



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA LESIÓN
QUÍMICA DEL NÚCLEO MEDIAL DEL
RAFÉ EN LA ETAPA JUVENIL SOBRE LAS
FUNCIONES DEL TESTÍCULO DE LA
RATA**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO
PRESENTA:
DIANA ELIZABETH VELÁZQUEZ
TORRES**



Directora: Dra. María Elena Ayala Escobar.

MÉXICO, D. F.

ENERO, 2008



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 AUTONOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA LESIÓN QUÍMICA DEL
NÚCLEO MEDIAL DEL RAFÉ EN LA ETAPA JUVENIL SOBRE
LAS FUNCIONES DEL TESTÍCULO DE LA RATA**

Tesis para obtener el título de biólogo

Tesis presentada por: Diana Elizabeth Velázquez Torres

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

Durante la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo de DGAPA
PAPIIT convenio IN-206805.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su ayuda y apoyo brindado en la elaboración de esta tesis.

A los miembros del jurado:

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. Roberto Domínguez Casalá

M. en C. Raúl Zavala Chavero

M. en C. Rosalva Rangel Corona

Dra. María de Lourdes Mora García

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 la Dra. Juana Monroy Moreno por la asesoría en cromatografía de líquidos

A Juanita, Eloir, Juan, Julio, Jessica, Daniel, Andrea, Maritza y María Luisa por crear un ambiente de trabajo agradable y por brindarme su valiosa amistad.

A Adriana y Román y a todo el personal del bioterio por su cooperación en el cuidado y mantenimiento de los animales de este estudio.

AGRADECIMIENTOS

A mis papas, María y David, por todo el apoyo que me dan, por escucharme y aconsejarme en todo momento, por el gran esfuerzo que hacen día con día para darme todo lo que necesito y un poco más, gracias a ustedes he llegado hasta donde estoy y porque más que padres son mis amigos.

A mis hermanos, Mayra y David, 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 afortunada que soy de tenerlos a mi lado.

A Jesús y Eric porque han cambiado la forma de ver las cosas, porque llenaron a todos con una enorme felicidad y una nueva visión de la vida.

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

A Cesar por ser una persona que ocupa un lugar muy especial en mi vida, porque una persona como tú es difícil de encontrar y yo tengo la fortuna de haberte conocido.

A Juanita, Eloir, Juan, Julio, Andrea, Maritza, Jessica y Daniel por su ayuda y la confianza que tienen en mí, pero sobre todo por su valiosa amistad que vale mas que nada en este mundo.

INDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Núcleo del raquí y serotonina.....	3
Síntesis de serotonina.....	3
Anatomía e histología del testículo.....	6
Túbulo seminífero.....	6
Espermatozoide.....	8
Espermatogénesis.....	10
Espermatogonia.....	10
Espermatocitos.....	10
Espermigénesis.....	11
Epidídimo.....	12
Vesícula seminal.....	13
Próstata.....	14
Esteroidogénesis.....	15
Regulación de las funciones del testículo.....	18
Regulación de la secreción de las gonadotropinas en el macho.....	19
Inervación serotoninérgica del testículo.....	20
Serotonina y la regulación de las funciones del testículo.....	21
Núcleos del raquí-hipotálamo.....	23
5,6-dihidroxitriptamina.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25

HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
MATERIALES Y MÉTODO	28
Procedimiento de la microinyección.....	28
Lesión química del núcleo medial del rafé.....	28
Estimulación del sistema serotoninérgico del núcleo medial del rafé.....	28
Procedimiento de autopsia.....	29
Evaluación de la espermatogénesis.....	29
Número de espermatozoides.....	29
Movilidad.....	30
Viabilidad.....	30
Cuantificación de gonadotropinas y hormonas esteroides.....	30
Cuantificación de dopamina, noradrenalina y serotonina.....	31
Análisis del sitio de lesión.....	31
Análisis estadístico de resultados.....	32
RESULTADOS	33
Efecto de la lesión química del núcleo medial del rafé.....	33
Animales sacrificados a los 45 días.....	34
Cuantificación de serotonina.....	34
Cuantificación de catecolaminas.....	34
Cuantificación de gonadotropinas.....	34
Cuantificación de hormonas esteroides.....	34
Peso de órganos.....	41

Animales sacrificados a los 65 días de edad.....	42
Cuantificación de serotonina.....	42
Cuantificación de catecolaminas.....	42
Cuantificación de gonadotropinas.....	47
Cuantificación de hormonas esteroides.....	47
Evaluación de la espermatogénesis.....	47
Peso de órganos.....	47
Efecto de la estimulación del sistema serotoninérgico del núcleo medial del rafé.....	51
Cuantificación de serotonina.....	51
Cuantificación de gonadotropinas.....	52
Cuantificación de hormonas esteroides.....	52
Peso de órganos.....	52
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	66
PERSPECTIVAS.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68
ANEXO 1.....	72
ANEXO 2.....	73

RESUMEN

La inervación serotoninérgica del hipotálamo se origina en los NDR y NMR. En la rata macho esta inervación modula la secreción de GnRH y de las gonadotropinas (FSH y LH). Hasta el momento las evidencias que señalan la participación del NMR en la modulación de la secreción de las gonadotropinas son contradictorias.

En el presente estudio se analizaron los efectos de la lesión química del NMR producida por la administración de 10 µg de 5,6-DHT, un neurotóxico selectivo de las neuronas serotoninérgicas, en ratas macho de 30 días de edad sobre el sistema serotoninérgico del hipotálamo, la secreción de las gonadotropinas y las funciones del testículo (espermatogénesis y secreción de testosterona). Así mismo se analizaron los efectos de la estimulación química del NMR inducida por la microinyección de 5-HTP, un precursor de la 5-HT, en la secreción de gonadotropinas.

En comparación con el grupo testigo absoluto en los animales que se administró el ácido ascórbico (Vehículo) y se sacrificaron a los 45 días de edad no se modificó el sistema serotoninérgico, ni las funciones del testículo, ni la secreción de FSH. En relación con el grupo testigo absoluto la concentración de LH fue mayor [0.54±0.03 vs. 1.05±0.21]. En comparación con el grupo de animales tratados con vehículo, en el grupo de animales con lesión del NMR la concentración de 5-HT y 5-HIAA en HA fue menor [5-HT: 1.37±0.09 vs. 0.80±0.13; 5-HIAA: 0.62±0.05 vs. 0.34±0.04, p<0.05] y en el HM únicamente la concentración del 5-HIAA fue menor [0.45±0.05 vs. 0.28±0.04, p<0.05]. La concentración de LH en el suero de estos animales también fue menor [1.05±0.21 vs. 0.62±0.11, p<0.05] y no se modificó el peso de los testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes, ni la concentración de hormonas esteroideas y FSH.

En comparación con el grupo testigo absoluto, en los animales con microinyección del vehículo en el NMR y sacrificados a los 65 días de edad la concentración de 5-HIAA en el HA fue menor [1.48±0.13 vs. 1.66±0.13, p<0.05], FSH [6.40±0.27 vs. 4.83±0.2, p<0.05] y progesterona [7.69±1.17 vs. 3.88±0.99, p<0.05]. En los animales con lesión química del NMR la concentración de 5-HT en el HA e HP fue menor [HA: 1.66±0.13 vs. 0.88±0.10; HP: 2.50±0.13 vs. 1.14±0.24, p<0.05], en el HM disminuyó 5-HT y 5-HIAA [5-HT: 1.32±0.09 vs. 0.73±0.12; 5-HIAA 0.42±0.03 vs. 0.26±0.04, p<0.05] y no se modificó la espermatogénesis, el peso de los testículos, la próstata, la vesícula seminal y las glándulas coagulantes, ni la concentración de FSH y hormonas esteroides.

En los animales con microinyección de 5-HTP en el NMR la concentración de 5-HT y 5-HIAA en el HA fue mayor [5-HT: 1.42±0.18 vs. 1.88±0.12; 5-HIAA: 0.52±0.10 vs. 1.23±0.26, p<0.05] que en el grupo tratado con vehículo. No se presentaron cambios en el HM y HP, así como en la concentración de hormonas esteroides. En comparación con el grupo testigo absoluto en los animales con microinyección de vehículo o 5-HTP en el NMR la concentración de FSH [Vehículo: 10.68±0.89 vs. 7.67±0.51; 5-HTP: 10.68±0.89 vs. 7.88±0.91] y LH [Vehículo: 0.99±0.12 vs. 0.65±0.02; 5-HTP: 0.99±0.12 vs. 0.64±0.04, p<0.05] fue menor.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que en la rata prepúber la inervación serotoninérgica que se origina en el NMR estimula la secreción de LH y no participa en la regulación de la secreción de FSH.

INTRODUCCIÓN

Las funciones del testículo, como son la espermatogénesis y la esteroidogénesis, son reguladas por las gonadotropinas (FSH y LH)]. La LH en las células de Leydig estimula la secreción de los andrógenos principalmente la testosterona. Mientras que la FSH en la célula de Sertoli estimula la proliferación de las células germinales.

En el hipotálamo se sintetiza la GnRH, esta hormona actúa en la hipófisis donde modula la síntesis y liberación de la FSH y LH (Brown, 1994). Se ha mostrado que diferentes sistemas de neurotransmisión regulan la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas entre los que se encuentra el sistema serotoninérgico (Frazer y Hensler, 1999; Jenness y col., 1982; Takeuchi, 1988).

La 5-HT que se encuentra en el sistema nervioso central es producida por el núcleo del rafe, en este núcleo se encuentran los somas de las neuronas serotoninérgicas que inervan distintas áreas del cerebro. De acuerdo a distintas características fisiológicas las neuronas serotoninérgicas que se encuentran en el núcleo del rafe se divide en el NDR, NMR y NPR. Las fibras serotoninérgicas que se originan en el NDR y NMR inervan principalmente el hipotálamo, mientras que el NPR a la médula espinal (Frazer y Hensler, 1999).

Se sugiere que el sistema serotoninérgico participa en la modulación de las funciones de la gónada. En relación a la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NMR, se mostró que en ratas hembras adultas con lesión electrolítica del NMR o en la rata hembra prepúber de 30 días de edad con lesión química de este núcleo inducida por la microinyección de la 5,6-DHT no se modifica la secreción de la LH (Barofsky, 1975; Monroy y col., 2003). Mientras que, en la rata adulta la estimulación electroquímica del NMR inhibe la liberación de LH (Morello y col., 1985). Estos resultados permiten pensar que la inervación que

se origina en el NMR no participa o ejerce un efecto inhibitorio en la modulación de la secreción de la LH.

Las evidencias que apoyan la participación que tiene la inervación serotoninérgica que se origina en el NMR en la regulación de la secreción de las gonadotropinas en la rata hembra son contradictorias. Mientras que, no existen estudios en los que se muestre que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NMR participa en la modulación de la secreción de las gonadotropinas y como consecuencia en las funciones del testículo. Por ello, en el presente estudio se analizó los efectos de la microinyección de la 5,6-DHT en el NMR o la estimulación de este núcleo por la microinyección del 5-HTP en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, la espermatogénesis y la secreción de progesterona y testosterona, en ratas prepúberes.

MARCO TEÓRICO

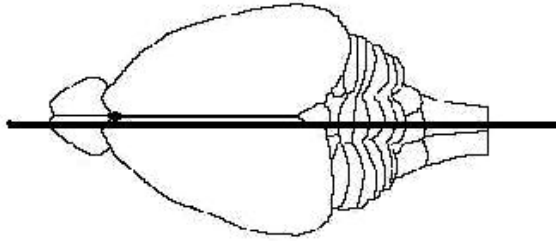
Núcleo del rafé y serotonina

La 5-HT es un neurotransmisor distribuido en diferentes regiones del encéfalo y en tejidos periféricos (Brown, 1994; Frazer y Hensler, 1999; Takeuchi, 1988; Tinajero y col., 1993). En el sistema nervioso central es producida principalmente por un grupo de 9 paquetes celulares (B₁-B₉), que se localizan en el cerebro medio y que en conjunto constituyen los núcleos del rafé (Figura 1). Estos núcleos se dividen en NDR, NMR y NPR (Frazer y Hensler, 1999). Los grupos B₆ y B₇ conforman el NDR y los paquetes B₈ y B₉ el NMR. El NDR y NMR proyectan sus fibras hacia varias áreas del encéfalo, entre ellas el hipotálamo (Takeuchi, 1988). En el hipotálamo, el núcleo supraquiasmático, el área hipotalámica anterior, el núcleo preóptico medial, y el núcleo arcuato, reciben inervación del NMR, mientras que el NDR inerva el hipotálamo anterior y lateral y el núcleo arcuato (Van der Kar y Lorens, 1979). El rafé del puente envía su inervación hacia el bulbo y la médula espinal.

Síntesis de serotonina

La 5-HT se sintetiza a partir del aminoácido L-triptofano que se obtiene de las proteínas que se ingieren en la dieta. Por acción de la enzima triptofano hidroxilasa, el cofactor pteridina y una molécula de agua, el triptofano se transforma en 5-HTP, el cual se convierte a 5-HT por acción de la enzima aminoácido aromático descarboxilasa, enzima que participa en otras reacciones de descarboxilación. La 5-HT se libera en la hendidura sináptica y parte de ella es recapturada por la misma neurona serotoninérgica (Frazer y Hensler, 1999).

Corte sagital



Corte coronal

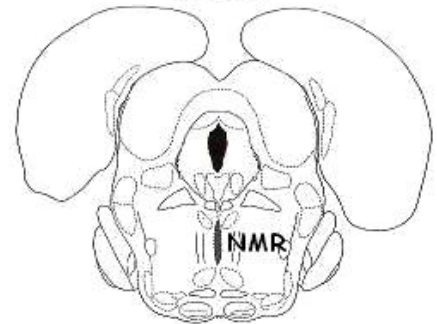
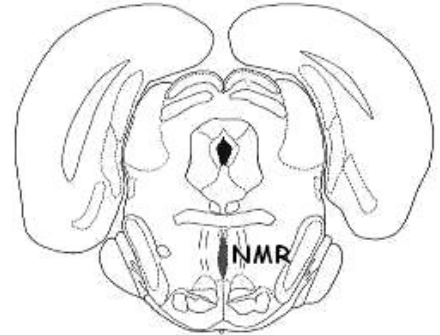
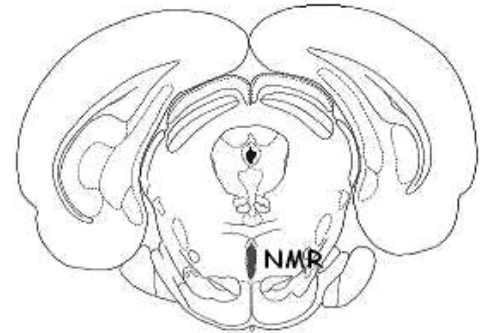
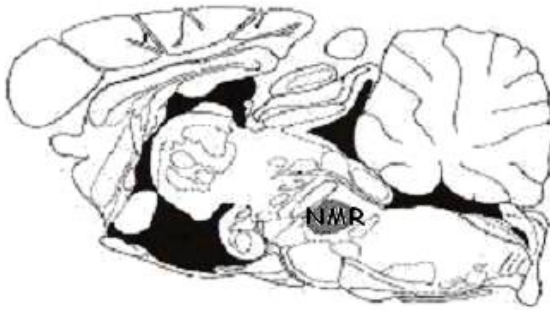
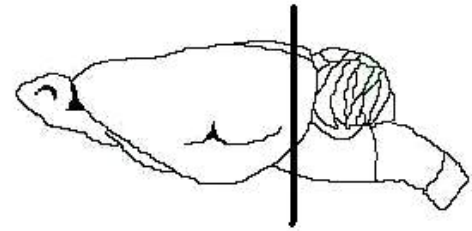


Figura 1. Esquema de la localización del NMR (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

La 5-HT es convertida en 5-hidroxiindoleacetaldehído por la MAO y éste es oxidado por la aldehído deshidrogenasa y forma el 5-HIAA que es el principal metabolito de la 5-HT (Frazer y Hensler, 1999) (Figura 2).

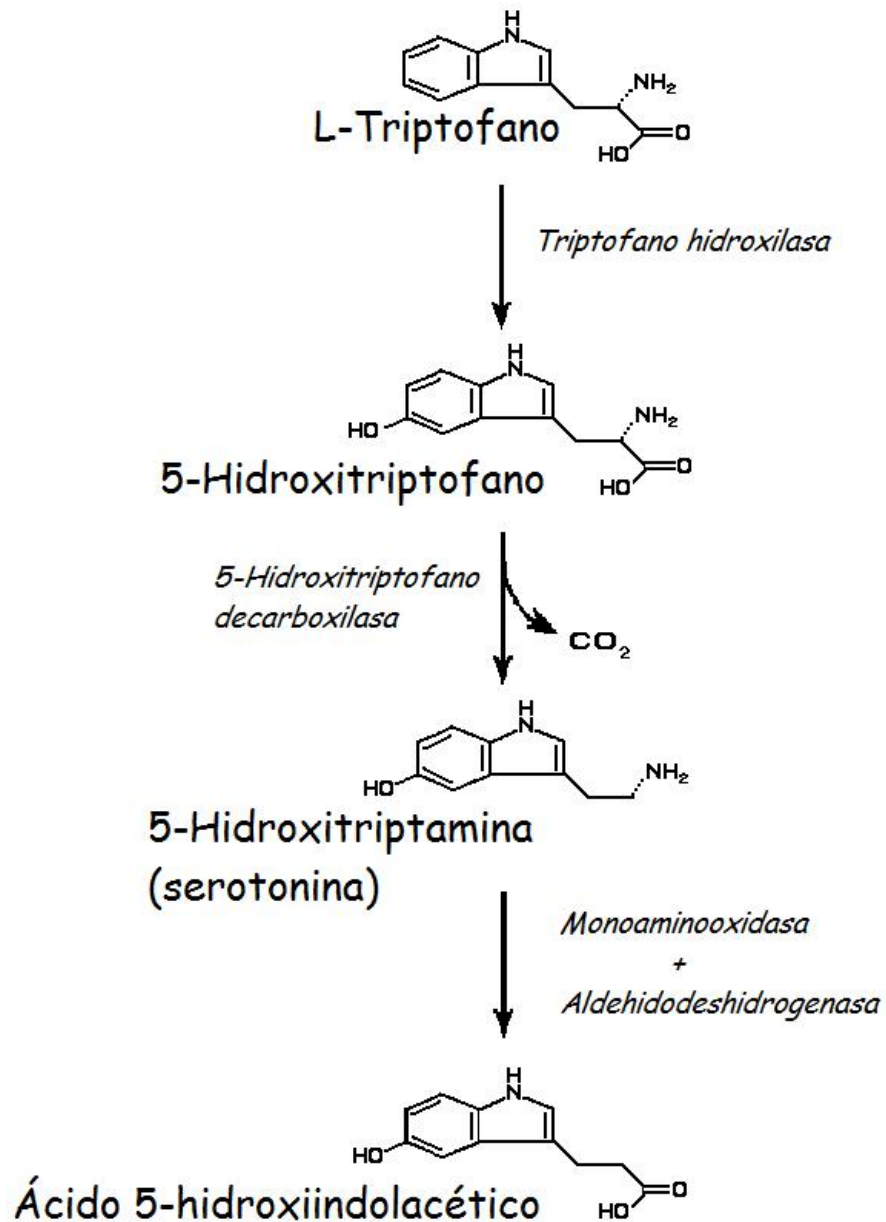


Figura 2. Síntesis de 5-HT (Frazer y Hensel, 1999).

Anatomía e histología del testículo

Los testículos son los órganos reproductores masculinos primarios. Son estructuras pares que en la mayoría de los mamíferos se localizan en el interior de una bolsa externa llamada escroto. Son de forma ovalada y superficie lisa. El testículo está compuesto por tres elementos:

1. La túnica albugínea. Formada por tejido conectivo fibroso en el que se encuentran fibras de músculo liso. En la superficie interna de la túnica albugínea hay tejido conectivo vascularizado llamado túnica vasculosa (Weichert y Presh, 1981; Krester y Kerr, 1994; Ross y col., 2004).
2. El túbulo seminífero. En la rata cada testículo contiene túbulos seminíferos, de unos 250 μm de diámetro y 50 cm de largo, que se comunican con los túbulos rectos que conforman la rete testis, que se localiza en el mediastino del testículo (Weichert y Presh, 1981; Krester y Kerr, 1994; Bellido, 1999; Sharpe, 1994).
3. El tejido intersticial. Representa aproximadamente el 15% del volumen total del órgano, rodea los túbulos seminíferos y está conformada por células intersticiales o células de Leydig (que sintetizan andrógenos), vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas, fibroblastos, macrófagos y células cebadas (Weichert, 1981; Krester y Kerr, 1994; Bellido, 1999; Sharpe, 1994).

El túbulo seminífero

En el túbulo seminífero se encuentran células de la línea germinal en distintos estados de maduración y las células de Sertoli (Krester y Kerr, 1994; Bellido, 1999; Sharpe, 1994). La pared del túbulo está formada por una membrana basal continua, rodeada por varias capas de células mioides que son las responsables de la contractilidad del túbulo, lo cual es necesaria para el transporte de los espermatozoides no móviles desde el túbulo seminífero hasta la red testicular (Bellido, 1999; Krester y Kerr, 1994).

Las células de Sertoli se apoyan en la membrana basal y llegan hasta el lumen del túbulo. Son grandes, alargadas, de forma piramidal e irregular, su volumen va de 5,000-8,000 μm^3 y su área de 9,000-20,000 μm^2 . En su citoplasma hay mitocondrias, abundante retículo endoplásmico liso, escaso retículo endoplásmico rugoso, lisosomas y aparato de Golgi. La forma del núcleo de la célula de Sertoli varía según el estado funcional. Puede ser alargada, redonda o triangular (Krester y Kerr, 1994).

Las funciones de la célula de Sertoli son:

1. Nutrición, proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de los espermatocitos y las espermatides.
2. Maduración de las células germinales.
3. Formación de la barrera hematotesticular, barrera que divide al epitelio germinal en dos compartimientos. Está formada por uniones estrechas entre las células de Sertoli, que crean una barrera permeable, que permite el paso de iones, aminoácido y proteínas. Por lo que el líquido que se encuentra en los túbulos seminíferos difiere considerablemente de la composición del plasma. El epitelio germinal se divide en:
 - a. El compartimiento germinal o basal, que contiene espermatogonias y espermatocitos en preleptoteno y leptoteno.
 - b. El compartimiento adluminal que contiene espermatocitos en zigoteno, paquiteno y diploteno y espermátides. Este compartimiento tiene un microambiente adecuado para el desarrollo de las células germinales y establecer un gradiente osmótico que facilita el transporte del líquido hacia la luz tubular.
4. Fagocitosis, las células de Sertoli fagocitan las células germinales dañadas y los cuerpos residuales de citoplasma que resultan de la transformación de la espermátide a espermatozoide (Bellido, 1999; Sharpe, 1994; Krester y Kerr, 1994).

5. Función secretora, las células de Sertoli secretan diferentes sustancias que pasan a la luz del túbulo y forman parte del líquido tubular. Entre estas se encuentra:
- a. La ABP, glicoproteína que se le une la testosterona, dihidrotestosterona y al 17β -estradiol. La secreción de ABP es estimulada por la FSH (Bellido, 1999; Granner, 1988; Ross y col., 2004).
 - b. La inhibina, hormona glucoproteica que actúa directamente en la hipófisis y modula la secreción de FSH por medio de un mecanismo de retroalimentación negativa. La secreción de inhibina está regulada por la FSH (Bellido, 1999; Granner, 1988; Ross y col., 2004).
 - c. La activina, estimula la secreción de la FSH e inhibe la de testosterona por las células de Leydig y estimula la proliferación de las espermatogonias.
 - d. Transferrina es una glicoproteína que transporta hierro hasta las células germinales.
 - e. El factor de crecimiento de los túbulos seminíferos, es un mitogéno que modula la proliferación de las células germinales (Bellido, 1999).

Espermatozoide

El espermatozoide o gameto masculino es una célula diferenciada producto del proceso de espermatogénesis que ocurre en los túbulos seminíferos (Curtis y Barnes, 1996; Merchant, 1991).

Los espermatozoides están compuestos por la cabeza, cuello y la cola o flagelo. La cabeza está constituida por:

1. El acrosoma: Se origina a partir del aparato de Golgi de la espermátida, contiene enzimas hidrolíticas necesarias durante la penetración de la corona radiada y la zona pelúcida del ovocito por parte del espermatozoide.

2. El núcleo: Contiene el ADN condensado asociado con proteínas nucleares llamadas protaminas. El complejo protamina-ADN es estabilizado por puentes disulfuro entre las protaminas. El núcleo se encuentra recubierto por el capuchón cefálico acrosómico.
3. El citoesqueleto: Se encuentra en el espacio que hay entre el acrosoma y la membrana plasmática. Tiene una función estructural, ya que define 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; Ross y col., 2004; Geneser, 2000).

El cuello es muy corto y se fija a la placa basal. Contiene 9 columnas segmentadas de las cuales se originan las fibras densas externas, detrás de la placa basal se encuentra el centriolo proximal.

La cola está formada por pieza intermedia, principal y terminal.

1. La pieza intermedia: Contiene dos microtubúlos centrales rodeados por nueve pares de túbulos periféricos formados por tubulina y actina. A esta estructura se le denomina axonema o complejo axonémico. Nueve fibras gruesas que se unen a las columnas segmentadas, estas fibras gruesas acompañan los túbulos dobles del complejo axonémico. Mitocondrias dispuestas de forma helicoidal, alrededor de las fibras densas externas y del complejo axonémico, las cuales proveen la energía para el movimiento de la cola.
2. La pieza principal: contiene la vaina fibrosa por fuera de las fibras gruesas y del complejo axonémico.
3. Pieza terminal: Contiene el complejo axonémico (Eddy y O'Brien, 1994; Ross y col., 2004; Geneser, 2000).

Espermatogénesis

Es el proceso del desarrollo de las células germinales dentro de los túbulos seminíferos. Durante este proceso se llevan a cabo una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias seguidas de dos divisiones meioticas de los espermatocitos y cambios morfológicos de las espermatides que dan origen a los espermatozoides (Eddy y O'Brien, 1994; Ross y col., 2004; Geneser, 2000) (Figura 3).

Espermatogonia

La espermatogénesis inicia con las espermatogonias tipo A que son células diploides que se apoyan en la membrana basal de los túbulo seminíferos, que proliferan por divisiones mitóticas. Las espermatogonias tipo A tiene 4 divisiones mitóticas consecutivas A₁, A₂, A₃, A₄. La espermatogonia A₄ al dividirse mitóticamente da origen a la espermatogonia intermedia, que al dividirse da origen a la espermatogonia tipo B (Curtis y Barnes, 1996; Krester y Kerr, 1994; Ross y col., 2004; Geneser, 2000) (Figura 3).

Espermatocitos

Las espermatogonias tipo B se diferencian por medio de una división mitótica para formar los espermatocitos primarios, que son células con núcleo esférico y tiene las características de las espermatogonias de tipo B. Los espermatocitos primarios duplican su ADN poco después de formarse y antes de que inicie la meiosis (preleptoteno). En este tipo celular se inicia la primera división meiótica o reduccional. Como resultado de está primera división se forman dos espermatocitos secundarios. En los espermatocitos secundarios se inicia la segunda división meiótica y se forma dos espermátides redondas por cada espermatocito secundario (haploides) (Curtis y Barnes, 1996; Krester y Kerr, 1994; Ross y col., 2004; Geneser, 2000) (Figura 3).

Espermioogénesis

La transformación de la espermátide en espermatozoide se denomina espermioogénesis. En esta etapa, el material nuclear se compacta y forma la cabeza del espermatozoide; los centriolos se reorganizan e inician el armado de nueve dobletes microtubulares periféricos y los dos túbulos centrales que dan origen al axonema de la cola del espermatozoide, que en conjunto constituyen el flagelo. Alrededor de la envoltura nuclear se forma el granulo acrosómico, a partir del aparato de Golgi, este granulo posteriormente se transforma en el acrosoma, que rodea la parte anterior de la cabeza del espermatozoide. En la pieza media se reorganizan las mitocondrias; finalmente se elimina la mayor parte del citoplasma que es fagocitado por las células de Sertoli (Ross y col., 2004; Geneser, 2000; Krester y Kerr, 1994) (Figura 3).

Los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero y transportados al epidídimo, de aquí a los conductos deferentes donde se almacenan la mayoría de ellos. Estos conductos desembocan en los conductos excretores de la vesícula seminal. El conducto deferente de cada testículo entra en la próstata y se unen en la uretra que se prolonga internamente por el pene (Curtis y Barnes, 1996; Ross y col., 2004; Geneser, 2000; Krester y Kerr, 1994) (Figura 3).

Epidídimo

El epidídimo está situado desde el polo anterior al posterior del testículo. Está constituido por un tubo, largo, enrollado rodeado por tejido conectivo, que se extiende desde el polo anterior del testículo y se continúa con el conducto deferente. Este tubo está revestido por un epitelio pseudoestratificado, compuesto por células basales pequeñas y células prismáticas. Estas células descansan sobre una membrana basal que se encuentra rodeada por tejido conectivo que contiene fibroblastos, colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibras

nerviosas, macrófagos, capas concéntricas de fibras musculares lisas, que facilitan el transporte de los espermatozoides al conducto deferente y tejido conjuntivo laxo (Cooper, 1999; Setchell y Brooks, 1988).

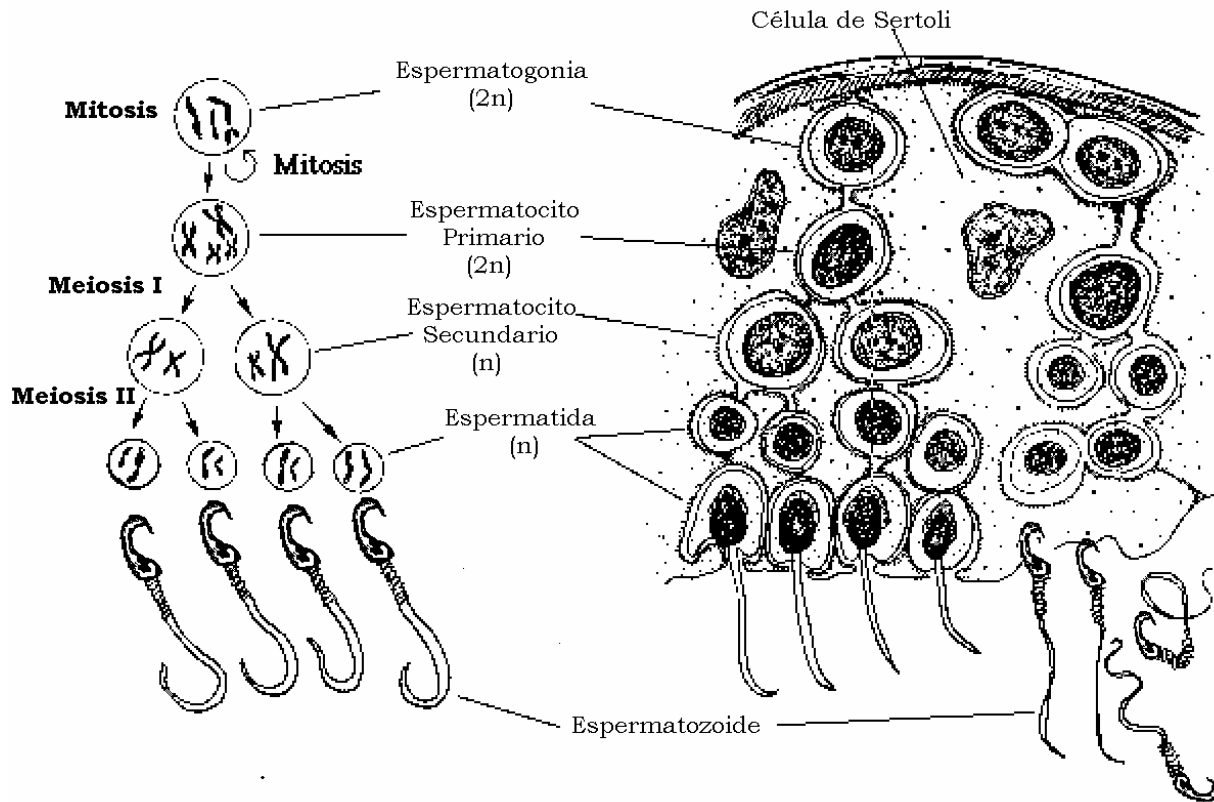


Figura 3. Esquema del proceso de la espermatogénesis (modificado de Curtis y Barnes, 1996)

El epidídimo se divide en tres partes: cabeza, es la parte que está unido al testículo por los conductos eferentes, cuerpo es la zona más delgada del epidídimo y cola en esta zona hay un ensanchamiento. Otra división basada en criterios fisiológicos y funcionales que lo divide al epidídimo en tres secciones: inicial, donde se realiza la absorción del 99% del fluido testicular; media, donde se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides; terminal, donde se almacenan los espermatozoides (Setchell y Brooks, 1988).

Los espermatozoides que llegan al epidídimo son inmaduros e inmóviles. Durante su trayecto a través del epidídimo se produce la maduración del espermatozoide, que consiste en cambios en la composición, organización y función de esta célula. En la superficie de la membrana plasmática se producen cambios en la composición de lípidos, glucoproteínas, proteínas y de carbohidratos, se incrementan los sulfoconjugados principalmente y se forman puentes disulfuro entre las fibras externa y las fibras de la vaina. Aumenta la producción del AMPc, el cual estimula la fosforilación de las proteínas lo que hace posible el movimiento del flagelo. Durante la maduración epidídimal los espermatozoides adquieren un movimiento progresivo (Eddy y O'Brien, 1994).

Vesícula seminal

La vesícula seminal es una glándula bilobulada con forma de saco, la superficie interna muestra pliegues de forma irregular, por lo que tiene una gran 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. La vesícula seminal está compuesta por tejido conectivo laxo, una capa de músculo liso y una lamina externa de tejido conectivo. Esta conformada de fibras elásticas y es envuelta por una capa muscular lisa constituida por 2 subcapas, una interna de fibras circulares y una externa de fibras longitudinales (Setchell y Brooks, 1988).

La vesícula seminal secreta un líquido alcalino que contiene: azúcares reducidos como la fructosa que es el principal nutriente de los espermatozoides; prostaglandinas, que estimula la contracción del músculo liso; potasio; fosforilcolina; proteínas; lactoferina y proteínas inhibidoras de bajo peso molecular (Curtis y Barnes, 1996; Setchell y Brooks, 1988).

Este líquido se deposita en el interior de la misma glándula y es expulsado en la eyaculación como resultado de la contracción de la musculatura lisa (Curtis y Barnes, 1996).

Próstata

La próstata se encuentra entre la vejiga urinaria y el piso de la pelvis, es traspasada por la uretra y el conducto eyaculador, está compuesta por glándulas periuretrales. La base es la superficie superior por debajo del cuello de la vejiga y el ápice es la parte inferior. La próstata 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 con ductos que drenan la parte posterior y lateral de la uretral, que equivale al 5-10%. Produce un líquido que contiene calcio y potasio, este fluido es alcalino y ayuda a neutralizar el ambiente ácido del aparato reproductor femenino (Curtis y Barnes, 1996; Setchell y Brooks, 1988).

Esteroidogénesis

En los testículos, las células de Leydig que forman parte del tejido intersticial sintetizan andrógenos (testosterona, dihidrotestosterona y androstenediona) los cuales participan en la regulación de la espermiogénesis (Csaba y col., 1998; Curtis y Barnes, 1996; Bellido, 1999).

En las células de Leydig el precursor inmediato de los esteroides gonadales es el colesterol. Estas células pueden sintetizar el colesterol a partir de acetyl-CoA, pero principalmente lo obtienen del plasma y lo almacenan en forma de ésteres de colesterol. 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 (Bellido, 1999; Granner, 1988) (Figura 4).

En la transformación de pregnenolona a testosterona se requiere la acción de 5 enzimas: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, $\Delta^{5,4}$ isomerasa, 17 α -hidroxilasa, C₁₇₋₂₀ liasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Bellido, 1999; Granner, 1988) (Figura 5).

La dihidrotestosterona se forma a partir de testosterona por la reducción de su anillo A, a través de la acción de la enzima 5 α -reductasa (Granner, 1988).

Además el testículo sintetiza 17 β -estradiol, que deriva de la aromatización periférica en las células de Sertoli, de la testosterona o la androstenediona.

Los andrógenos, principalmente la testosterona y la dihidrotestosterona, estimulan la espermatogénesis y en la diferenciación sexual el desarrollo de los órganos sexuales secundarios. Las células blanco de la dihidrotestosterona se encuentran en: la próstata, vesícula seminal, los genitales externos y la piel genital. Mientras que las de testosterona están en las estructuras derivadas del conducto de Wolff, espermatogonias, músculo, hueso, riñón y cerebro entre otra estructuras (Granner, 1988).

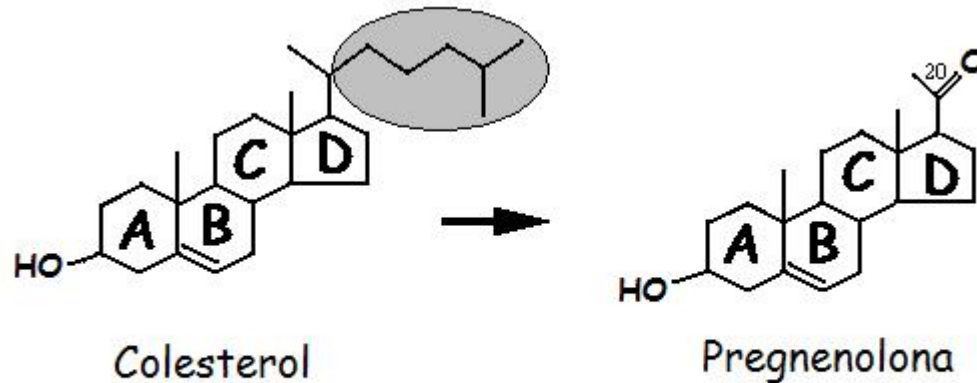


Figura 4. Representación gráfica de la separación de la cadena lateral del colesterol (modificado de Granner, 1988).

La transformación de colesterol a pregnenolona, se realiza en la mitocondria. El transporte del colesterol de la cara externa de la membrana de la mitocondria hasta la interna intervienen los fosfolípidos de la membrana y un péptido activador de la esteroidogénesis. En la mitocondria el colesterol es convertido a pregnenolona por la acción de la enzima de escisión de la cadena lateral citocromo P-450 (Granner, 1988). La pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa al retículo endoplasmático, donde se completa la esteroidogénesis. En el testículo existen dos rutas para la síntesis de testosterona, una a partir de 17-hidroxi-pregnenolona, conocida como ruta Δ_5 y otra a partir de 17-hidroxi-progesterona o Δ_4 . La ruta que predomina en los roedores es la Δ_4 (Granner, 1988) (Figuras 5 y 6).

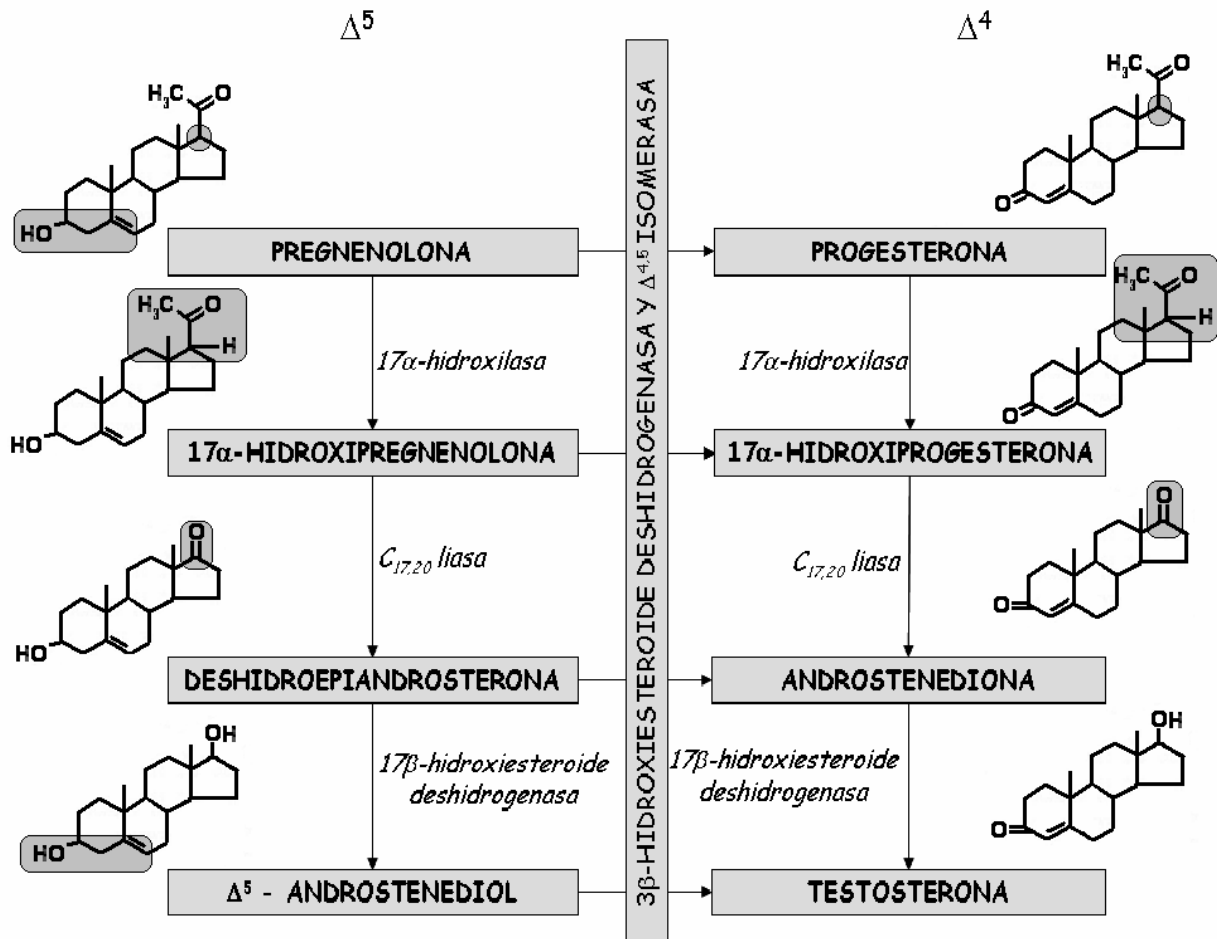


Figura 5. Representación gráfica de la transformación de pregnenolona a testosterona (modificado de Granner, 1988).

La testosterona puede seguir dos rutas metabólicas para dar origen a esteroides biológicamente activos. Por la ruta de la 5α -reductasa se transforma primero en dihidrotestosterona y a continuación en 3α -diol o 3β -diol, y por la ruta de la aromatasa, la testosterona se transforma en estradiol y la androstenediona en estrona (Bellido, 1999) (Figura 6).

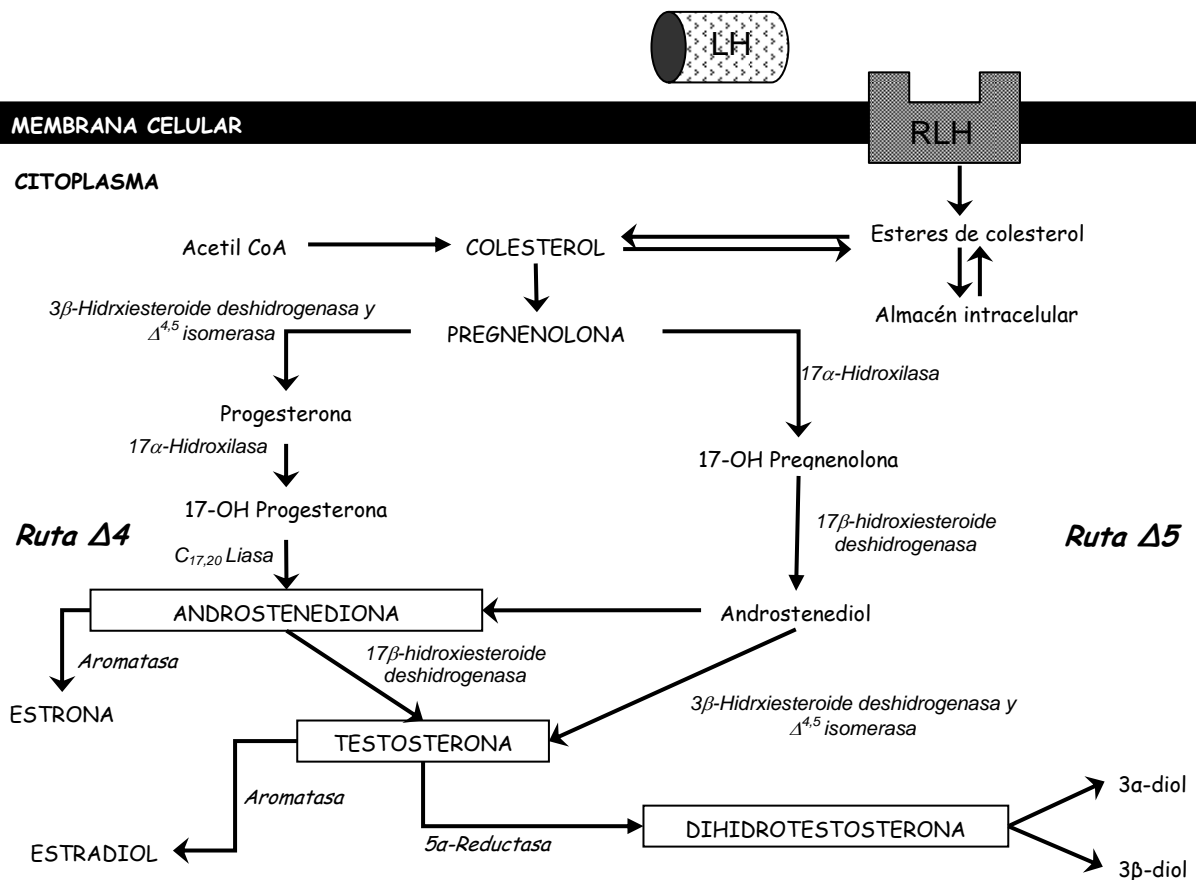


Figura 6. Representación esquemática de la esteroidogénesis (modificado de Bellido, 1999).

Regulación de las funciones del testículo

Las funciones del testículo son reguladas por las gonadotropinas, (FSH y LH) y por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal, factor de crecimiento de los fibroblastos, factor de crecimiento parecido a la insulina I entre otros (Huhtaniemi y col., 1986).

La FSH es una glucoproteína sintetizada en la hipófisis y a nivel del testículo actúa sobre las células de Sertoli y como consecuencia participa en la regulación del desarrollo de los espermatozoides (Curtis y Barnes, 1996).

La FSH es necesaria para que se inicie la espermatogénesis debido a que al interactuar con la célula de Sertoli, esta célula proporciona los elementos necesarios para que las espermatogonias se multipliquen e inicien la primera división meiótica (Huang y Neischlag, 1986). La FSH estimula la esteroidogénesis por un doble mecanismo, aumenta el número de receptores a la LH en las células de Leydig y favorece la síntesis del factor estimulante de la esteroidogénesis en las células de Sertoli, el cual estimula la producción de la testosterona en la célula de Leydig (Bellido, 1999).

La LH interactúa con sus receptores de membrana en la célula de Leydig, activa las proteínas G e incrementa la formación del AMPc y como consecuencia la activación de los sistemas enzimáticos que transforman el colesterol en testosterona (Curtis y Barnes, 1996). Los dos efectos principales de la LH sobre la esteroidogénesis consisten en aumentar la disponibilidad del colesterol y acelera la transformación del colesterol a pregnenolona (Bellido, 1999).

Regulación de la secreción de gonadotropinas en el macho

Los mecanismos que regulan las funciones del testículo dependen de la interrelación de los eventos neuroendócrinos en los que están involucrados el hipotálamo, la hipófisis y la propia gónada (Ojeda y Urbansky, 1994; Sharpe, 1994).

Para su estudio los diversos agrupamientos de neuronas del hipotálamo reciben el nombre de núcleos hipotalámicos (Brown, 1994; Fink, 1988). En el área preóptica, los núcleos preóptico medial, anterior, ventromedial y arcuato, se han identificado neuronas que secretan la GnRH (Silverman y col., 1994). Estas neuronas envían su inervación a la eminencia media, donde liberan la GnRH hacia el sistema porta-hipofisiario, y es transportada hacia la adenohipófisis. En esta

glándula la GnRH se une a sus receptores en los gonadotropos y estimula la síntesis y secreción de las gonadotropinas (Brown, 1994).

La secreción de la GnRH y las gonadotropinas es modulada por las hormonas esteroides y por diferentes sistemas de neurotransmisión, entre los que se encuentran las catecolaminas, el ácido gama amino butírico, aminoácidos excitadotes y la 5-HT (Fink, 1988; Kordon y col., 1994).

Los resultados de los estudios sobre la participación de la 5-HT en la modulación de la secreción de las gonadotropinas son contradictorios, debido a la diversidad de modelos utilizados, del ambiente hormonal del animal, de la edad y del sexo (Kordon y col., 1994)

El GnRH es secretada en forma pulsátil (se presentan “picos” de secreción con determinada amplitud y frecuencia que se repiten en secuencia). En los gonadotropos la GnRH estimula la secreción de LH y FSH. En el testículo, la GnRH inhibe la esteroidogénesis y el desarrollo de los órganos sexuales secundarios (Bellido, 1999).

Inervación serotoninérgica del testículo

A partir de algunas evidencias experimentales Ojeda y Urbansky (1994) sugieren que las funciones del testículo no sólo están reguladas por factores hormonales, sino también por la inervación autonómica de la gónada.

El testículo recibe inervación por el nervio espermático superior que se origina en el plexo renal. La inervación adrenérgica transcurre por el nervio espermático y a lo largo de los vasos sanguíneos intersticiales, particularmente los que se encuentran más cerca de la cápsula y alrededor de la rete testis. Las fibras colinérgicas se ubican en la región capsular. En los nervios colinérgicos se ha

identificado la presencia neuropéptido Y, sustancia P y péptido intestinal vasoactivo (VIP) en relación con los vasos sanguíneos intratesticulares. Aunque no se han identificado fibras serotoninérgicas, sin embargo se encuentran receptores a serotonina 5-HT₂ (Bergh y Damber, 1993).

La sección del nervio espermático, resulta en la disminución en la concentración de 5-HT en un 34 % en la cápsula del testículo y en el fluido intersticial. El hecho de que la denervación no elimina por completo la presencia de 5-HT en el testículo, es interpretado como prueba de que la 5-HT que se encuentra en el testículo se origina del nervio espermático superior y de otras fuentes como son el nervio espermático inferior, los mastocitos (Campos y col., 1990) o por las células de Leydig (Tinajero y col., 1993).

Serotonina y la regulación de las funciones del testículo

La 5-HT participa en la regulación de la secreción de la GnRH (Frazer y Hensler, 1999; Jennes y col., 1982; Takeuchi, 1988). La función de este sistema de neurotransmisión es diferente en el animal adulto y prepúber y entre el macho y la hembra de los roedores (Arias y col., 1990; Becu-Villalobos y Lacau-Menguído, 1990; Justo y col., 1989; Moguilevsky y col., 1985). El papel diferencial que se le ha atribuido a la 5-HT en la modulación de la regulación de la secreción de las gonadotropinas al parecer está relacionado con el medio ambiente hormonal del animal.

En ratas macho de 16 y 60 días de edad, la administración del 5-HTP (precursor de la 5-HT) incrementa la secreción de la FSH sin modificar la de LH, mientras que en la hembras se incrementa la concentración de la LH y no se modifica la de FSH. Cuando las ratas macho son castradas y tratadas con 5-HTP la concentración de FSH disminuye, mientras que cuando se les administra testosterona mas el precursor se estimula la secreción de la FSH. Estos resultados

indican que la participación del sistema serotoninérgico en la modulación de la secreción de las gonadotropinas es diferente entre la hembra y el macho y que esta diferencia está relacionada a la acción de la testosterona (Justo y col., 1989).

En el testículo la 5-HT participa en la regulación del flujo sanguíneo y la secreción de testosterona. La concentración de 5-HT disminuye con la administración de testosterona, gonadotropina corionica humana o GnRH (Bergh y Damber, 1993).

La idea de que la 5-HT modula las funciones del testículo al actuar directamente en la gónada, es apoyada por los resultados de Csaba y col., (1998), quienes mostraron que cuando se realiza la inyección intratesticular de 5,7-dihidroxitriptamina (neurotóxico que destruye los elementos neurales serotoninérgicos), la secreción de testosterona disminuye siete días después de realizado el tratamiento. Estos resultados permiten sugerir que la 5-HT además de modular la secreción de las gonadotropinas también participa en la modulación de la esteroidogénesis directamente en las células de Leydig.

La disminución en la concentración de 5-HT inducido por la administración de la pCA por vía sistémica a ratas de 30 a 34 días de edad, incrementa el funcionamiento del testículo evaluado por la producción de espermatozoides a los 60 días de edad. Cuando el tratamiento con el inhibidor de la síntesis de 5-HT se realiza de los 40 a 44 días de edad hay retraso en la maduración sexual y disminuye la producción de espermatozoides a los 60 días de edad. Estos efectos llevaron a los autores a sugerir que la 5-HT participa de manera diferencial en la regulación de la maduración sexual durante el desarrollo prepuberal de la rata macho (Shishkina y Borodin, 1989).

En ratas macho de 30 días de edad, el bloqueo del sistema serotoninérgico mediante la administración de la pCA a partir del día 30 y hasta los 65 días de

edad, disminuye significativamente el número de espermatozoides, así como el porcentaje de espermatozoides móviles y viables, sin modificaciones significativas en la concentración de testosterona. Los resultados de este estudio son interpretados como prueba que el sistema serotoninérgico participa de manera estimulante en la regulación de la espermatogénesis y esteroidogénesis, posiblemente al modificar la secreción de gonadotropinas o directamente el funcionamiento del testículo (Aragón y col., 2005).

Núcleos del rafé-hipotálamo

En la rata hembra la inervación del hipotálamo que se origina en los núcleos dorsal y medial del rafé participan de manera diferencial en la regulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas (Barofsky, 1975; Morello y col., 1989). En ratas hembras con lesión del NDR hay disminución del número de animales que ovulan en el día del estro y de la secreción preovulatoria de la LH (Barofsky, 1979). En cambio con lesión del NMR no se observan cambios. Cuando se realiza la estimulación del NMR disminuye la secreción preovulatoria de la LH (Morello y col., 1985). Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que la inervación del hipotálamo que se origina en el NDR ejerce un papel estimulante en la secreción de las gonadotropinas y que la que se origina en el NMR es de tipo inhibitoria.

En la rata hembra también se ha propuesto que la inervación serotoninérgica del hipotálamo, que se origina en el NMR no ejerce ningún efecto en la modulación de la secreción de la LH, ya que la lesión electrolítica a ratas hembras adultas no se modifica la concentración de LH en suero (Barofsky, 1975).

5,6-dihidroxitriptamina

La 5,6-DHT es un fármaco que destruye de forma selectiva las neuronas serotoninérgicas, al ser recapturada por la sinapsis serotoninérgica donde se autooxida, lo que provoca la generación de o-quinonas. La autooxidación de la 5,6-DHT promueve la formación de radicales libres superoxidativos como $O_2^{\cdot-}$, radicales hidroxil $HO\cdot$ y H_2O_2 , los cuales dañan el ADN, las proteínas y los lípidos. Estas especies de oxígeno pueden actuar como un segundo intermediario en la señalización intracelular o inhiben la respiración mitocondrial lo que culmina con la muerte de la célula (Sinhbabu y col., 1985; Sing y Dryhurst, 1990 y 1991; Jiménez Del Rio y Velez-Pardo, 2002) (Figura 7).

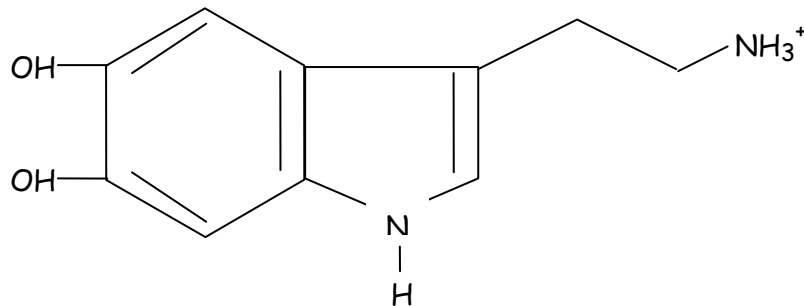


Figura 7. Estructura de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) (modificado de Sing y Dryhurst, 1990, 1990)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La serotonina regula la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, aunque no existe información de la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en los NDR y NMR en la modulación de la secreción de las gonadotropinas y el funcionamiento del testículo.

En el presente estudio se analizó la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo proveniente del NMR en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, la espermatogénesis y la esteroidogénesis, en ratas prepúberes a los que se les lesionó o estimuló el NMR.

Los resultados de este estudio nos permitirán avanzar en el conocimiento de la función de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NMR en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, en la espermatogénesis y como consecuencia en la reproducción. Así mismo, en un futuro nos permitirá entender los posibles efectos secundarios sobre la reproducción, de algunos fármacos que se utilizan para el tratamiento de alteraciones del sueño o de estado de ánimo y que afectan al sistema serotoninérgico.

HIPÓTESIS

Dado que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NMR participa en los mecanismos neuroendocrinos que modulan la secreción de las gonadotropinas, la lesión o la estimulación de este núcleo provocará modificaciones en la secreción de las gonadotropinas que resultarán en cambios en las funciones del testículo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NMR sobre los mecanismos neuroendocrinos que modulan las funciones del testículo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el efecto de la lesión o la estimulación química del NMR sobre las concentraciones de 5-HT y del 5-HIAA en el HA, HM y HP.
2. Analizar el efecto de la lesión química del NMR en las concentraciones de DA y DOPAC en el HA, HM y HP.
3. Analizar el efecto de la lesión química del NMR en las concentraciones de NA y MHPG en el HA, HM y HP.
4. Evaluar los efectos de la lesión o la estimulación química del NMR sobre las concentraciones de gonadotropinas.
5. Analizar los efectos de la lesión o la estimulación química del NMR sobre la espermatogénesis.
6. Evaluar los efectos de la lesión o la estimulación química del NMR en la concentración de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol.

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron 105 ratas macho de 30 días de edad, de la cepa CII-ZV que fueron mantenidas en condiciones controladas de iluminación, 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (05:00-19:00 luz), con libre acceso al agua y al alimento. Los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales: grupo testigo absoluto: animales sin tratamiento; grupo inyectado con el vehículo: animales con microinyección de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) en el NMR; grupo con 5,6-DHT: animales con microinyección de 5,6-DHT (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) en el NMR.

Procedimiento de la microinyección

Lesión química del núcleo medial del rafe

Entre las 10:00 y 12:30 horas. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Anestosal, Smith Kline Norden de México, México) (40 mg/kg de peso) por vía intraperitoneal, seguido de anestesia complementaria con éter cuando fue necesario; se colocaron en un aparato estereotáxico, se cortó cuero cabelludo, se eliminó el tejido adherido al cráneo con agua oxigenada (1:1), se perforó el cráneo con una fresa odontológica y se introdujo una aguja de microinyección hasta el NMR siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982). La aguja se conectó a una bomba de microinyección y se inyectaron 10 µg de 5,6-DHT disuelta en 2.5 µL de ácido ascórbico o 2.5 µL del vehículo, a una velocidad de 1 µL/minuto.

Estimulación del sistema serotoninérgico del núcleo medial del rafe.

Ratas macho de 30 días de edad se colocaron en el aparato estereotáxico como en el procedimiento anterior y se inyectaron 20 µg/2.5 µL de 5-HTP en el

NMR. Como grupo de comparación se utilizaron animales a los que se les inyecte 2.5 μ L de solución salina al 0.9% en la misma región.

Procedimiento de autopsia

Los animales en los que se realizó la estimulación del NMR fueron sacrificados por decapitación a los 60 minutos después del tratamiento. En el caso de los animales en los que se realizó la lesión fueron sacrificados a los 45 o 65 días de edad, entre las 12:00 y 13:00 horas, se colectó la sangre del tronco, se le dejó coagular por 20 minutos y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos, se colectó el suero y se almacenó a -20° C hasta el día en que se llevo a cabo la cuantificación de progesterona, testosterona, 17 β -estradiol y gonadotropinas por radioinmunoanálisis.

En el momento de la autopsia se disecaron y pesaron los testículos, epidídimo, próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes.

Evaluación de la espermatogénesis

Número de Espermatozoides

En el momento de la autopsia se extrajeron los conductos deferentes, y su contenido se colocó en tubos eppendorf con 500 μ L de solución tirodes (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) a una temperatura de 37° C durante 15 minutos en baño maría, se realizó una dilución 1:15 de esta solución espermática, se tomó una alícuota de 10 μ l y se colocó en la cámara de Neubauer y en 5 cuadrantes se contaron el número de espermatozoides, con el uso de un microscopio óptico a 40X. Se promedió el número de espermatozoides de los 5 cuadrantes y los resultados se expresan como 1×10^6 células en 1 ml de líquido espermático.

Movilidad

Se tomó una alícuota de 20 µl de la solución espermática y se colocó en un portaobjetos. Con la ayuda de un microscopio óptico a 40X, se contó el número de espermatozoides que presentaron movimientos ondulantes del flagelo, así como aquellos que permanecieron inmóviles. Se contaron en total 100 células. Los resultados se expresaron como porcentaje de células móviles e inmóviles.

Viabilidad

Se mezclaron 10 µl de la solución espermática con 10 µl de solución azul tripano (0.4 %) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). De esta solución se tomó una alícuota que se colocó en un portaobjetos y se protegió con un cubreobjetos. Las evaluaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio óptico. Se consideró un espermatozoide vivo aquel en el que la cabeza no presente un color azul y un espermatozoide muerto aquel que presente una cabeza con coloración azul. Se contaron 100 espermatozoides en total, se promediaron los resultados de cada grupo experimental para obtener un porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

Cuantificación de gonadotropinas y hormonas esteroides

La cuantificación de FSH y LH se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo. Los anticuerpos que se emplearon fueron rFSH-¹²⁵I-RP2 y rLH-¹²⁵I-RP2 respectivamente y se proporcionaron por el National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). La concentración de ambas hormonas se expresó en ng/mL.

La cuantificación de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol se realizó por medio de la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida con un kit Coat-A-Count-USA (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA). La concentración de progesterona y testosterona se expresó en nanogramos por mililitro (ng/mL) y la de 17 β -estradiol en picogramos por mL (pg/mL).

Cuantificación de dopamina, noradrenalina y serotonina

Al momento de la autopsia se extrajo el cerebro, se colocó en solución salina fría, se congeló en nitrógeno líquido y se realizaron cortes coronales del cerebro y se diseccionaron el HA, HM y HP (Anexo 1) siguiendo como referencia la coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta la cuantificación de la 5-HT, NA, DA, 5-HIAA, MHPG, y DOPAC por la técnica de cromatografía de líquidos siguiendo la metodología utilizada por Ayala y col., (1998) (Anexo 2). La concentración se expresó en ng/mg de tejido. Con los valores de la concentración de los neurotransmisores y metabolitos se calculó la actividad de la neurona serotoninérgica, dopaminérgica y noradrenérgica siguiendo la relación propuesta por Shannon y col., (1986).

Actividad neuronal = [5-HIAA] / [5-HT]

Análisis del sitio de lesión

Para verificar el sitio de lesión en los animales en los que se realizó la estimulación o lesión del NMR, la región del cerebro medio y posterior se fijó en formol al 10% durante una semana y posteriormente se realizaron cortes coronales (de la región frontal a la caudal) de 100 μm de grosor en el vibratomo, los cuales se tiñeron por la técnica de violeta de cresilo, y posteriormente se observaron con la ayuda de un microcopio estereoscópico para verificar el sitio de lesión.

Análisis Estadístico de Resultados

Los resultados de peso corporal, testículo, epidídimo, próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes número de espermatozoides, concentración hormonas y neurotransmisores, así como la actividad neuronal se analizaron por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA) seguida por una de Tukey. Los resultados de espermatozoides móviles y viables se analizaron por la prueba de X^2 . En todos los casos se consideraron que las diferencias son significativas cuando la probabilidad sea igual o menor al 5 %.

RESULTADOS

1. Efecto de la lesión química del NMR.

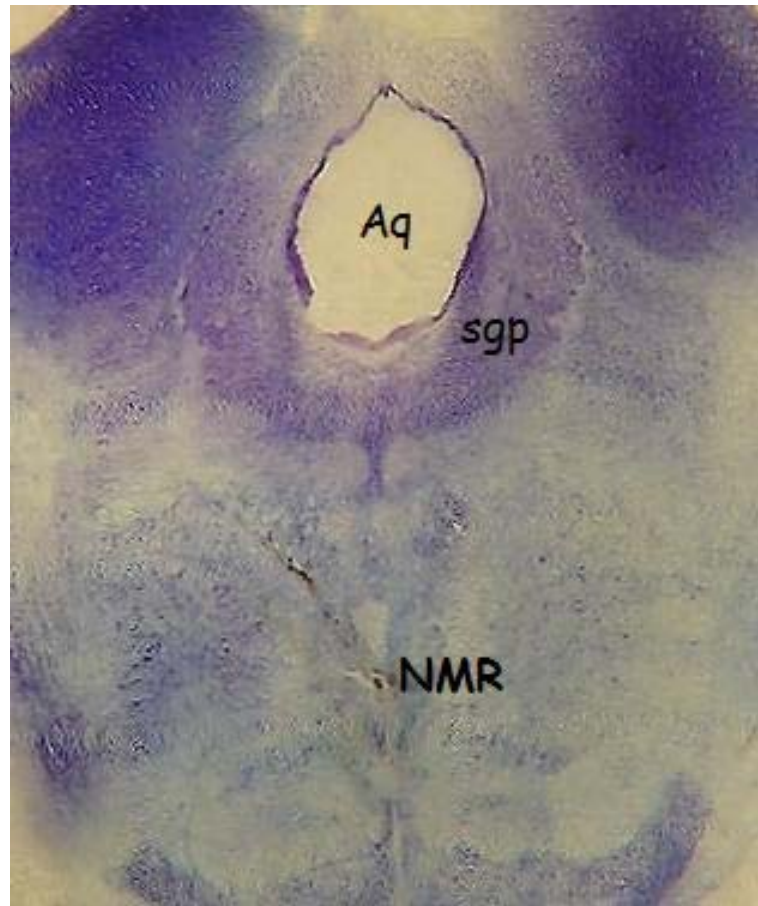


Figura 8. Fotomicrografía de un corte coronal de cerebro de ratas en las que se muestra la lesión del NMR inducida por la microinyección del 10 μ g de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT). Acueducto (Aq). Sustancia gris periacueductal (sgp).

En la figura 8 se presenta la fotomicrografía de un corte coronal de cerebro de rata en el que se observa que la microinyección de la 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) lesionó exclusivamente al NMR. Los resultados que se presentan de los diferentes parámetros evaluados en los animales con lesión del NMR y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad, comprenden únicamente los de aquellos en los que la lesión abarcó el núcleo completo.

Animales sacrificados a los 45 días de edad

Cuantificación de serotonina

La microinyección de ácido ascórbico en el NMR no modificó la concentración de 5-HT, 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el HA, HM y HP en comparación con el testigo absoluto (Figuras 9, 10, 11). La microinyección de 5,6-DHT en el NMR, resultó en una menor concentración de 5-HT y su metabolito en el HA (Figura 9). En el HM del grupo tratado con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT), la concentración de 5-HIAA fue menor que en el grupo tratado con vehículo (Figura 10), mientras que en el HP la concentración de 5-HT fue menor que en el grupo testigo (Figura 11).

Cuantificación de catecolaminas

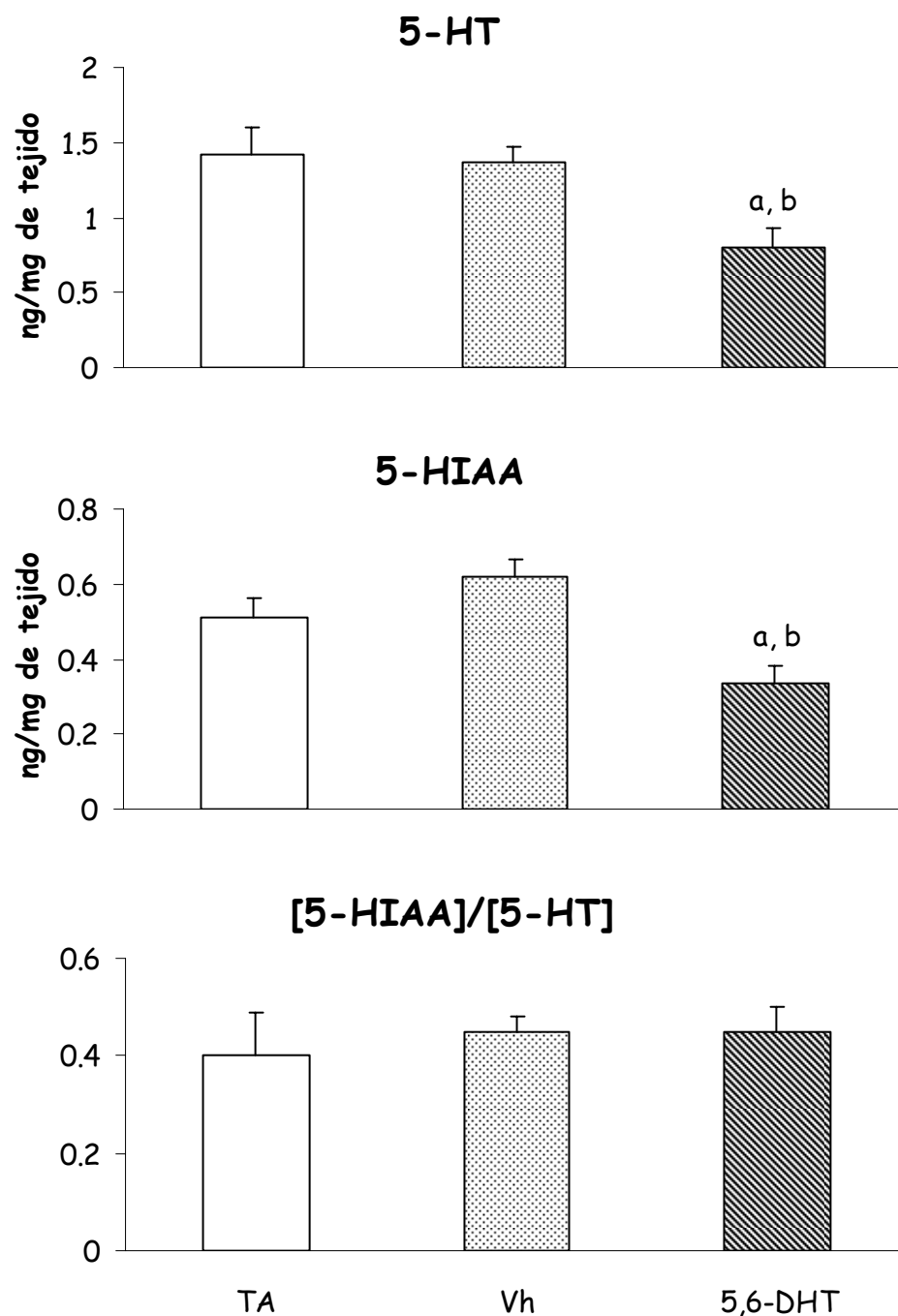
En comparación con el grupo testigo absoluto, la microinyección de vehículo ó 5,6 DHT en el NMR no modificó la concentración de NA, MHPG, DA, DOPAC, la relación [MHPG]/[NA], ni la relación [DOPAC]/[DA] (Cuadro 1, 2).

Cuantificación de gonadotropinas

La concentración de FSH no fue modificada por ninguno de los tratamientos. En los animales con microinyección del vehículo en el NMR la concentración de LH fue mayor que en el grupo testigo absoluto y menor en los animales con lesión en comparación con el grupo inyectado con vehículo (Figura 12).

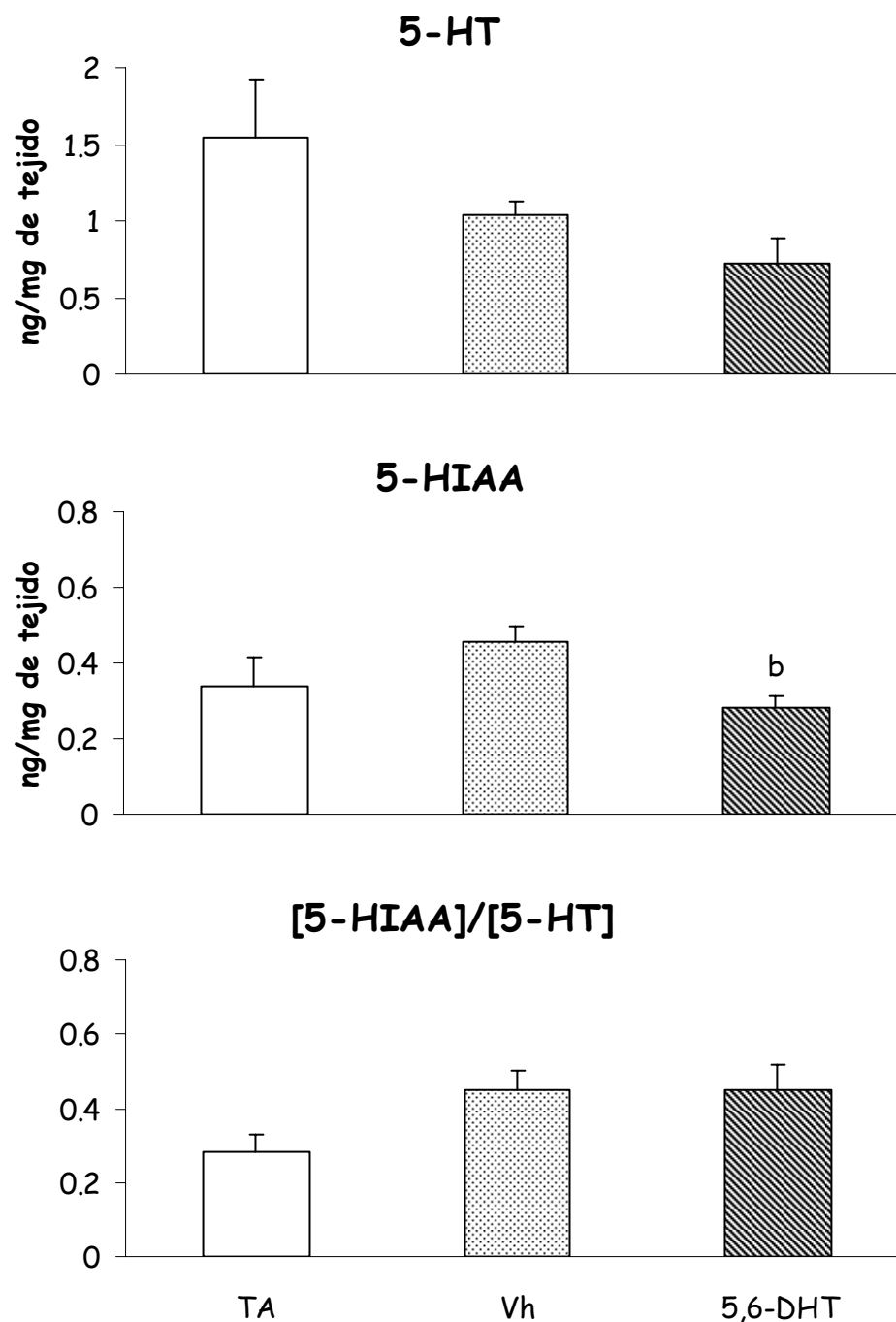
Cuantificación de hormonas esteroideas

En relación con el testigo absoluto, la microinyección de ácido ascórbico o 5,6-dihidroxitriptamina en el NMR no modificó la concentración de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol (Figura 13).



a, $p < 0.05$ vs. grupo TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)
b, $p < 0.05$ vs. grupo TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

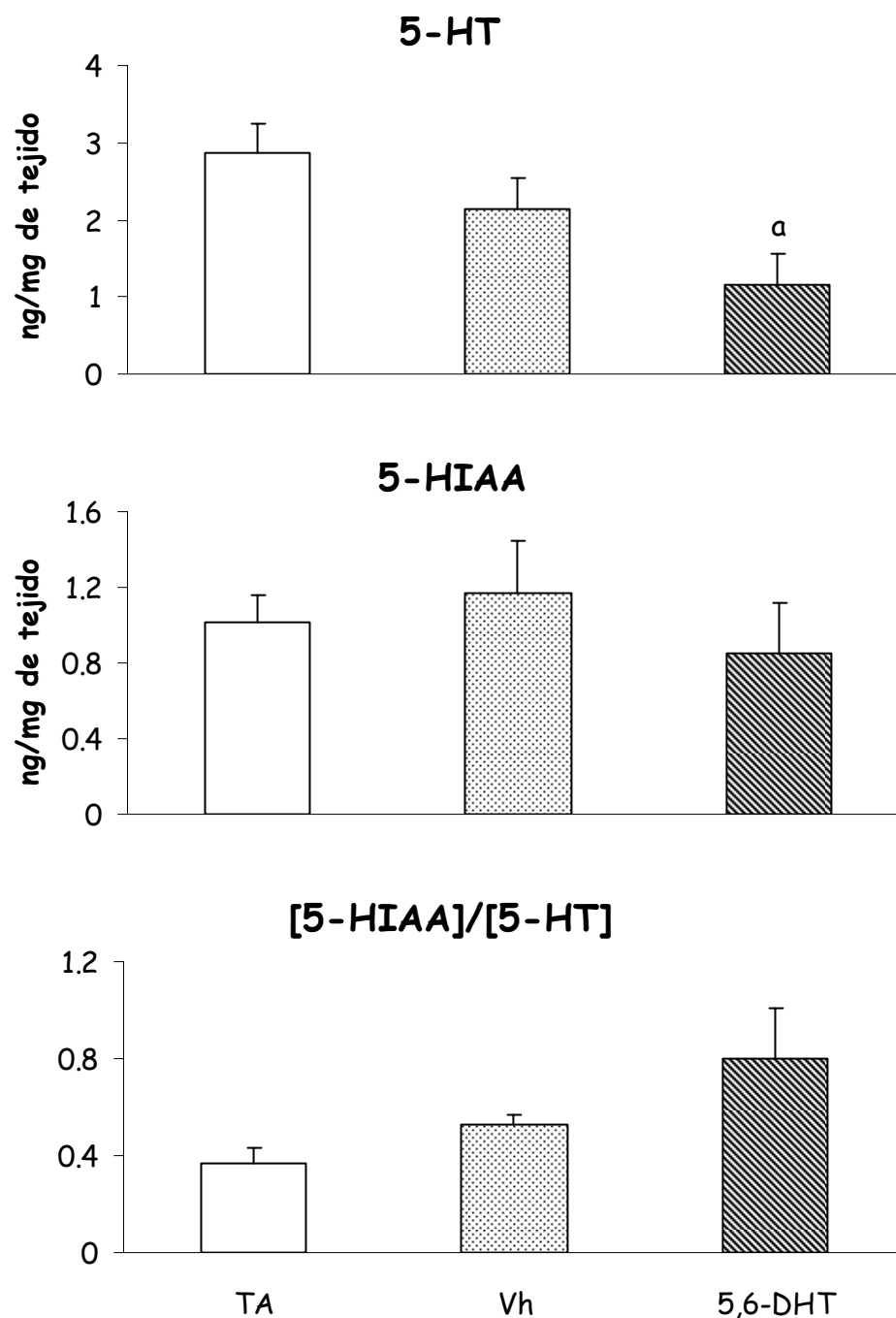
Figura 9. Media \pm e.e.m. de la concentración de 5-HT, 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el HA de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 45 días de edad.



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 10. Media \pm e.e.m. de la concentración de 5-HT y 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el HM de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 45 días de edad.



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 11. Media \pm e.e.m. de la concentración de 5-HT y 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el HP de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 45 días de edad.

Cuadro 1. Media \pm e.e.m. de la concentración de NA, MHPG y la relación [MHPG]/[NA] de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 45 días de edad.

Hipotálamo anterior			
Grupo	NA	MHPG	MHPG/NA
TA	1.98 \pm 0.16	0.09, 0.90	0.06, 0.43
Vh	2.09 \pm 0.16	0.48 \pm 0.05	0.25 \pm 0.02
5,6-DHT	1.99 \pm 0.18	0.52 \pm 0.14	0.25 \pm 0.07
Hipotálamo medio			
TA	1.18 \pm 0.20	0.75 \pm 0.23	0.79 \pm 0.20
Vh	2.03 \pm 0.19	1.32 \pm 0.57	0.67 \pm 0.26
5,6-DHT	1.82 \pm 0.27	0.98 \pm 0.25	0.45 \pm 0.09
Hipotálamo posterior			
TA	0.52 \pm 0.13	3.03 \pm 0.81	5.31 \pm 1.05
Vh	0.75 \pm 0.04	8.41 \pm 4.43	5.28 \pm 1.43
5,6-DHT	0.95 \pm 0.23	2.35 \pm 0.33	3.55 \pm 1.32

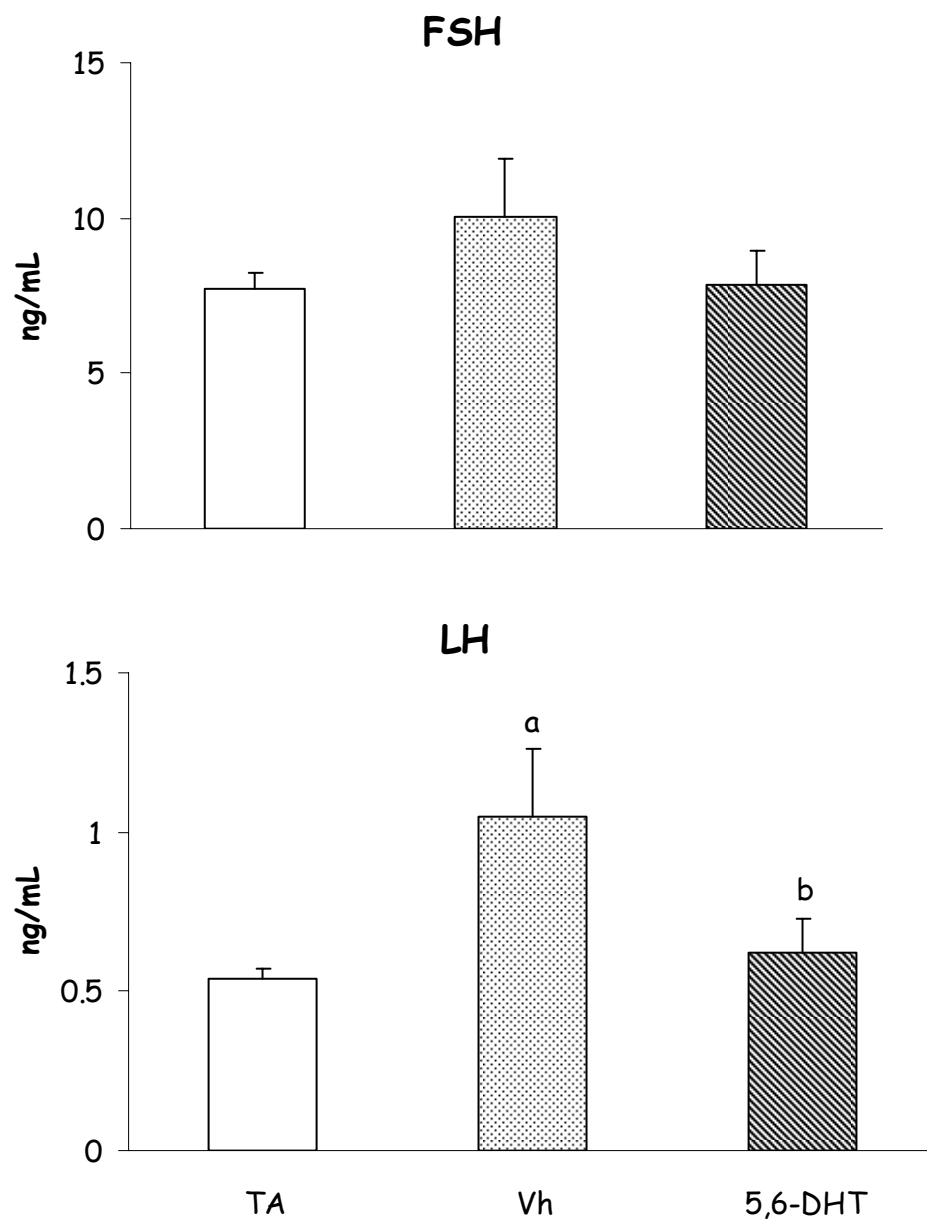
Cuadro 2. Media \pm e.e.m. de la concentración de DA, DOPAC y la relación [DOPAC]/[DA] de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 45 días de edad.

Hipotálamo anterior			
Grupo	DA	DOPAC	DOPAC/DA
TA	0.46 \pm 0.07	0.08 \pm 0.02	0.18 \pm 0.05
Vh	0.28 \pm 0.05	0.06 \pm 0.01	0.25 \pm 0.05
5,6-DHT	0.29 \pm 0.05	0.09 \pm 0.03	0.40 \pm 0.16
Hipotálamo medio			
TA	0.55 \pm 0.14	0.10 \pm 0.03	0.14 \pm 0.04
Vh	0.49 \pm 0.12	0.10 \pm 0.02	0.28 \pm 0.14
5,6-DHT	0.79 \pm 0.21	0.18 \pm 0.03	0.27 \pm 0.06
Hipotálamo posterior			
TA	0.85 \pm 0.40	0.26, 0.56 **	0.37, 0.23 **
Vh	0.15 *	---	---
5,6-DHT	0.58 \pm 0.17	0.38 *	0.45 *

--- por debajo de la sensibilidad del método

* El valor del cuadro es el detectado en uno de los animales del grupo

** Los valores del cuadro son los que se detectaron en dos animales del grupo



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 12. Media \pm e.e.m. de la concentración de FSH y LH en el suero de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 45 días de edad.

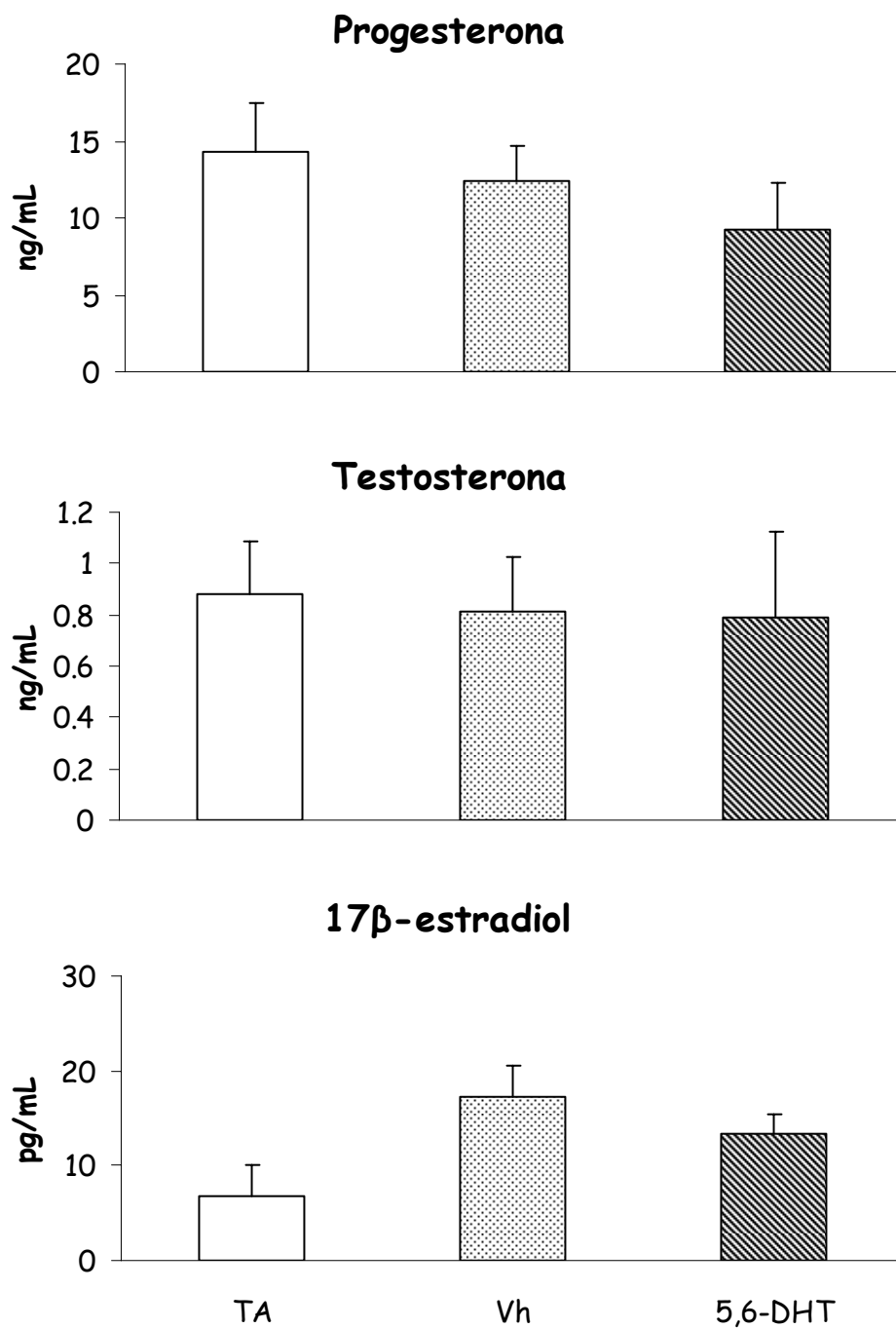


Figura 13. Media \pm e.e.m. de la concentración de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol en el suero de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 45 días de edad.

Peso de los órganos

En los animales con microinyección de vehículo o 5,6-DHT en el NMR no se modificó el peso de los animales ni en el peso de los órganos del aparato reproductor (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Media \pm e.e.m. del peso corporal, masa testicular y del epidídimo de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 45 días de edad.

Grupo	No.	Peso corporal (g)	Masa testicular (g)	Masa del epidídimo (g)
TA	10	157 \pm 4.64	1.51 \pm 0.10	0.19 \pm 0.01
Vh	11	155 \pm 4.16	1.48 \pm 0.16	0.20 \pm 0.02
5,6-DHT	10	161 \pm 4.92	1.53 \pm 0.19	0.18 \pm 0.02

Cuadro 4. Media \pm e.e.m. del peso de la próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 45 días de edad.

Grupo	Próstata (g)	Vesícula seminal (g)	Glándulas coagulantes (g)
TA	0.11 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
Vh	0.11 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
5,6-DHT	0.10 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01

Animales sacrificados a los 65 días de edad

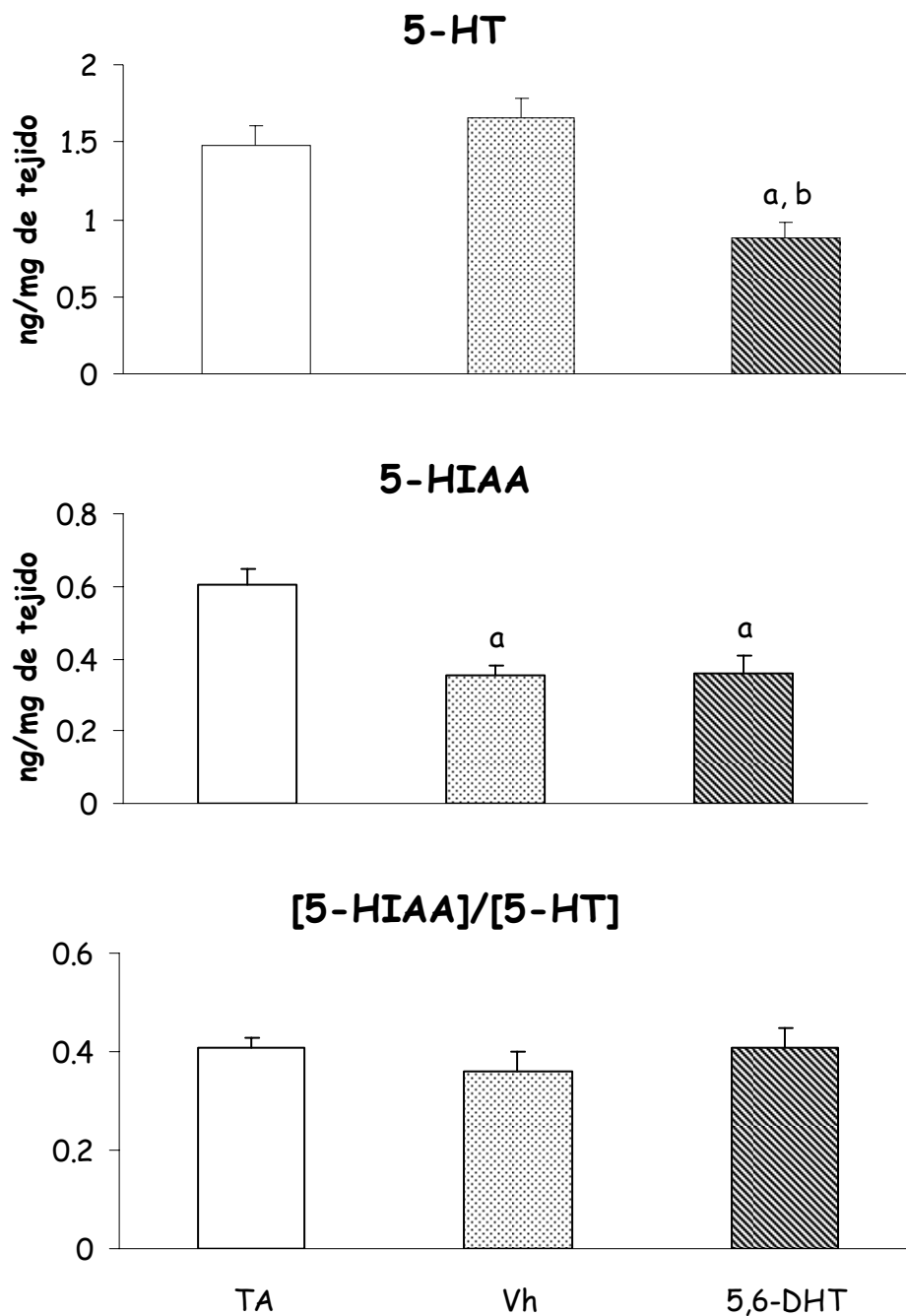
Cuantificación de serotonina

La microinyección de ácido ascórbico en el NMR no modificó la concentración de serotonina, ni la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo anterior, medio y posterior, mientras que la del ácido 5-hidroxiindolácetico fue menor la del hipotálamo anterior. En comparación con el grupo con vehículo, la lesión del NMR disminuyó la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior, medio y posterior y de 5-HIAA sólo en el hipotálamo anterior y medio y no se modificó la relación [5-HIAA]/[5-HT] (Figuras 14, 15, 16).

Cuantificación de catecolaminas

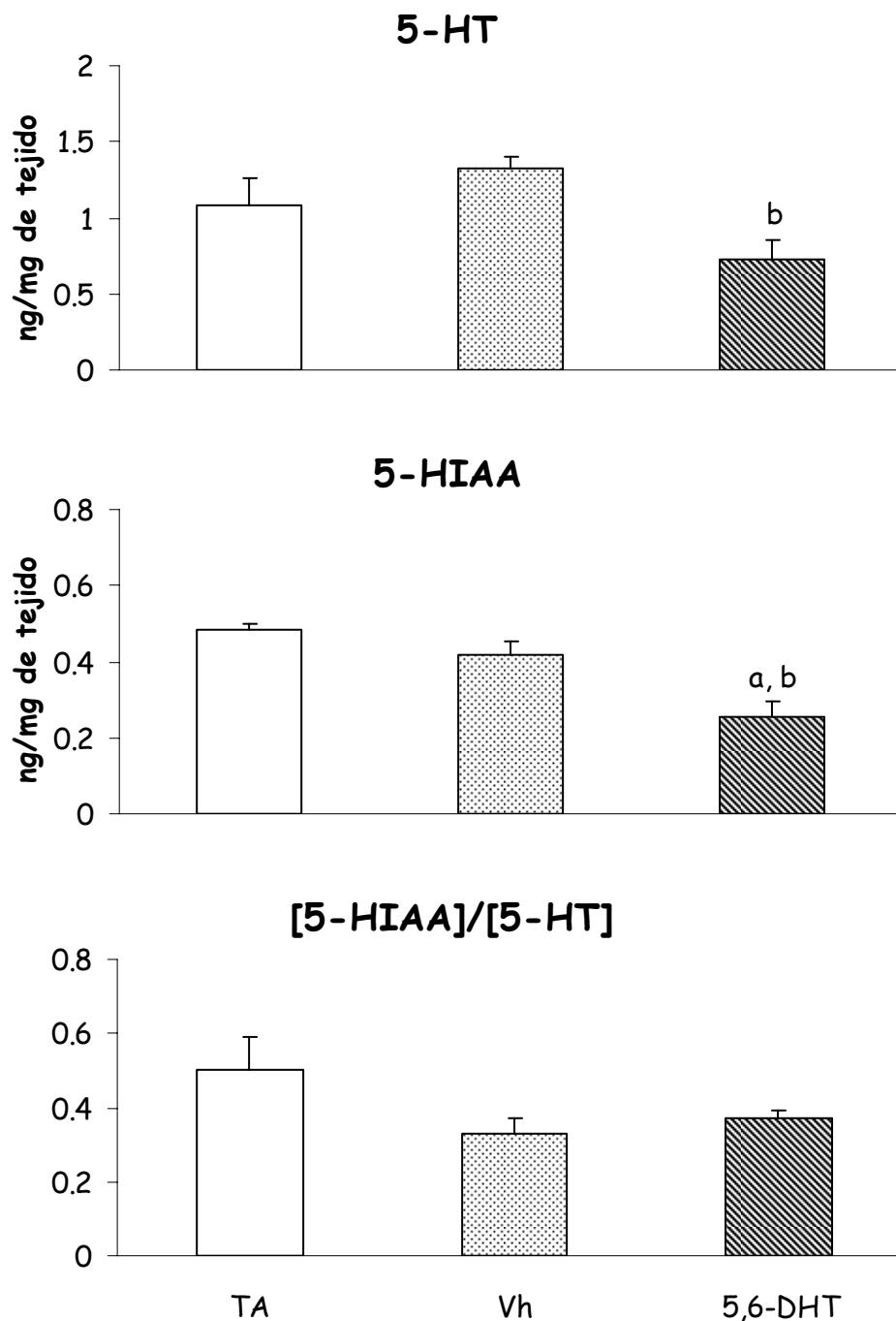
La administración de ácido ascórbico o 5,6-DHT en el núcleo medial del rafé, no modificó la concentración de NA, MHPG ni la relación [MHPG]/[NA] en relación al testigo absoluto (Cuadro 5).

En comparación con el grupo testigo absoluto, en el grupo de animales en los que se administró el vehículo la concentración de DOPAC fue mayor. En el grupo con microinyección de 5,6-DHT en el núcleo medial del rafé no se presentaron cambios (Cuadro 6).



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)

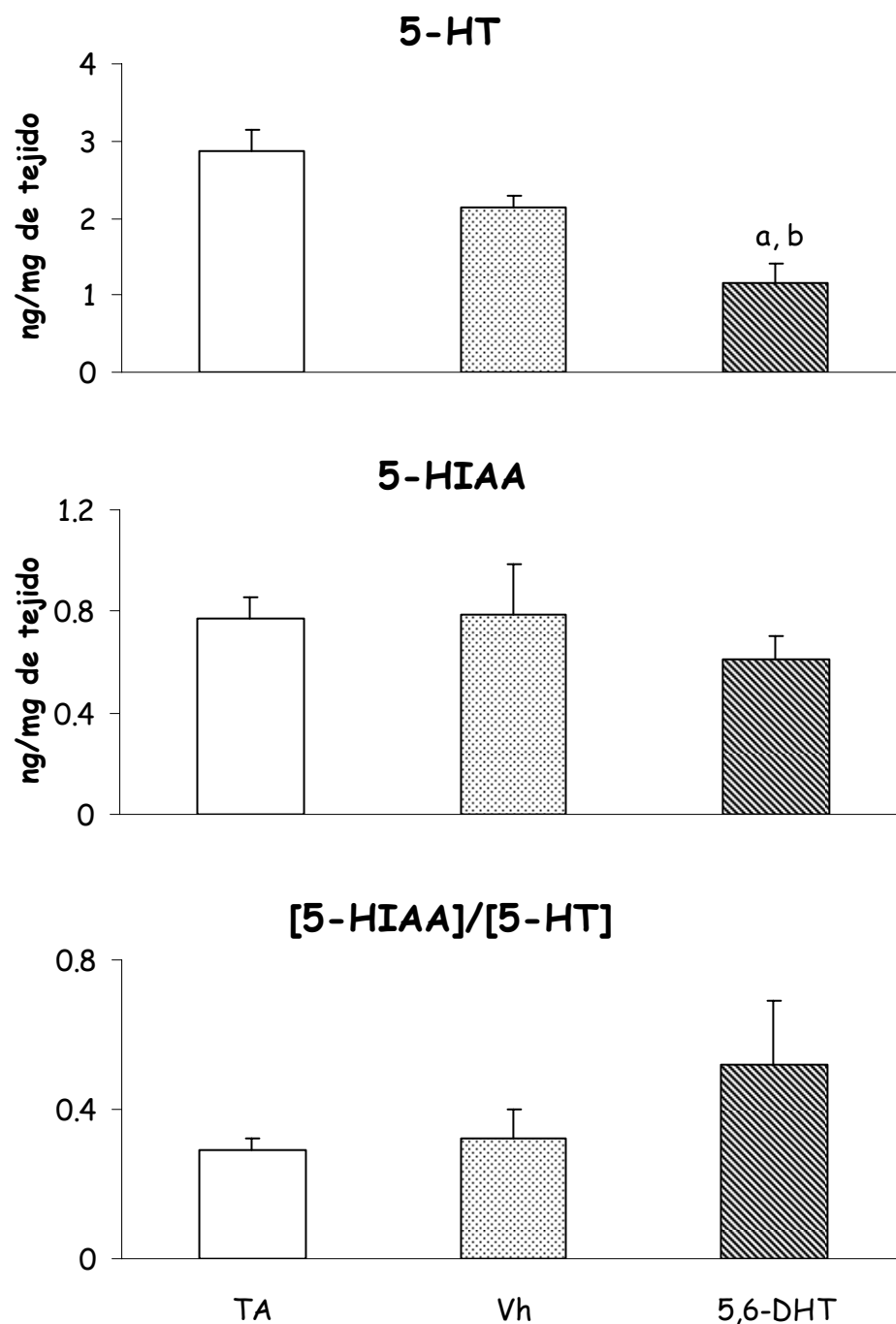
Figura 14. Media \pm e.e.m. de la concentración 5-HT, 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el HA de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DTH) y sacrificadas a los 65 días de edad.



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 15. Media \pm e.e.m. de la concentración de 5-HT, 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el HM de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 65 días de edad.



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 16. Media \pm e.e.m. de la concentración 5-HT, 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el HP de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 65 días de edad.

Cuadro 5. Media \pm e.e.m. de la concentración de NA, MHPG y la relación [MHPG]/[NA] de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 65 días de edad.

Hipotálamo anterior			
Grupo	NA	MHPG	MHPG/NA
TA	1.89 \pm 0.09	---	---
Vh	2.00 \pm 0.11	0.60, 0.44 **	0.30, 0.24 **
5,6-DHT	1.62 \pm 0.23	0.20 \pm 0.04	0.39 \pm 0.23
Hipotálamo medio			
TA	1.68 \pm 0.23	0.25 *	0.27 *
Vh	1.91 \pm 0.16	1.37 \pm 0.74	0.71 \pm 0.40
5,6-DHT	1.45 \pm 0.20	0.53 \pm 0.07	0.69 \pm 0.22
Hipotálamo posterior			
TA	0.66 \pm 0.05	0.90 \pm 0.23	1.39 \pm 0.34
Vh	0.73 \pm 0.09	2.26 \pm 0.74	3.50 \pm 1.11
5,6-DHT	0.98 \pm 0.40	2.24 \pm 0.51	2.12 \pm 0.47

--- por debajo de la sensibilidad del método

* Valor detectado en uno de los animales del grupo

** Valores detectados en dos animales del grupo

Cuadro 6. Media \pm e.e.m. de la concentración de DA, DOPAC y la relación [DOPAC]/[DA] de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 65 días de edad.

Hipotálamo anterior			
Grupo	DA	DOPAC	DOPAC/DA
65 días			
TA	0.31 \pm 0.04	0.07 \pm 0.02	0.25 \pm 0.08
Vh	0.37 \pm 0.07	0.08 \pm 0.01	0.24 \pm 0.05
5,6-DHT	0.28 \pm 0.05	0.06 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02
Hipotálamo medio			
TA	0.49 \pm 0.09	0.10 \pm 0.02	0.22 \pm 0.03
Vh	1.11 \pm 0.32	0.22 \pm 0.03 a	0.26 \pm 0.08
5,6-DHT	0.77 \pm 0.29	0.14 \pm 0.03	0.20 \pm 0.05
Hipotálamo posterior			
TA	0.26 \pm 0.11	0.13 *	0.28 *
Vh	0.21, 0.17 **	0.85 *	---
5,6-DHT	0.28, 0.44 **	102.63, 0.22 **	0.5 *

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

--- por debajo de la sensibilidad del método

* Valor detectado en uno de los animales del grupo

** Valores detectados en dos animales del grupo

Cuantificación de gonadotropinas

En comparación con el grupo testigo absoluto, en el grupo de animales con microinyección del ácido ascórbico en el NMR la concentración de FSH fue menor, sin que se modificara la de LH. En el grupo de animales con lesión no se modificó ninguno de estos parámetros (Fig. 17).

Cuantificación de hormonas esteroides

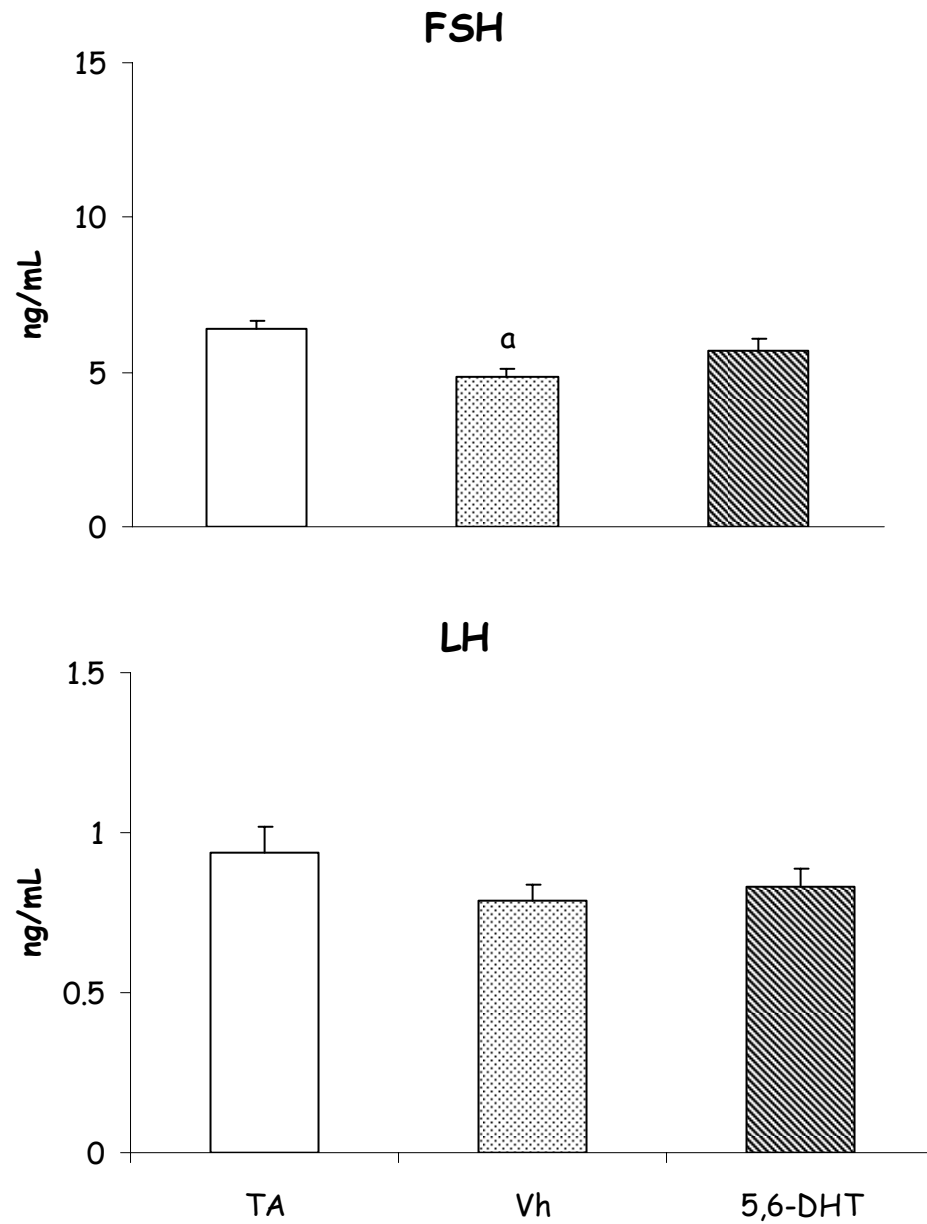
En los animales con microinyección de ácido ascórbico o 5,6-DHT en el NMR la concentración de progesterona fue menor que en el grupo testigo absoluto, mientras que no se modificó la concentración de testosterona y 17 β -estradiol (Figura 18).

Evaluación de la espermatogénesis

En comparación con el grupo testigo absoluto en los animales en los que se realizó la microinyección del vehículo o de la 5,6-DHT no se modificó el número de espermatozoides del conducto deferente, ni su movilidad ni viabilidad (Figura 19).

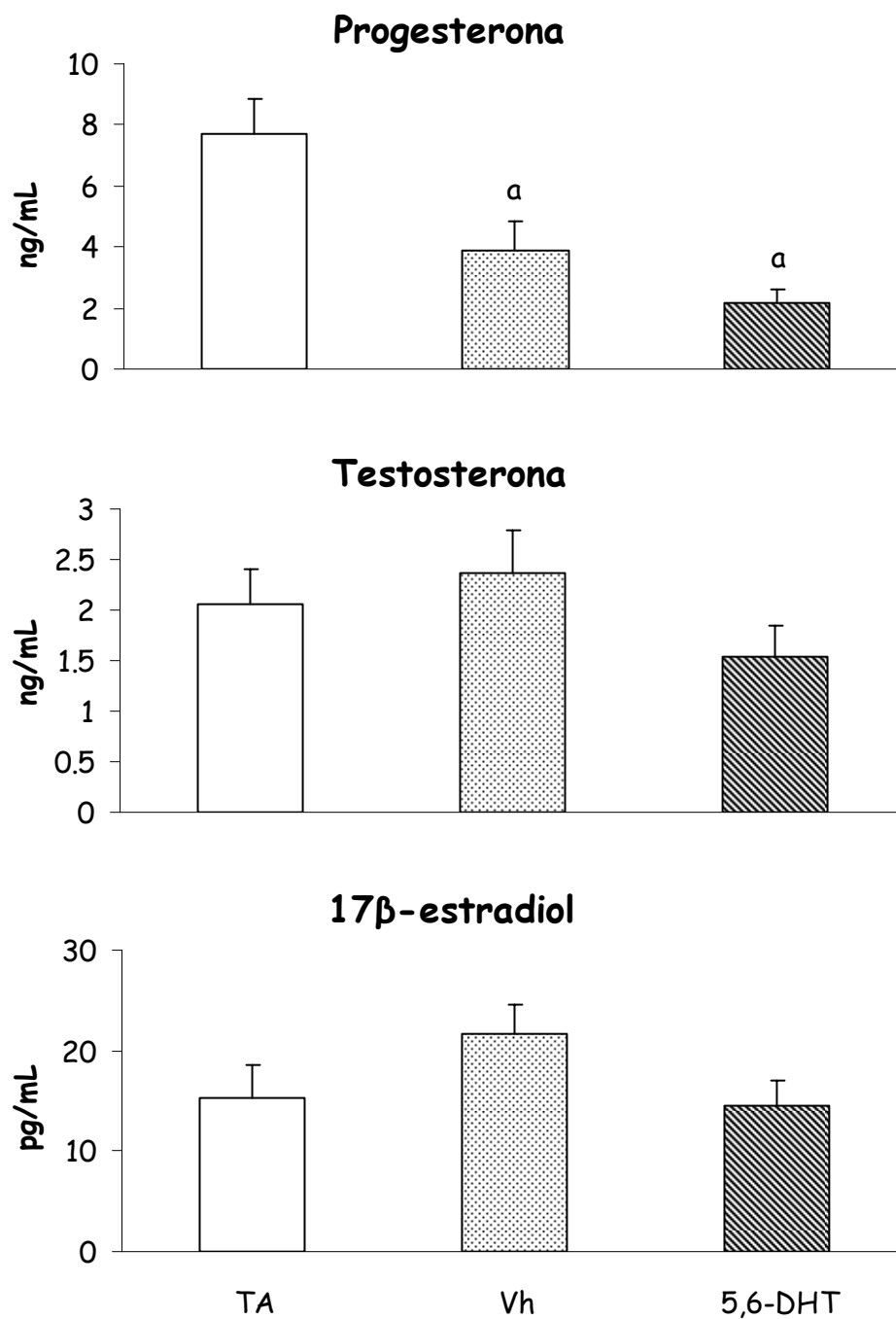
Peso de los órganos

En relación con el testigo absoluto la microinyección del ácido ascórbico en el NMR no modificó el peso corporal, la masa testicular, del epidídimo, próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes. Mientras que, en los que recibieron la microinyección de 5,6-DHT el peso corporal fue mayor y de la próstata fue menor en comparación con el grupo testigo absoluto (Cuadro 7 y 8).



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

Figura 17. Media \pm e.e.m. de la concentración de la FSH y LH en el suero de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 65 días de edad.



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

Figura 18. Media \pm e.e.m. de la concentración de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol en el suero de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 65 días de edad.

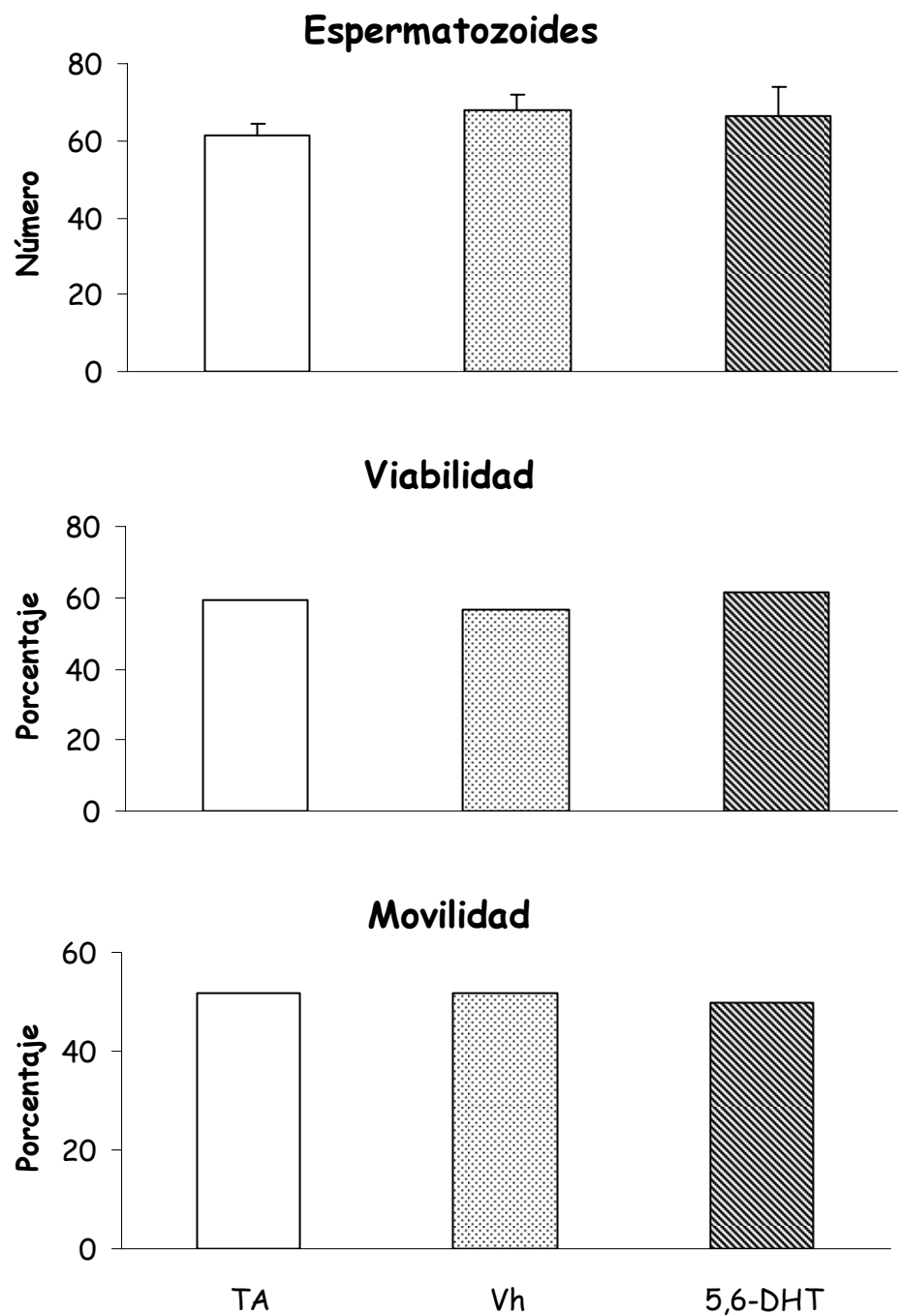


Figura 19. Número de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides viables y móviles de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad.

Cuadro 7. Media \pm e.e.m. del peso corporal, masa testicular y del epidídimo de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 65 días de edad.

Grupo	No.	Peso corporal (g)	Masa testicular (g)	Masa del epidídimo (g)
TA	26	262 \pm 4.99	2.79 \pm 0.10	0.58 \pm 0.02
Vh	10	267 \pm 10.63	2.89 \pm 0.01	0.58 \pm 0.03
5,6-DHT	15	277 \pm 4.05 a	3.04 \pm 0.06	0.58 \pm 0.01

a, $p < 0.05$ vs. Grupo TA (Prueba t de Student)

Cuadro 8. Media \pm e.e.m. del peso de la próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de ácido ascórbico (Vh) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificadas a los 65 días de edad.

Grupo	Próstata (g)	Vesícula seminal (g)	Glándulas coagulantes (g)
TA	0.44 \pm 0.02	0.35 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01
Vh	0.36 \pm 0.05	0.31 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02
5,6-DHT	0.37 \pm 0.02 a	0.35 \pm 0.01	0.16 \pm 0.02

a, $p < 0.05$ vs. Grupo TA (Prueba t de Student)

2. Efecto de la estimulación del sistema serotoninérgico del núcleo medial del rafé (NMR).

Cuantificación de serotonina

La microinyección de solución salina, en el NMR no modificó la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior, mientras que la del 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] fue menor que en el grupo testigo. En comparación con el grupo con vehículo, la microinyección de 5-HTP resultó en una mayor concentración de 5-HT y 5-HIAA sin que se modificará la relación [5-HIAA]/[5-HT] (Figura 20).

La microinyección del vehículo o 5-HTP, no modificó ninguno de los parámetros medidos en el hipotálamo medio (Figura 21).

En el hipotálamo posterior la administración del vehículo en el NMR resultó en una mayor concentración de 5-HT que en el grupo testigo absoluto y sin cambios en la concentración de 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT]. La microinyección de 5-HTP no indujo cambios significativos en los parámetros estudiados (Figura 22).

Cuantificación de gonadotropinas

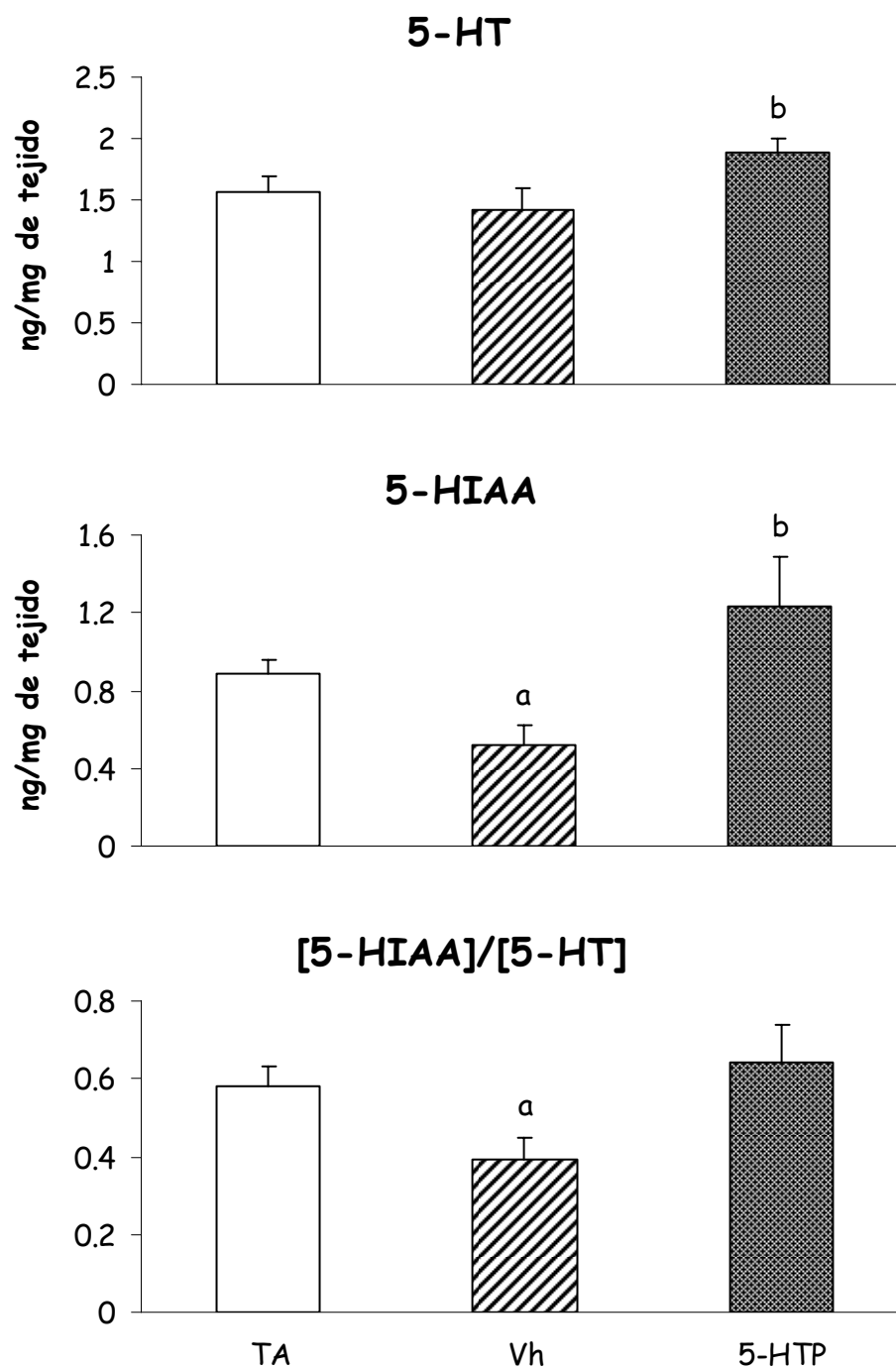
En comparación con el grupo testigo en los animales con microinyección de solución salina o 5-HTP en el NMR la concentración de FSH y LH fue menor (Figura 23).

Cuantificación de hormonas esteroideas

La microinyección de solución salina o 5-triptofano en el NMR no modificó significativamente la concentración de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol (Figura 24).

Peso de los órganos

En comparación con el grupo testigo absoluto, en los animales con microinyección de vehículo o 5-HTP en el NMR no se modificó el peso de los animales ni en el peso de los órganos del aparato reproductor (Cuadro 9 y 10).



a, $p < 0.05$ vs. grupo TA (Prueba t de Student)

b, $p < 0.05$ vs. grupo Vh (Prueba t de Student)

Figura 20. Media \pm e.e.m. de la concentración de 5-HT, 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el HA de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de solución salina (Vh) o 5-hidroxi-DL-triptofano (5-HTP) y sacrificadas a los 30 días de edad.

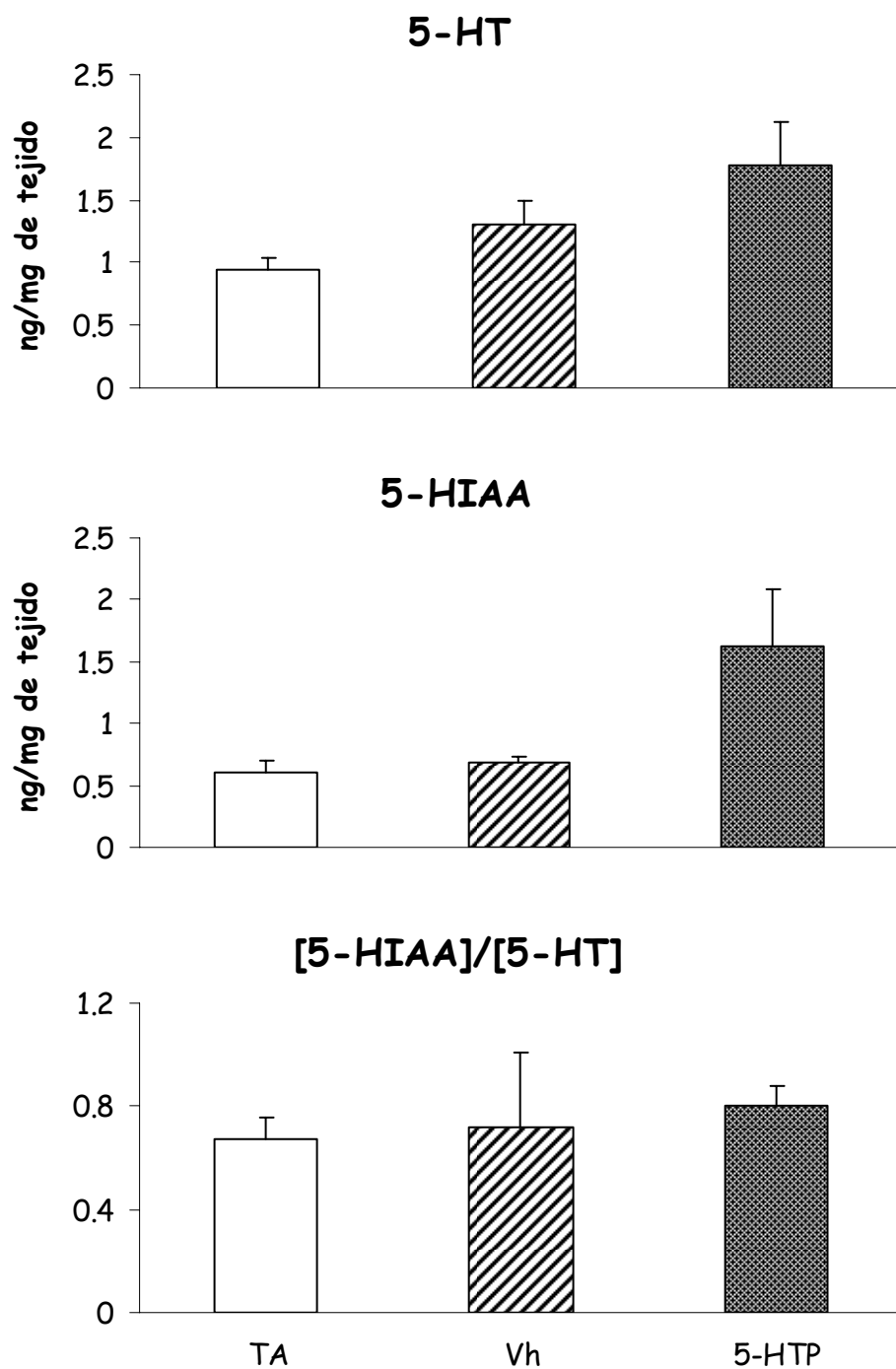
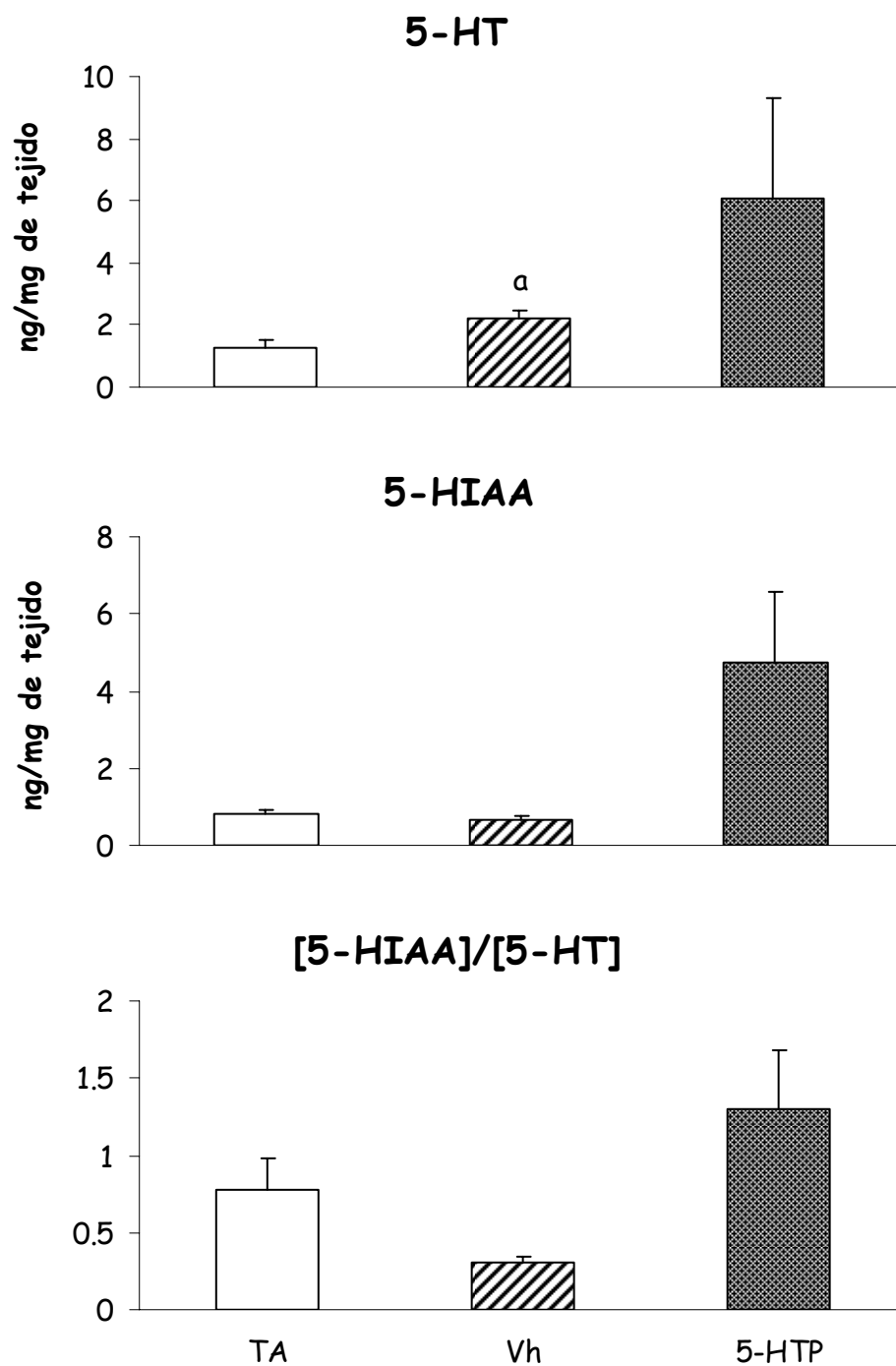
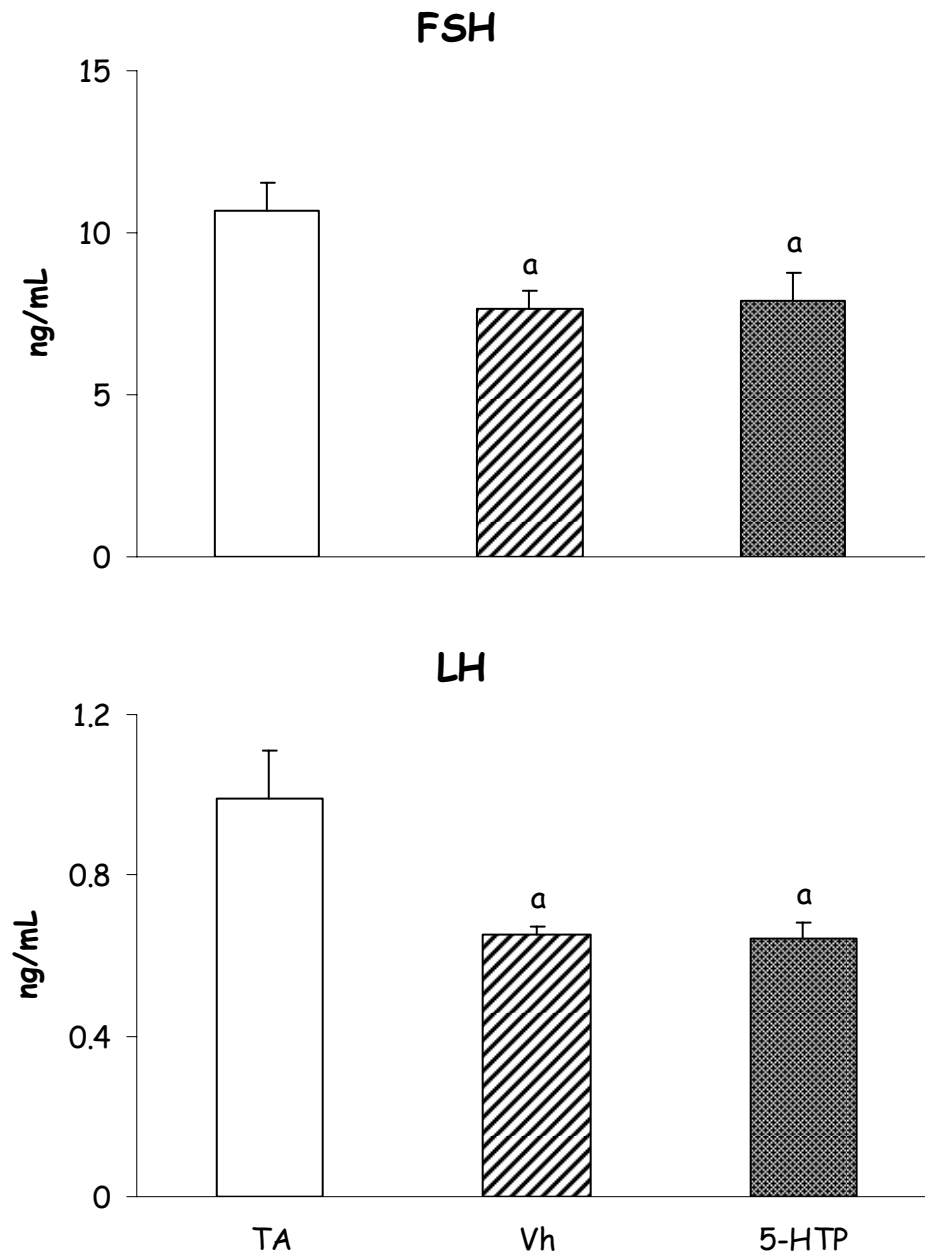


Figura 21. Media \pm e.e.m. de la concentración de 5-HT, 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el HM de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de solución salina (Vh) o 5-hidroxi-DL-triptofano (5-HTP) y sacrificadas a los 30 días de edad.



a, $p < 0.05$ vs. grupo TA (Prueba t de Student)

Figura 22. Media \pm e.e.m. de la concentración de 5-HT, 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el HP de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de solución salina (Vh) o 5-hidroxi-DL-triptofano (5-HTP) y sacrificadas a los 30 días de edad.



a, $p < 0.05$ vs. grupo TA (Prueba t de Student)

Figura 23. Media \pm e.e.m. de la concentración FSH y la hormona luteinizante (LH) en el suero de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el núcleo medial del rafe (NMR) de solución salina (Vh) o 5-hidroxi-DL-triptofano (5-HTP) y sacrificadas a los 30 días de edad.

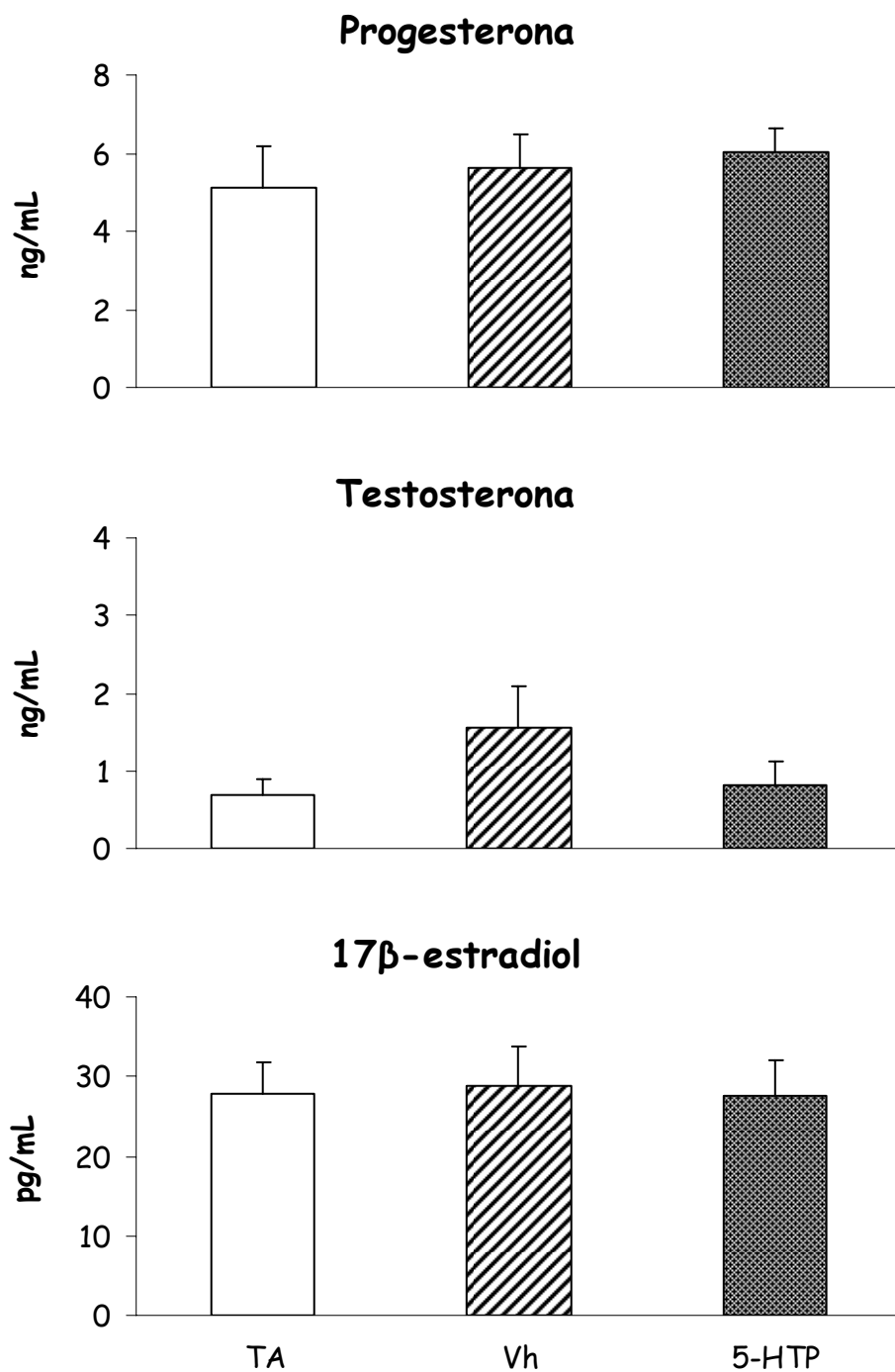


Figura 24. Media \pm e.e.m. de la concentración de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol en el suero de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el núcleo medial del rafe (NMR) de solución salina (Vh) o 5-hidroxi-DL-triptofano (5-HTP) y sacrificadas a los 30 días de edad.

Cuadro 9. Media \pm e.e.m. del peso corporal, masa testicular y del epidídimo de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de solución salina (Vh) o 5-hidroxi-DL-triptofano (5-HTP) y sacrificadas a los 30 días de edad.

Grupo	No.	Peso corporal (g)	Masa testicular (g)	Masa del epidídimo (g)
TA	8	80.36 \pm 3.12	0.66 \pm 0.03	0.09 \pm 0.004
Vh	7	85.57 \pm 1.41	0.65 \pm 0.02	0.09 \pm 0.004
5-HTP	8	88.25 \pm 1.46	0.67 \pm 0.04	0.09 \pm 0.005

Cuadro 10. Media \pm e.e.m. del peso de la próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes de ratas sin tratamiento (TA) o con microinyección en el NMR de solución salina (Vh) o 5-hidroxi-DL-triptofano (5-HTP) y sacrificadas a los 30 días de edad.

Grupo	Próstata (g)	Vesícula seminal y glándulas coagulantes(g)
TA	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.003
Vh	0.06 \pm 0.003	0.03 \pm 0.003
5,6-DHT	0.05 \pm 0.003	0.03 \pm 0.003

DISCUSIÓN

Con base en los resultados del presente estudio en el que no se observaron modificaciones en la concentración de FSH y LH, el número, viabilidad y movilidad de los espermatozoides sugerimos que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NMR no participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y en la regulación de la espermatogénesis.

La disminución en la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el HA y HM de los animales con microinyección del 5,6-DHT en el NMR está en concordancia con el hecho de que la 5,6-DHT es un fármaco que daña selectivamente a las neuronas serotoninérgicas por la propiedad de autooxidarse lo que genera quinonas y radicales libres superoxidativos como el O_2^- , radicales hidroxil $HO\cdot$ y H_2O_2 , los cuales dañan el ADN, las proteínas y los lípidos (Sinhbabu y col., 1985; Sing y Dryhurst, 1990 y 1991). El hecho de que no se modificara la concentración de NA, MHPG, DA y DOPAC en el hipotálamo indican que la 5,6-DHT afecta exclusivamente al sistema serotoninérgico.

El hecho de que el hipotálamo de los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NMR la disminución en la concentración de 5-HT y del 5-HIAA se presentara a partir de los 45 días y se mantuviera hasta los 65 días coincide con lo reportado por Ueda y Kawata (1994), quienes mostraron que cuando se realiza la microinyección intraventricular de 5,6-DHT a partir del día tres se observa degeneración de las fibras serotoninérgicas en diferentes regiones del encéfalo entre ellas el núcleo del rafé, y este efecto se mantiene hasta por tres meses.

El hipotálamo también recibe inervación que se origina en el NDR (Van der Kar y Lorens, 1979), lo que explica que los animales con lesión del NMR se encuentra 5-HT y su metabolito en el hipotálamo. Otra posibilidad es que la

serotonina se este sintetizando directamente en el hipotálamo, donde se describe la existencia de neuronas que sintetizan esta amina (Takeuchi, 1988).

En el HA y HM de los animales con lesión del NMR la relación [5-HIAA]/[5-HT], fue similar en los animales sin lesión, lo que se explica por la disminución en la concentración de la amina y del metabolismo simultáneamente.

La idea de que en el hipotálamo la serotonina participa en la regulación de la secreción de la GnRH y como consecuencia de las gonadotropinas ha sido planteada por otros autores (Arias y col., 1990; Moguevsky y col., 1985). En la rata macho prepúber el sistema serotoninérgico regula de manera estimulante la secreción de la FSH (Justo y col., 1989). Sin embargo, en los animales con lesión del NMR no se modificó la concentración de esta gonadotropina. Es posible que en los animales con lesión, la presencia de inervación serotoninérgica que se origina en el NDR que para el caso de la hembra se ha sugerido ejerce un papel estimulante en la secreción de las gonadotropinas (Barofsky, 1979; Barofsky, 1975; Morello y col., 1989), es la que mantiene la secreción de la FSH en los animales con microinyección de 5,6-DHT.

Otra posibilidad es que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NMR no participe en la modulación de la secreción de la FSH, como se ha sugerido para el caso de la rata hembra adulta (Barofsky, 1975; Morello y col., 1989) y prepúber (Monroy y col., 2003).

El efecto diferencial de la lesión del NMR en la secreción de la FSH y LH, posiblemente esté asociado a que la inervación serotoninérgica que se origina en este núcleo, inerva de forma diferencial los núcleos del hipotálamo (Takeuchi, 1988). El hecho que al lesionar el NMR la concentración de LH disminuya sin que se altere la de FSH puede deberse a que se está modificando la secreción del factor liberador de la LH, debido a que la inervación serotoninérgica que se origina en el

NMR llega al área preóptica (Van der Kar y Lorens, 1979), donde se encuentra el centro que regula la secreción de LH (McCann y col., 2002) y al eliminarse la innervación serotoninérgica que se origina en el NMR disminuye la secreción de LH.

En el animal prepúber la lesión química del NMR no modifica la primera ovulación ni la concentración de FSH en suero (Monroy y col., 2003), lo que coincide con lo observado en la rata macho, debido a que no se modifica la concentración de esta gonadotropina ni la función de la gónada. La FSH es un factor esencial en la regulación de la espermatogénesis, debido a que actúa en las células de Sertoli y estimula la secreción de proteínas y factores que inducen la multiplicación de las espermatogonias y la diferenciación de las mismas a espermatozoides (Russell y col., 1987; Raj y Dym, 1976).

La LH estimula la producción de testosterona en la célula de Leydig, debido a que favorece la transformación del colesterol a 2α -hidroxicolesterol, un paso necesario para la transformación de progesterona y testosterona (Payne y col., 1995; Saez, 1994). La menor concentración de progesterona observada en los animales con microinyección de la 5,6-DHT y sacrificados a los 65 días de edad no se acompaña de la disminución en la concentración de LH. Por ello, es posible que la disminución de esta hormona esteroide es el resultado de que se modificó alguna vía neural que comunica el testículo con el hipotálamo. La idea de una comunicación neural entre el hipotálamo y el testículo ha sido propuesta previamente (Lee y col., 2002), y es apoyado por los resultados de Selvage y col., (2003), quien mostró que la lesión del núcleo paraventricular, no modifica la concentración de LH, pero si disminuye la concentración de testosterona.

Otra posibilidad es que la disminución en la concentración de progesterona observada en los animales con lesión del NMR este asociado a una menor secreción de ACTH, como resultado de la disminución en la concentración de 5-HT en el HA observada en estos animales. En relación a esto se ha mostrado que la

administración de un agonista de los receptores 5-HT₁ aumenta la liberación de ACTH, este efecto se bloquea cuando se administra un antagonista de estos receptores en el núcleo paraventricular (Osei-Owonsu y col. 2005). Además la ACTH estimula la secreción de progesterona por la glándula adrenal (Ney y col. 1967).

La disminución en la concentración de testosterona no fue significativa y no provocó alteraciones en la viabilidad, movilidad y número de espermatozoides. Sin embargo esta disminución en la concentración de testosterona posiblemente si se reflejo en la modificación del peso de la próstata que es una glándula andrógeno dependiente. La posibilidad de que los cambios en la producción de testosterona afectan a la próstata, se apoya en el hecho de que en ratas de 3 meses de edad, a los que se les realizó la castración, el peso de la próstata disminuyó, mientras que al administrar propionato de testosterona en estos animales, el peso de la glándula se recuperó en un 72% (Justulin y col., 2006). También se ha mostrado que en animales de 3, 15, 17 y 21 meses de edad, en los que se realizó la administración de testosterona, aumentó el peso de la próstata, el contenido de proteínas, el número celular (Banerjee y col., 1994).

La falta de cambios en la concentración de FSH en los animales con lesión del NMR se acompañó del mantenimiento de la espermatogénesis normal, debido a que no se modificó el número, la viabilidad y movilidad de los espermatozoides. En relación a esto se ha mostrado que la FSH actúa en la célula de Sertoli estimulando la secreción de sustancias necesarias para que se lleve a cabo la espermatogénesis, además de aumentar los receptores a LH en las células de Leydig. La idea de que la FSH participa en la regulación de la espermatogénesis se apoya en diferentes estudios, como el de Russell y col., (1987) en donde a ratas de 32 días de edad, con hipofisectomía les administró FSH y se observa que la degeneración de los espermatoцитos en paquiteno y de las espermatides, producida por la hipofisectomía disminuye significativamente. Otro estudio es el que realizó

Raj y col., (1976) donde administra un antisuero de FSH disminuye el número de espermátides. En conjunto nuestros resultados y los reportados por otros autores apoyan la idea de que la FSH es esencial en el mantenimiento de la espermatogénesis.

El aumento en la concentración 5-HT y 5-HIAA en el HA de los animales con microinyección de 5-HTP en el NMR, coincide con lo observado por otros autores, que han mostrado que el 5-HTP es un precursor de la 5-HT y la síntesis de la 5-HT se correlaciona con la concentración de 5-HTP (Danilova y Ali, 1980). La posibilidad de que la concentración de 5-HT aumenta en periodos muy cortos después de la administración de este precursor ha sido mostrada por Justo y col., (1989), quienes observaron que cuando se administra el 5-HTP por vía intraperitoneal, la síntesis de 5-HT se incrementa a los 30 minutos y el mayor efecto se observa a los 60 minutos.

El aumento en la concentración de 5-HT y 5-HIAA en el HA de los animales que se les realizó la microinyección de 5-HTP, se puede considerar como un indicador de que se incrementó la actividad de las neuronas serotoninérgicas que se originan en este núcleo. Este evento se explica debido a que las fibras serotoninérgicas que se origina en el NMR inervan el área preóptica e hipotalámica anterior y al núcleo supraquiasmático (Van der Kar y Lorens, 1979), que en nuestro estudio forman parte del HA. La falta de cambios observados en el sistema serotoninérgico en el HM y HP, posiblemente es el resultado de que las fibras serotoninérgicas que se origina en el NMR inervan en menor proporción a otros núcleos hipotalámicos, como el núcleo arcuato (Van der Kar y Lorens, 1979), que junto con la eminencia media y el área hipotalámica dorsal constituyen el HM. Mientras que, no se ha descrito la inervación serotoninérgica del HP (núcleo mamilar medio, supramamilar y tracto mamilo talámico).

La idea de que el NMR es la principal fuente de inervación serotoninérgica de los núcleos que conforman el HA se ha propuesto previamente (Van der Kar y Lorens, 1979). Estos autores mostraron que al realizar la lesión electrolítica del NMR, en el núcleo supraquiasmático disminuye la concentración de 5-HT en un 70% y en el área hipotalámica anterior 60 %.

La disminución en la concentración de FSH y LH en los animales en los que se realizó la administración de 5-HTP no coincide con lo reportado por otros autores donde la administración intraperitoneal de 5-HTP en ratas macho de 30 días de edad, estimula la secreción de FSH (Justo y col., 1989), mientras que no se modifica la concentración de LH (Moguilevsky y col., 1985). Las diferencias observadas entre nuestro estudio y lo reportado por otros autores posiblemente se debe a que cuando se administra por vía sistémica el 5-HTP este precursor atraviesa la barrera hematoencefálica (Hardebo y Owaman, 1980) y actúa en todas las neuronas serotoninérgicas, como las del NDR y NMR. En relación a la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR se sugiere que ejerce un papel estimulante en la regulación de la secreción de la FSH (Mendoza y col., 2006).

El hecho de que en los animales con microinyección de Vh o 5-HTP en el NMR disminuyera la concentración de FSH y LH, nos permite pensar que estos cambios son el resultado de sección de las fibras que se originan en este núcleo al introducir la aguja de microinyección. La sección de estas fibras posiblemente modificó información neural que llega al hipotálamo, lo que se traduce en la disminución en la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas. Es posible, que la información neural que parte del NMR actúe directamente en el hipotálamo o en alguna otra estructura que regule el funcionamiento de los núcleos hipotalámicos en donde se encuentran los somas o terminales de las neuronas que producen la GnRH.

La disminución en la concentración de LH y FSH en los animales con microinyección de Vh o 5-HTP en el NMR no se acompañó de modificaciones en la secreción de progesterona, testosterona y 17β -estradiol. Se ha mostrado que la LH al actuar en las células de Leydig estimula el complejo enzimático que transforma el colesterol en progesterona y la formación de testosterona, mientras que la FSH activa a las enzimas que aromatizan a los andrógenos a estrógenos (Saez, 1994). Por ello, la falta de cambios en la concentración de hormonas esteroides observada en estos animales posiblemente puede deberse a que el tiempo que transcurrió entre la administración de 5-HTP y el sacrificio no fue suficiente para que se presentaran los cambios en la secreción de estos esteroides.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que:

- El HA, HM y HP reciben inervación serotoninérgica proveniente del NMR.
- La inervación serotoninérgica que se origina en el NMR participa de forma estimulante en la regulación de la secreción de la LH en los animales prepúber, y no participa en la modulación de la secreción de FSH.
- La lesión del NMR modifica una vía neural de comunicación que existe entre el hipotálamo y el testículo y que participa en la modulación de la secreción de progesterona.
- El NMR no participa en la regulación de la espermatogénesis.
- Entre el NMR y el hipotálamo existe una vía de comunicación neural que participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas.

PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos surgen las siguientes interrogantes:

- ¿Qué efectos tendría la eliminación o estimulación conjunta de los NDR y NMR en la secreción de gonadotropinas y las funciones del testículo?
- ¿Existe una vía de comunicación neural que comunica al NMR o NDR con el testículo?
- ¿Cual es la vía neural que existe entre NMR o NMR y el testículo?
- ¿Existe una vía de comunicación neural que comunique al hipotálamo con el testículo?
- ¿La eliminación o estimulación del NDR o NMR modifica la secreción de ACTH?

BIBLIOGRAFÍA

1. Aragón M. A., Ayala M. E., Marin M., Aviles A., Matsumura P. A., Domínguez R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction*, 129: 717-127.
2. 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.
3. Ayala M. E., Monroy J., Morales L., Castro M. E., Domínguez R. (1998). Effects of a lesion in dorsal raphe nucleus performed during the juvenile period of the female rats, on puberty. *Brain Res. Bull.*, 47:211-218.
4. Banerjee P., Barnejee S., Dorsey R., Zirkin B., Brown T. (1994). Age- and lobe-specific response of the brown Norway rat prostate to androgen. *Biology of reproduction*, 51: 675-684.
5. Barofsky A.-L. (1975). Progesterone-induced luteinizing hormone release in oestrogen-primed varietomized rats after destruction of mid-brain inputs to supraquiasmatic nuclei. *J. Endocr.*, 66: 285-286.
6. Barofsky A.-L. (1979). Median raphe stimulation and sham procedures inhibit the LH surge. *Neuroendocrinology*, 28: 358-370.
7. Becu-Villalobos D., Lacau-Menguído I. M. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal de la rata hembra. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, 40: 1-17.
8. Bergh A., Damber J.-E. (1993). Vascular controls in testicular physiology. En: **Molecular biology of the male reproductive system**. Kestser (Edit). Academic Pres., Inc. E.U.A., 838-866.
9. Bellido MC. (1999). Reproducción en el varón. En: **Fisiología humana**. JAF. Tresguerres (edit) McGraw-Hill, Madrid, España, 1049-1063.
10. Brown R. E. (1994). Neurotransmitter. En: **An introduction to Neuroendocrinology**. Cambridge University Press, Inglaterra, 56-87.
11. Campos M. B., Vitale M. L., Calandra R. S., Chiochio S. R. (1990). Serotonergic innervation of the testis. *J. Reprod. Fert.*, 88: 475-479.
12. 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.
13. 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.
14. Csaba Z., Csernus V., Gerendai I. (1998). Intratesticular serotonin effects steroidogenesis in the rat testis. *J. Neuroendocrinol*, 10: 371-376.
15. Danilova O., Ali K. (1980). [Morphometric study of the effect of 5-hydroxytryptophan on the activity of various hypothalamic centers in rats depending on the state of their sexual system] *Probl. Endokrinol (Mosk)*, 26: 42-46.
16. 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.
17. Fink G. (1988). Gonadotrophin secretion and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, J. D. Neill (Edits.). Raven Press, New York, EUA, 1349-1378.
18. Frazer A., Hensler JG. (1999). Serotonin. En: **Basic neurochemistry, molecular, cellular, and mediagal aspects**. G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, P. B. Molinoff (Edits.). Raven Press, New York, EUA, 263-292.

19. Geneser F. (2000). Órganos de la reproducción. En: **Histología**. F. Geneser (Edit.). Editorial Medica Panamericana, tercera edición, Argentina, 639-663.
20. Granner D. K. (1988). Hormonas de las gonadas. En: **Bioquímica de Harper**. R. K. Murray, D. K. Garnner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell (Edits.). Manual Moderno, décimo primera edición, México, 530-546.
21. Hardebo J. E., Owman C. (1980). Barrier mechanisms for neurotransmitters monoamines and their precursors at the blood-brain interface. *Ann Neurol.*, 8: 1-31.
22. Huang H. F. S., Neischlag E. (1986). Suppression of the intratesticular testosterone is associated with qualitative changes in spermatogonial populations in intact adult rats. *Endocrinology*, 118: 619-627.
23. Huhtaniemi I. T., Nevo N., Amsterdam A., Naor Z. (1986). Effect of postnatal treatment with a gonadotropin-releasing hormone antagonist on sexual maturation of male rats. *Biology of Reproduction*, 35: 501-509.
24. Jennes D., Beckman W. C., Stumpf W. E., Grzanna R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH system in the septum and hypothalamus. *Exp. Brain Res.*, 46: 331-338.
25. Jimenez Del Rio M., Velez-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.
26. 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.
27. Krester D. M., Kerr J. B. (1994). The cytology of he testis. En: **Physiology of Reproduction**. E. Knobil, J. D. Neill. (Edits.) Vol.1 segunda edición. Raven Press, New York, USA, 1621-1681.
28. 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.
29. Lee S., Miselis R., Rivier C. (2002). Anatomical y functional evidence for a neural hipotalamic-testicular pathway that is independent of the pituitary. *Endocrinology*, 143: 4447-4454.
30. Merchant, H. (1991). Gametogénesis. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. R. Domínguez (Edit.), UNAM y Porrúa, México, 11-29.
31. McCann S. M., Karanth S., Mastronardi C. A., Dee W. L., Childs G., Miller B., Sowers, Yu w. H. (2002). Hipotalamic control of gonadotropin secretion. *Prog. Brain Res.*, 141: 151-164.
32. Moguilevsky J. A., Faigón M. R., Scacchi P., Szwarcfarb B. (1985). Effect of the serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats. *Neuroendocrinology*, 40: 135-138.
33. Monroy J., Ayala M. E., 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.
34. Morello H., Taleisnik S. (1985). Changes of the release of luteinizing hormone (LH) on the day of proestrous after lesions or stimulation of the raphe nuclei in rats. *Brain Res.* 360: 311-317
35. 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.

36. Ney R. L., Dexter R. N., Davis W. W., Garren L. D. (1967). A study of the mechanisms by which adrenocorticotrophic hormone maintains adrenal steroidogenic responsive. *The Journal of clinical investigation*, 46: 1916-1924.
37. 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, EU, 363-409.
38. Osei-Owusu P., James A., Crane J., Scrogin K. E. (2005). 5-hidroxitriptamina 1A receptor in the paraventricular nucleus of the hypothalamus mediate oxitocin and adrenocorticotropin hormone release and some behavioral components of the serotonin syndrome. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 313: 1324-1330.
39. Paxinos G., Watson C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York, EUA.
40. Payne A. H., Youngblood G. L. (1995). Regulation of expression steroidogenic enzymes in Leydig cell. *Biology of reproduction*, 52: 217-225.
41. Raj H. G. M., Dym M. (1976). The effects of selective withdrawal of FSH or LH on spermatogenesis in the immature rat. *Biology of reproduction*, 14: 489-494.
42. 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.
43. Russell L. D., Alger L. E., Nequin L. G. (1987). Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology*, 120: 1615-1632.
44. Saez J. M. (1994). Leydig cells: Endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocrine reviews*, 15: 574-626.
45. Selvage D. J., Rivier C. (2003). Importance of paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway between the brain and testis that modulates testosterone secretion independently of the pituitary. *Endocrinology*, 144: 594-598.
46. Setchell, B. P. y Brooks D.E (1988). Anatomy, vasculature, innervations, and fluids of the male reproductive tract. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, J. D. Neill (Edits.) Vol. 1, Raven Press, New York, EUA, 753-836.
47. 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 raphe nucleus. *J. Neurochem.*, 47: 959-965.
48. 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.
49. Shishkina GT., Borodin PM: (1989). Involvement of brain serotonin in regulation of sexual maturity in male rats. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 19: 145-149.
50. Sinhababu A. K., Ghosh A. K., Borchardt R. T. (1985). Molecular mechanism of action of 5,6-dihydroxytryptamine. Synthesis and biological evaluation of 4-metil-, 7-metil-, and 4,7-dimetil-5,6-dihydroxytryptamine. *J. Med. Chem.*, 28: 1273-1279.
51. Sing S., Dryhurst G. (1990). Further Insights into the oxidation chemistry and biochemistry of serotonergic neurotoxin 5,6-dihydroxytryptamine. *J. Med. Chem.*, 33: 3035-3044.
52. Sing S., Dryhurst G. (1991). Reactions of the serotonergic neurotoxin 5,6-dihydroxytryptamine with glutathione. *J. Org. Chem.*, 56: 1767-1773.
53. Silverman A. J., Livne I., Witkin J. W. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: **The**

- Physiology of Reproduction.** E. Knobil, J. D. Neill (Edits.). vol. 2, segunda edición, Raven Press, New York, EUA, 1683-1710.
54. 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.
55. Tinajero J. C., Fabbri A., Dufau M. L. (1993). Serotonergic inhibition of rat leydig cell function by propranolol. *Endocrinology*, 133: 257-264.
56. Ueda S., Kawata M. (1994). Regeneration of serotonergic immunoreactive fibers in the brain of 5,6-dihydroxytryptamine treated rat. *J. Hirnforsch*, 35: 159-180.
57. 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.
58. Weichert C. K., Presh W. (1981). *Elementos de anatomía de los cordados*, 4ª edición, Mc Graw-Hill, New York, EUA, 314-328.

Anexo 1

En la disección del hipotálamo anterior se consideró como límite rostral el quiasma óptico y la comisura anterior, lateralmente los surcos hipotalámicos laterales, y caudalmente el área retroquiasmática y el tracto mamilotalámico. El hipotálamo medio se delimitó rostralmente por el tracto mamilotalámico y el fornix, lateralmente por los surcos hipotalámicos y caudalmente por los cuerpos mamilares. En el hipotálamo posterior se consideró como límite rostral los cuerpos mamilares, lateralmente los surcos hipotalámicos y caudalmente la fosa interpeduncular y el área tegmental ventral. La profundidad del corte para la disección de cada una de las regiones del hipotálamo fue de 3 mm (Figura 24).

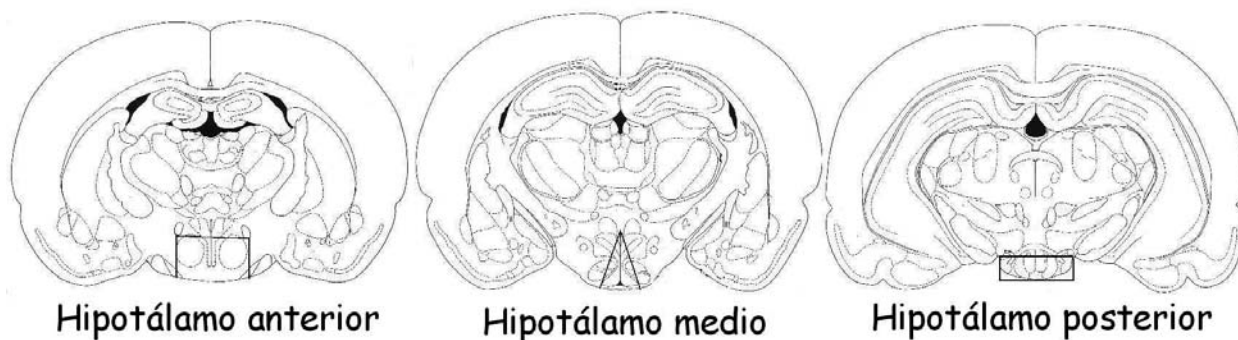


Figura 25. Esquemas de la localización del hipotálamo anterior medio y posterior (Con base en el atlas de Paxinos y Watson 1982).

Anexo 2

La muestra de tejido del hipotálamo anterior, medio y posterior fue pesada individualmente en una balanza de precisión y colocada en un tubo eppendorf de 1.5 mL y suspendido en 300 μ L de ácido perclórico (HClO_4) 0.1 N (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), posteriormente fue homogenizado por sonicación en frío, se centrifugado 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 μm (Millipore Bedford, MA, EUA) y se tomó una alícuota de 20 μL que se inyectó al sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

El aparato de cromatografía consistió en una bomba de isocrática (Perkin-Elmer, Co., Norwalk, CT, EUA, modelo LC-250), detector amperométrico (Bionalytical Systems, Inc., EUA, modelo LC-4C) acoplada a una celda de transductor LC-4C de carbón vidriado (Bionalytical Sistem, Inc., EUA) al que se le aplicó un potencial de 0.850 V contra un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), la ganancia del detector fue de 5.0 nA. Columna fase reversa C-18 (4.8 mm d.i.x25 cm) con partícula esférica de 10 μm de diámetro (Perky-Elmer, Co., Norwalk, CT, EUA). Las muestras procesadas se introdujeron en un válvula de inyección de 6 puertos (Rheodyne, modelo 7125) con un loop de 20 μL .

Se emplearon soluciones estándares de NA, MHPG, DA, DOPAC, 5-HT, 5-HIAA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), preparadas y diluida en HClO_4 0.1 N y almacenadas. Las soluciones estándar fueron diluidas, el día en que las soluciones problemas fueron procesadas. El sistema fue calibrado con el método de estándar externo empleando, que utiliza el área de los picos obtenidos en el cromatograma de tres concentraciones diferentes de estándares como puntos de calibración (0.1, 0.5 y 1 ng) y se ajusta a una curva lineal que incluye el origen por el método de regresión de mínimos cuadrados. Los valores de correlación obtenidos para cada uno de los estándares fueron mayores o iguales a 0.98. La sensibilidad

del ensayo para todos los neurotransmisores y sus metabolitos fue de 0.01 ng. La concentración de los diferentes neurotransmisores en las muestras problema se calculó al comparar el área debajo de la curva los estándares, de cada una de los neurotransmisores y sus metabolitos.

ABREVIATURAS

FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
5-HT	Serotonina ó 5-hidroxitriptamina
NDR	Núcleo dorsal del rafé
NMR	Núcleo medial del rafé
NPR	Núcleo del rafé del puente
5,6-DHT	5,6-dihidroxitriptamina
5-HTP	5-hidroxitriptofano o 5-hidroxi-DL-triptofano
5-HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético
HA	Hipotálamo anterior
HM	Hipotálamo medio
HP	Hipotálamo posterior
MAO	Monoaminooxidasa
ABP	La proteína transportadora de andrógenos (por sus siglas en inglés)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
pCA	p-cloroanfetamina
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenil acético
NA	Noradrenalina
MHPG	Ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol
ACTH	Hormona adrenocorticotropa