



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTO DE LA LESIÓN DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ
EN LA ETAPA JUVENIL SOBRE EL PROCESO DE
ESPERMATOGÉNESIS Y ESTEROIDOGÉNESIS EN LA RATA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
JUAN LUIS MENDOZA GUTIERREZ



DIRECTORA: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

MÉXICO D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

**Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

Carrera de Biología

**EFFECTO DE LA LESIÓN DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ EN
LA ETAPA JUVENIL SOBRE EL PROCESO DE
ESPERMATOGÉNESIS Y ESTEROIDOGÉNESIS EN LA RATA**

Tesis que presenta: Juan Luis Mendoza Gutierrez

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

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

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA-PAPIIT Convenio IN-206805.

Agradecimientos:

A la Doctora María Elena Ayala Escobar por su dirección, enseñanza apoyo, consejos y valiosa ayuda en la realización de esta tesis; pero sobre todo por su paciencia y comprensión que me brindo en mis mas duros momentos.

A los miembros del jurado:

M. en C. Raúl Zavala Chavero.

Dra. María Elena Ayala Escobar.

M. en BRA. Ma. Judith Villavicencio Macias.

Dra. Rosalva Rangel Corona.

Dra. Leticia Morales Ledesma.

Por su valiosa contribución en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Andrés Aragón Martínez por la asesoría en las evaluaciones de la espermatogénesis.

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

A Juanita, Eloir, Diana, Julio, Daniel, Jessica, Maritza y Andrea por su amistad, apoyo, por crear un ambiente de trabajo agradable y sobre todo por compartir conmigo parte de su vida.

A todo el personal Bioterio de la FES-Zaragoza por su cooperación en el cuidado y mantenimiento de los animales.

¡Gracias a todos!

Dedicatorias:

A mí Madre:

Esperanza Mendoza por que no tengo palabras para agradecerle la vida, su apoyo y su incondicional amor. Por lo tanto le escribo lo siguiente:

Comienzo estas simples palabras para el ser mas bello, ese ángel que Dios me dio en préstamo, ese bello ser lleno de ternura, a esa hermosa señora llena de experiencia y sabiduría; esa señora que da luz y sentido a mi vida. Oh hermosa señora, usted me dio la vida, sus lágrimas y su dolor aquel día en que al mundo por gracia de Dios yo vine. Usted es mi vida y mi esperanza, por que solo usted me enseñó que la vida no es fácil y que cae uno alguna vez. Usted nunca me dejó solo, mas que ayudarme a levantar me impulso y a que luchara con pasión. A usted le debo lo que ahora soy, por que gracias a usted diferencie la paz del dolor y por usted supe que existe el amor. Hoy señora le declaro mi amor, mi gratitud y mi respeto, pero con toda quietud le pido perdón porque cuando un chamaco fui, en aquellos días de relax, nunca la supe oír y por eso miles de errores cometí. Solo usted me espero hasta media noche, pensando en mí, como se espera día con día la vida; solo usted no dio media vida por mí, la dio entera y sin esperar recibir algo a cambio, mas que ver a un hijo realizado. Solo un ser como usted es capaz de convertir el caos en calma total. Solo por mí, usted paso carencias y humillaciones por darme una vida mejor. Por todo esto quiero que usted sepa que mis triunfos son también suyos. Muchas gracias que Dios me la bendiga, la amo mucho.

A mí abuelo:

Guillermo Mendoza, donde quiera que esté gracias por su cariño, sus consejos, porque usted me enseñó a ser un buen hijo y un hombre de bien.

A mis hermanos:

Francisco Javier y Carlos Manuel por su apoyo y por que se que siempre podré contar con ustedes.

A mí sobrino:

Alejandro por que vino a llenar de alegría mi vida.

A mis amigos y amigas:

Meche, Yahir, Maru, Araceli, Rosa, Alma, Ariadna, Alondra, Héctor, Amadeo, Armando, Rodrigo, José J, David, etc. etc. Por todos los momentos agradables y desagradables, por su amistad y por estar conmigo.

ÍNDICE

Resumen	I
Introducción	1
Desarrollo Peripuberal de la Rata Macho	7
Espermatogénesis	9
Esteroidogénesis	11
Regulación Hormonal de las Funciones del Testículo	16
Eje Hipotálamo–Hipófisis	20
Organización del Sistema Serotoninérgico	21
Serotonina y Secreción de Gonadotropinas	25
Propiedades Químicas de la 5,6–Dihidroxitriptamina	30
Justificación	32
Hipótesis	33
Objetivo general	33
Objetivos particulares	34
Materiales y Método	35
Procedimiento de Lesión	35
Procedimiento de Autopsia	36
Evaluación de la Espermatogénesis	37

Cuantificación de Serotonina	38
Cuantificación de Gonadotropinas y Hormonas Esteroides	39
Análisis Estadístico de Resultados	40
Resultados	41
Concentración de 5-HT y 5-HIAA	41
Concentración de Catecolaminas	42
Concentración de Gonadotropinas	47
Concentración de Hormonas Esteroides	48
Concentración Espermatica	51
Peso de Órganos	51
Discusión	54
Conclusiones	63
Bibliografía	64

RESUMEN

La serotonina es producida en el sistema nervioso central por neuronas localizadas en los núcleos del rafe. Existen evidencias en las que se señala que el núcleo dorsal del rafe (NDR) ejerce un papel modulador en la regulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de las gonadotropinas [hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH)], las cuales modulan las funciones del testículo (espermatogénesis y esteroidogénesis). Sin embargo, hasta el momento las evidencias que señalan la participación de este sistema de neurotransmisión en la secreción de gonadotropinas son contradictorias. Es por ello que en el presente trabajo fue de nuestro interés analizar los efectos de la lesión selectiva de las neuronas serotoninérgicas del NDR. Para ello, se utilizaron ratas de 30 días de edad de la cepa CII-ZV a las cuales se les inyectaron 10 μg de 5,6-Dihidoxitriptamina (5,6-DHT) (fármaco que destruye selectivamente las neuronas serotoninérgicas) en un volumen de 2.5 μl de ácido ascórbico, en el NDR. Otro grupo de animales se les inyectó 2.5 μl de ácido ascórbico (grupo con VH). Un grupo de animales no recibió ningún tratamiento. Todos los animales fueron sacrificados a los 45 ó 65 días de edad. Al momento de la autopsia se disecaron y pesaron los testículos, se disecaron conductos deferentes para la evaluación espermática y se cuantificó la concentración de gonadotropinas y de hormonas esteroides en suero por radioinmunoanálisis. En el hipotálamo anterior (HA), medio (HM) y posterior (HP) se cuantificó la concentración de serotonina, dopamina y noradrenalina.

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto o que recibieron el vehículo en el NDR, en los animales en los que se lesionó el NDR, la concentración de serotonina y de su metabolito (5-HIAA) disminuyó significativamente en hipotálamo anterior (HA) y medio (HM) cuando los animales se sacrificaron a los 45 o 65 días de edad. No se presentaron cambios en la concentración de catecolaminas.

La concentración de FSH en el suero de los animales en los que se realizó la microinyección de la 5,6-DHT y que fueron sacrificados a los 45 o 65 días de edad disminuyó de manera significativa. Este comportamiento se acompañó de un menor número de espermatozoides y de la disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos y móviles.

Mientras que en el grupo de animales con lesión del NDR y que fueron sacrificados a los 65 días de edad la administración de la 5,6-DHT solo provocó una disminución en el peso de la vesícula seminal.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten sugerir que en el animal prepúber la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe, participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de FSH y en el proceso de la espermatogénesis.

INTRODUCCIÓN

El aparato reproductor del macho esta constituido por dos testículos, dos epidídimos, dos conductos deferentes, glándulas accesorias (próstata y vesícula seminal) y genitales externos (Figura 1). De estos componentes, el testículo, bajo la producción de hormonas sexuales mantiene la estructura y el funcionamiento del resto de los componentes del aparato reproductor (Bellido, 1999).

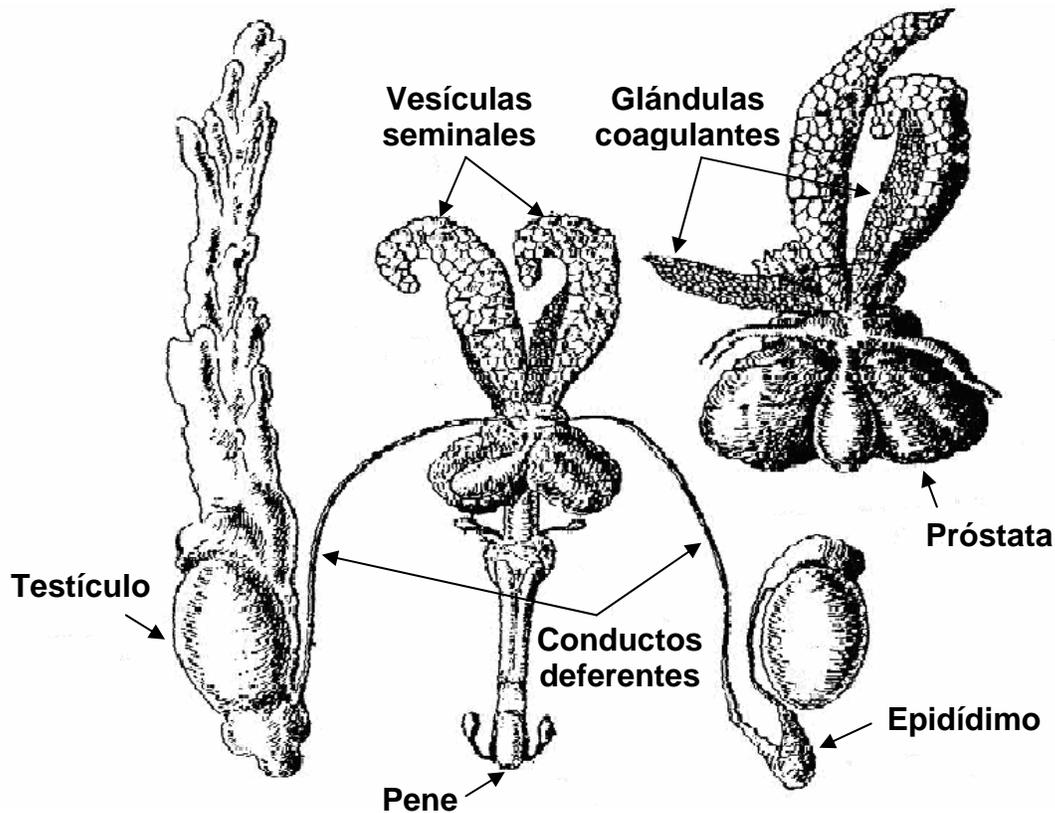


Figura1. Esquema del aparato reproductor de la rata macho (Modificado de Setchel y col., 1994).

En los mamíferos los testículos se ubican a ambos lados de la línea media y descienden poco antes del nacimiento a la bolsa escrotal, maduran durante el desarrollo prepuberal y realizan una doble función: producción de espermatozoides y secreción de hormonas esteroides (testosterona principalmente) y proteicas (inhibina y activina), así como diferentes factores de crecimiento (Geneser, 2000; Skinner, 2005).

Los testículos están conformados por dos compartimentos; el intersticial y el túbulo seminífero. En los túbulos seminíferos se encuentran dos tipos celulares: las células germinales en distintos estadios de maduración y las de Sertoli. Entre este último tipo celular existen uniones estrechas que forman la barrera hematotesticular que se desarrolla durante la pubertad justo antes de que se inicie la espermatogénesis y divide el epitelio germinal en un compartimiento basal y otro adluminal (Bellido, 1999). Las células de Sertoli son de forma cilíndrica, se extienden desde la membrana basal hasta la superficie luminal del epitelio, el núcleo de esta célula es oval y con un nucleolo grande. En el citoplasma se encuentran gotas de lípido y un retículo endoplásmico liso bien desarrollado (Geneser, 2000).

Los túbulos seminíferos están rodeados por células alargadas denominadas, mioideas, inmediatamente después se encuentra la membrana basal. Internamente se encuentran las células de Sertoli y de la línea germinal en diversas etapas de desarrollo (Akingbemi, 2005) (Figura 2). Las células más inmaduras, o espermatogonias tienen su soporte en la membrana basal y

forman el epitelio germinativo. En dirección a la luz del túbulo, se encuentran los espermatocitos primarios, secundarios y espermatides. En este último tipo celular se presentan una serie de cambios que culminan con la formación del espermatozoide, el que se ubica en la luz del túbulo (Geneser, 2000).

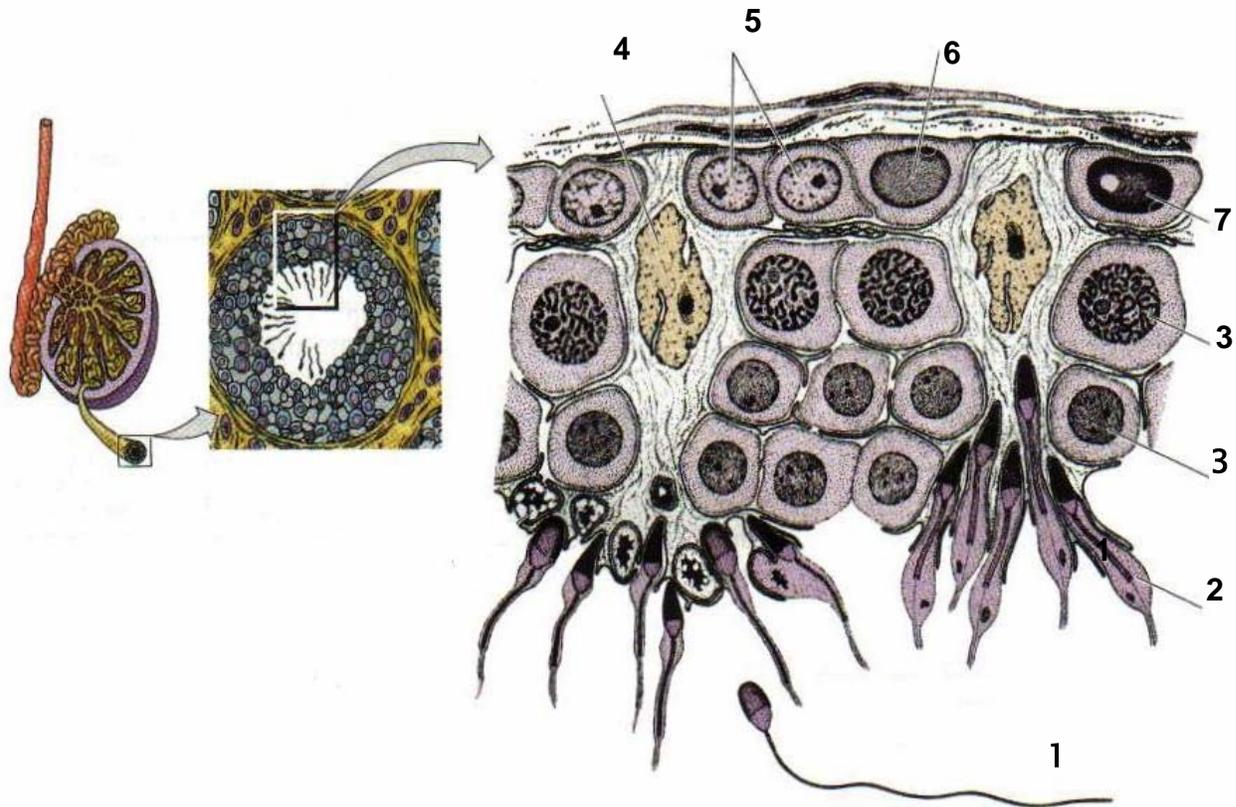


Figura 2. Esquema de un túbulo seminífero y un corte en donde se muestra los diferentes tipos celulares presentes. 1). espermatozoides; 2). espermatides; 3). espermatocito secundario; 4). célula de Sertoli; 5). espermatogonia; 6). lamina basal; 7). espermatocito primario (Modificado de Gilbert, 2003).

Las células de Sertoli, durante el desarrollo prepuberal y en la etapa adulta tienen un papel nutritivo debido a que mantienen al epitelio germinal, así mismo llevan a cabo la función de fagocitosis de residuos de citoplasma, después de la transformación de la espermatide a espermatozoide. Así mismo, sintetizan diferentes proteínas y hormonas como son: la proteína unidora de los andrógenos (ABP), que se une a la testosterona, para que esta sea transportada hasta sus células blanco, las células germinales, en donde estimula su diferenciación y proliferación; activina e inhibina que modulan la secreción de FSH por la hipófisis; transferrina que transporta el hierro a las células germinales (Robertson y col, 1993).

Las células mioideas, además de ser responsables de la función contráctil del túbulo, que ayuda al transporte de los espermatozoides no móviles hasta la red testicular, interviene en la regulación paracrina del testículo (Bellido, 1999), ya que producen un factor no mitogénico (P-Mod-S) el cual estimula la diferenciación de las células de Sertoli durante el periodo fetal (Palliniemi y col., 1993).

El tejido intersticial que representa aproximadamente el 15% del volumen testicular total, contiene vasos sanguíneos y linfáticos, inervación adrenérgica y serotoninérgica, y nervios que contienen neuropéptido Y, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo (Bergh y Damber, 1993). Como parte de este tejido también se encuentran las células de Leydig, fibroblastos, macrófagos y células cebadas (Bellido, 1999). Las células de Leydig forman

grupos, que están altamente irrigadas por capilares. Son células poligonales, con un núcleo redondo ubicado excéntricamente, en su citoplasma el retículo endoplásmico liso está muy desarrollado y la membrana interna de las mitocondrias forma estructuras tubulares (Geneser, 2000).

Los espermatozoides producidos en el túbulo seminífero pasan al epidídimo, conducto deferente y conducto eyaculador. El epidídimo es un tubo plegado que termina en el conducto deferente y se divide en cuatro segmentos; inicial, la cabeza, el cuerpo y la cola. En los tres primeros (inicial, cabeza y cuerpo) se produce la maduración de los espermatozoides, mientras que en el terminal o cola se almacenan los espermatozoides maduros hasta la eyaculación (Bellido, 1999).

El epidídimo se encuentra adyacente a cada uno de los testículos dentro del saco escrotal. Presenta una estructura tubular y contorneada (Yeung y col., 1991). Consta de una mucosa constituida por un epitelio pseudoestratificado con microvellosidades (Goppal, 1999). La mucosa del epidídimo absorbe un gran volumen de fluido proveniente de la rete de testis. También sintetiza y metaboliza esteroides y prostaglandinas y secretan diversas moléculas orgánicas hacia el lumen. Las secreciones de los distintos tipos celulares a lo largo del epidídimo es heterogénea. Esto propicia que existan diferentes microambientes a lo largo de la luz del órgano. Se considera que esto favorece la maduración de los espermatozoides (Jervis y Robaire, 2001). Cuando el espermatozoide entra al epidídimo tiene poca movilidad y su transporte en

este órgano se lleva a cabo por movimientos peristálticos. Estos movimientos musculares son activados por la inervación adrenérgica, colinérgica, peptidérgica; así como por las angiotensinas, vasopresina y oxitocina (Cooper, 1999).

Otra de las características que adquiere el espermatozoide en su paso por el epidídimo es la maduración. Este proceso se refiere a el cambio en la capacidad funcional que incluye el movimiento de gotas citoplásmicas del cuello a la parte final de la pieza media, la oxidación de los disulfuros intracelulares y alteraciones en los lípidos de la membrana del espermatozoide y en muchas especies un remodelamiento en la forma acrosomal. Entre las proteínas involucradas en la maduración de los espermatozoides se encuentran GPX5, GGT, inmovilina, SGP2 y PBP que se sintetizan en la pieza inicial y en la región media se secreta 2D6, p34h β -NGF, que ayudan a la maduración del espermatozoide en la rata y en el ratón (Cooper, 1999).

Así mismo, durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo, los grupos tiol (-SH) de las protaminas son progresivamente oxidados, formando puentes disulfuro inter e intraprotaminas (Calvin y Bedford, 1971).

Desarrollo peripuberal de la rata macho

La pubertad se define como la etapa biológica entre la inmadurez y la madurez sexual, en la cual ocurren una serie de cambios neuroendocrinos y fenotípicos con los cuales se da el inicio de la actividad reproductiva (Ramaley, 1979). Con base en parámetros morfológicos y fisiológicos, el desarrollo sexual en la rata macho se divide para su estudio en cuatro fases (Ojeda y Urbanski, 1994): neonatal, infantil, juvenil y peripuberal.

Etapa neonatal

Este periodo comprende del día 1 al 7 de vida. En esta etapa la concentración de hormona luteinizante (LH) en el plasma es de un 50% de la concentración del animal adulto, mientras que la concentración de hormona folículo estimulante (FSH) es baja (Adams y Steiner, 1988; Ojeda y Urbanski, 1994). La testosterona, actúa en las glándulas accesorias del aparato reproductor para mantener su estructura y parte de ese andrógeno es aromatizado a estradiol en el hipotálamo, en donde estimula la masculinización de los centros hipotalámicos que regulan la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Odell, 1990).

Etapas infantil

Esta comprende del día 8 al día 21, alrededor del día 15 la concentración de LH disminuye, el androstenediol es el andrógeno predominante y a partir del día 10 la concentración de FSH aumenta en relación a la etapa neonatal. En el día 21 se observan espermatoцитos primarios en los tubulos seminíferos. En esta etapa el aumento en la concentración de FSH es necesaria para estimular la proliferación de las células de Sertoli, que al inicio de la pubertad y durante la etapa adulta le proporcionan a las células germinales los elementos necesarios para su proliferación y diferenciación (Adams y Steiner, 1988; Ojeda y Urbanski, 1994).

Etapas Juvenil

Este periodo comprende del día 21 al día 35. Al inicio de este periodo el principal andrógeno secretado por el testículo es el androstenediol. En el día 30 se incrementan las concentraciones de testosterona y de dihidrotestosterona, mientras el androstenediol disminuye. En comparación con las etapas previas, la concentración de prolactina se incrementa alrededor del día 25, el aumento en la concentración de esta hormona se correlaciona con el aumento en el crecimiento y desarrollo del testículo, vesícula seminal y próstata. Durante esta etapa la concentración de FSH es mayor que en las otras etapas del desarrollo prepuberal. Al parecer el incremento en la secreción de esta gonadotropina es necesario para el inicio de la

espermatogénesis y la formación de los receptores a LH en las células de Leydig, este evento se refleja en el aumento en la producción de testosterona. En el día 30 también se incrementa la expresión de los receptores a la GnRH en la hipófisis (Adams y Steiner, 1988; Ojeda y Urbanski, 1994).

Etapas peripuberal

Comprende del día 36 al 55 ó 60. Alrededor del día 40 la concentración de FSH empieza a disminuir y aproximadamente en el día 50 se presenta un segundo incremento en la concentración de prolactina. En el día 45 los primeros espermatozoides se ven en el lumen de los túbulos seminíferos y 13 ó 14 días después se encuentran en conductos deferentes. En esta etapa la testosterona es el principal andrógeno secretado por el testículo (Adams y Steiner, 1988; Ojeda y Urbanski., 1994).

Espermatogénesis

La espermatogénesis, es la secuencia de acontecimientos citológicos mediante los cuales las células germinales inmaduras o espermatogonias se transforman en espermatozoides (Figura 3). Este proceso inicia en la pubertad y se mantiene durante toda la vida, y disminuye durante la senectud. La espermatogénesis es un proceso continuo que se divide en tres fases. En la primera, la proliferación por mitosis de las espermatogonias tiene un doble fin, producir espermatoцитos primarios y mantener el número de

espermatogonias. En la segunda fase los espermatocitos primarios entran en meiosis, durante la cual se producen dos divisiones celulares como resultado de la primera división meiótica los espermatocitos primarios se transforman en secundarios. En la segunda división meiótica los espermatocitos secundarios dan origen a las espermatides redondas cuyo número de cromosomas es haploide (Bellido, 1999; Sharpe, 1994; Weinbauer y Nieschlag, 1993).

En la tercera fase también llamada espermiogénesis no se producen divisiones, se presenta una serie de cambios nucleares y citoplasmáticos que conducen a la transformación de la espermatide en un espermatozoide. Estos cambios consisten en la condensación del material genético en el núcleo, formación del acrosoma por fusión de vesículas de complejo de Golgi, desarrollo del flagelo. Entre el flagelo y la cabeza se forma la pieza media, donde se organizan las mitocondrias. También se pierde el citoplasma, que se queda como cuerpo residual en los túbulos y son fagocitados por las células de Sertoli (Bellido, 1999).

Una vez formado el espermatozoide, viaja al epidídimo para madurar estructural y funcionalmente, este proceso es conocido como capacitación. Las células epiteliales de este órgano fagocitan cualquier corpúsculo residual no eliminado por las células de Sertoli. También secreta un líquido seminal, que en su mayoría es reabsorbido en la región proximal del epidídimo. Durante el paso de los espermatozoides en este componente del aparato reproductor, los

gametos adquieren movilidad y la capacidad para fertilizar al óvulo, esta maduración también depende de los andrógenos (Geneser, 2000).

La organización de los diferentes tipos celulares que comprenden la espermatogénesis en los túbulos seminíferos se le conoce como ciclo del epitelio seminífero (Figura 4). Este para su estudio se ha sido dividido en catorce etapas o asociaciones, que se identifican con números romanos (I hasta el XIV). A cada etapa o asociación se le clasifica tomando en cuenta la estructura y morfología del núcleo de la célula germinal. En las etapas I a la VIII se identifican espermatogonias, espermatoцитos, espermátides redondas y espermatozoides. En las etapas IX a la XIV se observan espermatoцитos y espermátides alargadas en diferentes estadios de desarrollo.

Esteroidogénesis

La esteroidogénesis se lleva a cabo en las células de Leydig, las que sintetizan y liberan varias hormonas esteroides principalmente los andrógenos. Estas hormonas se sintetizan a partir del colesterol. Las células de Leydig, aunque sintetizan colesterol a partir de acetilCoA, lo obtienen fundamentalmente del plasma. Otra fuente son las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales se introducen en la célula por endocitosis mediada por receptor. El colesterol independientemente de su origen se almacena en forma de ésteres de colesterol. El primer paso en la síntesis de las hormonas esteroides es la transformación del colesterol en pregnenolona bajo la acción

de la enzima de escisión de cadena lateral citocromo (P-450_{scc}) (Graner, 1988; Tresguerres, 2003).

En el transporte desde la cara externa de la membrana de la mitocondria hasta la interna, donde se realiza la transformación del colesterol a pregnenolona, intervienen los fosfolípidos de membrana y un péptido activador de la esteroidogénesis. La pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa al retículo endoplasmático liso, donde se completa la esteroidogénesis (Tresguerres, 2003).

Dos rutas metabólicas conducen a la síntesis de testosterona en el testículo, una a partir de 17-hidroxi-pregnenolona, conocida como la ruta $\Delta 5$ y otra a partir de 17-hidroxi-progesterona o $\Delta 4$; los esteroides intermedios de la ruta $\Delta 5$ pueden convertirse en $\Delta 4$ (figura 5). La importancia relativa de estas dos rutas varia según la especie; en el testículo humano la más importante es la $\Delta 5$, mientras que en los roedores es la $\Delta 4$ (Tresguerres, 2003).

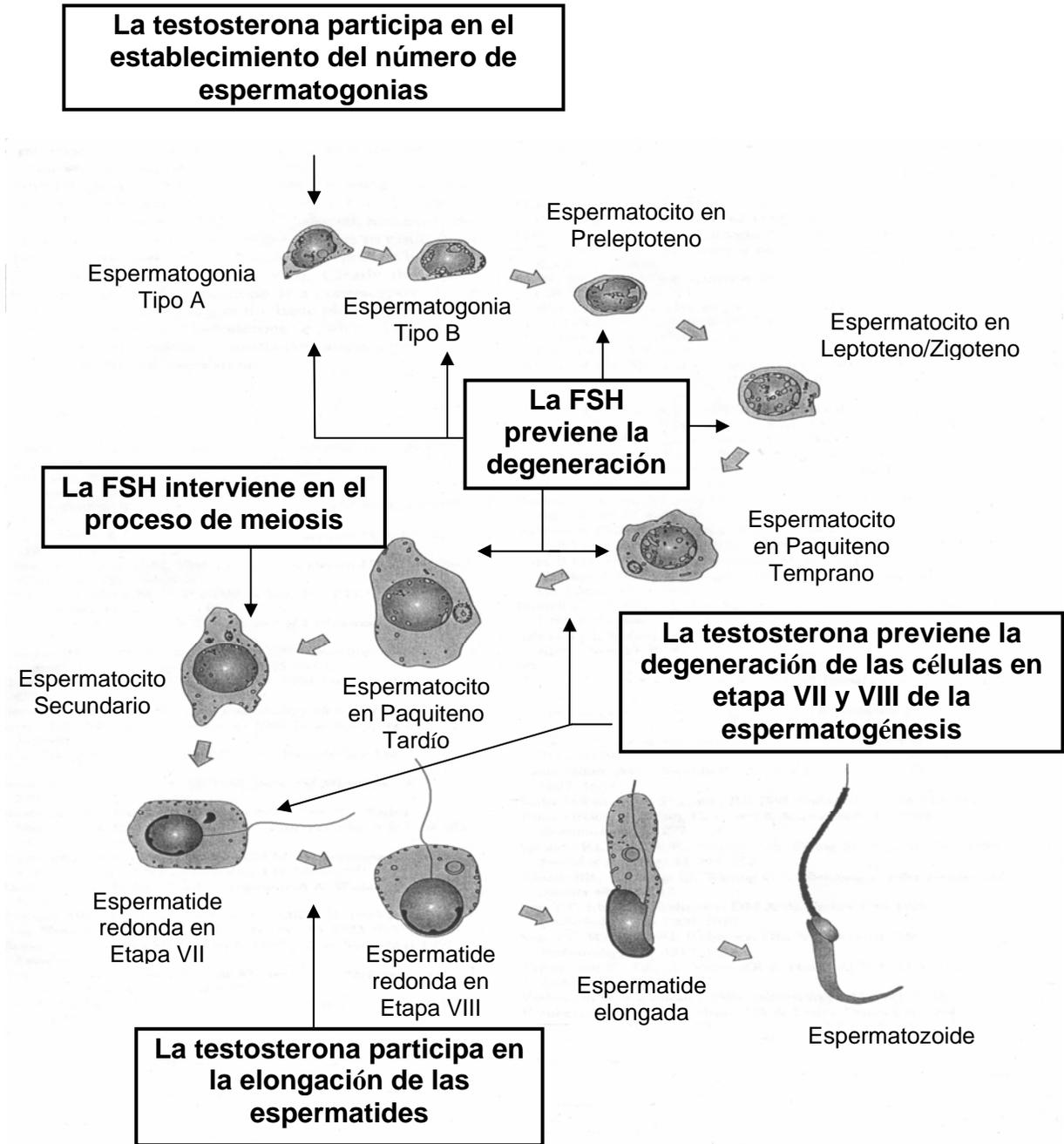


Figura 3. Efecto de la testosterona y de la hormona estimulante del folículo (FSH) en el proceso de la espermatogénesis en la rata adulta (Modificado de McLachlan y col., 1996).

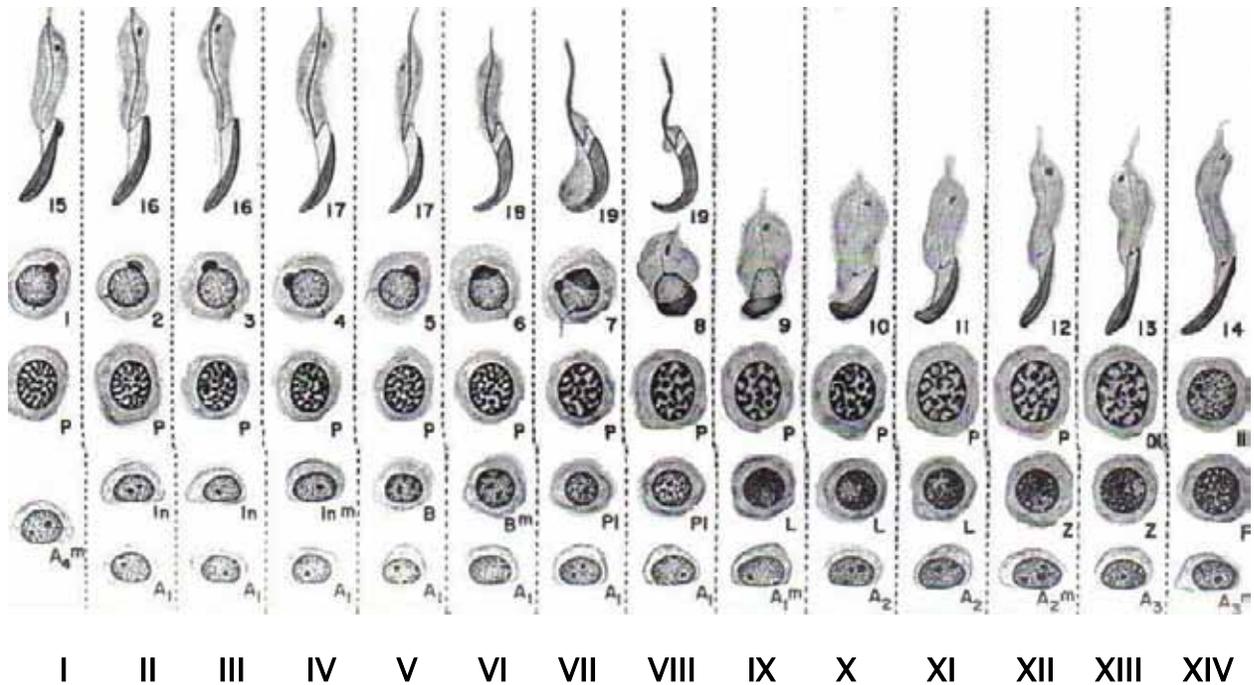


Figura 4. Esquema representativo del ciclo del epitelio seminífero donde se observan las etapas (I a la XIV) en las que se divide el proceso de la espermatogénesis en la rata macho (Tomado de Kretser y Kerr, 1994).

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

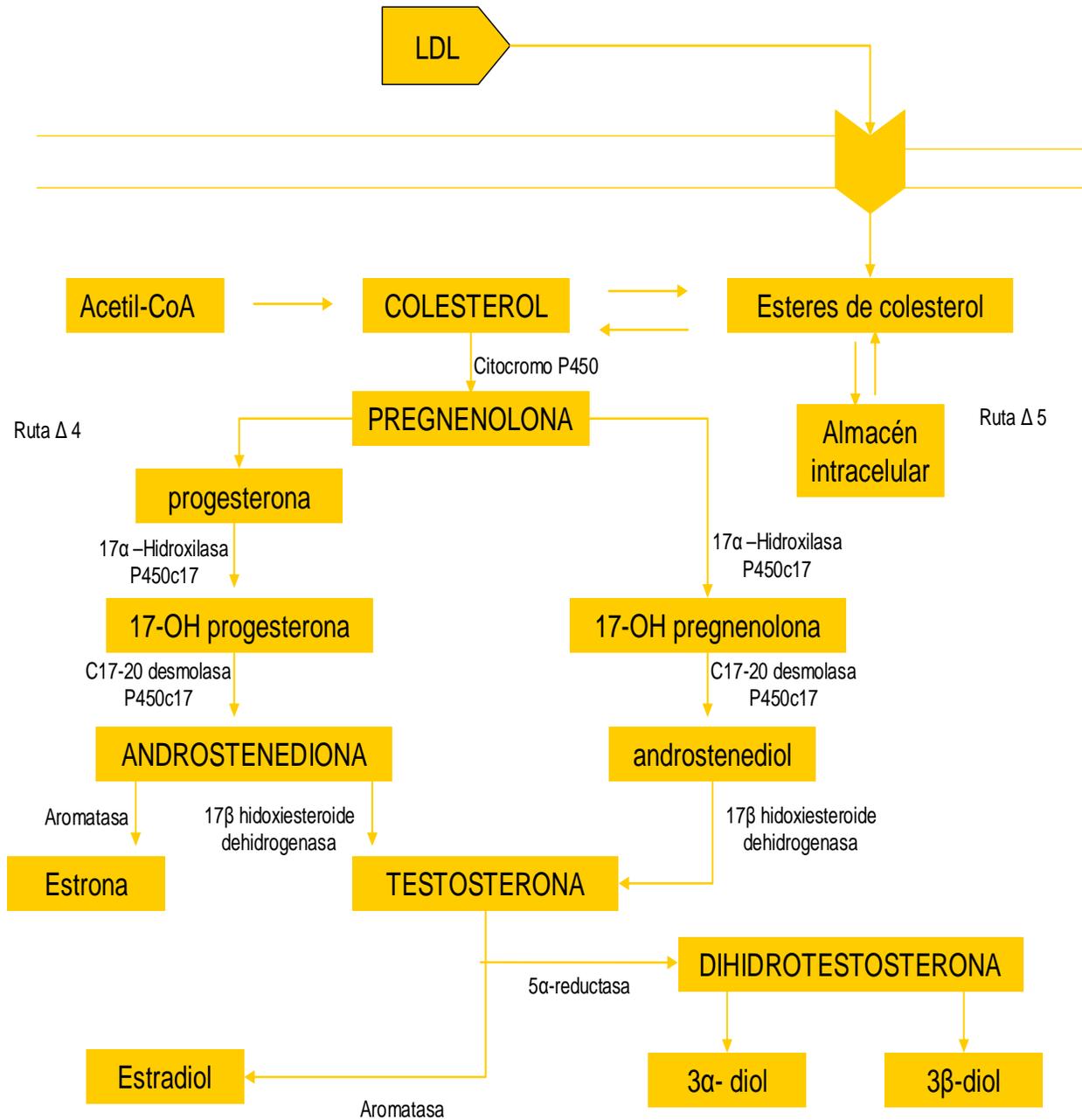


Figura 5. Esquema representativo de la ruta de síntesis de testosterona a partir del colesterol (Tomado de Tresguerres, 2003).

Regulación Hormonal de las Funciones del Testículo

Las funciones del testículo son reguladas por las gonadotropinas (FSH y LH), las aminas biogénicas (noradrenalina, adrenalina y serotonina); por algunos factores de crecimiento como son: el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento transformante ($TGF\alpha$ y $TGF\beta$), factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I); y por los propios andrógenos (Holdcraf y Brawn, 2004; Robertson y col., 1993). Existen evidencias que muestran que el papel de las gonadotropinas es mantener el funcionamiento de las células somáticas (células de Sertoli y de Leydig), mientras que el de los andrógenos, principalmente la testosterona, es estimular la transformación de la espermatide a espermatozoide (Holdcraf y Brawn, 2004).

La FSH actúa sobre células de Sertoli y estimula la producción de los diferentes factores de crecimiento que son esenciales para la multiplicación de las células germinales y su transformación a espermatozoides (Curtis y Barnes, 1996). Los receptores para esta gonadotropina se encuentran localizados fundamentalmente en la membrana de las células de Sertoli y también en los macrófagos que se ubican en el intersticio testicular. En la célula de Sertoli, la FSH induce la expresión de sus receptores. Esta hormona junto con las tiroideas son factores esenciales en la multiplicación de este tipo celular durante la vida fetal y neonatal de la rata (Huhtaniemi y col., 1986; Nagy, 1972).

La FSH al interactuar con sus receptores de membrana en las células de Sertoli activa a la enzima adenilato ciclasa y como resultado estimula la producción del segundo mensajero el AMP cíclico y favorece el incremento del Ca^{2+} intracelular, lo que resulta en la activación del sistema de aromatasa, que transforma a la testosterona en estradiol. También actúa sobre el metabolismo energético y la división de estas células. La FSH es necesaria para el inicio de la espermatogénesis en la pubertad, pero una vez que este proceso ha sido establecido puede mantenerse por la acción de la testosterona. Debido a que las células germinales no poseen receptores a FSH, los efectos de esta hormona son mediados por las células de Sertoli (Bellido, 1999; Sharpe, 1994; Tresguerres, 2003).

En el testículo de las ratas inmaduras la FSH es un factor importante en el inicio de las divisiones de las células germinales, así mismo existen estudios que muestran que la FSH participa en las divisiones meióticas predominantemente de espermatocitos primarios a espermátides (Weinbauer y Nieschlag, 1993). Además cuando a ratas hipofisectomizadas se les administra FSH, se mantiene la espermatogénesis sólo de manera cualitativa (Bartlett y col., 1989, citado en Weinbauer y Nieschlag, 1993).

Mientras que, cuando ratas macho de 20 días de edad son tratadas diariamente durante 14 días con un antisuero a FSH, se observa la disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos, los cuales presentan la reducción de

un 65% del número de espermatoцитos en paquiteno y de un 33% en el número de espermátides (Madhwa Raj y Martín, 1976).

La LH regula la producción de andrógenos en las células de Leydig. Los principales efectos de esta hormona sobre la esteroidogénesis consisten en aumentar la disponibilidad de colesterol y acelerar su transformación a pregnenolona (Tresguerres, 2003). Madhwa Raj y Martin, (1976) mostraron que cuando se administra diariamente un antisuero a LH a ratas macho a partir de los 20 días de edad y se sacrifican 14 días después, se altera la morfología de las células de Leydig, disminuye el peso del testículo y la concentración de testosterona. Con base en estos resultados los autores sugieren que la LH es un factor importante en el mantenimiento y funcionamiento de las células de Leydig y en la producción de testosterona.

En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha mostrado la acción de la LH en la regulación de la esteroidogénesis por las células de Leydig. Huhtaniemi y col., (1984) mostraron que la administración de un antisuero a GnRH induce la disminución en la secreción de gonadotropinas, esto se acompaña de la disminución en la secreción de testosterona, lo cual llevó a los autores a sugerir que la falta de GnRH suprime la capacidad de estas células para producir testosterona. Mientras que, cuando células de Leydig se mantienen en cultivo y se administra al medio LH o gonadotropina coriónica humana (hCG), se incrementa la producción de testosterona (Sharpe, 1994).

La testosterona es un regulador paracrino en el testículo y de forma indirecta, por intermedio de las células de Sertoli, establece, mantiene y restaura la espermatogénesis. Así mismo, estimula el desarrollo y maduración de los conductos excretores y de las estructuras accesorias del aparato reproductor. También participa en la modulación de la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y la prolactina (Bellido,1999).

Ahmad y col., (1975), mostraron que cuando a ratas hipofisectomizadas de 90 días de edad se les administra diariamente 1mg de testosterona o de dihidroxitestosterona durante 4 semanas, se restaura y mantiene la espermatogénesis, lo cual llevó a los autores sugerir que la testosterona es un factor importante en el mantenimiento de la espermatogénesis. Por otra parte, cuando a ratas macho adultas se les trata con un antagonista de la GnRH durante 30 días, al final de este periodo se observa una disminución en la concentración de LH, FSH y testosterona. Estas modificaciones se acompañan de una disminución en el número de células espermatogénicas en los túbulos seminíferos. Cuando a las ratas tratadas con el antagonista de la GnRH se les implantan cápsulas de testosterona se observa una recuperación en la concentración de FSH y el número de células espermatogénicas. Con estas evidencias los autores concluyen que la testosterona es un factor importante en el mantenimiento de la espermatogénesis (Rea y col., 1986).

Durante el desarrollo de la espermatogénesis algunas células germinales son vulnerables a la degeneración. En relación a esto Russell y Clermont

(1977), mostraron que cuando a ratas adultas, se realiza la hipofisectomia aumenta la incidencia de degeneración de espermatocitos en paquiteno y espermatides de las etapas VII o VIII del ciclo del epitelio seminífero. Este comportamiento es revertido con la administración de LH y/o la combinación de LH más FSH.

Otro estudio en el que se muestra la participación de la FSH y la testosterona en el proceso de la espermatogénesis es el llevado a cabo por Bartlett y col. (1989). Ellos observaron que después de realizar una hipofisectomía en la rata macho adulta disminuye el número de espermatocitos en paquiteno y espermatides redondas, y no se observan cambios en el número de espermatides elongadas. Cuando se administra testosterona se mantiene la formación de espermatides elongadas. Así mismo, cuando los animales son tratados con FSH se incrementó el número de espermatides redondas y espermatocitos en paquiteno. También la administración de ambas hormonas mantiene la espermatogénesis. Estos resultados permiten postular a los autores que la FSH es un factor importante en el mantenimiento de la espermatogénesis en ratas macho adultas.

Eje Hipotálamo–Hipófisis

La secreción de las gonadotropinas es regulada por el hipotálamo vía el decapeptido conocido como GnRH. Esta hormona es secretada por neuronas especializadas que se localizan en diferentes núcleos hipotalámicos, como son

el área preóptica hipotalámica anterior, en el hipotálamo medio basal y en los núcleos ventromedial y arcuato (Silverman y col., 1994). La GnRH es liberada en la eminencia media y llega hasta la adenohipófisis por la sangre que circula por el sistema portal-hipofisiario y estimula la síntesis de las gonadotropinas por los gonadotropos (Fink, 1988).

Existen evidencias experimentales en las que se muestra que en el macho la síntesis y liberación de la GnRH, es regulada por diferentes neurotransmisores, entre los que se encuentran las catecolaminas, aminoácidos estimuladores, el ácido gama aminobutírico (GABA) y la serotonina entre otros (Crowley y Zemlan, 1981). Los somas de las neuronas productoras de estos neurotransmisores se localizan en el propio hipotálamo o en regiones extrahipotalámicas (Kordon y col., 1994). Además de estos sistemas de neurotransmisión, las hormonas esteroides modulan la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas al actuar directamente en la neurona que secreta a la GnRH o indirectamente sobre las neuronas que producen los sistemas de neurotransmisión, como las serotoninérgicas (Soghomonian y col., 1988).

Organización del Sistema Serotoninérgico

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una monoamina que se encuentra en la mayoría de las especies animales. En los mamíferos se ha identificado en el sistema nervioso central principalmente en el núcleo del

rafe, en el hipotálamo y en la glándula pineal. También esta presente en diferentes tejidos periféricos como las células cromafines de la mucosa gastrointestinal, la glándula pineal, el páncreas, el pulmón, el timo, la glándula tiroides, el tracto urogenital y el testículo (Frungieri y col. 1999; Takeuchi, 1988 y Tinajero y col., 1993).

La 5-HT se forma a partir del aminoácido triptofano, el cual es consumido en la dieta diaria. El paso inicial en la síntesis y metabolismo de esta amina es el transporte del triptofano de la sangre al cerebro. Las neuronas serotoninérgicas contienen la enzima L-triptofano-5-monooxigenasa, comúnmente llamada triptofanohidroxilasa (enzima limitante en la síntesis de este neurotransmisor) que convierte la serotonina en 5-hidroxitriptofano (5-HTP). El 5-HTP posteriormente por acción de una enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos se transforma en 5-HT. La serotonina es almacenada en vesículas de secreción y liberada a la hendidura sináptica y parte de esta serotonina es recapturada por las terminales nerviosas y por acción de la enzima monoaminoxidasa (MAO), es transformada al ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) principal metabolito de la serotonina (Frazer y Hensler, 1999; Shepherd, 1985) (Figura 6).

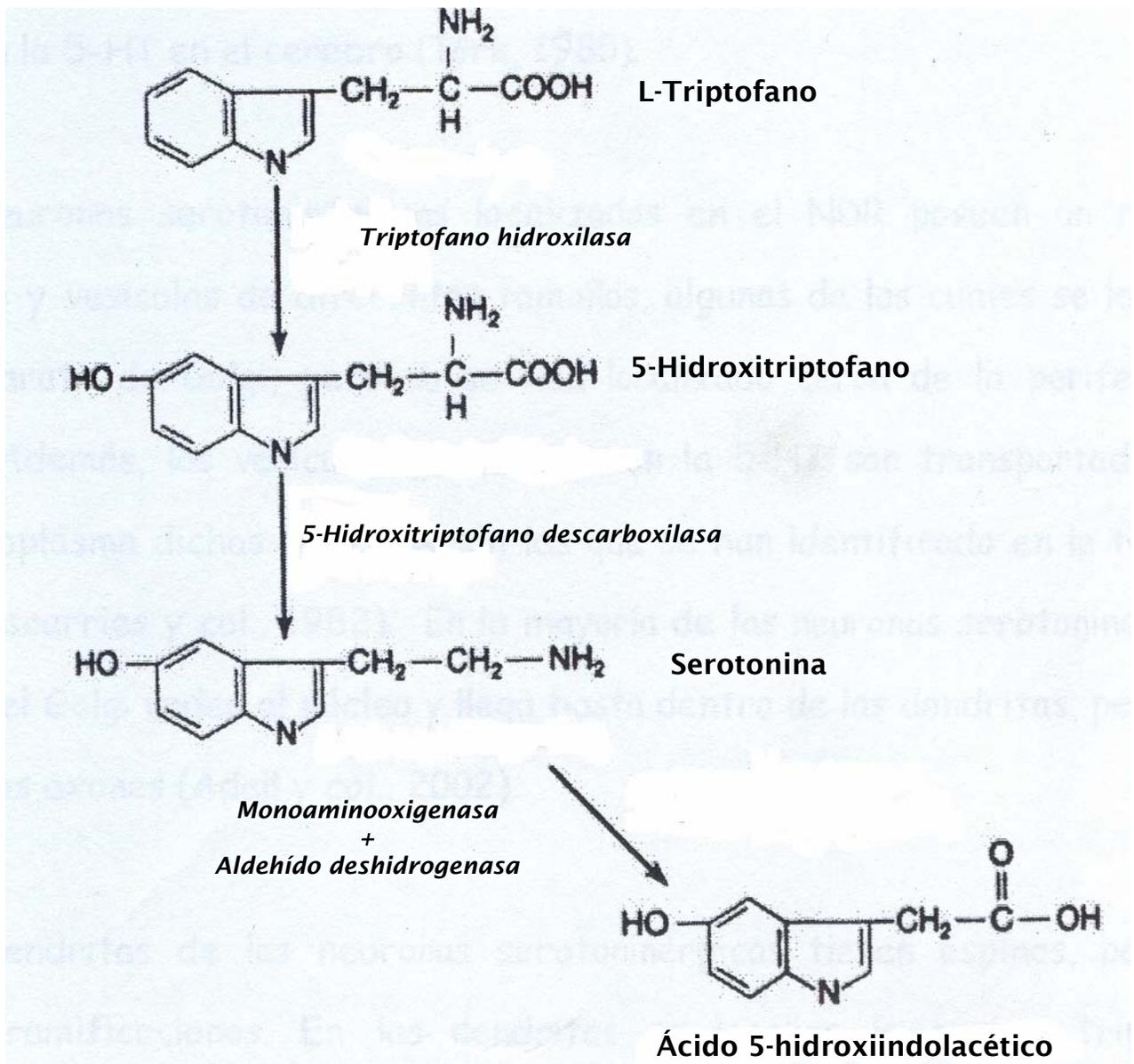


Figura 6. Ruta de biosíntesis de la serotonina (Tomado de Frazer y Hensler 1999).

Por medio de técnicas de histofluorescencia e inmunocitoquímica se han identificado en los diferentes núcleos hipotalámicos fibras noradrenérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas entre otras (Kordón y col., 1994; Takeuchi, 1988). Los somas de las neuronas que sintetizan 5-HT se localizan en el núcleo del rafé, que esta constituido de nueve paquetes celulares localizados en la parte anterior del mesencéfalo y se identifican con la letra B y un número (B1–B9) (Takeuchi, 1988). El núcleo del rafé se divide en dorsal, medial y del puente. Los núcleos dorsal y medial proyectan fibras serotoninérgicas que inervan diferentes regiones del encéfalo, entre estos los núcleos hipotalámicos. El rafé del puente envía su inervación hacia cerebelo, médula oblonga y espinal (Dahlstrom y Fuxe, 1964). También se ha sugerido que parte de la 5-HT hipotalámica proviene de neuronas cuyos somas se localizan en el núcleo ventromedial (Montagne y Calas, 1988).

Inicialmente se consideraba que el núcleo dorsal estaba conformado por somas exclusivamente serotoninérgicos, pero actualmente se sabe que del conjunto de células que conforman este núcleo, solo del 40 al 50 % de los somas son serotoninérgicos y el resto corresponde a neuronas dopaminérgicas, noradrenérgicas y gabaérgicas. El paquete celular B₇ es el mas grande y se localiza en la región mas anterior del mesencéfalo, junto a este se encuentra el paquete B₆, estos dos grupos constituyen el núcleo dorsal del rafé. El paquete B₈, también es grande y constituye el núcleo medial del rafé y se ubica ventralmente (Frazer y Hensler, 1999) (Figura 7).

La 5-HT participa en la modulación de la secreción de algunas hormonas, en la regulación de la temperatura corporal, del sueño, del apetito; también participa en la regulación del funcionamiento del sistema nervioso central, cardiovascular y en el sistema gastrointestinal (Crowley y Zemlan, 1981).

Serotonina y Secreción de Gonadotropinas

Se sugiere que la 5-HT participa en la modulación de la secreción de las gonadotropinas debido a que en la eminencia media existe contacto axo-axonal entre las terminales de las neuronas que producen la GnRH y las que secretan la serotonina (Takeuchi, 1988). Así mismo, por medio de técnicas de inmunocitoquímica se ha demostrado que en los diferentes núcleos hipotalámicos existe 5-HT y que en el área preóptica existe comunicación entre las terminales nerviosas de las neuronas productoras de la GnRH y las neuronas productoras de 5-HT (Jennes y col., 1985).

Por otra parte se ha observado que cuando ratas hembras prepúberes de 16 ó 18 días son tratadas con 5-hidroxitriptofano, se estimula la secreción de LH y no se modifica la de FSH (Moguilevsky y col., 1987). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que este mismo tratamiento en machos castrados, incrementa la producción de FSH y no modifica la de LH (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1989; Justo y col., 1989). Estos resultados nos llevan a pensar que el sistema serotoninérgico participa de manera diferencial

en la hembra y en el macho, en la modulación de la secreción de las gonadotropinas durante el desarrollo del animal prepúber.

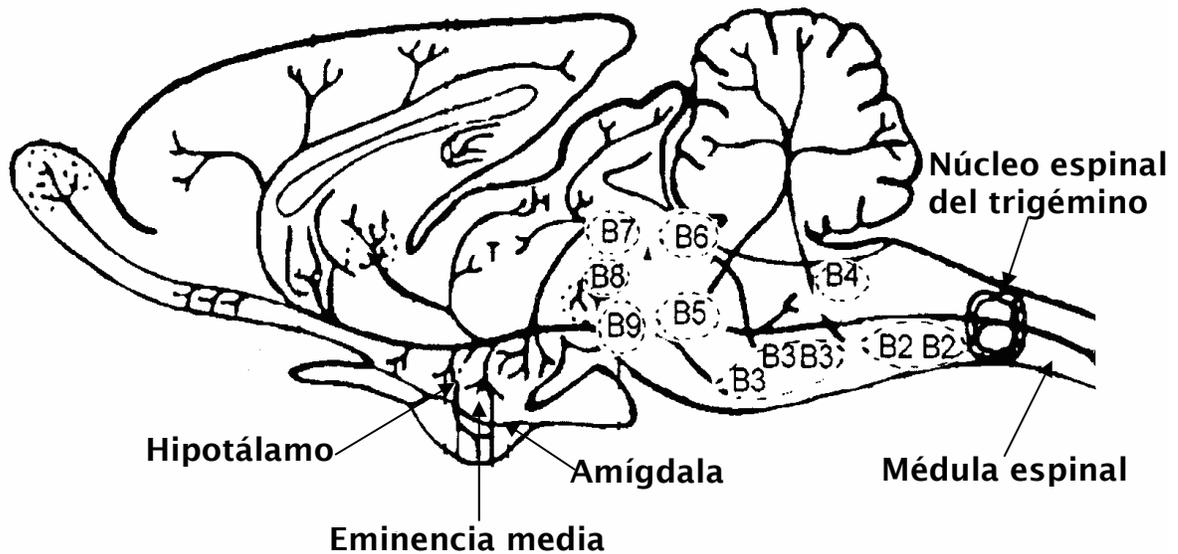


Figura 7. Corte sagital del cerebro de la ratona donde se representa la localización de los cuerpos celulares serotoninérgicos (B2 al B9) y sus proyecciones en el cerebro (Modificado de Frazer y Hensler, 1999).

El bloqueo del sistema serotoninérgico inducido por la administración de p-clorofenilalanina (un inhibidor de la síntesis de 5-HT) (PCPA) a ratas macho de 30 ó 34 días de edad y sacrificadas a los 60 días, no modifica la concentración de testosterona. Mientras que la administración de PCPA en animales de 40 ó 44 días disminuye la concentración de testosterona, el peso testicular y de las vesículas seminales así como el número de espermatozoides en el epidídimo. Sin embargo cuando se administra 5-hidroxitriptofano a ratas

macho de 30, 32, 34, 36 ó 38 días de edad, y sacrificados a los 60 días de edad, se incrementa la concentración de testosterona y el peso de la próstata y vesícula seminal. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que el sistema serotoninérgico estimula el desarrollo sexual de la rata macho durante el periodo prepuberal (Shishkina y Dygalo., 2000).

En la rata y el ratón macho adulto, la administración intraventricular de 5-HT disminuye o inhibe la secreción de la FSH y LH (Van de Kar y col., 1985). Estos resultados permiten pensar que la inervación serotoninérgica ejerce una influencia estimuladora en la secreción de la FSH y LH. Así mismo, cuando a ratas macho prepúberes se les inyecta intraventricularmente 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT), fármaco que provoca la degeneración selectiva de las terminales nerviosas serotoninérgicas, se observa que una semana después de la microinyección, la concentración de la FSH en sangre disminuye así como la producción de espermatozoides. Estos resultados permitieron sugerir que en la rata macho la 5-HT modula de manera inhibitoria la producción de la FSH y como consecuencia la espermatogénesis (Collu y col., 1974). Sin embargo otros autores sugieren que la 5-HT puede jugar un papel estimulante en la secreción de la FSH (Shishkina y Borodin, 1989).

Además de la acción de la 5-HT en los centros que regulan la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, existen evidencias de que esta amina puede actuar directamente en el testículo y participar en la modulación de las funciones de este órgano (Collin y col. 1996; Tinajero y col., 1993).

Se ha mostrado que la 5-HT es secretada por células de Leydig en cultivo, y que estas células poseen la maquinaria enzimática para la síntesis *de novo* de esta amina. También está presente en la cápsula testicular y en el fluido intersticial. Al parecer la 5-HT en las células de Leydig participa en la modulación la producción de testosterona (Tinajero y col., 1993). Así mismo, modifica el flujo sanguíneo en la gónada (Collin y col., 1996). Con base en estas evidencias es posible sugerir que la serotonina participa en la modulación de las funciones del testículo al actuar directamente en la gónada.

La administración de 5,7-dihidroxitriptamina (fármaco que provoca la degeneración de los somas serotoninérgicos) en el área preóptica media de ratas macho adultas y sacrificadas 15 días después de la administración, incrementa las concentraciones de LH y testosterona sin modificar las concentraciones de FSH, estas evidencias permiten sugerir que la inervación serotoninérgica que se origina en el área preóptica media participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de LH en ratas macho adultas (Mas y col. 1984).

Estudios llevados a cabo por Van de Kar y col. (1978) mostraron que las concentraciones de 5-HT y LH se incrementan después de la castración de la rata macho adulta y que estos efectos son revertidos después de la administración de propionato de testosterona, estas evidencias les

permitieron sugerir que la testosterona modula mediante un mecanismo de retroalimentación la secreción de LH en ratas macho adultas. Y estudios llevados a cabo por Tinajero y col. (1993) mostraron que la LH estimula la liberación de 5-HT por parte de las células de Leydig vía adenosin monofosfato cíclico (AMPC).

Aragón y col., (2005), mostraron que la administración sistémica de p-clorofenilalanina (p-CA) a ratas macho de 30 días de edad y sacrificadas a los 45 ó 65 días de edad no modifica la concentración de LH y hormonas esteroides, mientras que la secreción de FSH se incrementó, y este aumento en la secreción de FSH se acompañó de la disminución del peso del testículo, en el número de espermatozoides y del porcentaje de espermatozoides viables y móviles, con base en esto los autores a sugieren que el sistema serotoninérgico participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el proceso de espermatogénesis, posiblemente regulando de manera inhibitoria la secreción de FSH.

En otros estudios se ha mostrado que la inervación serotoninérgica que se origina en los núcleos dorsal del rafe participa en la regulación de la secreción de gonadotropinas utilizando como modelo de estudio a la rata hembra.

Monroy y col., (2003), mostraron que la lesión química del núcleo dorsal del raquí, inducida por la administraci3n de 10 µL de 5,6-DHT a ratas hembra de 30 días de edad, provoca una disminuci3n en la secreci3n de FSH, sin modificarse la secreci3n de LH, lo cual permiti3 sugeri que la inervaci3n serotoninérgica del núcleo dorsal del raquí juega un papel importante en la regulaci3n de la secreci3n de FSH.

Propiedades Químicas del 5,6-Dihidroxitriptamina

La 5,6-DHT (Figura 8) desde el punto de vista químico es un fármaco muy utilizado en estudios neurol3gicos por sus propiedades neurodegenerativas; ya que esta neurotoxina destruye de manera selectiva a las neuronas serotoninérgicas (Satendra y Dryhurst, 1990).

Existen evidencias que muestran que la capacidad de la 5,6-DHT para inducir la degeneraci3n neural esta relacionada a una propiedad química de autooxidaci3n en el sistema nervioso central (Satendra y Dryhurst, 1990).

La reacci3n de oxidaci3n de la 5,6-DHT es iniciada por acci3n directa de oxígeno molecular (O₂) que tiene como resultado la formaci3n de una quinona y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Los productos de autooxidaci3n de la 5,6-DHT son especies reactivas de oxígeno reducido, tales como el H₂O₂, O₂ y OH los cuales atacan las proteínas y lípidos de la membrana neuronal, que conducen a la muerte celular por apoptosis (Satendra Dryhurst, 1991).

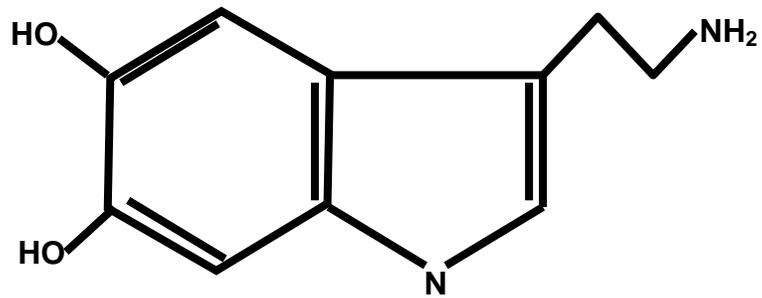


Figura 8. Estructura química de la 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT). (Tomada de Satendra y col., 1990).

JUSTIFICACIÓN

Con base en las evidencias antes mencionadas es posible pensar que en la rata macho la 5-HT participa en la modulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas. Sin embargo, la información reportada hasta el momento es contradictoria. Además, hasta el momento existe poca información sobre las vías serotoninérgicas que llegan al hipotálamo y que están vinculadas con la regulación de la secreción de las gonadotropinas y las funciones del testículo.

Por lo anterior, en el presente trabajo se estudió la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe, por medio de la lesión química inducida por la microinyección de la 5,6-dihidroxitriptamina, en las funciones del testículo (espermatogénesis y esteroidogénesis).

HIPÓTESIS

En la rata macho la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del raqué modula de manera estimulante la secreción de las gonadotropinas, por lo que la eliminación de esta inervación se traducirá en la disminución de la secreción de las gonadotropinas, de la espermatogénesis y de la secreción de hormonas esteroides.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la lesión química de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del raqué, sobre los mecanismos neuroendocrinos que modulan las funciones del testículo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del raqué en la rata macho de 30 días, en la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo.
2. Evaluar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del raqué en la rata macho de 30 días, en la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo.
3. Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del raqué en la rata macho de 30 días, en la concentración de catecolaminas en el hipotálamo.
4. Estudiar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del raqué en la rata macho de 30 días, en la concentración de gonadotropinas.
5. Evaluar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del raqué en la rata macho de 30 días, en la concentración de progesterona, testosterona y 17β -estradiol en suero.
6. Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del raqué en la rata de 30 días, en el número de espermatozoides, viabilidad y movilidad.

MATERIALES Y MÉTODO

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

Los animales fueron asignados al azar en los siguientes grupos experimentales: animales sin tratamiento (grupo testigo absoluto); animales con microinyección de ácido ascórbico en el núcleo dorsal del rafé (grupo con vehículo); animales con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la microinyección de 5,6-DHT (grupo 5,6-DHT). Animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron por decapitación a los 45 ó 65 días de edad.

Procedimiento de Lesión

La lesión del núcleo dorsal del rafé se realizó entre las 10:00 y 11:30 horas. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (anestesal, Smith Kline Norden de México, México) (40 mg/Kg de p.c.) por vía intraperitoneal, cuando se requirió se realizó la anestesia complementaria con éter. Los animales se colocaron en un aparato estereotáxico, se realizó una incisión en piel, se perforó el cráneo con una fresa odontológica y se introdujo

una aguja de microinyección (29 x 13 mm), la que se encuentra conectada a una jeringa Hamilton y esta a su vez acoplada a una bomba de microdiálisis (MCA/100 Bioanalytical Systems, USA). Las coordenadas para la introducción de la aguja de microinyección hasta el núcleo dorsal del rafe se calcularon tomando como referencia el Atlas de Paxinos y Watson (1982). La lesión química del núcleo dorsal del rafe se realizó al inyectar 10µg de 5,6-DHT (Sigma Chemical Co., St Louis, MO EUA) disuelta en 2.5µL de ácido ascórbico. La velocidad de inyección del fármaco fue de 1µL/minuto. La microinyección del ácido ascórbico se realizó siguiendo la metodología antes mencionada.

Procedimiento de Autopsia

Los animales se sacrificaron por decapitación a los 45 ó 65 días de edad, entre las 12:00 y 13:00 horas. Se colectó la sangre del tronco, se dejó reposar durante 20 min. y se centrifugó a 3500 r.p.m durante 15 minutos, posteriormente se colectó el suero y se almacenó a -20° C para la cuantificación de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y 17β-estradiol) y de gonadotropinas (FSH y LH) por la técnica de radioinmunoanálisis. En el momento de la autopsia se disecaron y pesaron los testículos, epidídimo, próstata y vesícula seminal. El peso de los órganos se expresó en gramos (g).

Evaluación de la Espermatogénesis

En el momento de la autopsia de los animales de 65 días de edad se disecaron los conductos deferentes, los que se colocaron en tubos eppendorf con 500 μL de solución tirodes (Sigma Chemical Co., St Louis, MO EUA) a una temperatura de 37°C durante 15 minutos en baño maría, posteriormente se realizó una dilución 1:15 de esta solución espermática, una alícuota de 10 μL se colocó en la cámara de Neubauer y en 5 cuadrantes se realizó el conteo del número de espermatozoides, con ayuda de un microscopio óptico a 40X. El número de espermatozoides de los 5 cuadrantes se promedió y los resultados se expresaron como 1×10^6 células en 1 mL de líquido espermático siguiendo la metodología propuesta por Aragón y col. (2005).

Movilidad

Se tomaron 20 μL de la solución espermática y se colocaron en un portaobjetos. Se contó el número de espermatozoides que presentaron movimientos ondulantes de la cabeza y flagelo, así como aquellos que permanecieron inertes (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 al 0.4 % de azul tripano (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). De esta solución una alícuota de 10 µl se colocó en un portaobjetos. Las evaluaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio óptico. Se consideró un espermatozoide vivo aquel en el que la cabeza no presentó un color azul y un espermatozoide muerto aquel que presentó una cabeza con coloración azul. Se contaron 100 espermatozoides en total por animal. Los resultados se reportan como porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

Cuantificación de Serotonina

Al momento de la autopsia se extrajo el cerebro, se colocó en solución fisiológica fría, se congeló en nitrógeno líquido y se realizaron cortes coronales del cerebro para la disección del hipotálamo anterior, medio y posterior siguiendo como referencia las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982). Las muestras se almacenaron a -70 °C para la posterior cuantificación de 5-HT, del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), noradrenalina (NA) y del ácido 4-hidroxi 3-metoxifeniletenglicol (MHPG) por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) siguiendo la metodología descrita por Ayala y col. (1998). La concentración de estos neurotransmisores se expresó en ng/mg de tejido. Con los valores de estos neurotransmisores se calculó la

actividad de la neurona serotoninérgica siguiendo la relación propuesta por Shannon y col. (1986).

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

Para identificar la trayectoria de la aguja de microinyección y la zona de lesión, la región posterior del cerebro de cada animal se fijo en formaldehído (JT. Baker) al 10%. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 100 μm en un vibratomo y los cortes fueron teñidos por la técnica de violeta de cresilo (Sigma Chemical CO., St Louis, MO, EUA).

Cuantificación de Gonadotropinas y Hormonas Esteroides

La cuantificación de FSH y LH en suero se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo. Los anticuerpos que se emplearon fueron rFSH-¹²⁵I-rp2 y rLH-¹²⁵I-rp2 respectivamente. La concentración de ambas hormonas se expresó en ng/mL de suero. La cuantificación de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida (se utilizó un kit coat-A-Count (Diagnostic PRoducts, Los Ángeles, CA USA)). La concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/mL y la de 17 β -estradiol por pg/mL.

Análisis Estadístico de Resultados

Los resultados del peso de los órganos, concentración de hormonas, neurotransmisores, actividad de la neurona serotoninérgica y número de espermatozoides se analizaron por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. El porcentaje de espermatozoides móviles y viables se analizó por la prueba de Ji cuadrada. En todos los casos se consideraron significativas las diferencias, aquellas en las que la probabilidad fue mayor o igual a 0.05.

RESULTADOS

En la figura 9 se muestra unas fotomicrografías representativas de corte coronal de cerebro en donde se observa la trayectoria de la aguja de microinyección en los animales con microinyección del ácido ascórbico (VH) o la zona de lesión inducida por la administración de 5,6-DHT.

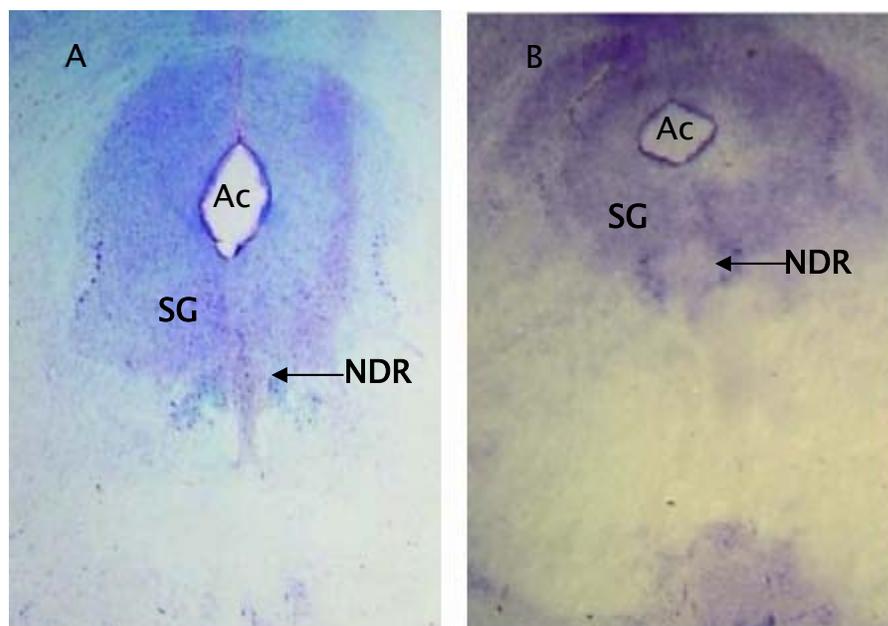


Figura 9. Fotomicrografía de corte coronal de cerebro de rata con microinyección de ácido ascórbico (A) o con 5,6-Dihidroxitriptamina (B) en el núcleo dorsal del raqué (NDR); SG, sustancia gris periacueductal; Ac, acueducto.

Concentración de Serotonina y 5-HIAA

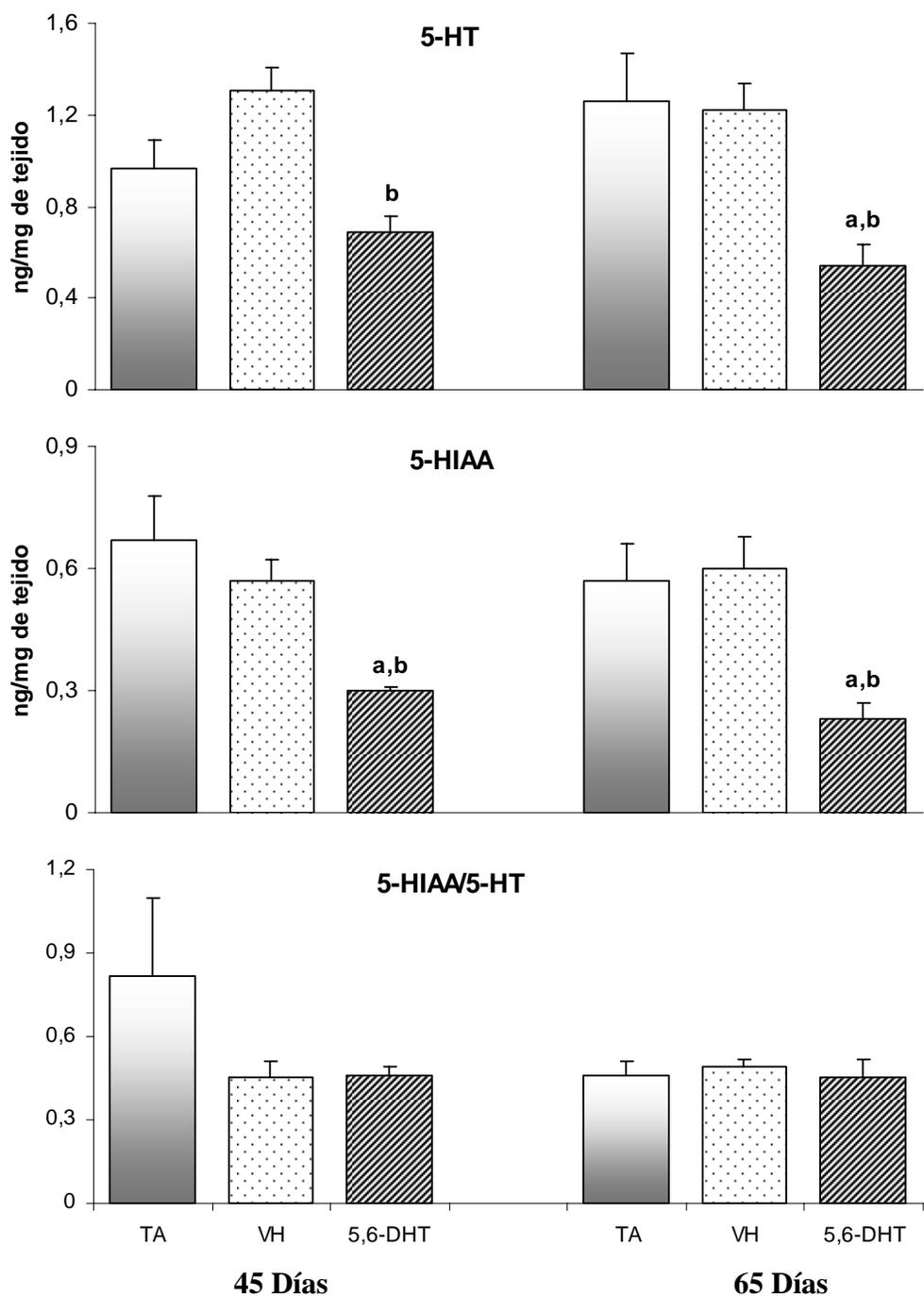
En comparación con el grupo de animales testigo absoluto o con microinyección de ácido ascórbico en el NDR, en los animales con lesión del

NDR, y sacrificados a los 45 ó 65 días, la concentración de 5-HT y de su metabolito (5-HIAA) disminuyó significativamente en hipotálamo anterior, medio y posterior (Figuras 10, 11 y 12) La relación 5-HT/5-HIAA no se modificó en las tres regiones hipotalámicas en ninguna de las edades estudiadas (Figuras 10, 11 y 12).

Concentración de Catecolaminas

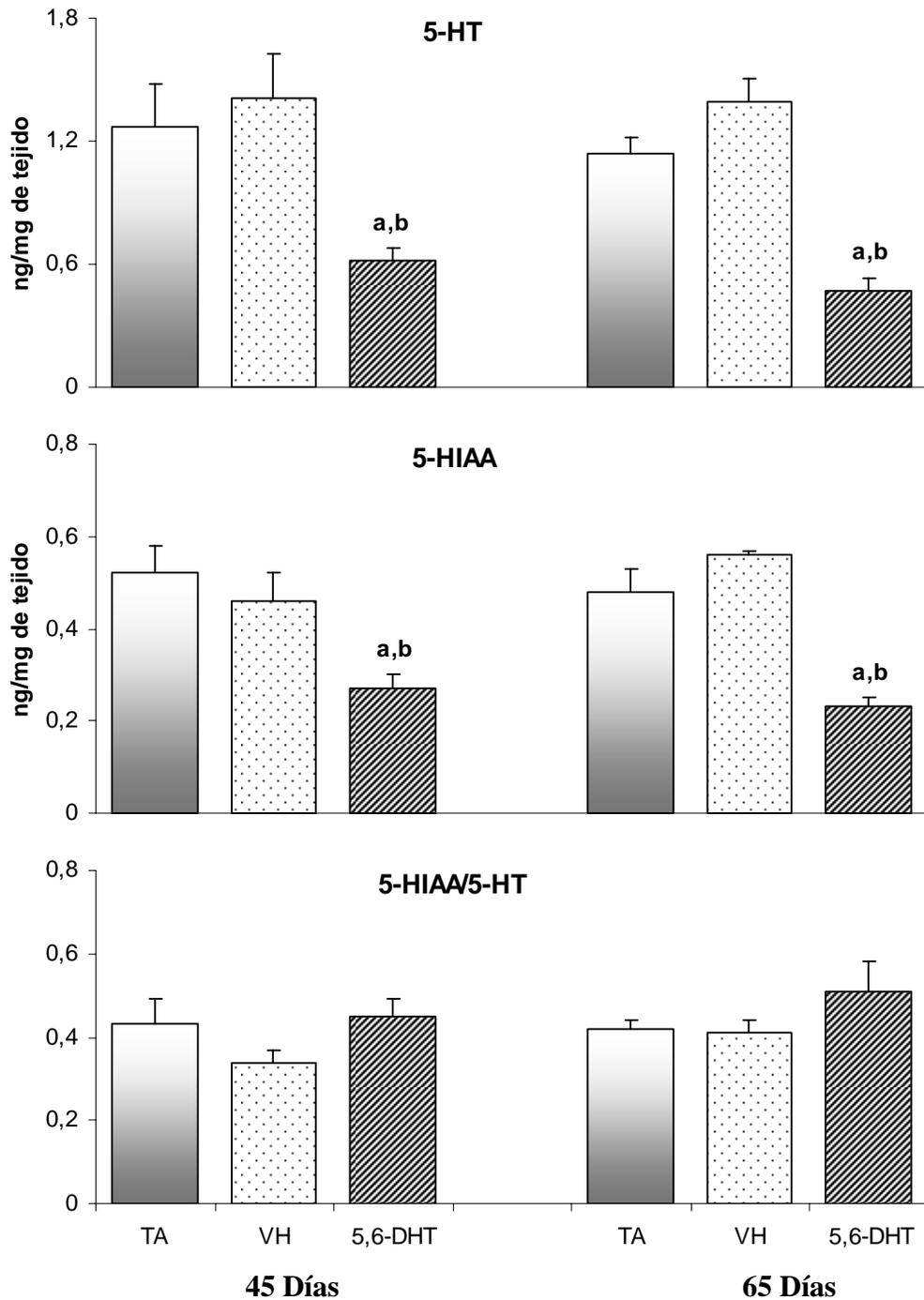
La concentración de DA y DOPAC en el hipotálamo anterior y medio de los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR, fue similar a lo observado en los animales tratados con el VH. Así mismo la relación DOPAC/DA en el hipotálamo anterior y medio de los animales con lesión del NDR no se modificó (Cuadro 1).

En el hipotálamo anterior y medio de los animales con lesión del NDR y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad no se observaron cambios significativos en la concentración de NA, MHPG y de la relación MHPG/NA en comparación con el grupo testigo o con VH (Cuadro 2).



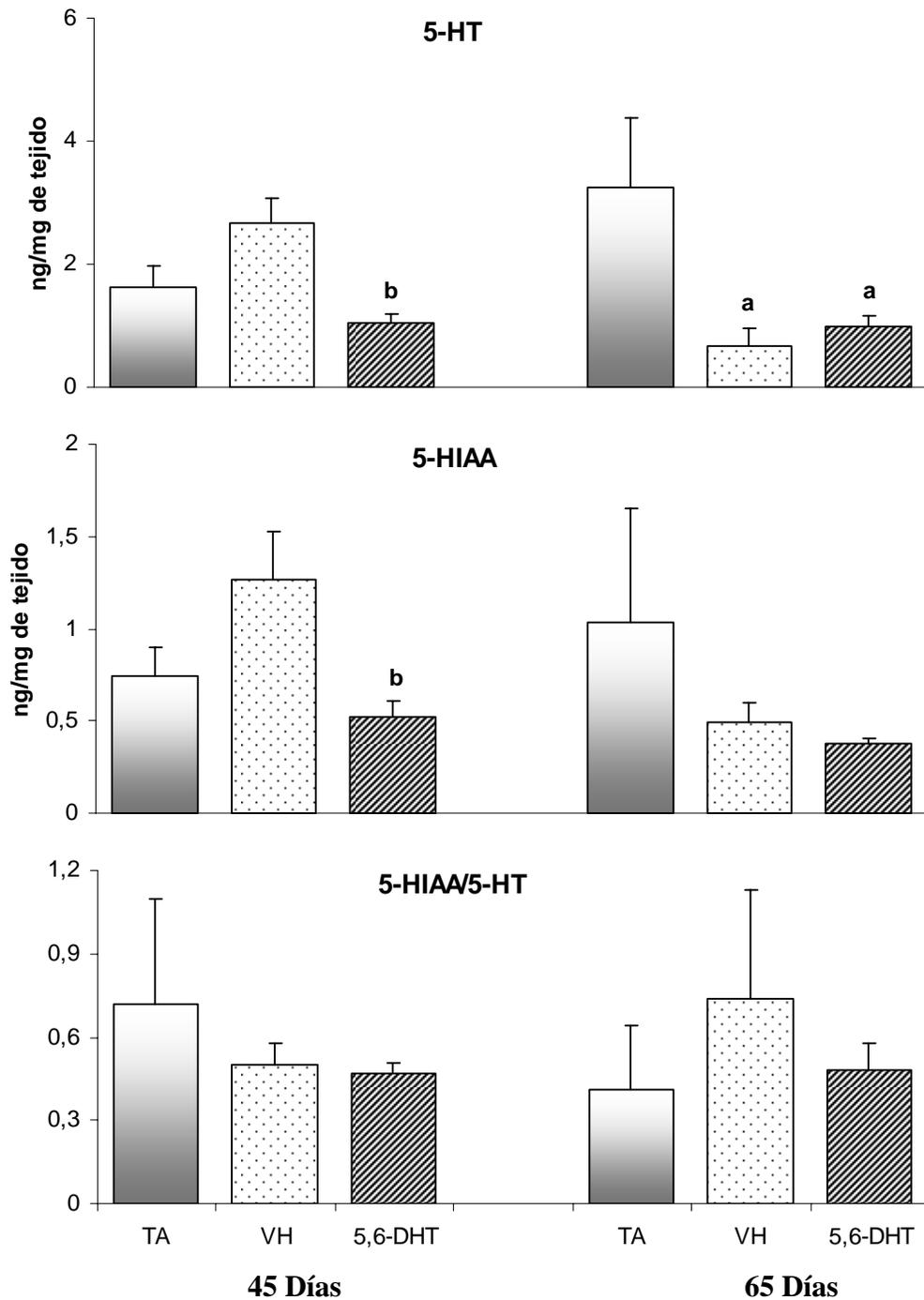
a, $p < 0.05$ vs. grupo TA; b, $p < 0.05$ vs. grupo VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 10. Concentración (media \pm e.e.m) de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolácetico (5-HIAA) y de la relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo anterior de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) o de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días.



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

Figura 11. Concentración (media \pm e.e.m) de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolácetico (5-HIAA) y de la relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo medio de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) o de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días



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

Figura 12. Concentración (media \pm e.e.m) de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolácetico (5-HIAA) y de la relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo posterior de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) o de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días.

Cuadro 1. Concentración (media \pm e.e.m) de dopamina (DA), ácido 3-4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y de la relación DOPAC/DA en el hipotálamo anterior y medio de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección de ácido ascórbico en el núcleo dorsal del rafe o de 5,6-Dihidroxitriptamina en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.

HIPOTÁLAMO ANTERIOR			
Grupo	DA ng/mg de tejido	DOPAC	DOPAC/ DA
45 días			
TA	0.38 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.21 \pm 0.03
VH	0.23 \pm 0.04	0.07 \pm 0.01	0.42 \pm 0.16
5,6-DHT	0.26 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.36 \pm 0.05
65 días			
TA	0.22 \pm 0.03	0.11 \pm 0.03	0.55 \pm 0.16
VH	0.31 \pm 0.06	0.10 \pm 0.03	0.29 \pm 0.05
5,6-DHT	0.30 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.30 \pm 0.05
HIPOTÁLAMO MEDIO			
45 días			
TA	0.68 \pm 0.30	0.19 \pm 0.12	(0.29, 0.10)
VH	0.53 \pm 0.19	0.13 \pm 0.03	0.38 \pm 0.07
5,6-DHT	0.42 \pm 0.06	0.13 \pm 0.02	0.33 \pm 0.04
65 días			
TA	0.46 \pm 0.06	0.12 \pm 0.02	0.25 \pm 0.05
VH	0.29 \pm 0.10	0.09 \pm 0.03	0.36 \pm 0.08
5,6-DHT	0.35 \pm 0.09	(0.26, 0.17)	(0.32, 0.73)

Cuadro 2. Concentración (media \pm e.e.m) de noradrenalina (NA), ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) y de la relación MHPG/NA en el hipotálamo anterior y medio de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección de ácido ascórbico en el núcleo dorsal del rafé o de 5,6-Dihidroxitriptamina en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.

HIPOTÁLAMO ANTERIOR			
Grupo	NA ng/mg de tejido	MHPG	MHPG/NA
45 días			
TA	1.79 \pm 0.16	-	-
VH	1.69 \pm 0.35	0.3895 *	0.1546 *
5,6-DHT	1.41 \pm 0.34	0.45 \pm 0.04	0.60 \pm 0.25
65 días	1.39 \pm 0.24	0.50 \pm 0.09	0.64 \pm 0.43
TA			
VH	2.00 \pm 0.20	-	-
5,6-DHT	2.18 \pm 0.17	1.16 \pm 0.22	0.60 \pm 0.15
HIPOTÁLAMO MEDIO			
45 días			
TA	1.93 \pm 1.21	0.72 \pm 0.15	1.24 \pm 0.67
VH	1.04 \pm 0.26	1.46 \pm 0.46	2.98 \pm 1.36
5,6-DHT	2.48 \pm 0.42	0.88 \pm 0.10	0.40 \pm 0.08
65 días	1.43 \pm 0.23	1.26 \pm 0.82	0.61 \pm 0.32
TA			
VH	1.73 \pm 0.18	1.0755 *	0.591 *
5,6-DHT	2.24 \pm 0.27	2.31 \pm 0.30	1.25 \pm 0.33

(-) Valores por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng)

(*) Valor único en el grupo

Concentración de Gonadotropinas

En comparación con los animales testigo absoluto o con microinyección de ácido ascórbico en el NDR, en el grupo de animales con lesión del NDR, no se observó diferencias significativas en la concentración de LH en ninguna de

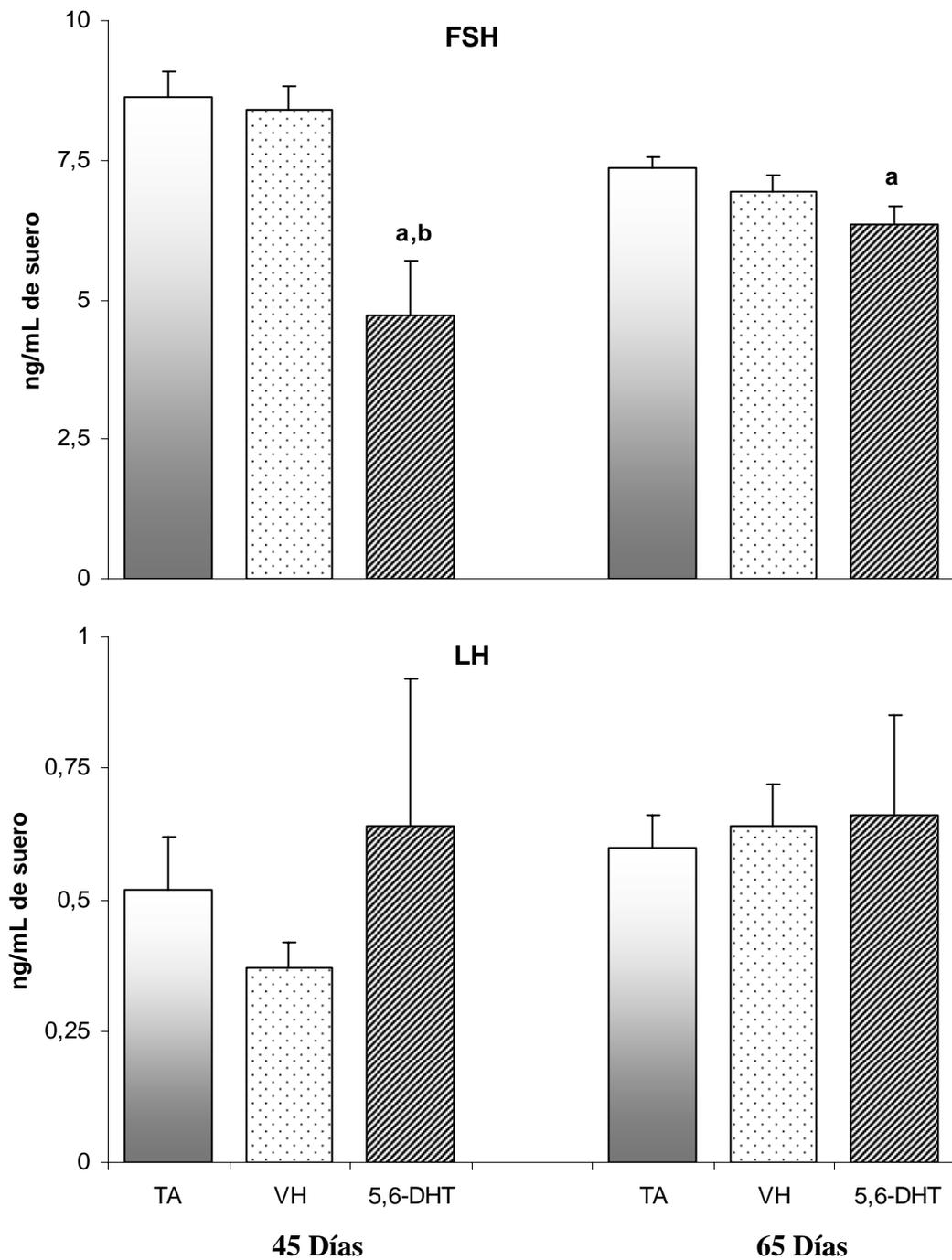
las edades estudiadas. Mientras que la concentración de FSH disminuyó en los animales con lesión del NDR (Figuras 13).

Concentración de Hormonas Esteroides

En comparación con el grupo de animales testigo, la lesión del NDR resultó en la disminución en la concentración de progesterona en suero de los animales sacrificados a los 45 ó 65 días de edad (Figura 14).

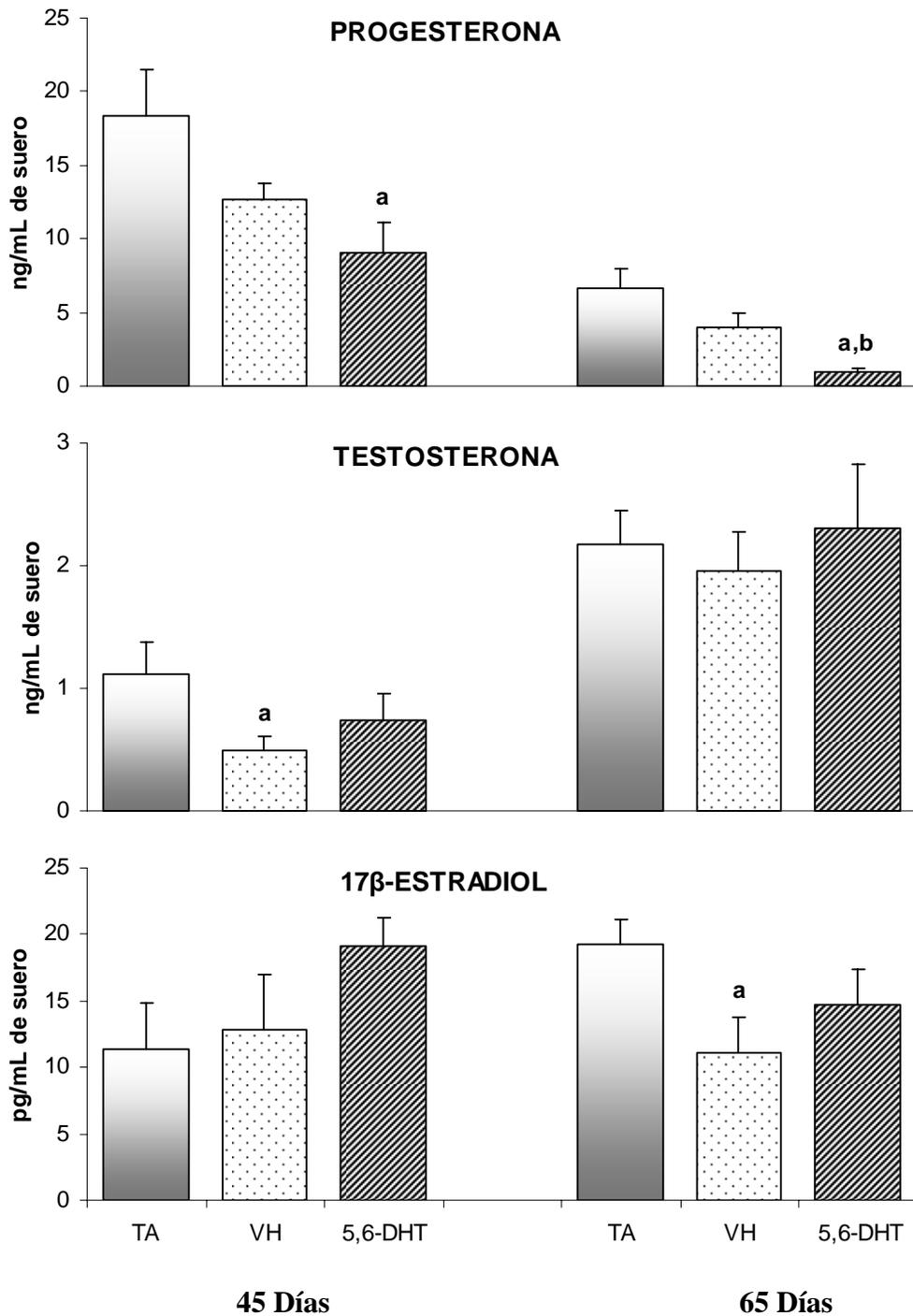
La concentración de testosterona fue menor en los animales con microinyección de ácido ascórbico en el NDR. En los animales con lesión del NDR no se presentaron cambios en ninguna de las edades estudiadas (Figura 14).

La microinyección de ácido ascórbico o 5,6-DHT no provocó cambios significativos en la concentración sérica de 17β -estradiol, excepto en aquellos animales que se trataron con ácido ascórbico y se sacrificaron a los 65 días de edad, en los que se observó una menor concentración del 17β -estradiol (Figura 14).



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

Figura 13. Concentración (media \pm e.e.m) en suero de la de hormona fólculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) o de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días.



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

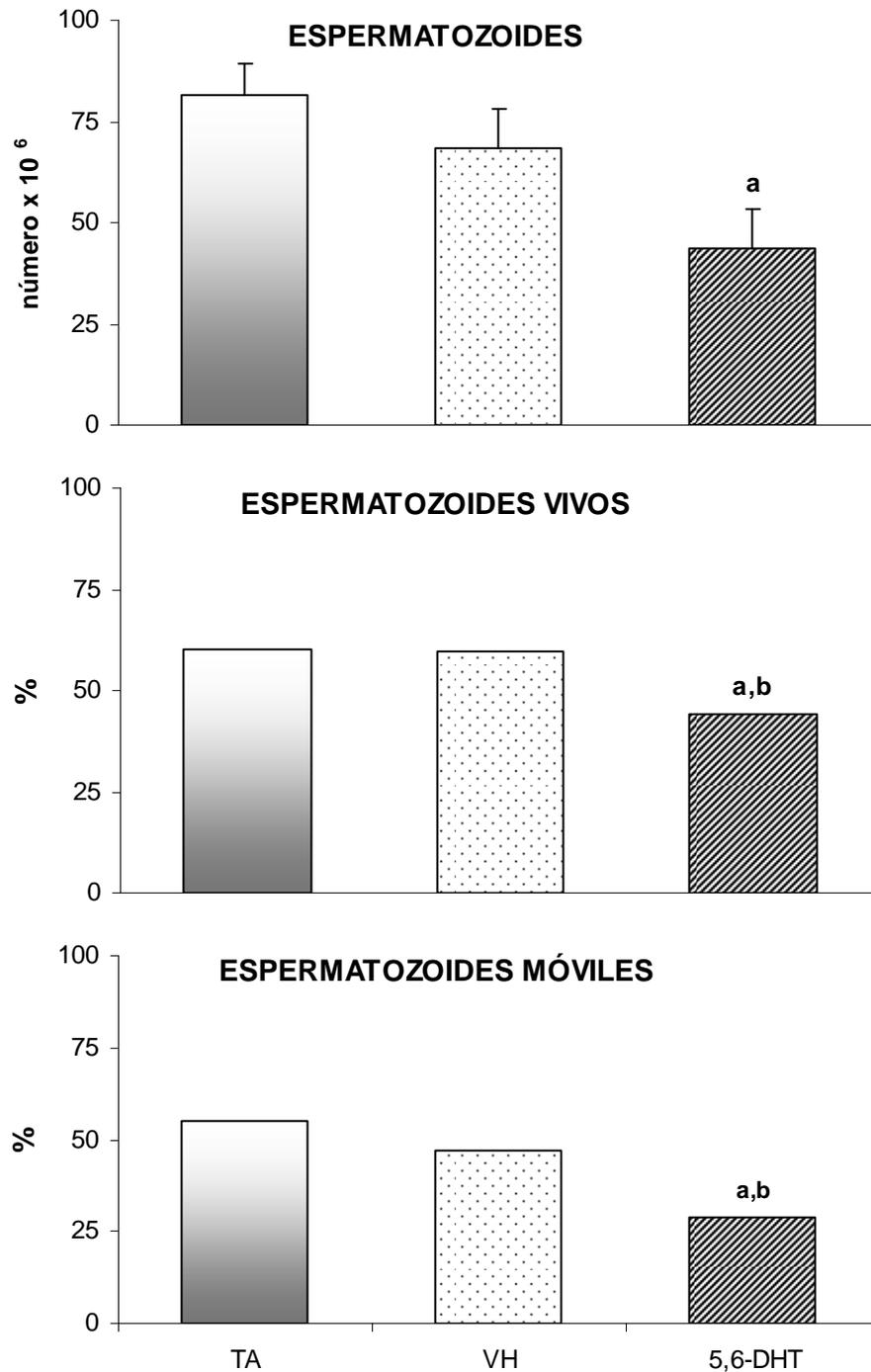
Figura 14. Concentración (media \pm e.e.m) de progesterona testosterona y 17 β -estradiol de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) o de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad

Concentración Espermática

En comparación con el grupo de animales que recibieron VH, en los animales con lesión del NDR y sacrificados a los 65 días de edad, la concentración de espermatozoides disminuyó de manera significativa, así como el porcentaje de espermatozoides vivos y móviles (Figura 15).

Peso de Órganos

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto o que recibieron VH, en los animales que se realizó la microinyección de la 5,6-DHT y que se sacrificaron a los 45 ó 65 días de edad, no se modificó el peso corporal de los animales, la masa testicular, del epidídimo, el peso de la próstata y de las glándulas coagulantes. Mientras que, el peso de la vesícula seminal disminuyó únicamente en el grupo de animales sacrificados a los 65 días de edad (Cuadro 3 y 4).



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

Figura 15. Número (media \pm e.e.m) de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides viables y móviles de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del raqué de ácido ascórbico (VH) o de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días

Cuadro 3. Peso corporal (Media \pm e.e.m), masa testicular y del epidídimo de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección en el núcleo dorsal del rafé de ácido ascórbico (VH) o de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.

GRUPO	Peso Corporal	Masa Testicular (g)	Masa del Epidídimo
45 Días			
TA	161 \pm 5.26	1.7 \pm 0.12	0.19 \pm 0.04
VH	157 \pm 3.45	1.7 \pm 0.04	0.18 \pm 0.01
5,6-DHT	150 \pm 3.16	1.4 \pm 0.12	0.17 \pm 0.01
65 Días			
TA	257 \pm 4.64	2.9 \pm 0.06	0.56 \pm 0.02
VH	267 \pm 3.45	3.0 \pm 0.07	0.57 \pm 0.01
5,6-DHT	245 \pm 6.51	2.7 \pm 0.12	0.50 \pm 0.04

Cuadro 4. Peso (media \pm e.e.m) de la próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes de animales testigo absoluto (TA), o con microinyección de ácido ascórbico en el núcleo dorsal del rafé (VH) o de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad.

GRUPO	Próstata	Vesícula Seminal (g)	Glándulas Coagulantes
45 Días			
TA	0.19 \pm 0.04	0.09 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
VH	0.14 \pm 0.01	0.12 \pm 0.05	0.05 \pm 0.01
5,6-DHT	0.09 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.003
65 Días			
TA	0.29 \pm 0.02	0.35 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01
VH	0.28 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01
5,6-DHT	0.22 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02 a	0.11 \pm 0.01

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

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten sugerir que en el animal prepúber la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé, participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de FSH y en el proceso de espermatogénesis.

La disminución en la concentración de 5-HT y de su metabolito en el hipotálamo anterior y medio de los animales con microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafé, así como la falta de cambios en las concentraciones de NA, DA y sus metabolitos nos indica que el fármaco daña selectivamente a las neuronas serotoninérgicas, como se ha demostrado previamente por otros autores (Jiménez y Velez, 2002; Monroy y col., 2003). La 5,6-DHT es capturada por las neuronas serotoninérgicas, se oxida y genera radicales de oxígeno (O_2), hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales pueden causar daño al ADN, proteínas y lípidos. Estas especies reactivas de oxígeno actúan también como un segundo intermediario en las señales intracelulares e inhibe el complejo respiratorio de la mitocondria y como consecuencia provoca la degeneración de las neuronas serotoninérgicas (Jiménez y Vélez., 2002).

El hecho de que en los animales con microinyección de 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafé, no se elimine por completo la concentración de 5-HT en el hipotálamo, es el resultado de que el núcleo remanente, el medial,

también constituye una fuente de 5-HT para el hipotálamo, como lo han propuesto otros autores (Frazer y Hensler, 1999). Los resultados de este estudio concuerdan con evidencias anatómicas en las que se muestra que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal y medial del rafé inervan diferentes regiones del encéfalo, entre ellas los núcleos hipotalámicos (Van de Kar y Lorens 1979; Takeuchi y col., 1988).

Otra posibilidad es que la 5-HT cuantificada en el hipotálamo de los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé sea sintetizada por neuronas localizadas en el propio hipotálamo. Entre los núcleos hipotalámicos, el ventromedial, es donde al parecer se encuentran las células productoras de esta amina. En relación a esto se mostró que cuando se realiza la deaferentación del hipotálamo en la rata macho no se elimina por completo la 5-HT en esta estructura (Takeuchi, 1988). Estos resultados apoyan la idea de que la 5-HT también se sintetiza en el hipotálamo.

Al parecer en el hipotálamo de los animales con microinyección de la 5,6 DHT la actividad de la neurona serotoninérgica, no se modificó ya que la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$, no cambio. Sin embargo, en estos animales existe un paralelismo entre la disminución en la tasa de síntesis y metabolismo de la serotonina, lo que explica que no se modificara la actividad de la neurona serotoninérgica. La disminución en la concentración de serotonina y de su metabolito en las tres regiones del hipotálamo, posiblemente este vinculado a la disminución del número de neuronas serotoninérgicas funcionales, que

resulta del daño inducido por la microinyección de la 5,6-DHT. Esta idea es apoyada por los resultados reportados por Das y col., (1985), quienes mostraron que cuando se administra en el tercer ventrículo 5,6-DHT, disminuye la concentración de 5-HT en diferentes regiones del cerebro.

En diferentes estudios experimentales se ha mostrado que en la rata macho el sistema serotoninérgico participa en la modulación de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de la FSH (Justo y col., 1989; Moguelevsky y col., 1985), estos autores mostraron que cuando a la rata macho se le administra el precursor de la síntesis de la 5-HT (5-hidroxitriptofano), se incrementa la concentración de 5-HT en el hipotálamo y la secreción de la FSH, mientras que no se modifica la concentración de LH. Estos resultados concuerdan con lo observado en el presente estudio, debido a que en los animales con lesión del núcleo dorsal del raquí, disminuye la concentración de 5-HT en el hipotálamo y de FSH en suero.

Con base en lo antes mencionado, es posible pensar que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del raquí participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de la FSH, ya que la lesión de este núcleo resultó en la disminución en la concentración de FSH. Mientras que no participa en la modulación de la secreción de LH. La idea de que la inervación serotoninérgica del hipotálamo participa en la modulación de la secreción de la FSH se apoya en las evidencias anatómicas en las que se muestra que en el área preóptica

existe comunicación entre los somas de las neuronas que producen GnRH y las terminales de las neuronas serotoninérgicas y en la eminencia media entre las terminales de ambos tipos neuronales (Jennes y col. 1982).

El efecto diferencial de la lesión del núcleo dorsal del rafé sobre la secreción de la FSH y LH, posiblemente es el resultado de la existencia de más de un factor liberador de las gonadotropinas, uno para la FSH y otro para la LH, como lo han propuesto previamente otros autores (Igarashi y McCann, 1964; Culler y col., 1986). En relación a esto Lumpkin y McCann, (1984) mostraron que cuando se lesiona el núcleo paraventricular del hipotálamo disminuye la secreción de FSH y no se modifica la de LH.

La disminución en el número de espermatozoides observada en los animales con microinyección del núcleo dorsal del rafé se relaciona con la disminución en la concentración de la FSH que se observó a los 45 y 65 días de edad. En relación a esto se ha mostrado que esta gonadotropina es un factor que participa en el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis. Esta hormona actúa directamente en las células de Sertoli, en donde estimula la secreción de factores, de crecimiento indispensables para la proliferación de las células germinales (Weinbauer y Nieschlag, 1993). La idea de que la FSH, entre otros factores, es importante en la regulación de la espermatogénesis se apoya en los resultados que muestran que cuando se realiza la hipofisectomía a ratas machos de 32 días de edad, en los tres días posteriores a la cirugía se incrementa la degeneración de los espermatoцитos en paquiteno, secundarios y

de las espermatides redondas, mientras que cuando a estos animales se les administra FSH o en combinación con la LH, disminuye la degeneración de las células germinales. Con base en estas evidencias se apoya la idea de que FSH ejerce una función estimulante en la espermatogénesis (Russell y col., 1987).

La célula de Sertoli le proporciona a las espermatogonias las condiciones para su multiplicación y diferenciación, debido a que secreta una serie de proteínas y factores, como la transferrina esenciales para el desarrollo y diferenciación. Por ello, la disminución en la espermatogénesis observada en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafe, posiblemente también sea el resultado de modificaciones en la multiplicación y maduración de las células de Sertoli, debido a la disminución en la secreción de la FSH. Esta idea se apoya en el hecho de que en la rata durante la etapa fetal y en el desarrollo prepuberal, la proliferación de las células de Sertoli es favorecida por la FSH (Orth, 1982; Orth, 1984). Además cuando en la rata prepúber se inhibe la multiplicación de estas células disminuye la producción de espermatozoides en la etapa adulta (Orth, y col. 1988) y cuando se estimula la proliferación de las células de Sertoli se favorece la formación de espermatozoides (Cooke y col., 1991).

Otra posible explicación a los cambios en la espermatogénesis, es que la disminución en la concentración de FSH modificó la proliferación de las células germinales e incrementó la degeneración de las mismas, lo que se reflejó en la disminución del número de espermatozoides. Esta idea es apoyada por las

evidencias en las que se ha mostrado que la FSH estimula la división meiótica de las células germinales y tiene un efecto antiapoptótico en las espermatogonias y espermatocitos (Tapanainen y col., 1993).

Se ha mostrado que la testosterona también participa en la regulación de la espermatogénesis, debido a que interviene en el desarrollo de las espermatogonias y espermatocitos, pero su principal función es participar en la elongación de las espermatides redondas (Sun y col., 1990; Weinbauer y Nieschlag, 1993). Sin embargo, la disminución en el número de espermatozoides observado en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafe no puede ser explicado por modificaciones en la secreción de testosterona, debido a que en estos animales la concentración de dicha hormona no se modificó. Estos resultados nos llevan a pensar que la disminución en la espermatogénesis puede atribuirse a la modificación de otro andrógeno como el 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol, cuya concentración es de cinco a ocho veces más grandes que la testosterona entre los 15 y 32 días de edad y posteriormente disminuye (Russell y col. 1987). Mientras que, la concentración de testosterona se mantiene baja hasta antes de la pubertad. En esta etapa del desarrollo, el 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol es esencial para el mantenimiento de las células germinales (Miyachi y col., 1972).

Con base en lo antes mencionados es posible sugerir que la disminución en el número de espermatozoides en los animales con lesión del núcleo del

rafé es el resultado de la disminución en la secreción de FSH y del 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol.

La disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles se puede atribuir a la disminución en la concentración de FSH ya que tanto en los túbulos seminíferos como en el epidídimo se expresan los receptores a FSH. En el epidídimo es donde se lleva a cabo el almacenamiento y maduración de los espermatozoides. Grover y col., (2005), mostraron que el bloqueo de los receptores de FSH en los túbulos seminíferos y en el epidídimo se acompaña de la disminución en el número y movilidad de los espermatozoides, lo que llevó a los autores a sugerir que la expresión de los receptores a la FSH es un evento esencial en el mantenimiento y funcionamiento del testículo y del epidídimo.

Según Greenwald y Roy (1994) la LH al unirse a sus receptores en la célula de Leydig estimula la síntesis de progesterona y testosterona. Por ello, la disminución en la concentración de esta gonadotropina se refleja en la menor secreción de testosterona en suero. Esto no coincide con nuestros resultados debido a que en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé no se modificó las concentraciones de LH ni de testosterona. Mientras que, la concentración de progesterona disminuyó.

Se ha propuesto que el funcionamiento de la célula de Leydig es regulado hormonal y neuralmente (Banczerowski P., y col., 2000). Gerendai y

Halász (1997), proponen la existencia de vías de comunicación neural entre el testículo y algunas regiones del sistema nervioso central, como el hipotálamo. Por medio de técnicas de histoquímica se ha mostrado que el testículo recibe información del nervio testicular inferior y superior, y del nervio espermático. Las catecolaminas, noradrenalina y adrenalina son liberadas de las terminales nerviosas y se unen a receptores catecolaminérgicos localizados en las células mioideas, de Sertoli, y de Leydig. Estas aminas en las células de Leydig participan en la regulación de la esteroidogénesis (Anakwe y Moger, 1986). En las células de Leydig se expresan receptores a 5-HT del tipo 5-HT₂, y la activación de este receptor inhibe la síntesis de testosterona (Tinajero y col., 1993). Además, Frungieri y col., (2002) han mostrado que existe interacción entre las catecolaminas y los receptores 5-HT₂, en la regulación de la esteroidogénesis en el testículo. Con base en estas evidencias es posible pensar que la eliminación de la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafe alteró una vía de comunicación neural entre el sistema nervioso central y el testículo, lo que se reflejó en la disminución en la secreción de progesterona.

La disminución en el peso de la vesícula seminal en los animales tratados con 5,6-DHT y sacrificados a los 65 días de edad, posiblemente se deba a cambios en la concentración de prolactina ya que no se observaron modificaciones en testosterona. En relación a estos se sabe que en el desarrollo de las glándulas accesorias y del propio testículo además de la testosterona participan otros factores, como la prolactina (PRL) y la hormona

de crecimiento (Kerry y Harvey, 2000). En relación a la PRL, Hostetter y Piasek, (1977) mostraron que el bloqueo de la síntesis de prolactina se acompaña de la disminución en el peso de la vesícula seminal, lo cual les permitió sugerir que la PRL tiene un efecto estimulante en el desarrollo de las glándulas accesorias.

Así mismo, se ha mostrado que alrededor del día 25 de edad la concentración de la PRL se incrementa aproximadamente un 50% de las concentraciones del adulto y al parecer esto se relaciona con el incremento en el peso de la vesícula seminal y próstata (Negro-Villar y col., 1973 citado en (Adams y Steiner, 1988). Estas evidencias experimentales nos permiten explicar que en los animales con lesión química del NDR y sacrificados a lo 45 días no se afectara el peso de las glándulas accesorias, debido a que la lesión del NDR se realizó (30 días de edad) después de que se presentó este pico de secreción de la PRL.

CONCLUSIONES

1. La inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la espermatogénesis en la rata macho.
2. En la fase juvenil de la rata macho, la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR participa de manera estimulante en la modulación de la secreción de la FSH.
3. La inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR no participa en la modulación de la secreción de LH en la fase juvenil en la rata macho.
4. La FSH es un factor importante en el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams L., Steiner R. (1988). Puberty. *Reviews of Reproductive Biology*, 10: 1-52.
2. Ahmad N., Haltmeyer GC., Eik-Nes KB. (1975). Maintenance of spermatogenesis with testosterone or dihydrotestosterone in hypophysectomized rats. *J. Reprod. Fertil.*, 44: 103-109.
3. Akingbemi BT. (2005). Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3: 51-64.
4. Anakwe OO., Moger WH. (1986). Catecholamine stimulation of androgen production by Leydig cells. Interaction with luteinizing hormone and luteinizing hormone releasing hormone. *Biology of Reproduction* 35: 806-814.
5. Aragón MA., Ayala ME., Marin M., Damián-Matsumura P., Domínguez R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction Research*, 129: 717-727.
6. Ayala ME., Monroy J., Morales L., Castro ME., Domínguez R. (1998). Effects of a lesion in the dorsal raphe nucleus performed during the juvenile period of the female rat, on puberty. *Brain Research Bulletin*, 47: 211-218.
7. Banczerowski P., Csaba Z., Csernus V., Gerendai I. (2000). The effect of callostomy on testicular steroidogenesis in hemiorchidectomized rats: a pituitary-independent regulatory mechanism. *Brain Research Bulletin* 53: 227-232.
8. Bartlett JMS., Weinbauer GF., Nieschlag E. (1989). Differential effects of FSH and testosterone on the maintenance of spermatogenesis in the adult hypophysectomized rat. *Journal of Endocrinology*, 121: 49-58.

9. Becù-Villalobos D., Lacau-Mengido IM. (1989). Developmental changes in FSH secretion induced by 5-hydroxytryptophan, naloxone and haloperidol in male and female rats. *Dev. Brain. Res.*, 47: 181-186.
10. Bellido MC. (1999). Reproducción en el varón. En: **Fisiología humana**. JAF. Tresguerres (Ed.). McGraw-Hill, Madrid, España, 1049-1063.
11. Bergh A., Damber JE. (1993). Vascular Controls in Testicular Physiology. En: **Molecular Biology of the Male Reproductive System**. De Krester D. (Ed.). Academic Press, Inc. EUA. 439-460.
12. Calvin HI., Bedford JM. (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the Epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 13: 65-75.
13. Collin O., Damber JE., Bergh A. (1996). 5-hydroxytryptamine a local regulator of testis blood flow and vasomotion in rats. *Journal of Reproduction*, 106: 17-22.
14. Collu R., Jequier JC., Letarte J., Leboeuf G., Ducharme JR. (1974). Endocrinology effects of Brain Serotonin Depletion by 5,6-dihydroxytryptamina in prepuberal Male rats. *Neuroendocrinology*, 14: 139-150.
15. Cooke P., Hess R., Porcelli J., Meisami E. (1991). Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology*, 129: 244-257.
16. Cooper TG. (1999). Epididymis. En: **Encyclopedia of Reproduction**. Vol. 2., Academic Press USA., pp. 1-17.
17. Crowley WR., Zelman FP. (1981). Neurotransmitter Systems. Anatomy and Pharmacology. En: **N. Adler (ed.). Neuroendocrinology of Reproduction**. Physiology and Behavior. Edit. Plenum Press, New York, USA. pp. 65-85.

18. Culler MD., Negro-Vilar A. (1986). Evidence that pulsatile Follicle-Stimulating Hormone secretion is independent of endogenous Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. *Endocrinology*, 118: 609-612.
19. Curtis, H., Barnes N. (1996). **La reproducción**. En: *Invitación a la Biología*. H. Curtis, N., Barnes (Ed.). Editorial Médica Panamericana, 5ta edición, Madrid, España, 665-673.
20. Das TK., Mazumber R., Biswas NM. (1985). Effect of intraventricular injection of 5,6-dihydroxytryptamine on spermatogenesis and plasma testosterone levels in the rat. *Journal of Endocrinology*, 106: 395-400.
21. Dahlström A., Fuxe K. (1964). Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62 (Suppl.232):1-55.
22. Fink G. (1988). Gonadotrophin secretion and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 1349-1378.
23. Frazer A., Hensler JG. (1999). Serotonin. En: **Basic Neurochemistry molecular, cellular and medical aspect**. GJ. Siegel, BW. Agronoff, RW. Alvers, PB. Molinogf (Eds.). Raven Press. New York, 263-292.
24. Frungieri BM, Gonzalez CSI., Rubio M., Ozu M., Lustig L., Calandra SR., (1999). Serotonin in Golden Hamster Testes: Testicular Levels, Immunolocalization and Role during Sexual Development and Photoperiodic Regresion-Recrudescence Transition. *Neuroendocrinology*, 69: 299-308.
25. Frungieri MB., Zitta K., Pignataro OP., Gonzalez-Clavar SI., Calandra SR. (2002). Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic and corticotropin-releasing hormone systems modulating cAMP and

- testosterone production in golden hamster. *Neuroendocrinology*, 76: 35–46
26. Geneser F. (2000). *Histología*. Editorial Médica Panamericana, 3^a edición., Madrid, España, 638–660.
 27. Gerendai A., Halász B. (1997). Neuroendocrine asymmetry, *Front. Neuroendocrinology*, 18: 354–381.
 28. Goppal D. (1999). Structure of Mammalian Epididymis. En: *Comparative Endocrinology and Reproduction*. Joy KP., Krishna A., Haldar C. (eds). Springer–Verlag. Nueva Delhi; 201–227 pp.
 29. Graner DK. (1988). Hormonas de las gónadas. En **Bioquímica Harper**. RK. Murray, DK. Graner, PA. Mayes, VW. Rodwel (eds). Manual Moderno, 11a edición, Mexico, DF. 530–546 pp.
 30. Greenwald GS., Roy SK. (1994). Follicular development and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 629–721.
 31. Grover A., Smith CE., Gregory M., Cyr DG., Sairam MR., Hermo L. (2005). Effects of FSH receptor deletion on epididymal tubules and sperm morphology, numbers, and motility. *Molecular Reproduction and Development*, 72: 135–144.
 32. Holdcraft RW, Braun RE. (2004). Hormonal regulation of spermatogenesis. *International Journal of Andrology*, 27: 335–342.
 33. Hostetter MW., Piasek BE. (1977). The effect of prolactin deficiency during sexual maturation in the male rat. *Biology of Reproduction*, 17: 574–577.
 34. Huhtaniemi IT., 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.
35. Huhtaniemi IT., Clayton RN., Catt KJ. (1984). Gonadotropin–Releasing Hormone Agonist Analog–Induced Steroidogenic Lesion in the Neonatal Rat Testis: Evidence for Direct Gonadal Action. *Endocrinology*, 115: 233–238.
 36. Huhtaniemi IT., Stewart JM., Channabasavaiah K., Fraser HM., Clayton RN. (1984). Effect of treatment with GnRH antagonist, GnRH antiserum and bromocriptine on pituitary–testicular function of adult rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 34: 127–135.
 37. Igarashi M., McCann SM. (1964). A hypothalamic follicle stimulating hormone releasing factor. *Endocrinology*, 74: 446–452.
 38. Jennes L., Beckman WC., Stumpt WE., Grzanna R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH systems in the septum and hypothalamus. *Exp. Brain Research*, 50: 91–99.
 39. Jennes L., Stumpt WE., Sheedy ME. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin–releasing hormone (GnRH)–producing neurons. *J. Comp. Neurol.* 232: 534–547.
 40. Jervis KM., Robaire B. (2001). Dynamic changes in gene expression along the rat Epididymis. *Biol. Reprod.* 65: 696–703.
 41. Jimenez M., Velez PC. (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–kB), p53, c–Jun transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, 63: 677–688.

42. Justo SN., Rossano GL., Szwarcfarb B., Rubio MC., Moguilevsky JA. (1989). Effects of serotonergic system on FSH secretion in male y female rats: evidence for stimulatory and inhibitory actions. *Neuroendocrinology*, 50:382–386.
43. Kerry LH., Harvey S. (2000). Growth hormone: a reproductive endocrine–paracrine regulator?. *Reviews of Reproduction*, 5: 175–182.
44. Kordon C., Drouva S., Martinez EG., Richard IW. (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation on luteinizing hormone and prolactin. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 1621–1682.
45. Kretser DM. y Kerr JB. (1994). The cytology of the Testis. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 1621–1682.
46. Lumpkin MD. McCann SM. (1984). Effect of Destruction of the Dorsal Anterior Hypothalamus on Follicle–stimulating Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology*, 115: 2473–2480.
47. Madhwa Raj HG., Martin D. (1976). The effects of selective withdrawal of FSH or LH on spermatogenesis in the immature rat. *Biology of Reproduction*, 14: 489–494.
48. Mas M., Gonzalez MC., Rodríguez M., Castro R., Oaknin S. (1984). Effects of Monoamine Neurotoxins Injected in Different Brain Areas on Gonadotropin and Androgen Secretion in the Male. *Neuroendocrinology*, 39:156–161.
49. McGuinness MP., Griswold MD. (1995). Neuroendocrine Regulation of Testicular Function. En: *The Reproductive Neuroendocrinology of Aging and Drug Abuse*. DK. Sarkar, ChD. Barnes (Edits). CRC Press, Inc. Florida EUA. 75–91.

50. McLachlan RI., Wreford NG., O´Donell L., De Krester DM., Robertson DM. (1996). The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology*, 148: 1–9.
51. Miyachi Y., Mieschlag E., Lipsett M. (1972). The secretion of gonadotropins and testosterone by the neonatal male rat. *Endocrinology*, 92, 1–11.
52. Moguilevsky JA., Faigón MR., Seacchi P., Szwarcfarb B. (1985). Effect of serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats. *Neuroendocrinology*, 40: 135–138.
53. Moguilevsky JA., Faigón MR., Seacchi P., Szwarcfarb B. (1987). Role of sexual differentiation of the hypothalamus in the differential effect of the serotonergic system on LH in pubertal male female rats. *Neuroendocrinology*, 45: 274–277.
54. Monroy J., Ayala ME., Chavira R., Damián–Matsumura P., Domínguez R. (2003). Comparative effects of injecting 5,6–dihydroxytryptamine in the dorsal or medial raphe nuclei on rat puberty. *Brain Research Bulletin*, 60: 307–315.
55. Montagne M., Calas A. (1988). Serotonin and endocrinology the pituitary. En: **Neuronal Serotonin**. NN. Osborne, M. Hamon (Eds.). Jhon wiley & Sons, New York , EUA, 271–274.
56. Montemayor ME., Clark AS., Lynn DN., Roy EJ. (1990). Modulation by norepinephrine of neuronal responses to estradiol. *Neuroendocrinology*. 52: 473–480.
57. Nagy F. (1972). Cell division kinetics and DNA synthesis in the immature Sertoli cells of the rats testis. *Journal Reproduction Fertil*, 28:389–395.

58. Negro-Vilar A., Krulich L., McCann SM. (1973). Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat. *Endocrinology*, 93: 660–664.
59. Odell DW. (1990). Sexual Maturation in the Rat. En: **Control of the Onset of Puberty**. Grumbachy Melvin M., Sizonenko Pierre C., Aubert Michel L (Ed). Williams & Wilkins. London, 183–210.
60. Ojeda RS., Urbanski FH. (1994). Puberty in the rat. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 363–404.
61. Orth J. (1982). Proliferation of Sertoli Cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.*, 203, 485–498.
62. Orth J. (1984). The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*, 115, 1248–1260.
63. Orth J., Gunsalus G., Lamperti A. (1988). Evidence from Sertoli Cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122; 787–797.
64. Palliniemi LJ., Fröjdman K., Paranko J. (1993). Cell Biology of Testicular Development. En: **Molecular Biology of the Male Reproductive System**. De Krester D. (Ed.). Academic Press, Inc. EUA. 21–54.
65. Paxinos G., Watson C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, EUA.
66. Ramaley J. (1979). Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. *Biology of Reproduction*, 20: 1–31.

67. Rea MA., Marshall GR., Weinbauer GF., Neischlag E. (1986). Testosterone maintains pituitary and serum FSH and spermatogenesis in gonadotropin-releasing hormone antagonist-suppressed rats. *Journal of Endocrinology*, 108: 101-107.
68. Robertson DM., Risbridger GP., Hedger M., McLachlan RI. (1993). Growth Factors in the Control of Testicular Function. En: **Molecular Biology of the Male Reproductive System**. De Krester D. (Ed.). Academic Press, Inc. EUA. 411-438.
69. Romano CM., Pedernera E. (1991). La glándula intersticial del testículo. En: **Tópicos Selectos de biología de la Reproducción**. R. Domínguez (Ed.). UNAM-Porrúa, México, DF., 231-254.
70. Ross CM., Romrell LJ., Kaye GI. (1992). **Histología Texto y Atlas Color**. 3a edición. Médica Panamericana. México D.F. 634 - 673.
71. Russell LD., Alger LE., Nequin LG. (1987). Hormonal Control of Pubertal Spermatogenesis. *Endocrinology*, 120: 1615-1632.
72. Russell LD., Ettlin RA., Sinha H., Clegg ED. (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press 41-118.
73. Russell LD., Clermont Y. (1977). Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Ana. Rec.*, 187: 347-366.
74. Satendra S., Dryhurst G. (1990). Further Insights into the Oxidation Chemistry and Biochemistry of the Serotonergic Neurotoxin 5,6-Dihydroxytryptamine. *J. Med Chem.*, 33: 3035-3044.
75. Satendra S., Dryhurst G. (1991). Reactions of the Serotonergic Neurotoxin 5,6-Dihydroxytryptamine with Glutathione. *J. Med Chem.*, 56: 1767-1773.

76. Scottt FG. (2003). La saga de la línea germinal. En: **Biología del desarrollo**. Ed. Médica Panamericana. 7a edición. Buenos Aires Arg. 655–691.
77. Setchel B., Maddocks S., Brooks DE. (1994). Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. Chapter 18. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 1063–1170.
78. Shannon NJ., Gunnet JW., Moore KE. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neural activity following electrical stimulation of the raphe nucleus. *J. Neurochem.*, 47: 959–965.
79. Sharpe RM. (1994). Regulation of spermatogenesis. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 1363–1434.
80. Shepherd. GM.(1985). *Neurobiología*. Editorial Labor, 3^a edición, Barcelona España, 187–195.
81. Shiskina GT., Borodin PM. (1989). Involvement of brain serotonin in regulation of sexual maturity in male rats. *Neurosci Behav Physiol*, 19 145–149.
82. Shishkina GT., Dygalo NN. (2000). Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 125: 45–51.
83. Silverman A., Liune Y., Witkin JW. (1994). The gonadotropin-releasing (GnRH) neuronal systems: Inmunochemistry. En: **The Phisiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 57–92.

84. Skinner MK. (2005). Sertoli cell secreted regulatory factors. En: Sertoli cell Biology. MK. Skinner, MD. Griswold (Eds.). Elsevier Science, San Diego, EUA, 107–120.
85. Soghomonian JJ., Beradet A., Descarries L. (1988). Ultrastructural relationships of central serotonin neurons. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 57–92.
86. Sun YT., Wreford NG., Robertson DM., Kretser DM. (1990). Endocrinology, 127: 1215–1223.
87. Takeuchi (1988). Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 25–56.
88. Tapanainen JS., Tilly JL., Vinko KK., Hsueh AJW. (1993). Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. Molecular endocrinology, 7: 643–650.
89. Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca DR., Dafau ML. (1993). Serotonin Secretion from rat Leydig Cells. Endocrinology, 133: 3026–3029.
90. Tresguerres, JFA. (2003). **Fisiología Humana**. Ed. McGraw–Hill, 2ª edición, Madrid, España, 1033–1047.
91. Van de Kar LD., Karteszi M., Bethea CL., Ganong WF. (1985). Serotonergic stimulation of prolactin and corticosterone secretion in mediated by different pathways from the mediobasal hypothalamus. Neuroendocrinology, 41: 380–384.
92. Van de Kar LD., Levin J., Van orden I. (1978). Serotonin in hypothalamic nuclei: Increased content alter castration of male rats. Neuroendocrinology, 27: 186–192.

93. Van de Kar LD., Lorens SA. (1979). Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and medial midbrain raphe nuclei. *Brain Res.*, 162: 45-54.
94. Weinbauer FG., Nieschlag E. (1993). Hormonal Control of Spermatogenesis. En: **Molecular Biology of the Male Reproductive System**. De Krester (Ed.). Academic Press, Inc. EUA, 99-142.
95. Yeung Ch., Cooper TG., Bergmann M., Schulze R. (1991). Organization of tubules in the human caput Epididymis and ultrastructure of their epithelia. *Am. J. Anat.* 191: 261-279.