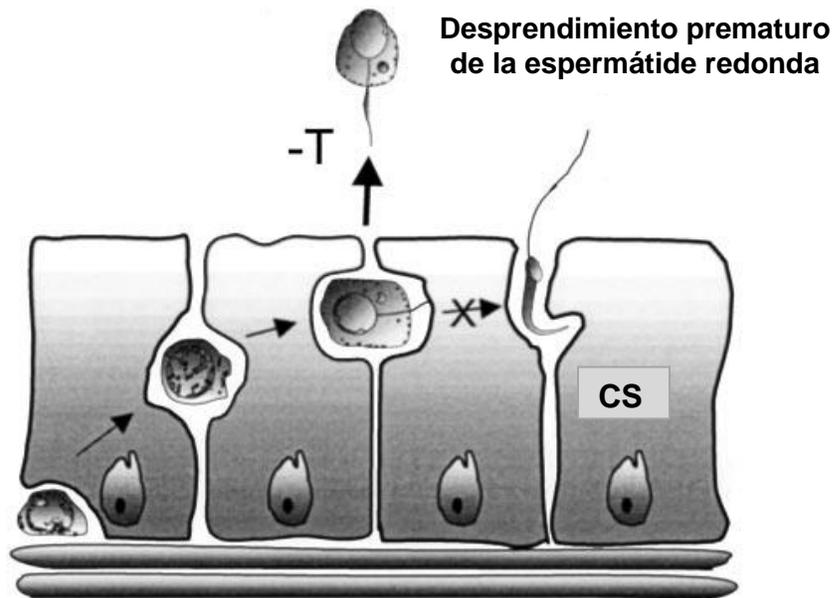


Figura 12. Relación espermátide redonda-epitelio seminífero y pérdida de unión a la célula de Sertoli (CS), lo que ocasiona el desprendimiento prematuro de ésta célula germinal y por lo tanto es incapaz de completar su maduración; efecto resultante de la disminución (-) en la secreción de testosterona (T) (Modificado de McLachlan y col., 2002).

La testosterona es importante en el proceso de espermatogénesis debido a que estimula la secreción de algunas proteínas por las células de Sertoli, ejemplo la proteína unidora de andrógeno, participa en el establecimiento, mantenimiento y restablecimiento de la espermatogénesis. Además interviene en el complejo hipotálamo-hipófisis, donde regula la liberación de LH (Sharpe y col., 1992; Tresguerres, 1999).

Muffly y colaboradores (1994), mostraron que, cuando a ratas macho adultas se les administra un anticuerpo contra GnRH, disminuye la concentración de LH, FSH y testosterona, así como el número de espermatogonias. Cuando a estos animales posteriormente se les administra FSH se restablece la multiplicación de las espermatogonias y se promueve la subsecuente maduración hasta el estado de espermátide redonda pero la transformación de ésta a espermatozoide ya no se presenta.

Estos resultados llevaron a los autores a proponer que además de la FSH, se requiere de un factor adicional, la testosterona, que favorece la conclusión de la espermatogénesis. Posteriormente McLachlan y col., 1995 demostraron que cuando disminuye la secreción de testosterona, la transformación del espermatozoido a espermátide redonda, paso I al VII del ciclo del epitelio seminífero se lleva a cabo normalmente. Mientras que la elongación de la espermátide redonda (paso VII a VIII) no prosigue, lo que indica que se requieren altas concentraciones de testosterona para que se lleve a cabo la espermiogénesis, idea que fue apoyada posteriormente por O'Donnell y colaboradores (1996).

Con base en las evidencias antes mencionadas se sugiere que la maduración de las espermatogonias depende de la presencia de FSH y la espermiogénesis es regulada por la testosterona y LH, mientras que la espermiación requiere de la FSH y testosterona (Matthiesson y col., 2006; Sharpe, 1994).

Estas gonadotropinas también participan en la esteroidogénesis, FSH la aumenta por doble mecanismo, incrementa el número de receptores de LH de las células de Leydig, y estimula la síntesis por las células de Sertoli del factor estimulante de la esteroidogénesis o de las células de Leydig (Tresguerres, 1999). La LH actúa en la célula de Leydig y estimula la producción de testosterona. Esta hormona al interactuar con sus receptores de membrana, activa la enzima adenilato ciclasa lo que incrementa la formación de AMPc segundo mensajero que activa los complejos enzimáticos que participan en la síntesis de testosterona a partir del colesterol (Ganong, 2006; Tresguerres, 1999).

Eje hipotálamo-hipófisis

El funcionamiento del aparato reproductor del macho requiere de la comunicación entre el sistema nervioso central, el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. Las señales hormonales y neuroquímicas transmiten la información entre el hipotálamo, hipófisis, células de Leydig, células de Sertoli y el epitelio germinal (Amman, 1986) (Figura 13).

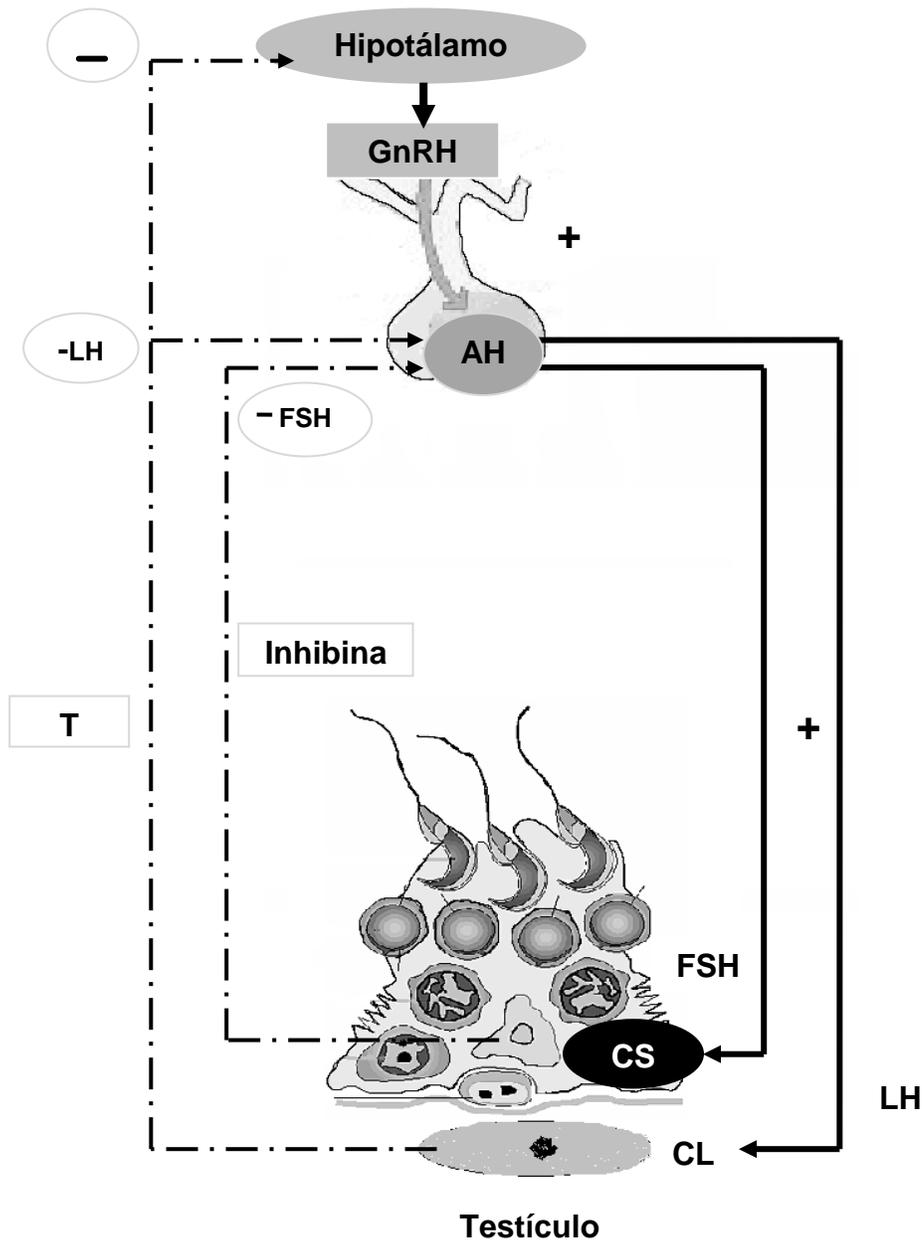


Figura 13. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo, la GnRH producida por el hipotálamo estimula a la adenohipófisis en la liberación de LH y FSH. La primera activa la síntesis de testosterona por las células de Leydig, y la FSH actúa en las células de Sertoli y favorece la espermatogénesis. La testosterona e inhibina inhiben la liberación de LH y FSH respectivamente; adenohipófisis (AH), célula de Sertoli (CS), célula de Leydig (CL), hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH), testosterona (T), + estimula, -inhibe (Modificado de Curtis, 2002; O`Donnell y col., 2006).

El hipotálamo está formado por grupos de neuronas que se denominan núcleos, entre estos, el área preóptica, los núcleos preóptico medial, anterior, ventromedial y arcuato, se han identificado neuronas que secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Silverman y col., 1994). Estas neuronas envían su innervación a la eminencia media, donde liberan la GnRH hacia el sistema porta-hipofisiario, que establece contacto con el sistema de vasos que irrigan la adenohipófisis y transporta hacia ella la GnRH y como consecuencia regula la secreción de las gonadotropinas (Smith y Jennes, 2001). La secreción de la GnRH es modulada a su vez por diferentes sistemas de neurotransmisión como las catecolaminas, el ácido gamma amino butírico, neuropéptido Y, glutamato y serotonina entre otros. En relación a la serotonina varios estudios anatómicos sustentan la existencia de interrelaciones entre las neuronas que secretan GnRH y las que secretan serotonina (Jennes y col., 1982; Justo y col., 1989; Kordon y col., 1994; Smith y Jennes, 2001) (Figura 14).

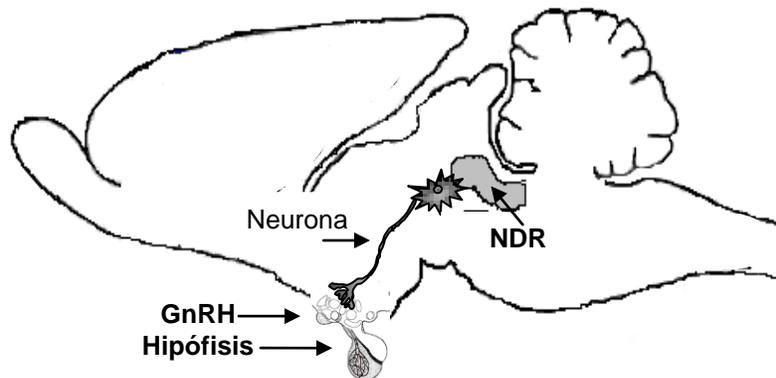


Figura 14. Esquema representativo de la comunicación entre neuronas serotonérgicas y las que secretan GnRH en un corte sagital del cerebro de rata; Núcleo dorsal del raquídeo (NDR); hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Modificado de Stig, 2007).

Serotonina

La serotonina ó 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una amina que se encuentra distribuida en el reino animal. Se le encuentra en vertebrados, moluscos, artrópodos y en algunas frutas comestibles como las nueces. La mayor parte de serotonina en el organismo se localiza en las células cromafines de la mucosa gastrointestinal, en las plaquetas, en el testículo y en el

sistema nervioso central. En esta última región es producida por la glándula pineal y por el núcleo del rafe. La 5-HT participa en la modulación de la secreción de algunas hormonas, en la regulación de la temperatura corporal, del sueño, del apetito; también participa en la regulación del funcionamiento del sistema nervioso central, cardiovascular y en el sistema gastrointestinal (Tryce, 1985; Tinajero y col., 1993; Velasco, 1999).

En el sistema nervioso central las neuronas serotoninérgicas se agrupan en nueve paquetes, designados del B1 al B9 y conjuntamente constituyen el núcleo del rafe. Este núcleo se localiza en el cerebro medio y se divide en dorsal (NDR), medial (NMR) y del puente (NPR) (Velasco, 1999). La principal fuente de serotonina del hipotálamo proviene de neuronas serotoninérgicas cuyos somas se localizan en el NDR Y NMR.

La serotonina se encuentra en todo el cuerpo pero ésta no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que el cerebro produce la propia. La síntesis de la amina depende del aporte de un aminoácido, el triptófano, proveniente de la dieta. Una vez incorporado el aminoácido a la neurona serotoninérgica, es hidroxilado por acción de la enzima, triptófano hidroxilasa, dando origen al 5-hidroxitriptófano. La serotonina se forma por descarboxilación del 5-hidroxitriptófano, reacción que es catalizada por la enzima descarboxilasa. La amina es liberada a la hendidura sináptica y parte es recapturada por la neurona serotoninérgica, en donde se metaboliza por medio de la monoaminoxidasa (MAO) y el producto de este catabolismo es el ácido 5-hidroxi-indolacético (5HIAA) (Mendoza, 2008) (Figura 15).

Las neuronas serotoninérgicas que se localizan en el NDR proyectan sus axones a diferentes regiones del hipotálamo, como el área preóptica, los núcleos ventromedial, supraquiasmático, arcuato y eminencia media donde se han encontrado neuronas que secretan GnRH (Jennes y col., 1982; Soghomonian y col., 1988). Diversos autores sugieren que la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR interactúa con el sistema GnRH del hipotálamo, interviene en su modulación, la de las gonadotropinas y como consecuencia en la espermatogénesis (Das y col., 1985; Justo y col., 1989; Van Der Kar y col., 1980; Pinilla y col., 1994).

Sin embargo, no existen evidencias claras que muestren la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de las gonadotropinas y espermatogénesis. En algunos

estudios se ha sugerido que la serotonina ejerce un papel en la modulación del eje hipotálamo hipófisis-testículo. A la serotonina se le ha atribuido un efecto inhibitorio o estimulante sobre la secreción de las gonadotropinas, efecto que al parecer depende de la edad y del sexo del animal (Aragón y col., 2005; Justo y col., 1989; Moguilevsky y col., 1985).

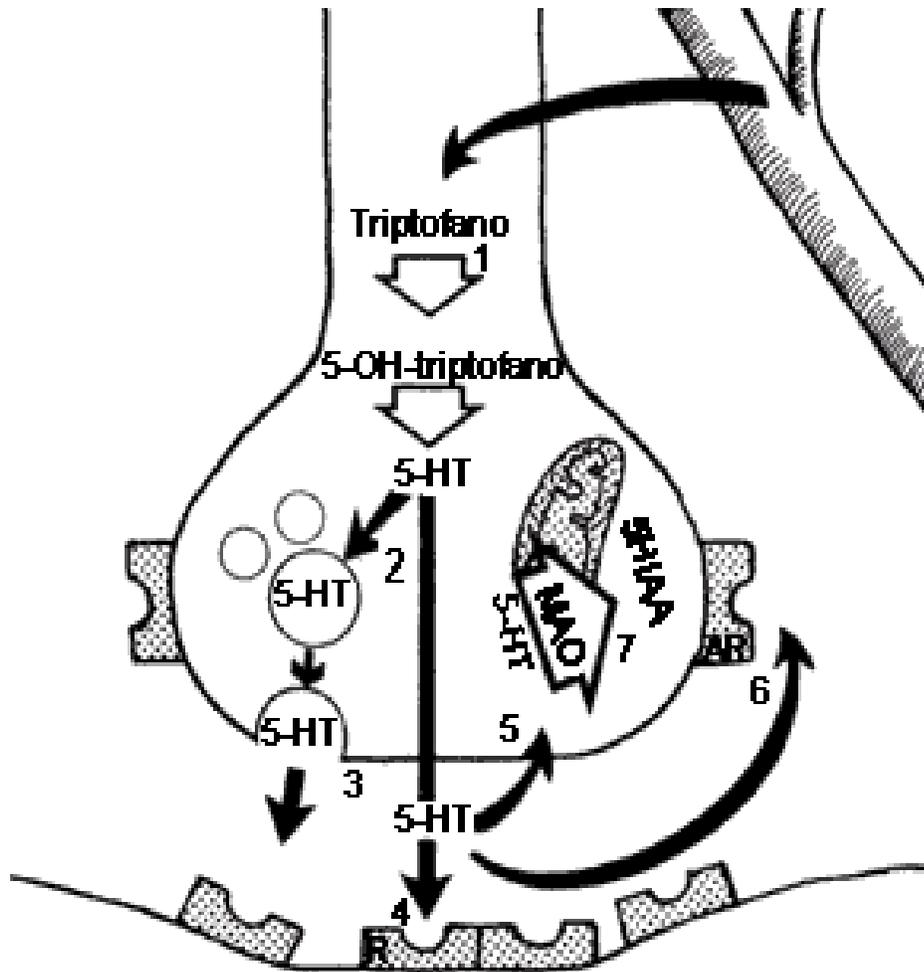


Figura 15. La sinapsis serotoninérgica, 1) enzima triptófano hidroxilasa, 2) almacenamiento en vesícula, 3) liberación, 4) receptor postsináptico, 5) recaptura, 6) autorreceptores, 7) metabolismo. 5-hidroxi (5-OH); 5-hidroxitriptamina (5-HT); monoaminooxidasa (MAO); ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) (Tomado de Braylowsky, 2002).

Ruzsas y colaboradores (1982), mostraron que cuando a la rata macho adulta se le administra 5-hidroxitriptofano (5-HTP), precursor de la síntesis de serotonina, y fluoxetina, inhibidor específico de la recaptura de 5-HT aumenta la concentración de LH en el suero. Sin embargo, cuando se inyecta el 5-HTP vía intraperitoneal a ratas macho de 16, 26, 30 ó 60 días de edad se incrementa la secreción de FSH, pero este efecto no se presenta a los 18 y 20 días de edad (Justo y col., 1989). Cuando se inyecta el 5-hidroxitriptofano a ratas hembras de 14,16 ó 20 días de edad, se estimula la secreción de LH y no se modifica la de FSH (Arias y col., 1990; Moguilevsky y col., 1985).

Por otra parte cuando se inhibe la síntesis de serotonina por la administración de p-clorofenilalanina (PCPA) a ratas macho de 30 y 34 días de edad resulta en la inhibición de la esteroidogénesis y espermatogénesis 30 días postratamiento (Shishkina y Borodin, 1989). Otro grupo de trabajo mostró que la administración intraperitoneal de p-cloroanfetamina (pCA), inhibidor serotoninérgico, a ratas macho de 30 días de edad no modificó la concentración de LH y testosterona, pero aumentó FSH, además observaron la disminución en el porcentaje de movilidad, viabilidad y número de espermatozoides (Aragón y col., 2005).

Collu y colaboradores (1978), mostraron que cuando a la rata macho prepúber se le administra intraventricularmente el neurotóxico selectivo de las neuronas serotoninérgicas, 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT), disminuye la concentración de FSH en suero. Otros autores observaron que después de la inyección intraventricular de 5,6-dihidroxitriptamina la concentración de serotonina en cerebro y de testosterona en plasma disminuyen, aunado a esto se presenta una reducción en el conteo de espermátidas en el paso 7, posteriormente la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) previene parcialmente la degeneración de espermátidas en el paso 7 e incrementa la concentración de testosterona sin alterar la concentración de serotonina. Esto posiblemente se debe a que se favoreció el incremento del índice mitótico y se redujo la degeneración de las espermatogonias en la rata prepúber (Das y col., 1985).

Otro grupo de trabajo mostró que la concentración de LH en plasma y de serotonina en hipotálamo disminuyó en los animales a los que se les inyectó 5,7-dihidroxitriptamina, (fármaco que destruye las terminales serotoninérgicas y noradrenérgicas), en el núcleo dorsal del rafe. Por lo que se sugiere que en la rata macho la vía serotoninérgica originada del núcleo dorsal del rafe, inerva el área preóptica, el núcleo ventromedial y arcuato, modula la secreción de gonadotropinas por acción sobre las neuronas productoras de GnRH (Van Der Kar y col., 1980). Con base en estos resultados los autores sugieren que la serotonina es necesaria en el desarrollo de la espermatogénesis en la rata prepúber y que el efecto diferencial de la serotonina sobre la secreción de gonadotropinas durante el desarrollo prepúber de la rata macho está relacionado con el medio hormonal.

Durante el desarrollo prepuberal, se establecen las interconexiones anatómicas y funcionales entre los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, los cuales son esenciales, permitiendo que la gónada cumpla sus funciones, producción de espermatozoides y secreción de hormonas. En particular en la rata macho de 30 días de edad se produce un incremento en la concentración de testosterona y dihidrotestosterona en plasma, mientras que la concentración de androstenediol disminuye. La concentración de FSH en plasma se incrementa entre el día 30 y 35 de edad. Este aumento en la concentración de FSH es necesaria en el inicio del proceso de espermatogénesis, esta gonadotropina junto con la testosterona participa en la producción de la primera oleada de espermatozoides, los cuales no se encuentran en el epidídimo y conducto deferente sino hasta los 60 a 65 días de edad. También el incremento en esta gonadotropina es importante debido a que induce la formación de los receptores a la LH en las células de Leydig, lo cual a su vez incrementa la producción de testosterona por el testículo (Adams y Steiner, 1988; Ojeda y Urbansky, 1994).

JUSTIFICACIÓN

La principal fuente de inervación serotoninérgica en el hipotálamo se origina en el NDR. Por lo que se sugiere que esta amina participa en la modulación de la secreción de las gonadotropinas y como consecuencia en las funciones del testículo. Sin embargo, no existe información clara sobre la participación de ésta inervación en la modulación de la espermatogénesis. Por ello, en el presente trabajo se analizaron los efectos de la microinyección de la 5,6-DHT en el NDR de la rata macho de 30 días de edad sobre la concentración de serotonina, FSH, LH y testosterona, así como en el número, viabilidad, movilidad y anormalidad espermática de la rata.

Así mismo, con la finalidad de analizar si los efectos que se observen en este trabajo experimental, inducidos por la microinyección de la 5,6-DHT, son el resultado de alteraciones en el sistema serotoninérgico y no de otro sistema de neurotransmisión, como las catecolaminas, se cuantificaron las concentraciones de noradrenalina y dopamina en el hipotálamo de estos animales.

HIPÓTESIS

Si la serotonina participa en la modulación de la secreción de las gonadotropinas, esenciales en las funciones del testículo; la lesión de la innervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR de la rata macho prepúber, se traducirá en la disminución de la concentración de serotonina, FSH, LH y testosterona, así como en el número, viabilidad, movilidad y forma normal de los espermatozoides de rata.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la lesión química de la innervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR, por medio de la microinyección de la 5,6-dihidroxitriptamina en este núcleo, sobre la modulación en la concentración de FSH, LH y testosterona, así como en la espermatogénesis de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafe en la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior y medio de la rata macho prepúber.
- Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafe en la relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo anterior y medio de la rata macho prepúber.
- Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafe en la concentración de catecolaminas (noradrenalina y dopamina) en el hipotálamo de la rata macho prepúber.
- Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafe de la rata macho prepúber en el número de espermatozoides, viabilidad y movilidad.
- Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafe de la rata macho prepúber en el porcentaje de espermatozoides normales y anormales.
- Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafe de la rata macho prepúber en la concentración de FSH, LH y testosterona en suero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho de 30 días de edad de la cepa CII-ZV (70-90 g de peso) mantenidas bajo condiciones controladas, 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad con libre acceso a la madre hasta el destete (21 días) y posteriormente al agua y alimento (Purina chow). Los animales fueron asignados al azar para uno de los siguientes grupos:

- Grupo testigo absoluto

Animales que no recibieron tratamiento y fueron sacrificados a los 65 días de edad.

- Grupo fármaco

La lesión del NDR se efectuó entre las 10:00 y 12:30 horas. Antes de la intervención los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Anestosal, Smith Kline Norden de México, México) (40 mg/Kg de peso) vía intraperitoneal, se colocaron en un aparato estereotáxico, se realizó un corte sobre la piel de la cabeza, se perforó el cráneo con una fresa odontológica y se introdujo una aguja de microinyección hasta el NDR (Figura 16), Las coordenadas para la introducción de la aguja de microinyección se calcularon tomando como referencia el Atlas de Paxinos y Watson (1982). La aguja se conectó, vía tubular, a una jeringa Hamilton acoplada a una bomba de microinyección, la dosis de 5,6-DHT administrada fue de 10µg disueltos en 2.5 µL de ácido ascórbico al 0.05 %. El fármaco se inyectó a una velocidad de 1µL/minuto.

- Grupo vehículo

Los animales fueron anestesiados y colocados en un aparato estereotáxico. Se abrió piel, se perforó cráneo y se introdujo la aguja de microinyección siguiendo los mismos parámetros utilizados en el grupo fármaco; pero únicamente se inyectaron 2.5 µL de ácido ascórbico a la misma velocidad que el fármaco.

Procedimiento de autopsia

El sacrificio de los animales se realizó entre las 12:00 y 13:00 horas por decapitación a los 65 días de edad, etapa en la que es posible obtener los espermatozoides de los conductos deferentes. Se colectó la sangre del tronco, se dejó coagular a temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos, se colectó el suero que se almacenó a -20°C hasta el día de la cuantificación de FSH, LH y testosterona. Durante el sacrificio el cerebro fue rápidamente removido y colocado en solución salina fría, después se congeló en nitrógeno líquido y se realizaron cortes coronales del cerebro para la disección del hipotálamo anterior, medio y posterior (Figura 17). Las muestras se almacenaron -70°C hasta la cuantificación de serotonina, y catecolaminas (noradrenalina y dopamina) por la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).

Cuantificación de FSH, LH y testosterona en el suero

La cuantificación de FSH y LH en suero se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo. Los anticuerpos que se emplearon fueron NIDDK-rFSH-RP-2 y NIDDK-rLH-RP-3 respectivamente, la concentración de ambas hormonas se expresó en nanogramos por mililitro de suero (ng/mL). La cuantificación de testosterona se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, se utilizó un kit coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA USA). La concentración de testosterona se expresó en ng/mL.

Cuantificación de serotonina y 5-HIAA

La concentración de 5-HT, del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), dopamina (DA), ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC), noradrenalina (NA) y del ácido 4-hidroxi 3 metoxifeniletiletilenglicol (MHPG) se cuantificó siguiendo la metodología descrita previamente por (Ayala y col., 1998). Las muestras de tejido del hipotálamo anterior, medio y posterior se pesaron individualmente en una balanza de precisión y colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL, a cada muestra se le agregaron 300 µL de ácido perclórico (HClO₄) 0.1 N (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), posteriormente se homogenizaron por sonicación en

frío, se centrifugó a 12,000 r.p.m. a -4°C por 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de celulosa de tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$ (Millipore Bedford, MA, EUA) y se tomó una alícuota de $20\ \mu\text{L}$ que se inyectó al (HPLC) (Figura 18).

El sistema de cromatografía se calibró con una curva estándar para los diferentes neurotransmisores a las siguientes concentraciones 0.1, 0.5 y 1 ng; con rango de 0.1ng a 2 ng/ μL . Los diferentes neurotransmisores de las muestras problema se identificaron al comparar los tiempos de retención comparados con los estándares de concentraciones conocidas. Los resultados se expresaron como nanogramos de neurotransmisor por miligramo de tejido. La sensibilidad fue de 0.01ng. La actividad serotoninérgica se calculó siguiendo lo descrito por Kerdelhue y col., 1989, citado en Ayala y col., 1998.

$$\text{Actividad} = 5\text{-HIAA}/5\text{-HT}$$

Evaluación de la espermatogénesis

Movilidad

En el momento de la autopsia se efectuó la disección de los conductos deferentes, se extrajo el contenido de los mismos, se colocó en un tubo eppendorf, al que previamente se le agregaron $500\ \mu\text{L}$ de solución tirodes (Sigma) y se mantuvo a una temperatura de 37°C . De esta suspensión espermática homogénea se tomó una alícuota de $20\ \mu\text{L}$, la cual se colocó en un portaobjetos limpio precalentado a 37°C . Con el uso de un microscopio óptico a 10X, se contó el número de espermatozoides que presentaron movimiento rectilíneo y ondulado del flagelo, así como aquellos que permanecieron inmóviles; se contaron 100 células por animal. Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides móviles e inmóviles.

Viabilidad

La viabilidad fue evaluada mediante el uso de la técnica *FertiLight* se colocó $250\ \mu\text{L}$ de la suspensión espermática en un tubo eppendorf al cual se adicionó $1\ \mu\text{L}$ de SYBR-14 y $1.3\ \mu\text{L}$ de Ioduro de Propidio (Sigma), de esta suspensión se tomó una alícuota de $15\ \mu\text{L}$ la cual se colocó en un portaobjetos. Las evaluaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. Se contaron 100 espermatozoides por animal. Los resultados se expresaron como porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

Número de Espermatozoides

El conteo espermático se determinó colocando 10 μL de la suspensión espermática en la cámara de Neubauer (Figura 21). Con ayuda de un microscopio óptico a 40x se contó el número de espermatozoides en 5 cuadrantes. El número de espermatozoides de los 5 cuadrantes se promedió y los resultados se expresaron como 1×10^6 células en un mL de líquido espermático siguiendo el método propuesto por (Aragón y col., 2005).

Anormalidades

Se tomaron 20 μL de la suspensión espermática y se colocaron en un portaobjeto limpio, efectuándose un barrido sobre el portaobjetos (Figura 22), se dejó secar la preparación y se procedió a realizar la tinción con la técnica de hematoxilina-eosina. Posteriormente se continuó con la evaluación de 100 espermatozoides por laminilla. Los resultados fueron registrados como porcentaje de formas normales y anormales y porcentaje de cada forma anormal. Las formas anormales se clasificaron siguiendo los criterios marcados por (Wyrobek y Bruce, 1975).

Análisis estadístico de resultados

La concentración de hormonas, neurotransmisores, actividad serotoninérgica y número de espermatozoides se analizaron por la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) seguida por la prueba de Tukey. El porcentaje de espermatozoides móviles, no móviles, viables, no viables, formas normales y anormales se analizó por la prueba de Ji cuadrada. Así mismo, se realizó un análisis de correlación entre las concentraciones de serotonina en el hipotálamo y de FSH, LH y testosterona en el suero y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideraron significativas las diferencias cuando la probabilidad fue menor a 0.05.

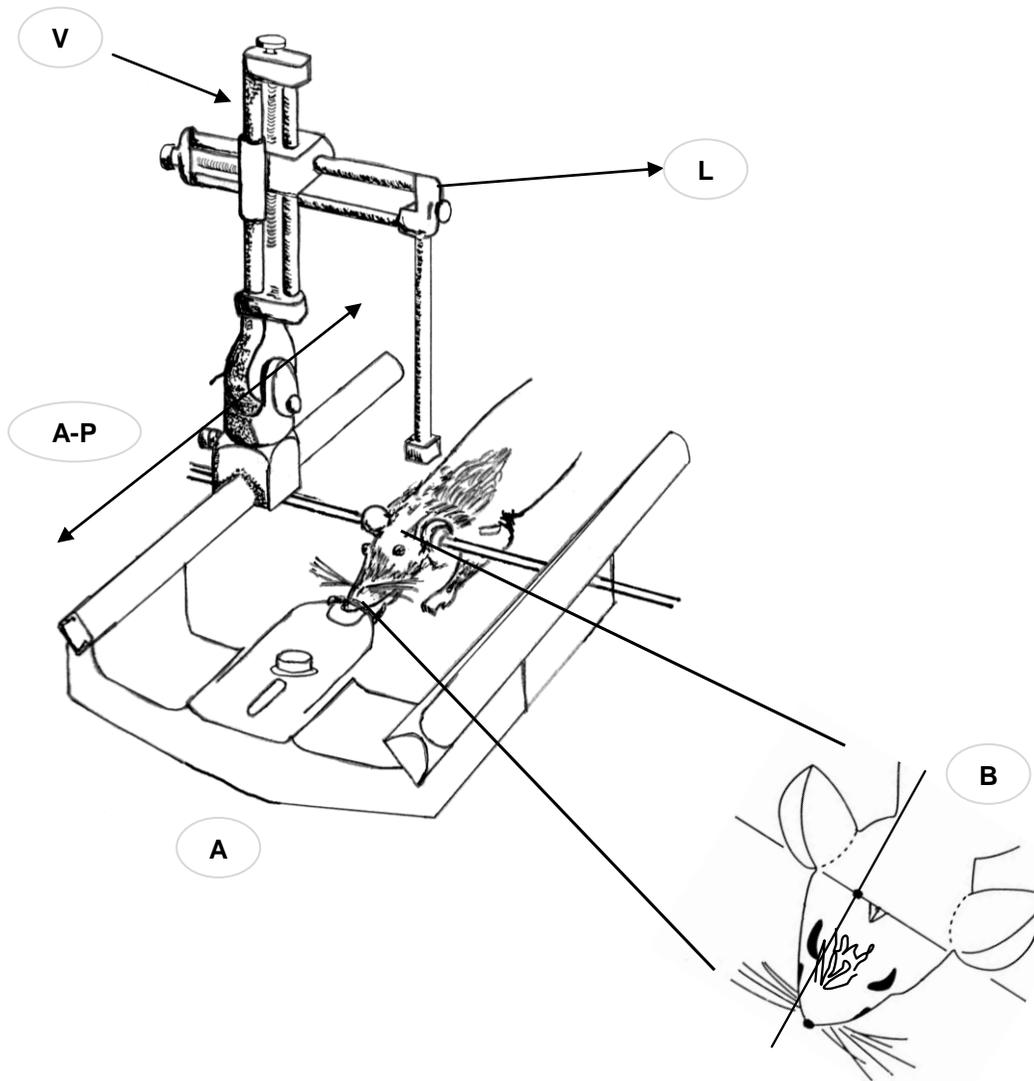


Figura 16. Rata en aparato estereotáxico (A); vista coronal de la cabeza de rata, donde se muestra la zona para perforar e introducir aguja de microinyección (B), plano lateral (L), ventral (V) y antero-posterior (A-P) (Modificado de Hedrich, 2004).

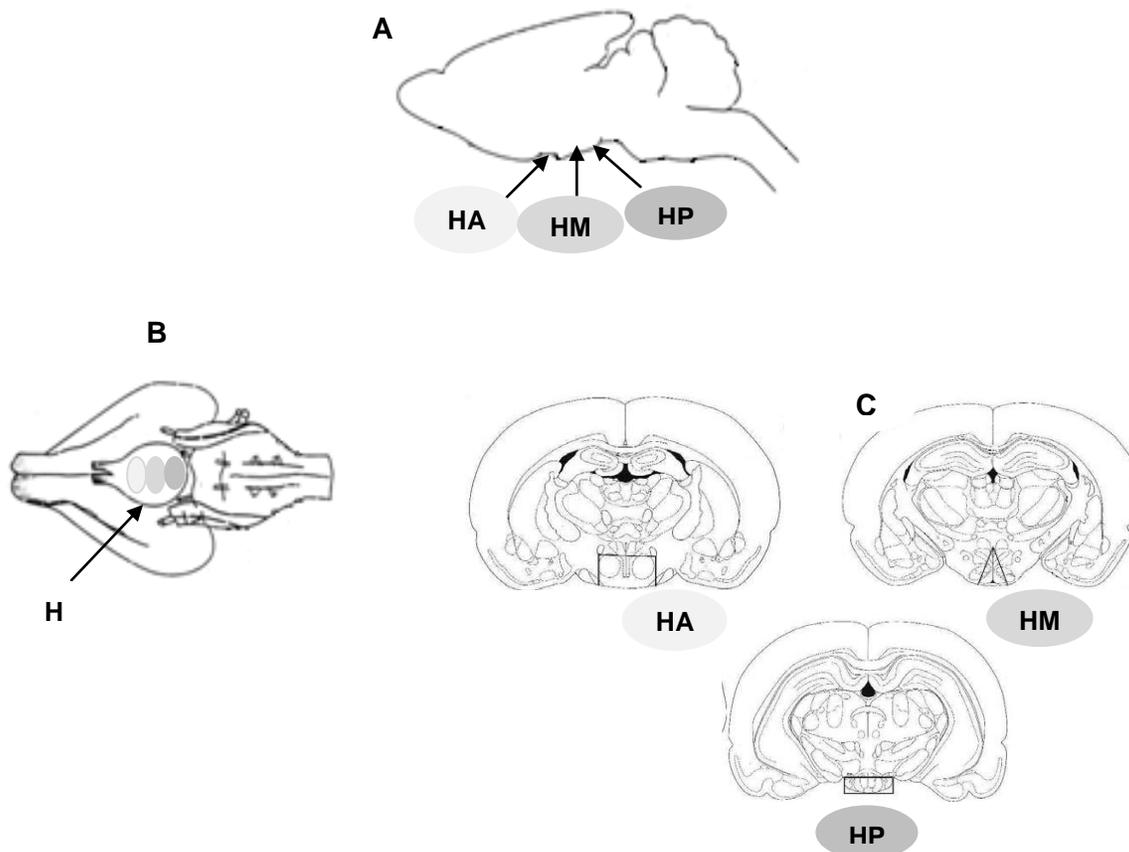


Figura 17. Vista sagital A, vista ventral B, cortes coronales del cerebro de rata C, indicando la ubicación del hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM), e hipotálamo posterior (HP), hipotálamo (H) (Modificado de Paxinos y Watson, 1982; Hedrich, 2004).

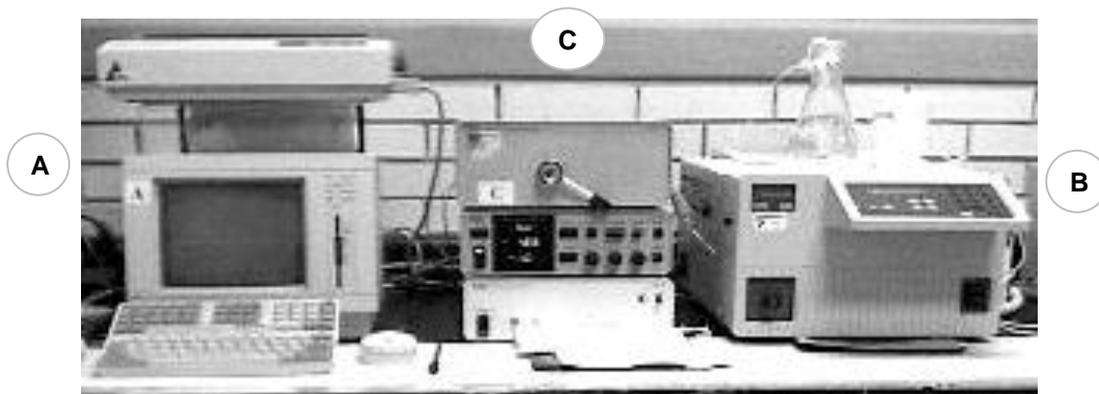


Figura 18. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), integrador e impresora (A), bomba (B), detector (C).

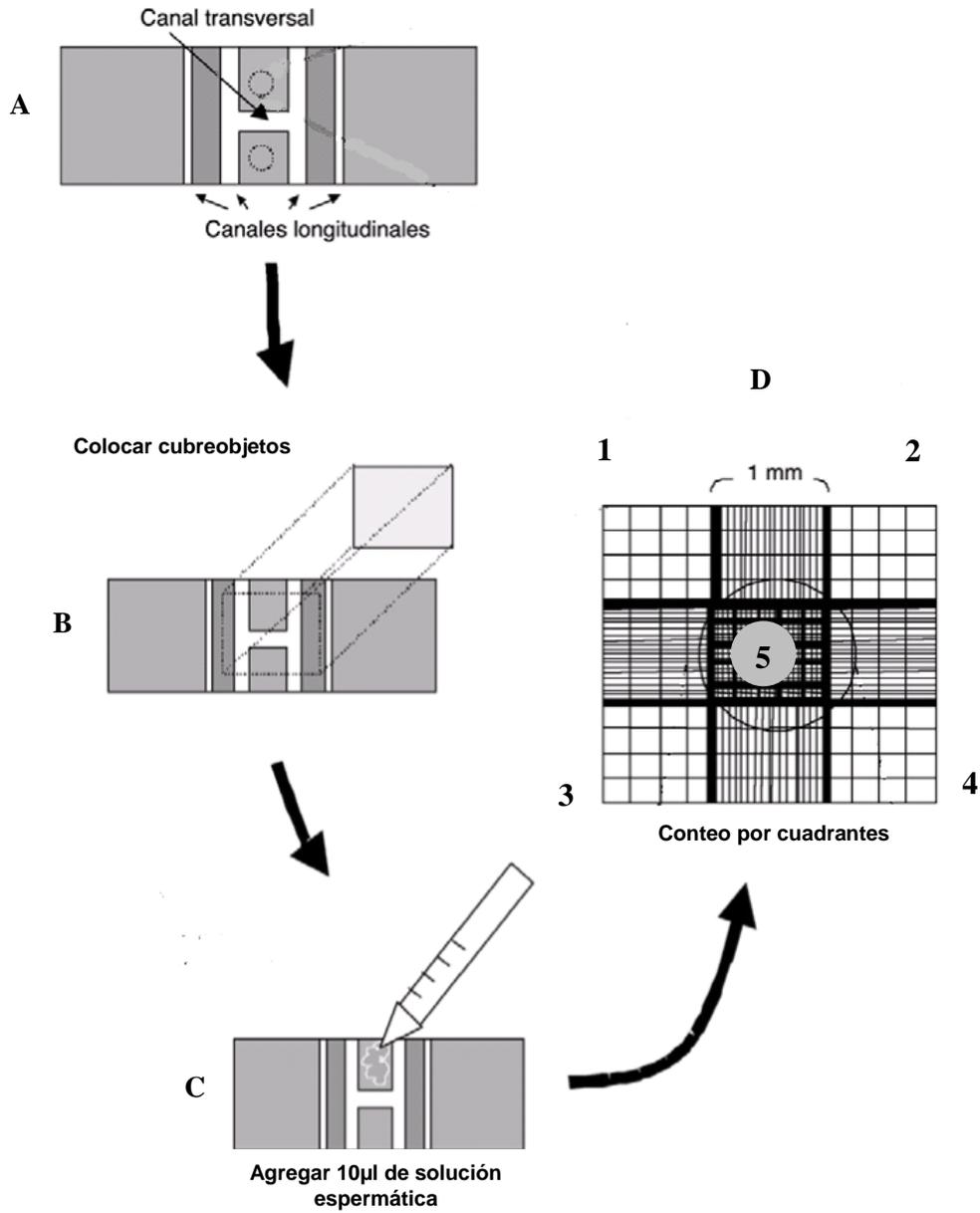


Figura 21. Ilustración esquemática del uso de la cámara Neubauer; A) cámara Neubauer, B) preparación de la cámara, C) colocación de la muestra, D) conteo de espermatozoides en 5 cuadrantes (Modificado de Castillo, 2004).

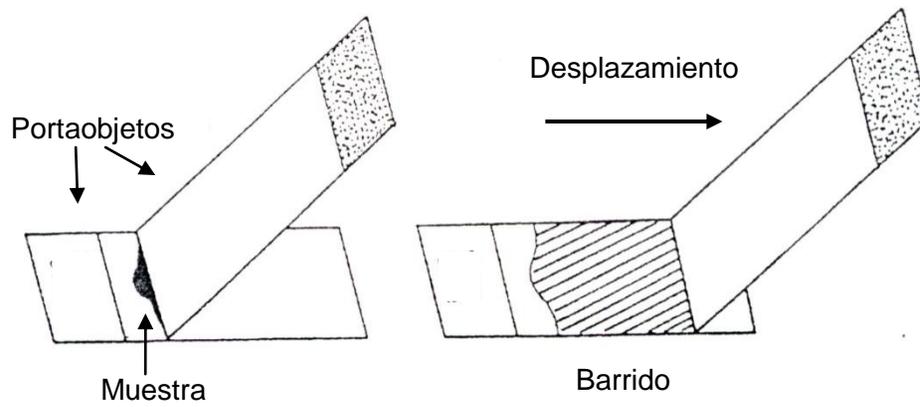


Figura 22. Representación del barrido hecho para la evaluación de espermatozoides anormales (Modificado de Castillo, 2004).

RESULTADOS

En la figura 23, se muestra el esquema de un corte coronal del cerebro de rata en donde la zona sombreada representa la lesión completa del núcleo dorsal del rafé inducida por la microinyección de la 5,6-dihidroxitriptamina. Todos aquellos animales en los que no se lesionó por completo la zona sombreada no se incluyeron en los resultados.

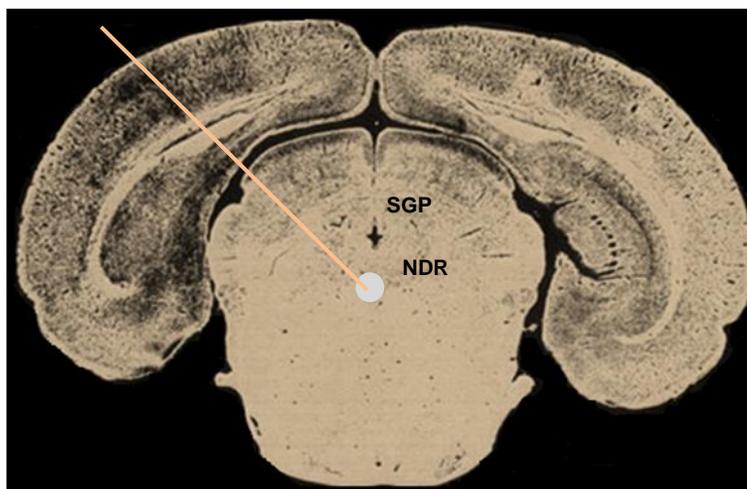
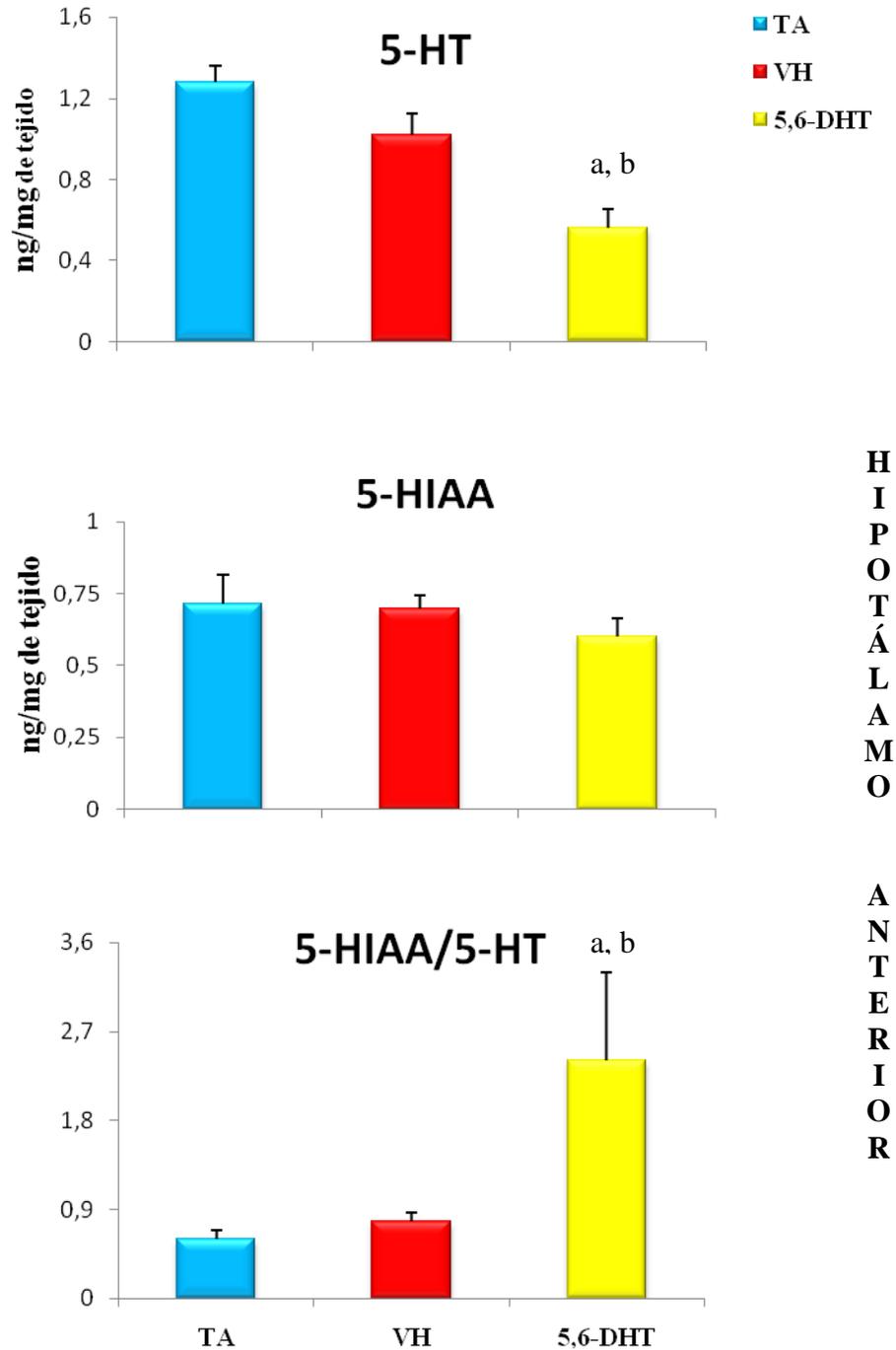


Figura 23. Corte coronal del cerebro de rata, en el que se representa la lesión del núcleo dorsal del rafé (NDR) área sombreada, producida por la 5,6-Dihidroxitriptamina; la línea diagonal representa la trayectoria de la aguja de microinyección; Sustancia gris periacueductal (SGP); (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

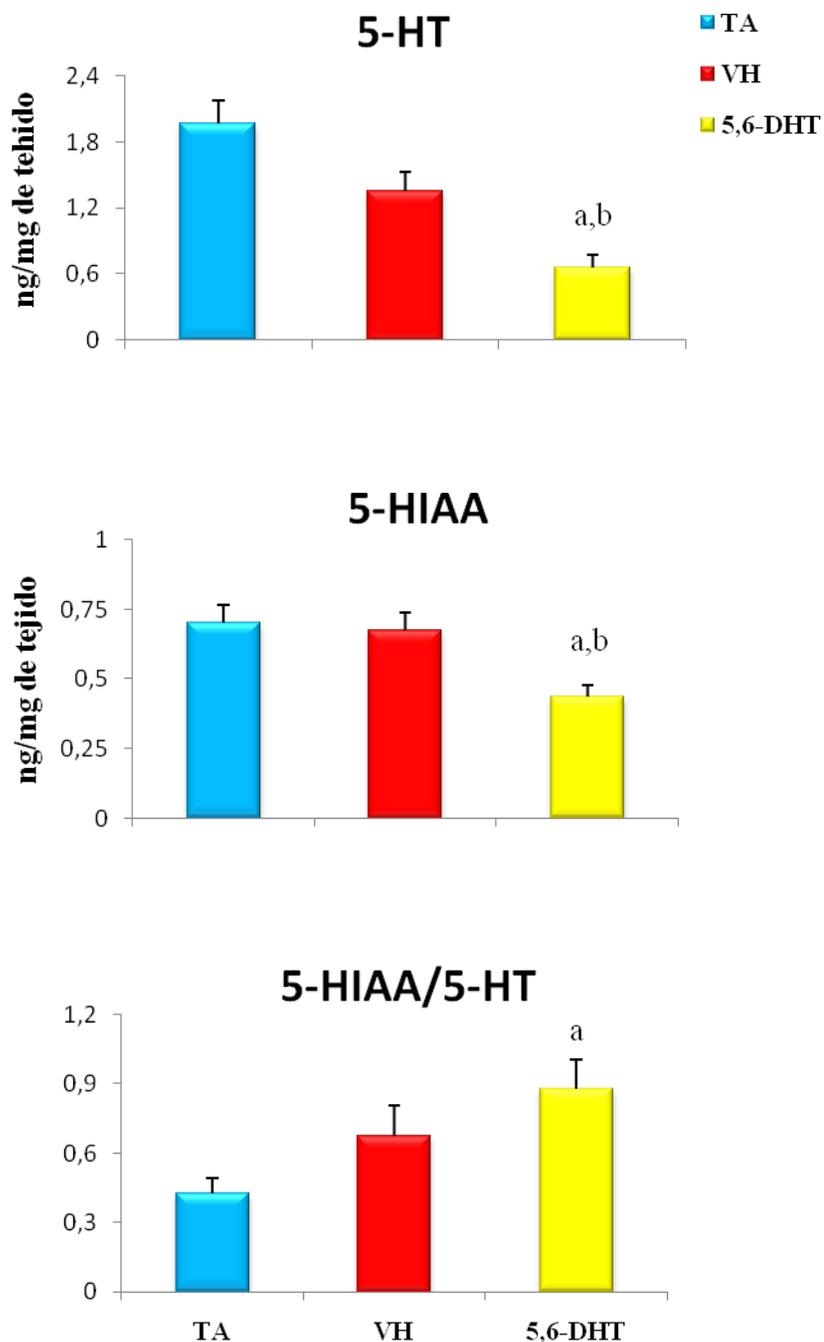
Concentración de Serotonina y 5-HIAA en hipotálamo anterior, medio y posterior

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en los animales con microinyección de ácido ascórbico (Vh) no se modificó la concentración de serotonina o de 5-HIAA ni de la relación 5-HIAA/5-HT (Figuras 24, 25 y 26) en ninguna de las zonas hipotalámicas estudiadas. En el hipotálamo anterior, medio y posterior de los animales con microinyección de 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafé, la concentración de serotonina disminuyó significativamente en comparación con el grupo testigo absoluto o vehículo. La concentración de 5-HIAA disminuyó sólo en el hipotálamo medio de los animales con microinyección del fármaco (Figura 25), mientras que en el hipotálamo anterior y posterior no se presentaron cambios en la concentración de este metabolito. La relación 5HIAA/5-HT se incrementó significativamente en las tres regiones del hipotálamo (Figura 24, 25 y 26).



a, $P < 0.05$ vs. Grupo TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)
 b, $P < 0.05$ vs. Grupo VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 24. Concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y la relación de 5-HIAA/5-HT (media \pm e.e.m), en el hipotálamo anterior de ratas sin tratamiento (TA) ó con microinyección en el núcleo dorsal del rafé (NDR) de ácido ascórbico (VH) ó 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

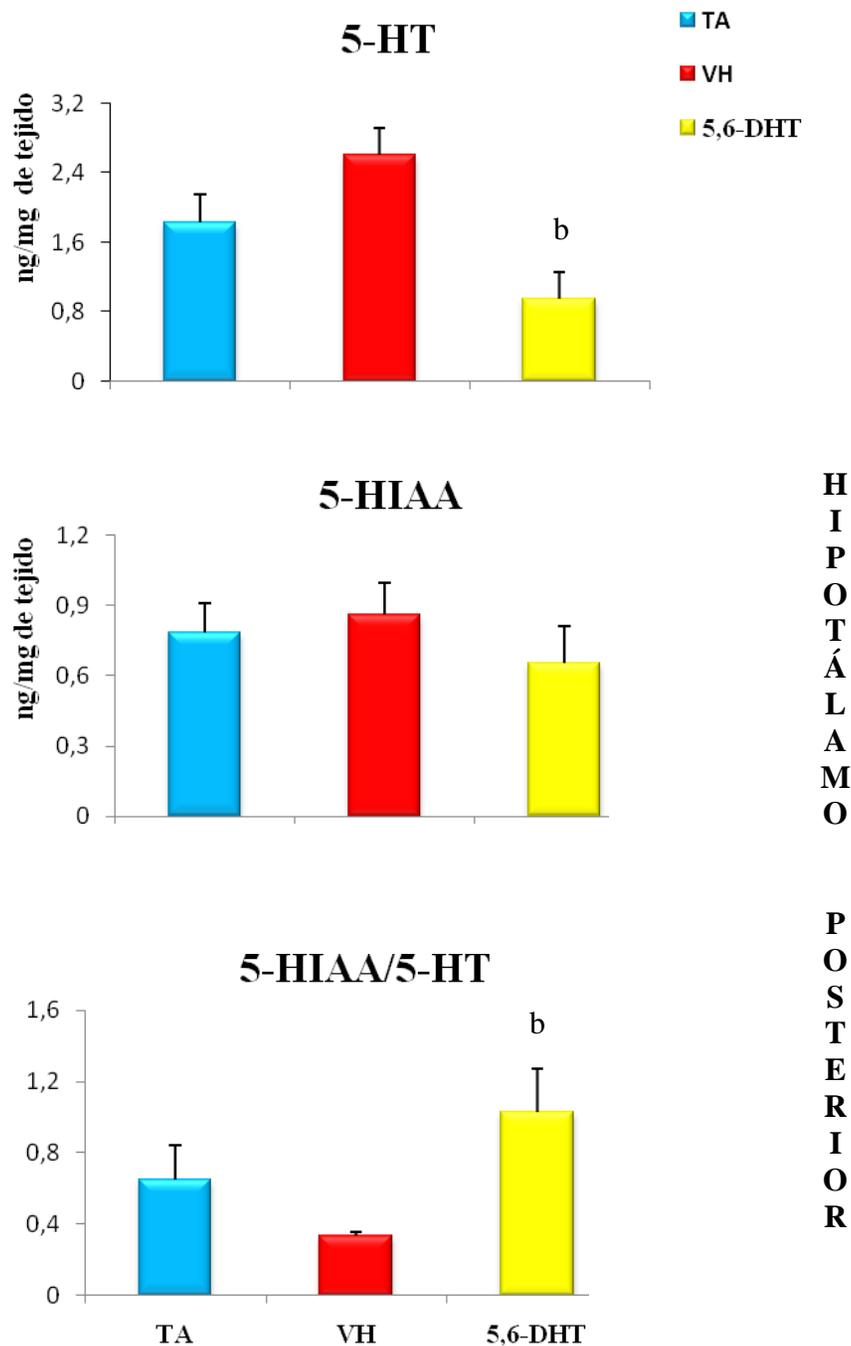


H
I
P
O
T
Á
L
A
M
O

M
E
D
I
O

a, $P < 0.05$ vs. Grupo TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)
 b, $P < 0.05$ vs. Grupo VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 25. Concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y la relación de 5-HIAA/5-HT (media \pm e.e.m), en el hipotálamo medio de ratas sin tratamiento (TA) ó con microinyección en el núcleo dorsal del rafé (NDR) de ácido ascórbico (VH) ó 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



b, $P < 0.05$ vs. Grupo VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 26. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y la relación de 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo posterior de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el núcleo dorsal del rafé (NDR) de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

Concentración de catecolaminas

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, la administración de ácido ascórbico o 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafé, no modificó la concentración de noradrenalina (NA), el ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) ni la actividad MHPG/NA (Cuadro1). Tampoco se observaron cambios significativos en la concentración de dopamina (DA), ácido 3-4 dihidroxifenilacetico (DOPAC), ni en la relación DOPAC/DA (Cuadro 2).

Cuadro 1. Concentración (media ± e.e.m) de NA, MHPG y de la relación MHPG/NA en animales testigo absoluto (TA), o con microinyección de ácido ascórbico en el NDR o de 5,6-Dihidroxitriptamina en el día 30 de edad y sacrificados 65 días de edad.

Hipotálamo anterior			
Grupo	NA	MHPG	MHPG/NA
TA	1.94 ± 0.27	-----	-----
Vh	1.30 ± 0.19	5.54*	4.26*
5,6-DHT	1.23 ± 0.16	-----	-----
Hipotálamo medio			
TA	1.57 ± 0.18	-----	-----
Vh	1.76 ± 0.23	-----	-----
5,6-DHT	1.75 ± 0.20	-----	-----
Hipotálamo posterior			
TA	1.49 ± 0.13	0.18*	0.13*
Vh	1.75 ± 0.33	-----	-----
5,6-DHT	1.65 ± 0.27	-----	-----

--- por debajo de la sensibilidad del método * Valor detectado en uno de los animales del grupo

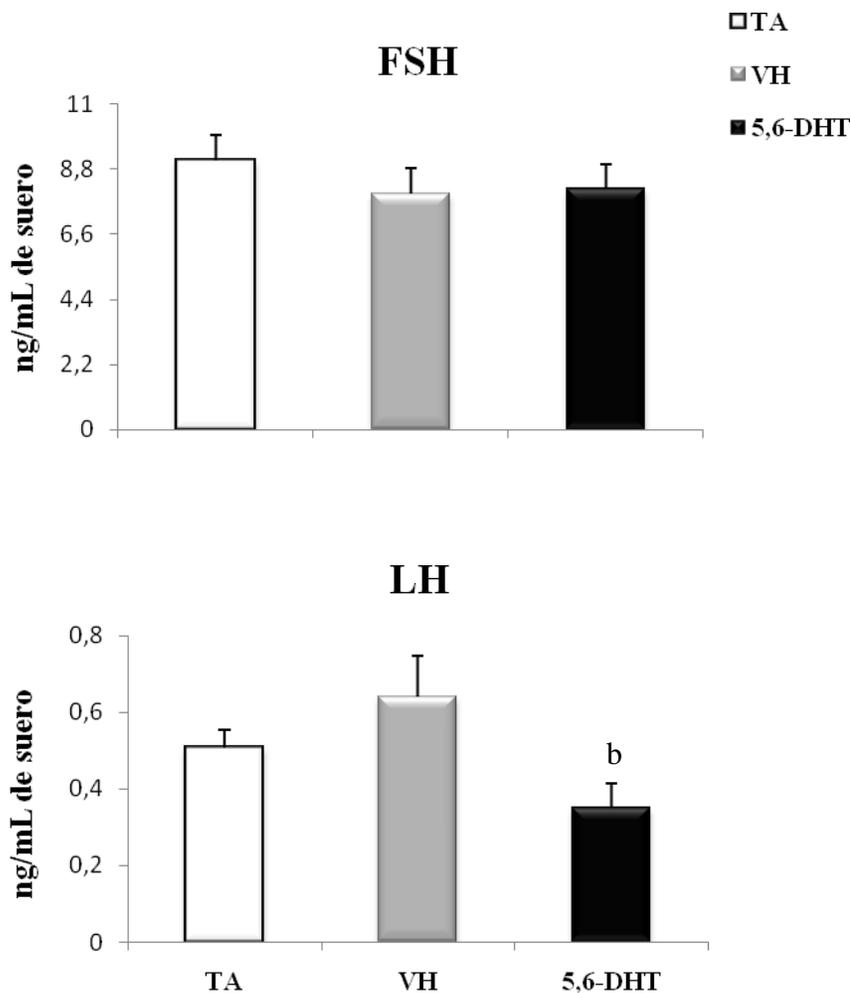
Cuadro 2. Concentración (media ± e.e.m) de DA, DOPAC y de la relación DOPAC/DA en animales testigo absoluto (TA), o con microinyección de ácido ascórbico en el NDR o de 5,6-Dihidroxitriptamina en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días de edad.

Hipotálamo anterior			
Grupo	DA	DOPAC	DOPAC/DA
TA	0.40 ± 0.10	0.17 ± 0.02	0.33 ± 0.24
Vh	0.53 ± 0.10	0.15 ± 0.03	0.29 ± 0.08
5,6-DHT	0.26 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.43 ± 0.23
Hipotálamo medio			
TA	0.52 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.08
Vh	0.67 ± 0.21	0.15 ± 0.01	0.35 ± 0.24
5,6-DHT	0.81 ± 0.16	0.24 ± 0.05	0.31 ± 0.23
Hipotálamo posterior			
TA	0.21±0.17	0.59, 0.79**	1.12, 0.63**
Vh	0.32±0.04	0.36, 0.88**	0.63, 0.32**
5,6-DHT	0.33*	0.13*	0.04*

--- por debajo de la sensibilidad del método * Valor detectado en uno de los animales del grupo
 ** Valores detectados en dos animales del grupo.

Concentración de FSH y LH

En los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR y sacrificados a los 65 días de edad, no se modificó la concentración de FSH en comparación con los animales testigo absoluto o con microinyección del vehículo. Mientras que la concentración de LH disminuyó en los animales con lesión del NDR, en comparación con el grupo con vehículo (Figura 27).

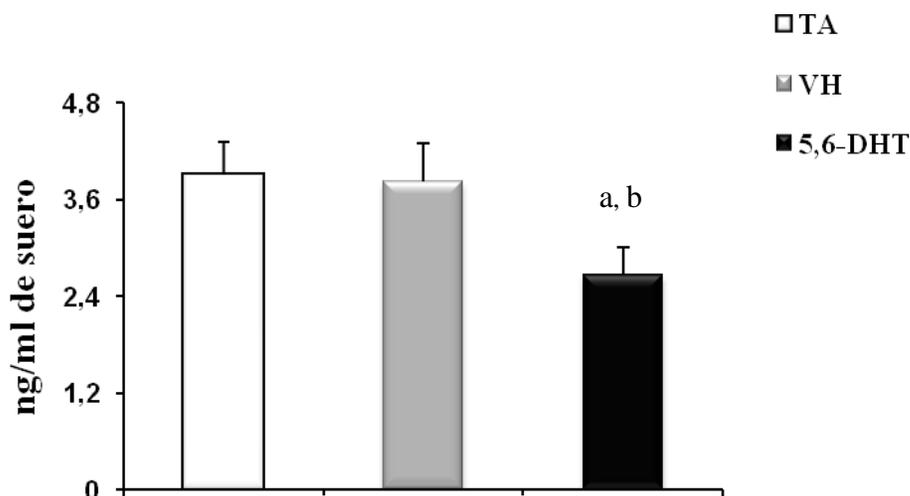


b, $P < 0.05$ vs. Grupo VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 27. Concentración en suero de la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (media \pm e.e.m), de animales testigo absoluto (TA), ó con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) ó de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

Concentración de Testosterona

En los animales con microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal del raqué, la concentración de testosterona fue menor en comparación con el grupo testigo o vehiculo (Figura 28).



a, $P < 0.05$ vs. Grupo TA; b, $P < 0.05$ vs. VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 28. Concentración de testosterona (media \pm e.e.m) en suero de ratas testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del raqué de ácido ascórbico (VH) o de 5,6- Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días de edad.

Correlación

Cuando se realizó el análisis de correlación entre la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior, medio y la concentración de gonadotropinas en suero se observó la correlación positiva entre serotonina en hipotálamo anterior y medio con FSH ($r=0.66$ y $r=0.74$, respectivamente) (Figuras 29 y 30); así como de serotonina en el hipotálamo anterior, medio con LH ($r=0.67$ y $r=0.58$, respectivamente) (Figuras 31 y 32). Éste mismo comportamiento se observó entre la concentración de LH y testosterona en el suero ($r=0.86$) (Figura 33).

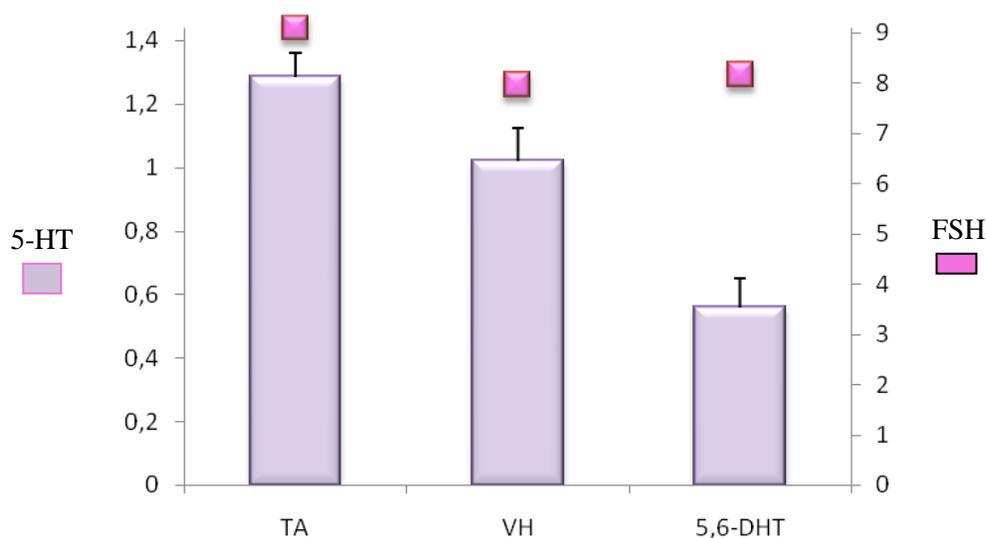


Figura 29. Correlación entre la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior y FSH en el suero de animales sacrificados a los 65 días de edad, ($r= 0.66$).

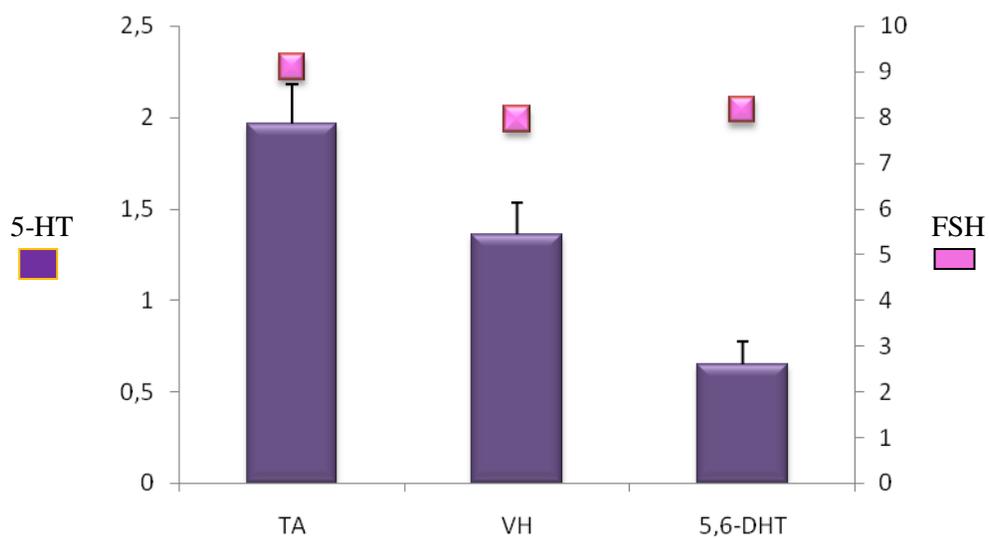


Figura 30. Correlación entre serotonina en el hipotálamo medio y FSH en animales sacrificados a los 65 días de edad, ($r=0.74$).

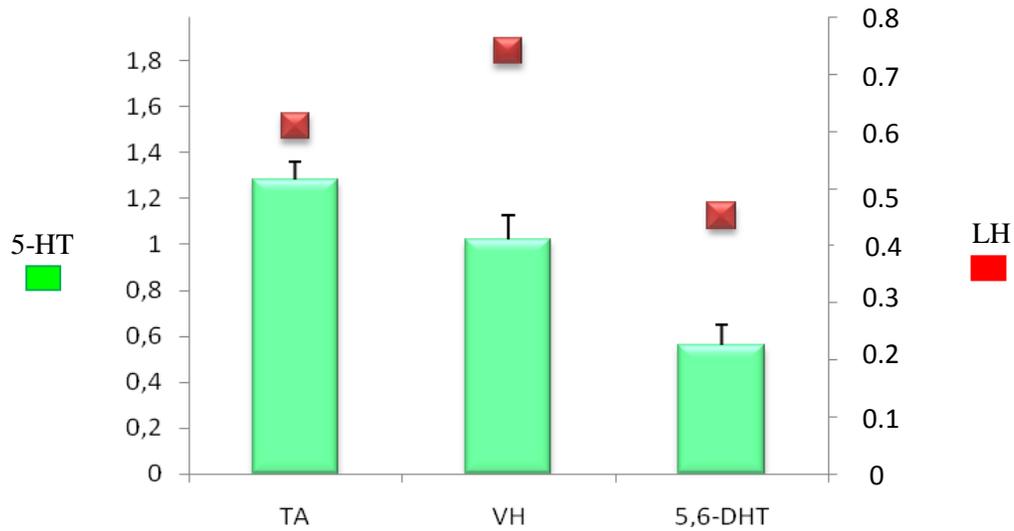


Figura 31. Correlación entre la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior y LH en el suero de animales sacrificados a los 65 días de edad, ($r=0.67$).

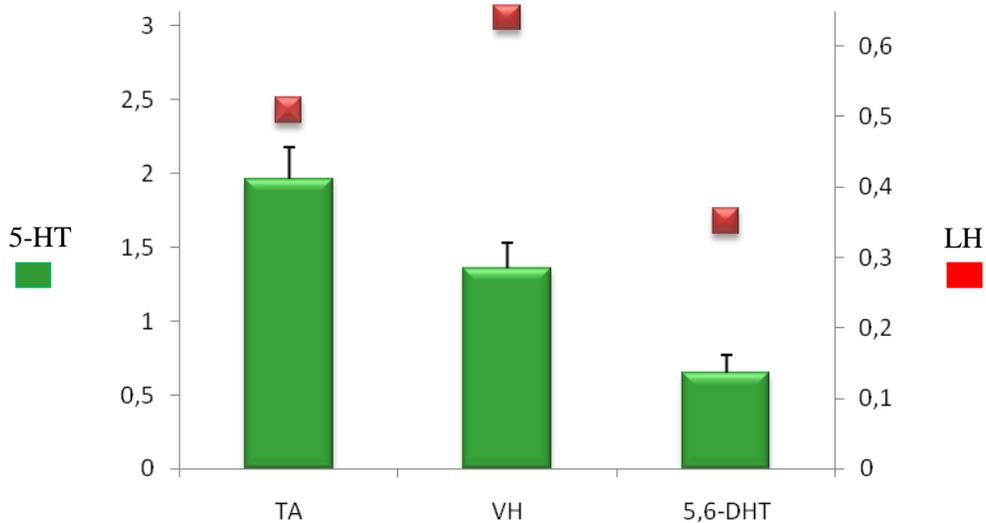


Figura 32. Correlación entre serotonina en el hipotálamo medio y LH en animales sacrificados a los 65 días de edad, ($r=0.58$).

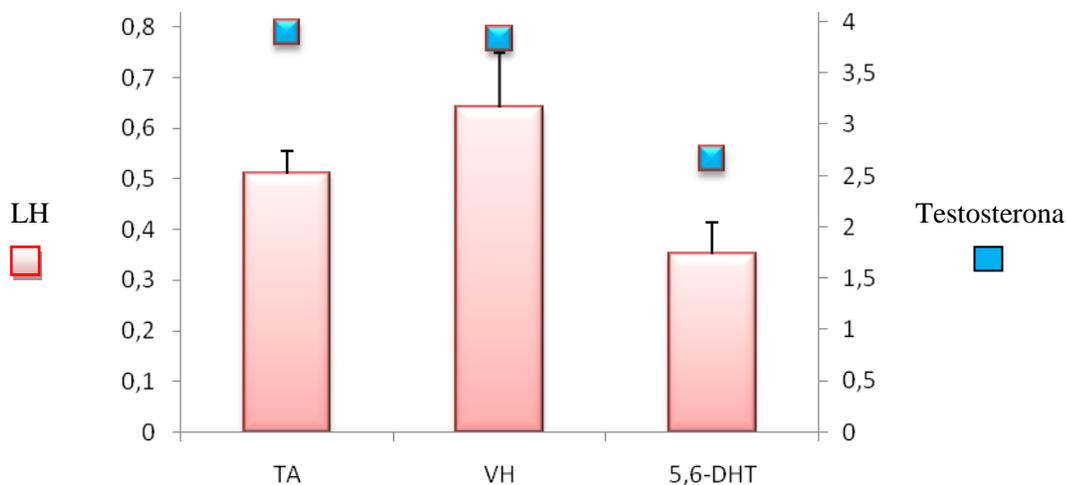


Figura 33. Correlación entre LH y testosterona en el suero de animales sacrificados a los 65 días de edad, ($r=0.86$).

Evaluación de la espermatogénesis

En comparación con el grupo testigo absoluto, en los animales con microinyección de ácido ascórbico en el NDR no se modificó el número, movilidad y viabilidad de los espermatozoides. En los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR, disminuyó el número y el porcentaje de espermatozoides móviles en comparación con el grupo testigo absoluto o con microinyección del ácido ascórbico. El porcentaje de espermatozoides viables no se modificó. Cuando se analizó la morfología de los espermatozoides en el grupo con microinyección de 5,6-DHT se observó el incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides anormales en comparación con el grupo testigo (Figuras 34-37).

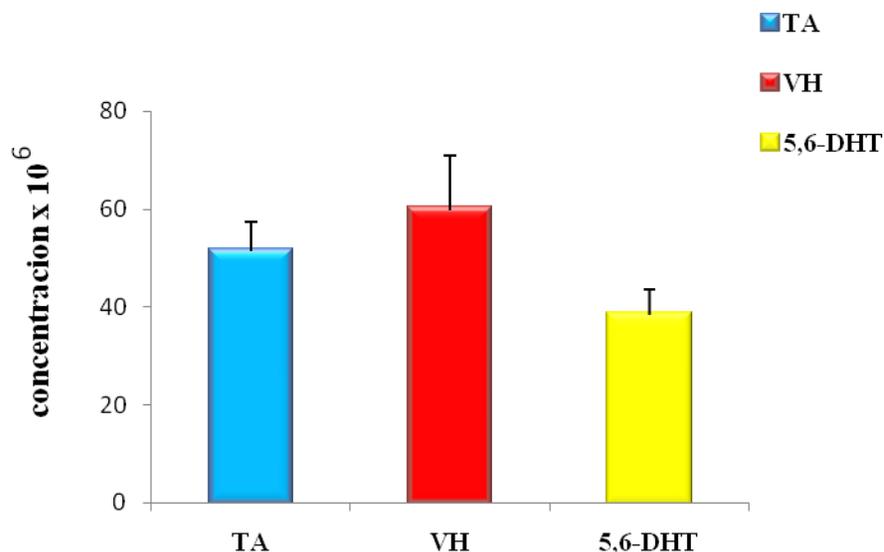
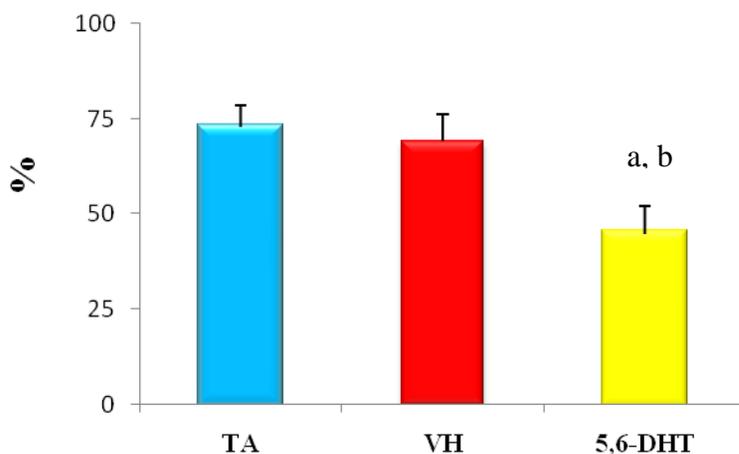


Figura 34. Número de espermatozoides (media \pm e.e.m) en animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del raqué de ácido ascórbico (VH) o de 5,6- Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



a, $p < 0.05$ vs. grupo TA; b, $p < 0.05$ vs. grupo VH (ANOVA seguida de la prueba de Ji cuadrada)

Figura 35. Porcentaje de espermatozoides móviles (media \pm e.e.m) en animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del raqué de ácido ascórbico (VH) o de 5,6- Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

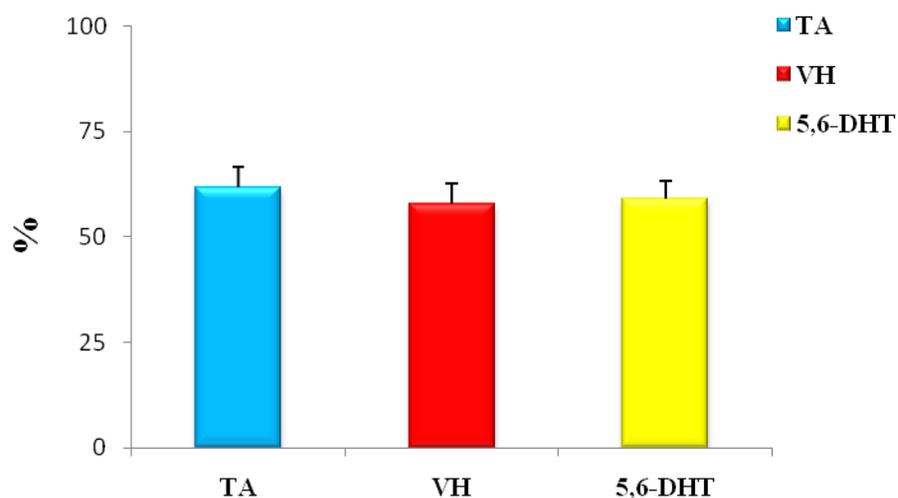
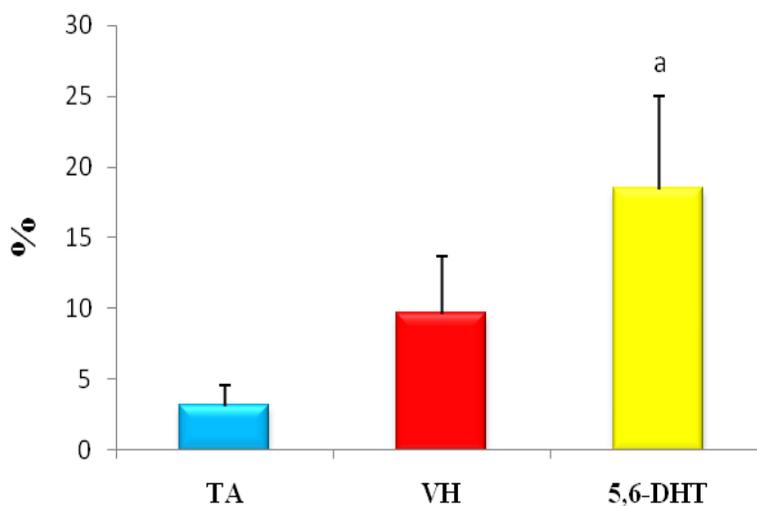


Figura 36. Porcentaje de espermatozoides viables (media \pm e.e.m) en animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) o de 5,6- Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



a, $P < 0.05$ vs. Grupo TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 37. Porcentaje de espermatozoides anormales (media \pm e.e.m) presentes en animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) o de 5,6- Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

Anormalidad espermática

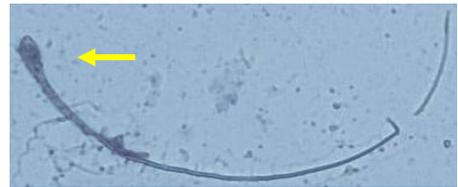
Un espermatozoide normal con el gancho característico y una sola cola se presenta en la Figura 38. Las anomalías espermáticas observadas en este trabajo fueron: microcefalia, macrocefalia, flagelo doblado, doble cabeza o flagelo y gota citoplasmática.



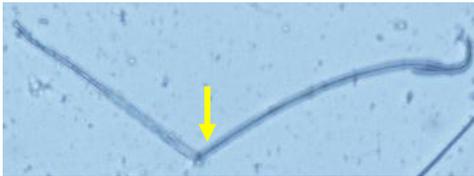
Espermatozoide normal



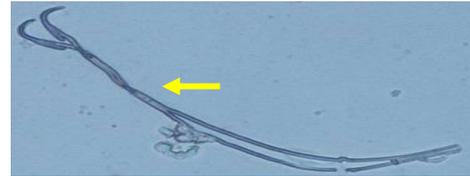
Microcefalia



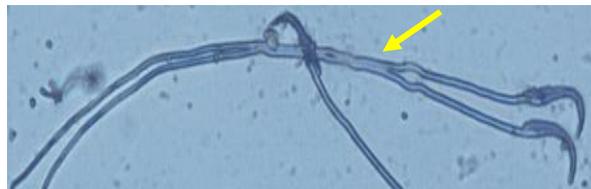
Macrocefalia



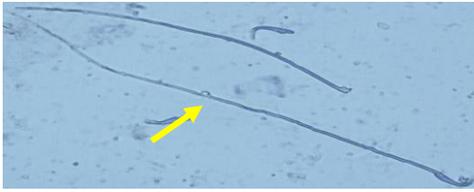
Flagelo doblado



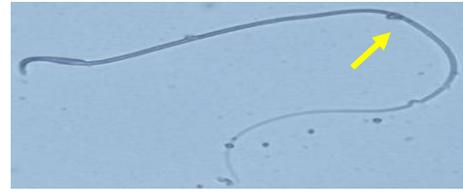
Doble flagelo o cola



Doble flagelo o cola



Gota citoplasmática



Gota citoplasmática

Fotomicrografía de un espermatozoide normal así como de diversas anomalías espermáticas observadas en animales sacrificados a los 65 días de edad.

El porcentaje total de espermatozoides anormales fue de: 3.11% en el testigo absoluto, 9.54% vehículo y 18.38% en el grupo fármaco. Cada uno de estos porcentajes fue dividido en una fracción relativa al tipo de anomalía presente en cada grupo (Figuras 44, 45, 46).

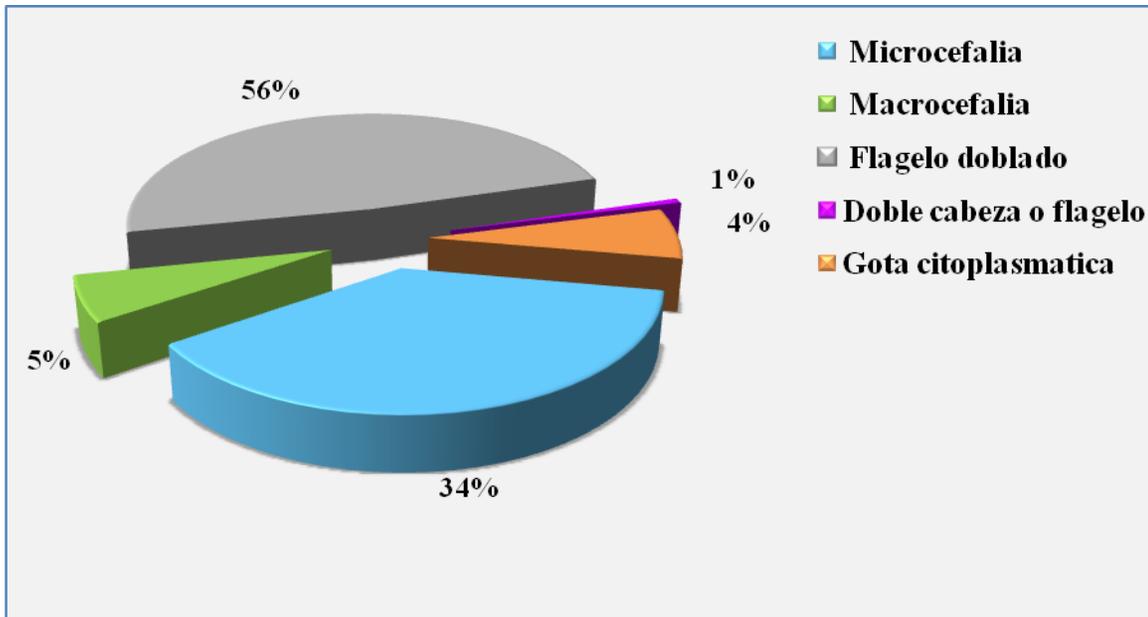


Figura 44. Porcentaje de los diferentes tipos de anomalías (media ± e.e.m) presentes en los espermatozoides de animales testigo absoluto sacrificados a los 65 días de edad.

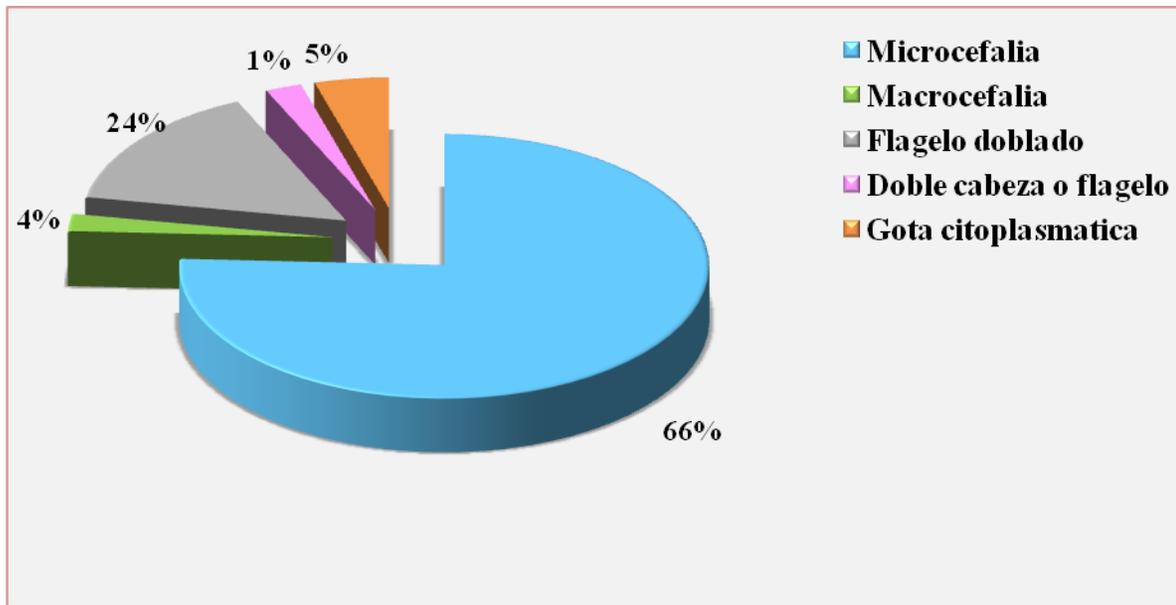


Figura 45. Porcentaje de los diferentes tipos de anomalías (media \pm e.e.m) presentes en los espermatozoides de animales con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días de edad.

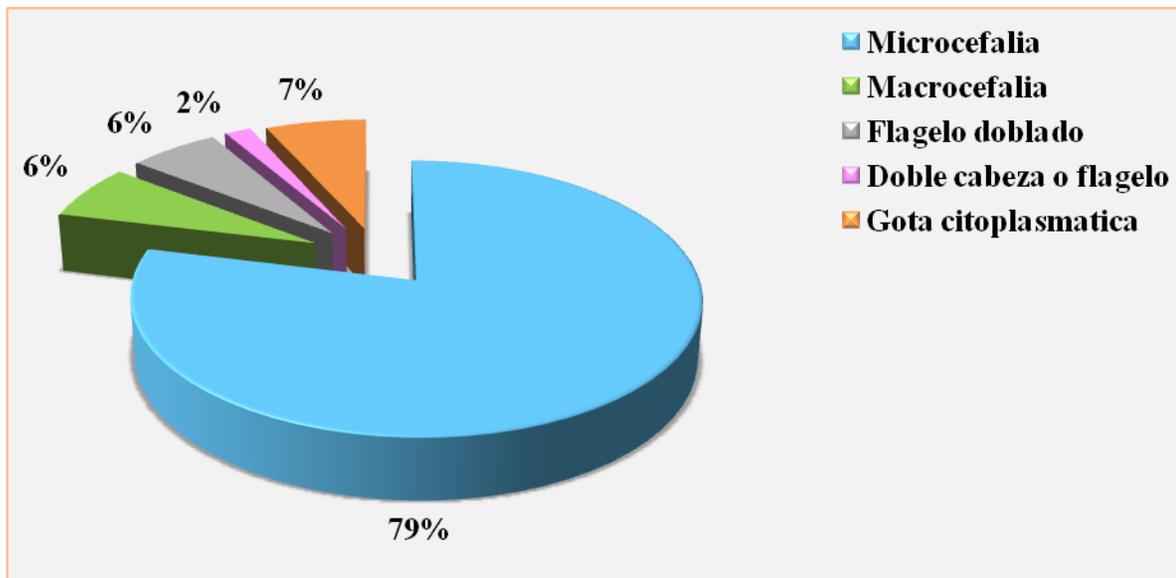


Figura 46. Porcentaje de los diferentes tipos de anomalías (media \pm e.e.m) presentes en los espermatozoides de animales con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de 5,6-dihidroxitriptamina en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días de edad.

DISCUSIÓN

Con los presentes resultados mostramos 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 regulación de la secreción de LH y en el proceso de espermatogénesis.

La disminución en la concentración de 5-HT que se observó en el hipotálamo anterior, medio y posterior de los animales con microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafe, es resultado de la acción del fármaco sobre las neuronas serotoninérgicas, lo que confirma lo ya propuesto por otros autores (Commins y col., 1986; Das y col., 1985; Jiménez Del Rio y Vélez-Pardo, 2002) quienes observaron que la 5,6-DHT es un neurotóxico que daña selectivamente a este tipo de neuronas. La 5,6-DHT al ser capturada por las neuronas serotoninérgicas se oxida y genera especies reactivas de oxígeno como el super óxido O_2^- , radicales hidroxil $HO\cdot$, y peróxido de hidrogeno H_2O_2 , que pueden causar daño al ADN, proteínas y lípidos (Jiménez Del Rio y Vélez-Pardo, 2002). Además, el que no se presentaran cambios significativos en la concentración de NA, MHPG, DA y DOPAC en el hipotálamo de los animales con microinyección de 5,6-DHT, refuerzan la idea de que este fármaco daña selectivamente al sistema serotoninérgico.

La disminución en la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio de los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR, es consecuencia del daño generado a las neuronas serotoninérgicas que conforman este núcleo y que inervan al hipotálamo. En apoyo a lo antes mencionado existen estudios anatómicos en los que se ha mostrado que estas fibras serotoninérgicas inervan diferentes núcleos hipotalámicos como el núcleo supraquiasmático, paraventricular, arcuato, área preóptica, y la eminencia media (Sting, 2007; Takeuchi, 1988). Así mismo, se ha mostrado que cuando en la rata macho se realiza la lesión química del NDR con 5,7-dihidroxitriptamina (fármaco que destruye las terminales serotoninérgicas y noradrenérgicas) disminuye la concentración de 5-HT en el área preóptica, núcleo hipotalámico ventromedial y núcleo arcuato (Van de Kar y col., 1980). También se ha observado que en la rata hembra de 30 días de edad, la lesión química del núcleo dorsal del rafe, inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina disminuye la concentración de

serotonina en el hipotálamo anterior y medio (Monroy y col., 2003). Por otra parte, cuando en la rata macho se realiza la estimulación eléctrica del NDR, se observa un efecto inverso en el área preóptica, núcleos arcuato y paraventricular (Houdouin y col., 1991; Shannon y col., 1986).

La causa del porque en los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR no se eliminara por completo la 5-HT en las tres regiones del hipotálamo, se debe a que esta estructura también recibe inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del rafe, por lo que la amina cuantificada en estos animales se origina en el núcleo del rafe remanente (medial). Otra posibilidad es que la serotonina cuantificada en estos animales sea sintetizada por el mismo hipotálamo, en relación a esto se ha observado que en el núcleo dorsomedial del hipotálamo existen neuronas productoras de serotonina (Takeuchi, 1988). En apoyo a esta idea se ha mostrado que después de realizar la deaferentación total del hipotálamo en la rata macho no se depleta por completo la serotonina en esta estructura; lo cual apoya la idea de que esta amina también se sintetiza en el hipotálamo (Frankfurt y col., 1981; Van der Kar y Lorens, 1979).

La disminución en la concentración de serotonina se acompañó de una menor concentración de su metabolito, el 5-HIAA, excepto en el hipotálamo anterior donde la concentración de 5-HIAA no cambio, este evento puede deberse a que en el hipotálamo anterior, a diferencia del hipotálamo medio, existe una mayor concentración de la inervación serotoninérgica proveniente del núcleo medial del rafe (Van der Kar y Lorens, 1979), lo cual mantiene sin cambios la concentración del metabolito. Aunado a esto, es posible que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR y NMR presente una susceptibilidad diferente al daño inducido por la 5,6-DHT; en apoyo a esto se ha observado que la inervación serotoninérgica proveniente del NDR es más vulnerable a la acción de los neurotóxicos derivados de las anfetaminas (Jacobs y Azmitia, 1992). El aumento en la relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo anterior, medio y posterior de los animales con lesión del NDR, posiblemente esté asociado al aumento en la acción de otra vía serotoninérgica que llega al hipotálamo, como la del NMR.

Por otra parte, estudios anatómicos empleando técnicas de inmunohistoquímica apoyan la idea de que la serotonina hipotalámica participa en la modulación de la secreción de las gonadotropinas, debido a que se ha observado la interacción de las terminales serotoninérgicas que se originan en los núcleos dorsal y medial del rafe con el soma, dendritas y terminales de las neuronas que secretan GnRH (Jennes y col., 1982; Smith y Jennes, 2001; Soghomonian y col., 1988). En relación a esto, Justo y colaboradores en 1989, mostraron que en la rata macho la administración vía intraperitoneal del precursor de la síntesis de serotonina, 5-hidroxitriptofano (5-HTP) a los 16, 26, 30 ó 60 días de edad incrementa la secreción de FSH, lo que los llevo a proponer que en la rata macho el sistema serotoninérgico regula de manera estimulante la secreción de FSH. Sin embargo, en nuestro trabajo, los animales con lesión del NDR no presentaron diferencias en la concentración de FSH. Respecto a esto se ha sugerido que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del rafe, modula de manera estimulante la secreción de FSH en la rata hembra prepúber (Monroy y col., 2003); por lo que es posible que la presencia de esta inervación sea la que mantiene la secreción de FSH en los machos con microinyección de 5,6-DHT. En cuanto a la concentración de LH, se observó una disminución, lo cual concuerda con los resultados de Van der Kar y col., 1980, quienes mostraron que en la rata macho adulto la lesión del NDR inducida por la administración de 5,7-dihidroxitriptamina disminuye la secreción de LH en suero.

El efecto diferencial que ejerce la inervación serotoninérgica sobre la secreción de FSH y LH, probablemente se deba a la existencia de un factor liberador específico que regula la secreción de cada gonadotropina como lo han propuesto algunos autores, quienes administraron antisuero o antagonistas del factor liberador de LH (LHRH), lo que suprimió la liberación de LH sin alterar la de FSH (Culler y col., 1986; McCann y col., 2001). Por lo que al lesionar el núcleo dorsal del rafe y observar una disminución en la concentración de LH sin que se modifique FSH, es posible que se alterara la secreción del LHRH. Lo anterior es reforzado por la existencia de un estudio, en el cual se muestra que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafe, inerva el área preóptica, región considerada el centro regulador de la secreción de LH (McCann y col., 2001), por lo que es posible que al dañarse las neuronas serotoninérgicas que se originan en el NDR disminuye la secreción de esta gonadotropina. La posibilidad de que al dañar las neuronas serotoninérgicas

se modifique la actividad de las neuronas que secretan el factor liberador de esta gonadotropina se sustenta en las evidencias anatómicas que muestran que en esta área existe comunicación sináptica entre los somas de las neuronas GnRHérgicas y las terminales de las neuronas productoras de serotonina (Jennes y col., 1982; Soghomonian y col., 1988).

En relación a lo antes mencionado se realizó el análisis de correlación entre la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior, medio y la concentración de LH, las variables se encontraron medianamente correlacionadas, $r=0.67$ y $r=0.58$ respectivamente; el hecho de que estas variables no estuvieran altamente correlacionadas es consecuencia de que la concentración de LH en el grupo VH presentó un ligero incremento, lo cual puede deberse a que al momento de introducir la aguja de microinyección se afectó la actividad de neural de otro sistema presente en el NDR, el cual a su vez modificó la actividad del hipotálamo. En apoyo a esta idea se ha mostrado que el NDR, además de estar conformado por somas serotoninérgicos, se encuentran neuronas que producen dopamina, GABA y neuropéptido Y (Morello y col., 1989), las cuales envían sus proyecciones al hipotálamo y locus coeruleus, estructuras que participan en la regulación de la secreción de LH (Rivier y col., 1991). Respecto a las concentraciones de LH y testosterona se encontraron altamente correlacionadas ($r=0.86$), lo que indica la estrecha relación entre las variables, por lo que al disminuir LH también disminuye testosterona. En apoyo a esto se ha mostrado que la LH estimula la síntesis de testosterona; en las células de Leydig, la LH se une a sus receptores acoplados a proteínas G, lo que resulta en la activación de la adenilato ciclasa, que estimula la conversión de ATP a AMPc, el cual activa la proteína cinasa A, que conlleva a la fosforilación de proteínas, incluyendo la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR), ésta transporta el colesterol desde el exterior de la membrana mitocondrial hacia su interior permitiendo su conversión a esteroides (Evaul y Hammes, 2008; Silvana y col., 2007). En relación a lo anterior, Behre y colaboradores en 1992, mostraron que después de la inyección subcutánea del antagonista de GnRH (cetorelix) en la rata macho, se reduce la concentración de LH y testosterona en suero. En otro estudio la administración intraperitoneal de un contaminante ambiental con efectos sobre la salud reproductiva humana y animal utilizado para la elaboración de plastificantes, solventes, plaguicidas y selladores el Aroclor 1254, a ratas macho adulta, disminuyó la concentración de LH y testosterona, así como la actividad de las enzimas esteroidogénicas: citocromo corte de cadena lateral (P450_{scc}), 3β -

hidroxiesteroide deshidrogenasa(3β -HSD) y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) (Murugesan y col., 2004).

También existe la posibilidad de que la disminución en la concentración de testosterona en suero, inducida por administración de 5,6-DHT, se deba a que se modificó alguna vía de comunicación neural que existe entre el sistema nervioso central y el testículo, que parece ejercer un control sobre sus funciones. Hasta el momento no hay evidencia anatómica de la comunicación neural directa entre el núcleo dorsal del rafe y el testículo. Sin embargo, se ha mostrado que cuando en la rata macho se inyecta en el testículo un trazador retrogrado, el virus de la pseudorabia, se identifican por inmunohistoquímica neuronas marcadas en diferentes regiones del cerebro, como el núcleo del rafe, el paraventricular del hipotálamo, amígdala central y el locus coeruleus entre otras regiones (Gerendai y col., 2000; James y col., 2007; Selvage y col., 2006). También cuando en la rata macho adulta se administra el trazador anterogrado, *P*-leukoaglutinina, en el NDR, se observó que este núcleo envía proyecciones hacia el núcleo del puente y locus coeruleus (Vertes y col., 1994). Además las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal y del puente envían proyecciones hacia el cordón espinal (Bowker y col., 1981), región de donde parte la inervación que transcurre por el nervio testicular (espermático). Conjuntamente estas evidencias reportadas en bibliografía sustentan la idea de la existencia de una comunicación neural entre el NDR y el testículo.

La posibilidad de que esta información neural que recibe el testículo participa en la regulación de sus funciones, se apoya en los estudios de Selvage y colaboradores (2003); Selvage y colaboradores (2006), quienes al estimular químicamente el núcleo paraventricular del hipotálamo o el locus coeruleus, observaron la disminución en la concentración de testosterona sin modificar la de LH.

En conjunto estas evidencias permiten sugerir la presencia de comunicación directa o indirecta entre algunas áreas cerebrales y el testículo, dicha comunicación participa en la regulación de la esteroidogénesis, por lo que es posible que al dañar las neuronas serotoninérgicas del NDR, se modificara la comunicación neural entre el sistema nervioso central y el testículo, lo cual se tradujo en la disminución de la concentración de testosterona.

La FSH, LH y testosterona son hormonas esenciales en la producción de espermatozoides (Holdcraft y Braun, 2004; McLachlan y col., 1996; McLachlan y col., 2002; O'Donnell y col., 2006); En nuestro estudio observamos que en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafe se presenta una disminución en el número de espermatozoides, aunque no fue estadísticamente significativa, esta reducción no se debe a cambios en la secreción de FSH, debido a que en estos animales la concentración de dicha hormona no se modificó. Esto permite sugerir que la disminución en el número de espermatozoides puede relacionarse con la menor concentración de testosterona, la cual se ha mostrado es esencial en el proceso de espermatogénesis, ya que participa en el desarrollo de las espermatogonias y espermatocitos, mantiene la supervivencia de las células germinales particularmente en la etapa VII del ciclo espermatogénico (O'Donnell y col., 2006), pero su principal función es intervenir en el proceso de elongación de las espermátidas redondas, donde la disminución en la concentración de testosterona resulta en un desprendimiento prematuro de espermátides redondas, por lo que no completan su maduración. Se ha sugerido que la ausencia de testosterona altera la asociación kinasa- β_1 -integrina o N-cadherin, lo que anticipa la liberación de las espermátides redondas (Lui y Lee, 2009; McLachlan y col., 2002; O'Donnell y col., 1996). También se ha observado que la disminución en la concentración de testosterona durante la espermiación propicia que las espermátidas elongadas sean retenidas y fagocitadas por las células de Sertoli (Beardsley y O'Donnell 2003). Lo antes mencionado permite explicar la reducción en el conteo espermático observado en los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR.

El movimiento del espermatozoide es un componente importante en la fertilidad, que puede ser alterado por el ambiente en que se desarrolla; esta capacidad de movimiento se adquiere durante el transito de los espermatozoides por el epidídimo (Comhaire, 1993; Syntin y Robaire, 2001).

En los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR no se presentaron cambios en la viabilidad de los espermatozoides, pero la movilidad disminuyó, es decir, muchos de los espermatozoides con membrana integra (viables) carecían de movimiento, estos resultados nos permiten sugerir que las células germinales presentaron alguna deficiencia flagelar; lo cual probablemente se deba a una espermatogénesis o maduración en el epidídimo defectuosa, lo que resulta en espermatozoides sin movilidad progresiva.

La disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles observada en los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR posiblemente este relacionada con la disminución en la concentración de testosterona ya que, se ha mostrado que esta hormona además de participar en la regulación de la espermatogénesis, mantiene la estructura y funciones del epidídimo. En relación a ésto se ha observado que después de la disminución en la concentración de testosterona, la actividad del epidídimo disminuye, debido a que la morfología y proliferación de sus células epiteliales es alterada, situación que se revierte tras la administración de testosterona (Barrios, 2002; Hamzeh y Robaire, 1992; Malgorzata y col., 2010; Primiani y col., 2007). Las células principales, son el tipo celular más abundante del epidídimo, desempeñan diversas funciones como: absorción y secreción de agua, iones, proteínas y lípidos; por lo que mantienen un microambiente esencial durante la maduración del espermatozoide, estas actividades son reguladas por las microvellosidades de las células principales. Primiani y colaboradores, (2007), mostraron que cuando se realiza la castración en la rata macho o se administra la flutamida, antagonista androgénico, disminuye la concentración de testosterona y esto ocasiona la disminución de las microvellosidades, efecto restablecido por la administración de testosterona, lo que llevó a los autores a sugerir que el crecimiento e integridad de las microvellosidades en las células principales del epidídimo es regulada por la testosterona.

Con base en estas evidencias es posible pensar que la disminución en la movilidad espermática sea resultado del mal funcionamiento del epidídimo, provocado por la menor concentración de testosterona en animales con lesión del NDR.

También se ha sugerido que durante el tiempo de permanencia del espermatozoide en el epidídimo, el flagelo es estabilizado. Durante éste proceso se forman enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína, esto es, oxidación de los grupos sulfhídrido (SH) a enlaces disulfuro (SS), lo que le confiere rigidez al flagelo (Seligman y Shalgi, 1991; Syntin y Robaire, 2001); respecto a esto se ha observado que después de la disminución de testosterona, resultado de la castración o inyección de un antiandrógeno, se inhibe la oxidación de los grupos SH lo que reduce la dureza y estabilidad en la cola del espermatozoide (Seligman y col.,1996). De acuerdo con las evidencias antes mencionadas, podemos decir que la 5,6-DHT afectó la producción de testosterona y como consecuencia las funciones del epidídimo, lo que se reflejó en la disminución de espermatozoides móviles.

El hecho de que en los animales con microinyección de 5,6-DHT se incrementara el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal, indica que el proceso de espermatogénesis fue afectado. Durante la espermiogénesis la forma del núcleo en las espermátidas, que es esférico, cambia conforme la cabeza del espermatozoide adquiere la forma específica de cada especie. Se sugiere que una estructura microtubular llamada manchete está involucrado en este proceso de morfogénesis; el manchete se une a la envoltura nuclear y circunscribe el núcleo de las espermátidas en las etapas tempranas de la espermiogénesis, ejerciendo una fuerza constrictora que origina la forma final de la cabeza del espermatozoide (Yoshida y col., 1994). Se ha observado que el testículo es rico en dineína citoplásmica, una proteína motora en asociación con los microtúbulos del manchete y la envoltura nuclear de espermátidas en los pasos 7 a 14 en el ciclo del epitelio seminífero, donde el paso 7 es particularmente sensible a la acción de la testosterona; además la identificación de la proteína RIM-BP3 en unión con el manchete, participa en la morfogénesis, ya que el bloqueo de ésta resulta en malformaciones de la cabeza del espermatozoide (Zhou y col., 2009). Estas observaciones permiten pensar que, durante la espermiogénesis, la asociación entre los microtúbulos del manchete y algunas proteínas (dineína, RIM-BP3), ensamblan una estructura mecánica involucrada en la forma y tamaño de la cabeza del espermatozoide, cuyo comienzo (paso 7) y función son regulados por la testosterona.

Respecto al aumento de espermatozoides anormales, observado en los animales del grupo vehículo, éste puede deberse a que la inyección de ácido ascórbico afectó la actividad de otro sistema de neurotransmisión presente en el NDR, el cual a su vez modificó la actividad del hipotálamo y como consecuencia el funcionamiento de la gónada. Este efecto también puede estar relacionado con un retraso en la secreción de testosterona por el testículo, inducido por la exposición a la anestesia con éter u otra manipulación asociada con la cirugía durante la microinyección del ácido en el NDR. En relación a esto, existe evidencia en la que se muestra que el estrés puede influir sobre alguno de los tres componentes del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, alterando las funciones reproductivas. Otra posibilidad, es que estos efectos sean el resultado de la sección de fibras durante la introducción de la aguja de microinyección para lesionar el NDR (Monroy y col., 2003; Rivier y col., 1991).

Por otra parte cuando el espermatozoide entra al epidídimo se caracteriza por la presencia de la gota citoplasmática, que se desplaza a lo largo de la pieza media del flagelo y eventualmente es fagocitada por las células principales del epidídimo; sin embargo, la presencia de espermatozoides con retención de gota sugiere una alteración en la función de estas células, la cual puede relacionarse con la actividad de las microvellosidades que son reguladas por la testosterona (Synitn y Robaire, 2001).

Por lo anterior se puede esperar que los defectos en la formación de la cabeza y flagelo del espermatozoide, observados en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé, se deban tanto a una espermatogénesis alterada, principalmente en la etapa de espermiogénesis, como a desperfectos sobre el funcionamiento del epidídimo, ésto a consecuencia de la disminución en la concentración de testosterona y de su menor participación en el desarrollo del espermatozoide.

CONCLUSIONES

- El hipotálamo anterior, medio y posterior reciben innervación serotoninérgica proveniente del núcleo dorsal del rafé.
- En el animal prepúber la innervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé participa de manera estimulante en la secreción de LH.
- La innervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé no participa en la modulación de la secreción de FSH en la rata macho prepúber.
- La innervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé participa en la regulación de la espermatogénesis en la rata macho.
- La Testosterona es importante en la adquisición de la movilidad, forma y número de espermatozoides.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, Monteiro A, Verhoeven G, Gendt. K (2008). Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle stimulating hormone and androgen. **Endocrinology**. 149(7): 3279-3285.
2. Adams L., Steiner R. (1988). Puberty. **Reviews of Reproductive Biology**, 10: 1-52.
3. Aragón MA, Ayala ME, Marín M, Avilés A, Matsumura PA, Domínguez R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. **Reproduction Research**, 129: 717-727.
4. Arias P., Szwarcfarb B., de Rondina D. C., Carbone S., Sverdlik R., Moguilevsky J. A. (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 Res.**, 523: 57-61.
5. Amman, P. R., (1986). Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. **Environ health perspect**, 70: 148-158.
6. Audesirk T., Audesirk G., Byers B. (2003). Reproducción Animal. En: **Biología**. T. Audesirk, G. Audesirk, B. Byers (Edits). Editorial Pearsons Educación, sexta edición, México, 720-726.
7. Ayala ME., Monroy J., Morales L., Castro ME., Domínguez R. (1998). Effects of a lesion in the dorsal raphe nucleus performed during the juvenile period of the female rat, on puberty. **Brain Research Bulletin**, 47: 211-218.
8. Ayala, M.E. (2009). Brain Serotonin, Psychoactive Drugs, and Effects on Reproduction. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry.*, 9: 258-276.
9. Beardsley, A., O'Donnell, L. (2003). Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats. **Biology of reproduction**, 68: 1299-1307.
10. Barrios, R.D. (2002). Fisiología y Reproducción. Reproducción animal Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela. 1-13.
11. Bellido MC. (1999). Reproducción en el varón. En: **Fisiología humana**. JAF. Tresguerres (Edit). Editorial McGraw-Hill, Madrid, España, 1049-1063.
12. Billard J. (1996). Functional heterogeneity of pituitary gonadotropes in response to a variety of neuromodulators. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 123: 163-170.
13. Behre, H.M., Klein, B., Steinmeyer, E., McGregor, G.P., Voigt, k., Nieschlag, E. (1992). Effective suppression of luteinizing hormone and testosterone by single doses of the new gonadotropin-releasing hormone antagonist cetorelix (SB-75). *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 75:393-398.

14. Bowker, R.M.; Westlund, N.; Coulter, J.D. (1981). Serotonergic projections to the spinal cord from the midbrain in the rat: An immunocytochemical and retrograde transport study. *Neurosci.*,24: 221-226.
15. Blanchard KT., Lee J.; Boeckelheide K., Leuprolide J. (1998). A gonadotropin-releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat, resulting in normalized stem cell factor expression. *Endocrinology*, 139; 236-244.
16. Brailowsky S. (1995). Las sustancias de los sueños, neuropsicofarmacología, Editorial Fondo de Cultura Económica, México, 66-82.
17. Castillo, M.G., (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. G. Castillo.(Edits). Editorial IMTA, Mexico, 13-30.
18. Csaba Z., Csernus V., Gerendai I. (1998). Intratesticular serotonin effects steroidogenesis in the rat testis. *J. Neuroendocrinol*, 10: 371-376.
19. Collu R., Jequier J.C., Letarte J., Leboeuf G., Ducharme JR. (1978). Endocrinology effects of Brain Serotonin Depletion by 5,6-dihydroxytryptamina in prepuberal Male rats. *Neuroendocrinology*, 14:139-150.
20. Comhaire, F.H. (1993). Methods to evaluate reproductive health of the human male. *Reproductive toxicity*, 7: 39-48.
21. Commins, L. D., Axt, J. K., Vosmer, G., Seiden, S. L. (1986). 5,6-Dihydroxytryptamine, a serotonergic neurotoxin, is formed endogenously in the rat brain. *Brain Research*, 12:7-13.
22. Cornwall, G.A., Vindivich, D.,Tillman,D.(1998).The effect of sulfhydryl oxidation on the morphology of immature hámster epididymal spermatozoa induced to acquire motility in vitro. *Biology of reproduction*, 39:141-155.
23. Cooper T. G. (1998) Epididymis. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil, J. D. Neill (Edits). Academic Pres., Inc. E.U.A., Vol. 2, 1-17.
24. Curtis, H., Barnes N. (1996). La reproducción. En: **Invitación a la Biología**. H. Curtis, N. Barnes (Edits). Editorial Medica Panamericana, quinta edición, Madrid, España, 665-673.
25. Culler MD., Negro-Vilar A. (1986). Evidence that pulsatile Follicle- Stimulating Hormone secretion is independent of endogenous Luteinizing Hormone Releasin Hormone. *Endocrinology*, 118: 609-612.
26. Das TK., Mazumber R., Biswas NM. (1985). Effect of intraventricular injection of 5,6-dihydroxytryptamine on spermatogenesis and plasma testosterone levels in the rat. *Journal of Endocrinology*, 106: 395-400.
27. DeMott R.P., Suarez SS. (1993). Hyperactivated sperm progression in the mouse oviduct. *Biology of Reproduction*, 46; 779-785.
28. Eddy E. M., O'Brien D. A. (1994). The spermatozoon. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, J. D. Neill (Edits.). Raven Press, New York, EUA, 1349-1378.
29. Eddy, E. M. (2006). The spermatozoon. En: **Physiology of Reproduction**. (edits) J. Neill. Chapter 1, 3ª Edition. Academic Press Elsevier, New York pp: 3-54.

30. Evaul, K., Hammes, R.M., (2008). Cross-talk between G Protein-coupled and Epidermal Growth Factor Receptors Regulates Gonadotropin-mediated Steroidogenesis in Leydig Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 283: 27525–27533.
31. Frankfurt, M., Lauder, M. J., Azmitia, E. C. (1981). The immunocytochemical localization of serotonergic neurons in the rat hypothalamus. **Neuroscience**, 24: 227-232.
32. Ganong, WF. (2004). Fisiología Médica. Editorial Manual Moderno, decimo novena edición, México, 460-471.
33. Garner, L.D., Johnson, A.L.(1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide. **Biology of reproduction**, 53: 276-284.
34. Gartner, L., Hiatt, J. (2007). Aparato reproductor masculino. En: **Histología, texto y atlas**. L. Gartner, J. Hiatt (Edits) Editorial McGraw Hill, tercera edición, México, 628-645.
35. Geneser, F. (2000). Órganos de la reproducción. En: **Histología**. F. Geneser (Edit.).Editorial Medica Panamericana, tercera edición, Argentina, 639-663.
36. Gerendai, I., Toth, E., Boldogkol, Z. (2000). Central nervous system structures labelled from the testis using the transsynaptic viral tracing technique. **Journal of Neuroendocrinology**, 12: 1087-1095.
37. Gilbert, S. (2003). Reproducción. En: **Biología del desarrollo**. S. Gilbert (Edits). Editorial Panamericana, decima edición, México, 459-480.
38. Granner, D. K. (1988). Hormonas de las gónadas. En: **Bioquímica de Harper**. R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell (Edits.). Manual Moderno, décimo primera edición, México, 530-546.
39. Griswold, M.D.(1995). Interactions between germ cells and Sertol cells in the testis. **Biology of reproduction**. 52: 211-216.
40. Guttman, J., Kimel. G., Volg. A., (2000). Dynein and plus-end microtubule-dependent motors are associated with specialized Sertol cell junction plaques (ectoplasmic specializations). **Journal of Cell Science**. 113: 2167-2176.
41. Hamzeh, M., Robaire, B. (1992). Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. **Biology of reproduction**, 46:301-308.
42. Hedrich, J. H. (2004). The laboratory mouse. Editorial Elsevier Academic Press, primera edición, USA, 129-199.
43. Holdcraft, R.W., Braun, R.E. (2004)Hormonal regulation of spermatogenesis. **Journal of andrology**, 27: 335-342.
44. Houdouin. F., Cespuglio, R. and Jouvet M. (1991). Effects induced by the electrical stimulation of the nucleus raphe dorsalis upon hypothalamic release of 5-hydroxyindole compounds and sleep parameters in the rat. **Brain Research**. 565: 48-56.
45. Jacobs BL., Azmitia EC. (1992). Structure and function of the brain serotonin system.*Physiol. Rev.*, 72: 165 229.
46. James, P.; Rivier, C.; Lee, S. (2007). Presence of corticotrophin-releasing factor and/or tyrosine hydroxylase in cells of a neural braintesticular pathway that are labelled by a transganglionic tracer. **J. Neuroendocrinol.**, 20: 173-181.
47. Jennes, L. Beckman, W. Stumpt, W. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenalinergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. **Esperimental Brain research**. 46: 331-338.
48. Jiménez Del Rio M., Vélez-Pardo C. (2002). Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of

hydrogen peroxide (H₂O₂), caspase-3, and nuclear factor kappa-B (NF-κB), p53, c-Jun transcription factors. **Biochemical Pharmacology**, 63: 677-688.

49. Jiménez-Trejo, F., Tapia-Rodríguez, M., Queiroz, D., Padilla, P., Avellar, M.C., Gutiérrez-Ospina, G. (2007). Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies. **Journal of Andrology**. 28: 138-149.
50. Justo S. N., Rossano G. L., Szwarcfarb B., Rubio M. C., Moguilevsky J. A. (1989). Effects of serotonergic system on FSH secretion in male y female rats: evidence for stimulatory and inhibitory actions. **Neuroendocrinology**, 50: 382-386.
51. Krzanowska, H., Styrna, J., Wabik-Sliz, B. (1995). Analysis of sperm quality in recombinant mouse strains: correlation of sperm head shape with sperm abnormalities and with the incidence of supplementary spermatozoa. **J. Reprod. Fertil**, 104: 347-354.
52. Krester D. M., Kerr J. B. (1994). The cytology of the testis. En: **Physiology of Reproduction**. E. Knobil, J. D. Neill. (Edits.) Vol.1 segunda edición. Raven Press, New York, USA, 1621-1681.
53. Kordon C., Drouva S. V., Martínez E. G., Weiner R. I. (1994). Role classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: **Physiology of Reproduction**. E. Knobil, J. D. Neill. (Edits.) Vol.1 segunda edición. Raven Press, New York, USA, 1621-1681
54. Lewis B., Aitken R.J. (2001). Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. **Biology of Reproduction**, 64; 1545-1556.
55. Leung, G., Dun, S., Wong, P. (1999). Serotonin via 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium. **Journal of Physiology**.3: 657-667.
56. Lui, W., Lee, W. M., (2009). Molecular mechanism by which hormones and cytokines regulate cell junction dynamics in the testis. **Journal of Molecular Endocrinology**, 43: 43-51.
57. 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.
58. Małgorzata, S., Kolasa, A., Sikorski, A. (2010). The Immunoeexpression of FSH-R in the Ductuli Efferentes and the Epididymis of Men and Rat: Effect of FSH on the Morphology and Steroidogenic Activity of Rat Epididymal Epithelial Cells In Vitro. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 10: 1-8.
59. Matthew, J. S., Lothar J. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurons directly during the oestrous cycle. **Reproduction**. 122: 1-10.
60. Matthiesson, K.L., McLachlan R.I., O'Donnell L., Robertson D.M. (2006). The relative roles of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone en maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. **Journal of Clinical Endocrinology**. 10: 3962-3969.
61. McCann, S.M., Karanth, S., Mastronardi, C.A. (2001). Control of gonadotropina secretion by follicle-stimulating hormone-releasing factor, luteinizing hormone-releasing hormone, and leptin. **Medical research**, 32:476-485.

62. McLachlan R. I., Wreford NG., O'Donnell L., De Krester DM., Robertson DM. (1996). The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. **Journal of Endocrinology**, 148: 1-9.
63. McLachlan R. I., Wreford NG., De Krester D.M., Robertson D.M. (1995). The effects of recombinant Follicle-Stimulating Hormone on the Restoration of spermatogenesis in the Gonadotropin-Releasing Hormone-Immunized adult rat. **Endocrinology**. 136: 4035-4042.
64. McLachlan R. I., O'Donnell L., De Krester D.M., Pratis K. Robertson D.M. (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man. **Journal of endocrine**. 149-176.
65. Mendoza P. (2008). Aspectos Generales de la Neurotransmisión en el SNC En: **Farmacología Médica**. P. Mendoza (Edit) Editorial Médica Panamericana, sexta edición, México, 269-272.
66. Monroy J., Ayala ME., Chavira R., Damián-Matsumura P., Domínguez R. (2003). Comparative effects of injecting 5,6-dihydroxytryptamine in the dorsal or medial raphe nuclei on rat puberty. **Brain Research Bulletin**, 60: 307-315.
67. Moguilevsky JA., Faigón MR., Seacchi P., Szwarcfarb B. (1985). Effect of serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats. **Neuroendocrinology**, 40: 135-138.
68. Morello H., Caligaris L., Haymal B., Taleisnik S. (1989). Inhibition of proestrous LH surge and ovulation in rat evoked by stimulation of the medial raphe nucleus involves a GABA-mediated mechanism. **Neuroendocrinology**, 50: 81-87.
69. Muffly, K. E., Nazian S.J. Cameron, D, (1994). Effects of follicle-stimulating hormone on the junction-related Sertoli cell cytoskeleton and daily sperm production in testosterone-treated hypophysectomised rats. **Biology of Reproduction**. 51: 158-166.
70. Multigner, L., Gagnon, J., Van dorsselaer , A. (1992). Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1. *Biologia del desarrollo*, 199-200.
71. Murugesan,P., Kanagaraj, P., Yuvaraj, S., Balasubramanian, K. (2004). The inhibitory effects of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 on Leydig cell LH receptors, steroidogenic enzymes and antioxidant enzymes in adult rats. **Journal of Clinical Endocrinology**. 12: 285-299.
72. Nelson, R. (2002). Enfermedades reproductivas. En: *Medicina interna de animales pequeños*. Segunda edición. Editorial Intermedica, Argentina. 958-969.
73. O'Donnell, L., McLachlan, R., Wreford, N., de Kretser, D., Robertson, D. M. (1996). Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. **Biology of reproduction**. 55: 895-901.
74. O'Donnell, L., McLachlan, R., (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. En: **Physiology of Reproduction**. (edits) J. Neill. Chapter 1, 3ª Edition. Academic Press Elsevier, New York pp: 1013-1020.
75. Ojeda S. R., Urbanski H. F. (1994). Puberty in the rat. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, J. D. Neill (Edits.). Vol. 1, segunda edición. Raven Press. New York, EUA, 363-409.
76. Paxinos G. Watson C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York, EUA.

77. Pinilla L, Ranchal A, Aguilar R, Aguilar E. (1994). Role of the serotonergic system in the control of gonadotropin secretion in prepubertal male rats. **European Journal of Endocrinology**. 130: 617-624.
78. Primiani, N., Gregory, M., Dufresne, J., Hermo. L. (2007). Microvillar size and espin expression in principal cells of the adult rat epididymis are regulated by androgens. **Journal of Andrology**, 28: 659-669.
79. Rathi R., Colembrander B., Bevers MM., Gadella BM. (2001). Evaluation in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, 65; 462-470.
80. Rivier, C, Rivest, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis: peripheral and central mechanisms, *Biol. Reprod.* 45 (1991) 523–532.
81. Ross, M. H., Gordon I. K., Wojciech P. (2004). Aparato genital masculino. En *Histología*. M. H. Ross, I. K. Gordon, P. Wojciech (Edits.). Editorial Medica Panamericana, cuarta edición, Buenos Aires, Argentina, 685-714.
82. Ruzsas, C., Limonta, P., Mrtini L. (1982). Role of serotonergic neurones in the control of gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Journal Endocrinology*. 94: 83-89.
83. Ruiz.F.D. (1988). Gametogénesis. En: *Fundamentos de embriología y fisiología de la Reproducción*. Universidad Nacional Autónoma de Mexico, primera edición, México, 188-195.
84. Seligman, J., Shalgi, R., (1991). Protein thiols in spermatozoa and epididymal fluid of rats. **Journal of reproduction and fertility**, 93: 399-408.
85. Seligman, J., Shalgi, R., Kosower, N.S. (1992). Effects of caput ligation on rat sperm and epididymis: protein thiols and fertilizing ability. **Biology o reproduction**, 46: 301-306.
86. Seligman, J., Shalgi, R., Kosower, N.S. (1996). Effects of castration on thiol status in rat spermatozoa and epididymal fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 47:295-301
87. Selvage D. J., Rivier C. (2003). Importance of paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway beetwen the brain y teste thatmodulates testosterone secretion independently of the pituitary. **Endocrinology**, 144: 594-598.
88. Selvage D. J., Parsons. L., Rivier, C.(2006). Role played by brainstem neurons in regulating testosterone secretion via a direct neural pathway between the hypothalamus and the testes. **Endocrinology**, 147: 3070-3075.
89. Schoenfeld HA., Hall SJ., Boekelheide K. (2001). Continuously proliferative stem germ cell partially repopulate the age, atrophic rat testis after gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. **Biology of Reproduction**, 64; 1273-1282.
90. Setchell B.P., Breed W.G. (2006). Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. En: *Physiology of Reproduction*. (Edits) J. Neill. Chapter 17, 3^a Edition. Academic Press Elsevier, New York, EUA. 771-826.
91. Shannon, N.J., Gunnet, J.W., Moore, K.E. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neural activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus, **J. Neurochem.** 47:950–965.

92. Sharpe R.M, Maddocks S, Millar M, Kerr jb, Saunders PT, Mckinnell C. (1992). Identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. **Journal of Andrology**, 13: 172-183.
93. Sharpe R. M. (1994). Regulation of Spermatogenesis. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, J. D. Neill (Edits.) Vol. 1. Raven Press, New York, EUA, 1363-1434.
94. Shishkina GT, Borondin PM. (1989). Involvement of brain serotonin in regulation of sexual maturity in male rats. **Neurosci. Behav. Physiol.** 19: 145-149.
95. Silva, P.F., Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65: 958-978.
96. Silvana A., Andric, Marija M., Janjic, Natasa J., Tatjana S. (2007). Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: 1399–1408.
97. Silverman A., Liune Y., Witkin JW. (1994). The gonadotropin-releasing (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 57-92.
98. Smith MJ, Jennes L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. **Reproduction**, 122: 1-10.
99. Soghomonian JJ., Beradet A., Descarries L. (1988). Ultrastructural relationships of central serotonin neurons. En: *Neuronal Serotonin*. N.N Osborne; M. Hamon(Eds.). Raven Press, New York, EUA, 57-92.
100. Stig H. (2007). Studies on the neuroendocrine role of serotonin, Danish **Medical Bulletin**. USA. 54: 266-288.
101. Syntin,P., Robaire, B. (2001). Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat. **Journal of Andrology**. 22: 235-244.
102. Takeuchi Y. (1988). Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. En: **Neuronal Serotonin**. N. N. Osborne, M. Hamon (Edits.). John Wiley & Sons Press, New York, EUA, 25 26.
103. Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca DR., Dafau ML. (1993). Serotonin Secretion from rat Leydig Cells. *Endocrinology*, 133: 3026-3029.
104. Tresguerres JFA. (1999). Fisiología del sistema endocrino. En: **Fisiología Humana**. JFA. Tresguerres (Edit) Editorial McGraw-Hill interamericana, segunda edición, Madrid, España, 1050-1053.
105. Tyce, GM. (1985). Biochemistry of serotonin. En: *Serotonin and the cardiovascular system*. (Edit) Vanhoutte PM, Editorial Raven Press, New York, 1-13.
106. Van de Kar, L. D., Lorens S. A. (1979). Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and median midbrain raphe nuclei. **Brain Research**, 162: 45-54.

107. Van de Kar, L. D., Lorens S. A., Alers, V. G., Van Orden L.S.(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.
108. Velasco M.A. (1999). Serotonina y antiserotonínicos. En: **Farmacología Fundamental**. M.A. Velasco (Edit) Editorial McGraw-Hill, cuarta edición, Madrid, España, 152-165.
109. Vertes, R.P.; Kocsis, B. (1994). Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 340: 11-26.
110. Weichert C. K., Presh W. (1981). Elementos de anatomía de los cordados, 4ª edición, Mc Graw-Hill, New York, EUA, 314-328.
111. Wyrobek, A.J., Bruce, R.W. (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 72: 4425-4429.
112. Yanagimachi R. (1994). Mammalian fertilization. En: **Physiology of Reproduction**. J. Neill. (Edit) Editorial Academic Press Elsevier, segunda edición, New York, EUA, 189-317.
113. Yoshida, T., Ioshii, S.O., Izutsu, K. (1994). Association of cytoplasmic dynein with manchette microtubules and spermatid nuclear envelope during spermiogenesis in rats. **Journal of cell sciencie**. 107: 625-633.
114. Zhou, J., Du, Y,R., Qin, W.H., Mansouri, A., Guang Hu, Y. (2009). RM-BP3 is a manchette-associated protein essential for spermiogenesis. *Development*, 136: 373-382.