



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE 5,6-DIHI
DROXITRIPTAMINA EN EL NÚCLEO DORSAL
DEL RAFÉ EN EL CICLO DEL EPITELIO SEMINÍ
FERO Y LA SECRECIÓN DE FSH DURANTE EL
DESARROLLO PREPUBERAL DE LA RATA**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
GABRIELA HERNÁNDEZ SILVA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE 5,6-DIHIDROXITRIPTAMINA EN EL
NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ EN EL CICLO DEL EPITELIO SEMINÍFERO Y
LA SECRECIÓN DE FSH DURANTE EL DESARROLLO PREPUBERAL DE LA
RATA**

Tesis para obtener el título de biólogo presenta: Gabriela Hernández Silva

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

A los miembros del jurado:

M.C. Raúl Zavala Chavero

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. Maria Esther Cruz Beltrán

M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez

Dra. Leticia Morales Ledesma

Por su valiosa contribución en la elaboración de esta tesis.

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

DEDICATORIAS

A mis papás, Carmen y Leo, porque no encuentro una forma de agradecerles toda una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sepan que este triunfo fue gracias a ustedes, ya que fueron mi fuerza y apoyo que me ayudaron a conseguirlo.

A mi hermana Grace, por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas, por escucharme y apoyarme, por ser mi mejor consejera y amiga.

A toda mi familia, por el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis amigos Marisol y Erik, por su apoyo y colaboración para la realización de esta tesis, por todos los momentos que vivimos dentro y fuera de laboratorio, pero sobre todo por su amistad.

A mis amigos Pamela, Estela, Elizabeth, Azucena, Marisol, Dalia, Martha, Erik y Raúl, porque amigos como ustedes son difíciles de encontrar, fácil de querer e imposible olvidar.

ÍNDICE

Resumen	I
Introducción	1
Serotonina.....	1
Aparato reproductor masculino.....	4
Testículo.....	4
Funciones del testículo.....	7
Espermatogénesis.....	8
Esteroidogénesis.....	13
Regulación de las funciones del testículo.....	15
Serotonina y funciones del testículo.....	19
5,6-Dihidroxitriptamina.....	22
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
Material y método	26
Lesión del núcleo dorsal del rafé.....	26
Procedimiento de autopsia.....	27
Cuantificación de serotonina y del ácido 5- hidroxiindolacético (5-HIAA).....	28
Identificación de la zona de lesión.....	30
Inclusión y tinción del testículo.....	31

Evaluación del ciclo del epitelio seminífero.....	31
Cuantificación de FSH, progesterona, testosterona y 17 β - estradiol en suero.....	32
Análisis estadístico de resultados.....	32
Resultados	33
Concentración de serotonina y del ácido 5- hidroxiindolacético.....	33
Concentración de FSH, progesterona, testosterona y 17 β - estradiol.....	37
Ciclo del epitelio seminífero.....	39
Discusión	49
Conclusiones	57
Bibliografía	58
Apéndice	69

RESUMEN

La serotonina es producida en el cerebro por neuronas que conforman el núcleo del rafé y que por su organización se ha dividido en: dorsal (NDR), medial (NMR) y del puente (NPR). Existe comunicación anatómica entre las neuronas que se originan en el NDR y las que secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), por lo que este neurotransmisor participa en la regulación de la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) y por lo tanto, de las funciones del testículo. Por lo anterior, en el presente estudio, se analizaron los efectos de la lesión química del NDR inducida por la 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT), neurotóxico de las neuronas serotoninérgicas, sobre la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético en el hipotálamo, el ciclo del epitelio seminífero y la concentración de FSH en el suero y en el ciclo del epitelio seminífero; así como su posible correlación con la producción de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y 17β -estradiol) en ratas de 30 días de edad, las cuales fueron sacrificadas a los 45 ó 65 días de edad.

En comparación con el grupo testigo o con microinyección de ácido ascórbico en el NDR (vehículo), en el hipotálamo anterior (HA) y medio (HM) de los animales con la microinyección de 5,6-DHT en el NDR y sacrificados a los 45 ó 65 días, la concentración de serotonina y su metabolito (5-HIAA) disminuyó, HA [(45 días: 5,6-DHT: 0.58 ± 0.11 vs TA: 1.92 ± 0.38 ; VH: 1.96 ± 0.28 , $p < 0.05$) (65 días: 5,6-DHT: 0.46 ± 0.10 vs TA: 1.30 ± 0.12 ; VH: 1.17 ± 0.11 , $p < 0.05$)]; HM [(45 días: 5,6-DHT: 0.54 ± 0.07 vs TA: 2.33 ± 0.41 ; VH: 1.99 ± 0.52 , $p < 0.05$) (65 días: 5,6-DHT: 0.50 ± 0.11 vs TA: 2.04 ± 0.21 ; VH: 1.32 ± 0.21 , $p < 0.05$)].

La concentración de FSH y progesterona en el suero, el diámetro de los túbulos seminíferos por estadios en los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR y sacrificados a los 45 ó 65 días no se modificó. Mientras que la concentración de testosterona y estradiol disminuyeron significativamente, testosterona [(45 días: 5,6-DHT: 0.56 ± 0.35 vs VH: 1.81 ± 0.36 , $p < 0.05$) (65 días: 5,6-DHT: 2.12 ± 0.18 vs TA: 3.79 ± 0.26 ; VH: 3.64 ± 0.51 , $p < 0.05$)]; estradiol [(45 días: 5,6-DHT: 0.56 ± 0.35 vs VH: 1.81 ± 0.36 , $p < 0.05$) (65 días:

5,6-DHT: 2.12 ± 0.19 vs TA: 3.79 ± 0.26 ; VH: 3.64 ± 0.56 , $p < 0.05$). También se observó un aumento en el porcentaje de túbulos seminíferos anormales que se caracterizaron por la presencia de espermátides y cabeza de espermatozoides sin flagelo en el lumen de los túbulos [45 días (5,6-DHT: 29% vs TA: 4%; VH: 9.4%, $p < 0.05$) (65 días (5,6-DHT: 36% vs TA: 5.2%; VH: 7.5%, $p < 0.05$). En los animales sacrificados a los 45 días esta anomalía se presentó en los túbulos en etapa VII, VIII y XI. Mientras que en los animales sacrificados a los 65 días en los estadios IV, VII, VIII, X y XII.

Con base a los resultados obtenidos nos permite sugerir que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR no participa en la regulación de la secreción de FSH y progesterona, pero si interviene en la secreción de testosterona, 17β -estradiol y en el mantenimiento de la estructura del ciclo del epitelio seminífero en la rata macho prepúber.

INTRODUCCIÓN

Serotonina

La serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) es una amina que se encuentra en las plaquetas y se libera a la sangre durante el proceso de coagulación. Se nombra de esa manera debido a que se identificó por primera vez en el suero y por su actividad vasoconstrictora. Es considerada como un mediador celular en tejidos periféricos y como un neurotransmisor en el sistema nervioso central (Velasco, 2000; Whitaker- Azmitia, 1999).

El 90% de la serotonina se encuentra en el tubo digestivo, con una mayor proporción en las células enterocromafines y el resto en las neuronas entéricas del plexo mientérico. También se le encuentra en el encéfalo, la retina, paredes de los vasos sanguíneos, plaquetas, pulmones, corazón, células del músculo liso, epidídimo, testículo, oviducto, útero y ovario (Jiménez Trejo y col., 2007; Velasco y col., 2000).

En el cerebro es producida por las neuronas serotoninérgicas, que se agrupan y conforman el núcleo del rafé, situado en el mesencéfalo. Anatómicamente al núcleo del rafé lo conforman nueve grupos designados como B1 hasta B9 y se divide en el núcleo dorsal (NDR, B6 y B7), medial (NMR, B8 y B9) y del puente (NPR) (Jacobs y Azmitia, 1992; Stig, 2007).

Las neuronas de los núcleos del NDR y NMR envían sus proyecciones e inervan diferentes regiones del encéfalo como la corteza, amígdala, hipocampo e hipotálamo. Mientras que el NPR envía su inervación al cerebelo y médula espinal, entre otras estructuras (McQuade y Sharp, 1997, Celada y col., 2002) (Fig. 1).

La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido L-triptófano, en una primera etapa este aminoácido es hidroxilado por acción de la enzima triptófano-hidroxilasa y como resultado se forma el L-5-hidroxitriptofano (5-HTP), que al ser

descarboxilado, por la enzima descarboxilasa, se convierte en serotonina (Velasco, 2000) (Fig. 2).

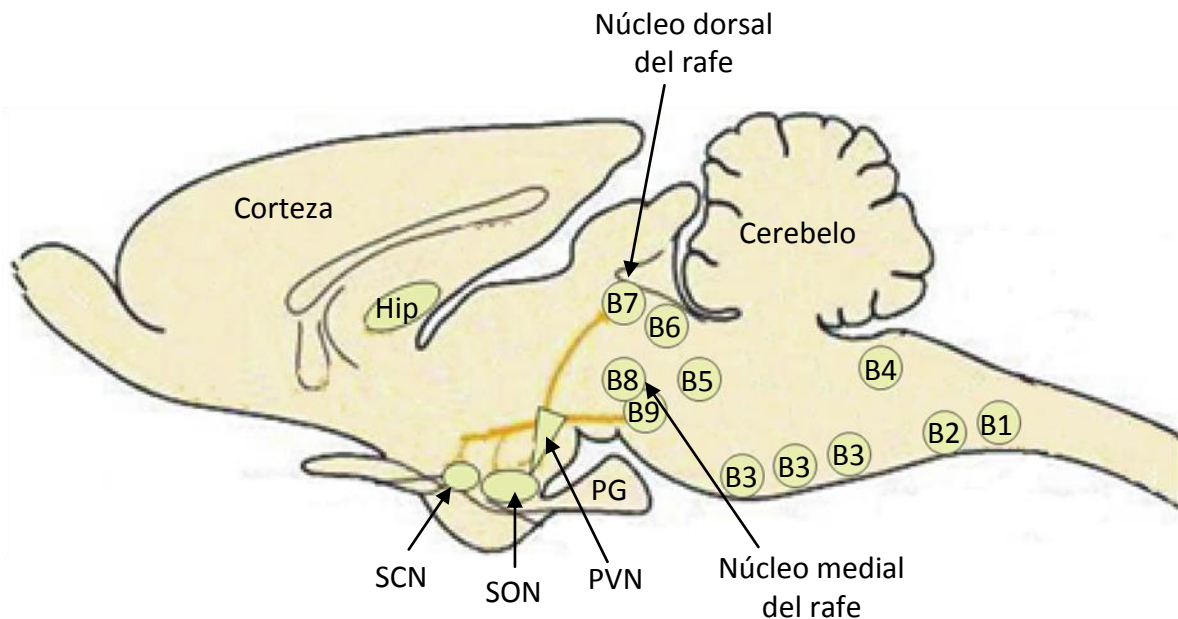


Fig. 1. Vista sagital del cerebro de ratona, donde se muestra la inervación de las neuronas serotoninérgicas. Hipocampo (Hip), Núcleo supraquiasmático (SCN), paraventricular (PVN), supraóptico (SON), glándula pituitaria (PG) (Modificado de Frazer y Hensler, 1999).

La serotonina sintetizada, se almacena en vesículas que se ubican en el axón de la neurona y de esta forma se protege de la degradación. La serotonina se libera de las vesículas a la hendidura sináptica y se une a sus receptores de membrana en la neurona postsináptica. Parte de la amina que no se une a los receptores se incorpora a la neurona que la sintetizó y por acción de la enzima monoamino-oxidasa (MAO) se inactiva y forma el metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Velasco, 2000).

Los receptores de la serotonina se han clasificado en siete familias (5-HT1 a 5-HT7), algunas de ellas comprenden varios subtipos de receptores como el 5-HT1 (5-HT1A, 5HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F) (Mendoza, 2008). La mayoría de los receptores se localizan postsinápticamente, pero el 5-HT1A y 5HT1B se localizan presinápticamente y funcionan como autorreceptores (Stig, 2007).

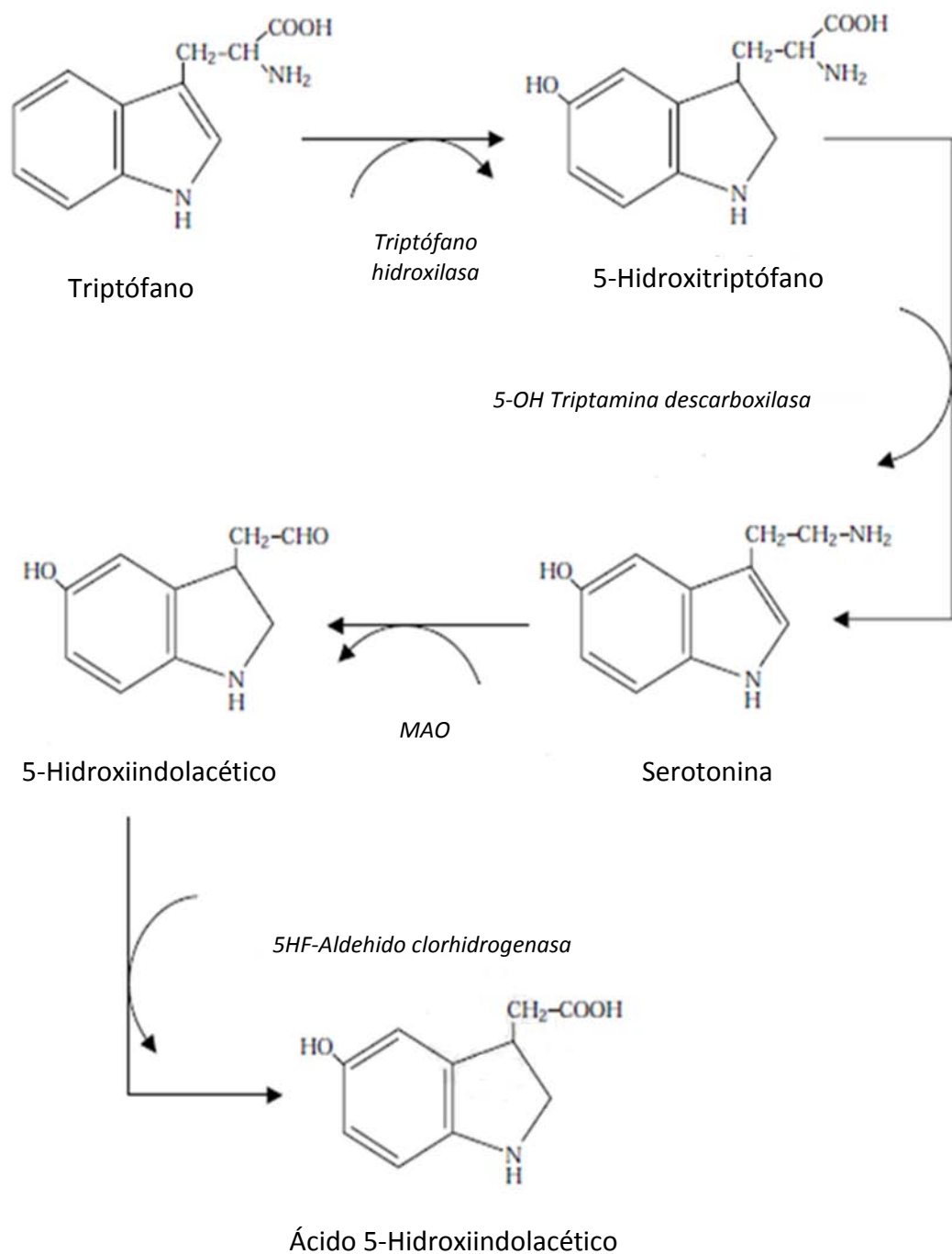


Fig. 2. Síntesis y degradación de la serotonina. Enzimas: Triptófano hidroxilasa, 5-OH Triptamina descarboxilasa, Monoamino-oxidasa (MAO), 5HF-Aldehido clorhidrogenasa (Modificado de Contreras y Mancillas, 2005).

A la serotonina se le asocia con algunos desórdenes psiquiátricos tales como la ansiedad, depresión, agresividad, pánico, esquizofrenia, comportamiento suicida y autismo; en desórdenes neurodegenerativos similares a la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y migraña, así mismo

participa en la modulación de diferentes aspectos de la fisiología como son: el sueño, termorregulación, aprendizaje, memoria, dolor, vasoconstricción, secreción de hormonas por la hipófisis, en el comportamiento sexual y en el funcionamiento de algunas glándulas como las gónadas (Amenta y col., 1992; Amireault y Dubé, 2005; Ayala, 2009; Lesch y Mössner, 1998; Mattson y col., 2004; Mendoza, 2008; Tinajero y col., 1993).

En relación a la función de la serotonina en el testículo se ha mostrado que cuando se administra serotonina por vía sistémica o directamente en el testículo se produce daño en las células germinales que forman parte del túbulo seminífero. Cuando se mantiene en cultivo células de Leydig y al medio se le adiciona serotonina se inhibe la producción de testosterona (Hedger y col., 1995). Con base en estas evidencias se sugiere que la serotonina participa en la modulación de las funciones del testículo, espermatogénesis y esteroidogénesis (Campos y col., 1990).

Aparato reproductor masculino

El aparato reproductor masculino lo conforman: los genitales externos (el pené, órgano de copulación, y los dos testículos que están suspendidos en el escroto) y los conductos deferentes, el epidídimo y las glándulas accesorias asociadas con el sistema de conductos (la vesícula seminal, la próstata y las glándulas bulbouretrales) (de Cowper) (Fawcett, 1995) (Fig. 3).

Testículo

El testículo y el epidídimo están situados dentro de las bolsas escrotales, en donde se mantienen a una menor temperatura a la corporal, lo que es necesario para la producción de espermatozoides viables. La posición de las gónadas es el resultado de su migración desde la pared posterior de la cavidad abdominal donde se desarrolla durante la vida intrauterina (Banks, 1986; Latarjet y Ruiz, 1999).

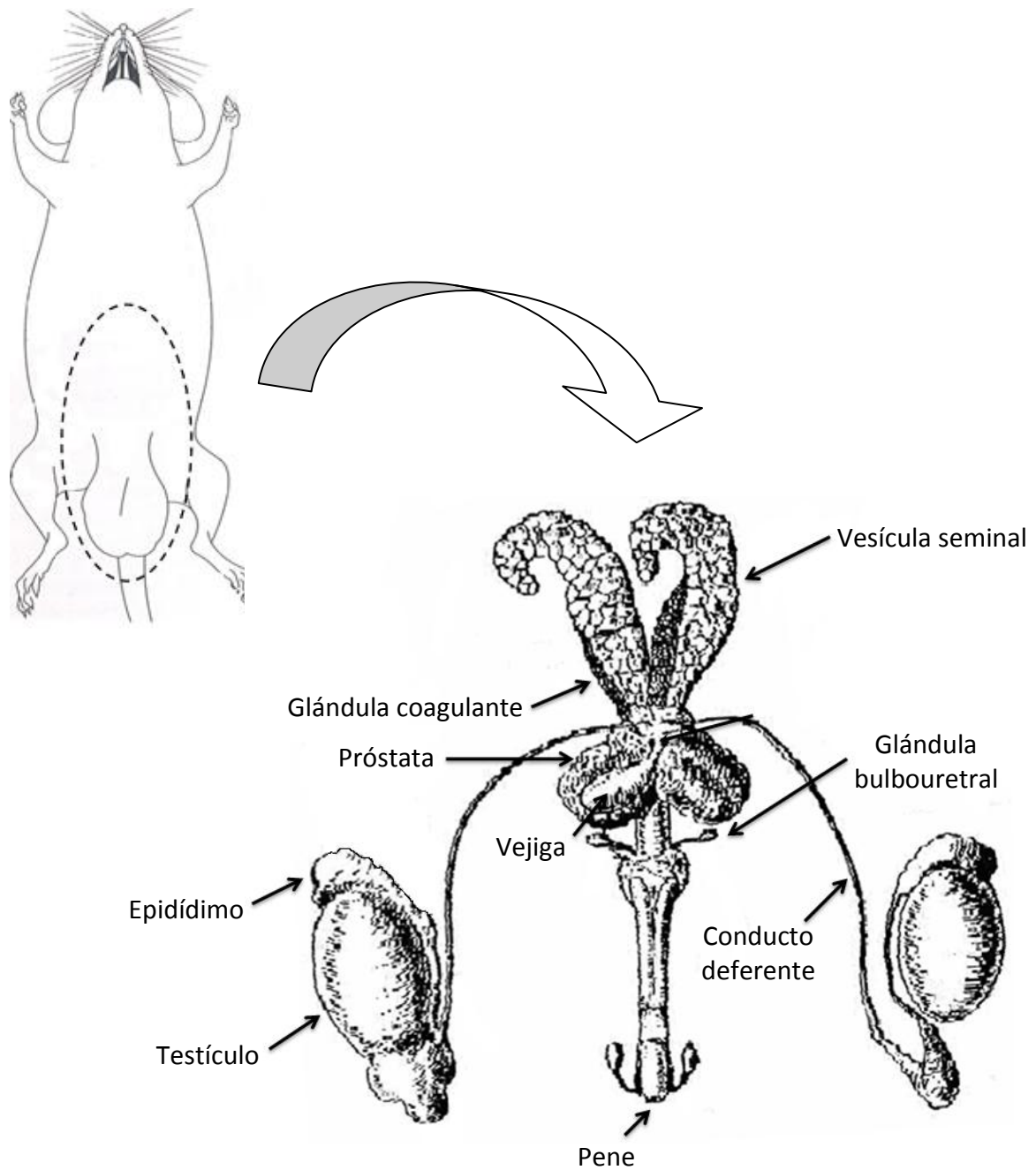


Fig. 3. Aparato reproductor de la rata macho (Modificado de Hedrich y Bullock, 2004; Setchel y col., 1994).

Este órgano se encuentra rodeado por una membrana fibrosa denominada túnica albugínea. Desde el punto de vista anatómico y funcional, el testículo se divide en dos compartimientos, el túbulo seminífero y el tejido intersticial (Banks, 1986; Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007; Rouviere y Delmas, 2005).

El túbulo seminífero externamente está rodeado por vasos linfáticos y células mioides peritubulares, internamente están revestidos por un epitelio estratificado llamado epitelio seminífero (Fawcett, 1995), donde se identifican dos tipos celulares, las de Sertoli que no se dividen una vez alcanzada la pubertad, y las germinales, que están en constante proliferación y diferenciación para formar los espermatozoides (Norman y Litwack, 1997) (Fig. 4).

El compartimiento intersticial, se ubica entre los túbulos seminíferos y está conformado de vasos sanguíneos y linfáticos y células de Leydig, las cuales representan el componente endocrino del testículo y son responsables de la producción de andrógenos como la testosterona (Banks, 1986; Fawcett, 1995; Norman y Litwack, 1997).

Las células mioides son las responsables de las contracciones rítmicas superficiales del túbulo seminífero, además de que poseen receptores para la testosterona (Banks, 1986; Fawcett, 1995).

Las células de Sertoli tienen un núcleo elipsoidal, presentan una o dos invaginaciones en su superficie, un nucléolo central rodeado por dos masas redondeadas de heterocromatina, el citoplasma contiene numerosas mitocondrias, el complejo de Golgi no presenta gránulos ni vesículas de secreción y el retículo endoplásmico rugoso es escaso, aunque el liso es abundante (Fawcett, 1995). Este tipo celular cumple diferentes funciones encaminadas al mantenimiento y diferenciación de las células germinales:

1. Participan en el desarrollo del testículo. Durante la formación del órgano, las células de Sertoli entran en contacto con las células germinales (gonocitos) e inhiben el inicio de la división meiótica (Griswold, 1998).
2. Proporcionan el soporte mecánico para las células germinales.
3. Apoyo nutricional a las células germinales en desarrollo. Las células de Sertoli secretan proteínas, hormonas, factores de crecimiento y nutrientes entre los que se encuentran: Proteína fijadora de andrógeno (ABP) que se

une a la testosterona e impide que salga de la región del túbulo seminífero y por lo tanto se incrementa su concentración para sostener la espermatogénesis; Hormona antimülleriana, que inhibe la formación de los conductos de Müller que formarán el útero y trompas de falopio durante el desarrollo embrionario; Inhibina, cuya función es inhibir la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH); Transferrina que se une a sus receptores específicos presentes en la base de las células de Sertoli y se difunde hacia el citoplasma, donde el hierro es transferido (Banks, 1986; Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007).

4. Contribuye con la formación de la barrera hematotesticular, debido a que las células de Sertoli presentan proyecciones que se unen entre sí y dividen al epitelio seminífero en el compartimiento basal, en el cual se ubican las espermatogonias y espermátocitos preleptoténicos y el adluminal donde se localizan los espermátocitos secundarios, y las espermátides redondas y elongadas (Banks, 1986; Cheng y Mruk, 2002; Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007; Lui y col., 2003).
5. Transporte de las células germinales en diferenciación hacia la luz del túbulo y liberación de los espermatozoides al lumen del túbulo (Banks, 1986; Fawcett, 1995; Gartner, 2007).
6. Fagocitosis del citoplasma que se elimina durante la espermiogénesis (Banks, 1986; Fawcett, 1995; Gartner, 2007).

Funciones del testículo

Los testículos tienen dos funciones: producen las células sexuales o espermatozoides y la secreción de las hormonas esteroideas, como la testosterona y proteicas (inhibina y activina) (Ganong, 1996; Geneser, 2000; Ross y col., 1997).

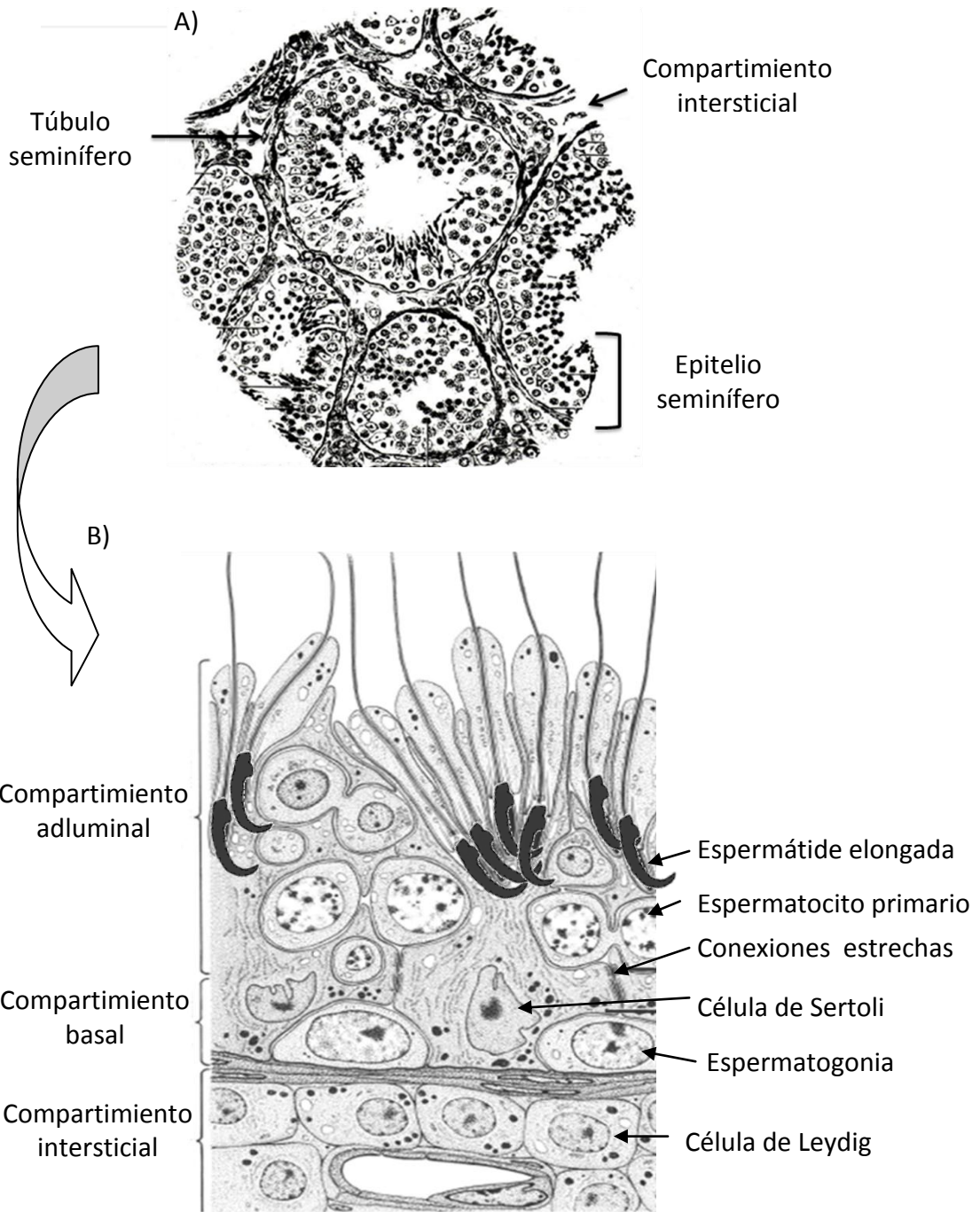


Fig. 4. Corte histológico del testículo y túbulo seminífero que muestra: A) Los túbulos seminíferos; B) La relación entre las células de Sertoli y las germinales (Modificado de Amann y Schanbacher, 1983; Fawcett, 1995).

Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso cíclico durante el cual las espermatogonias, células diploides se multiplican, dividen y diferencian para dar

origen a una célula haploide especializada, el espermatozoide (Banks, 1986; Marina, 2003) (Fig. 5).

La diferenciación de los tipos celulares a partir de las espermatogonias tipo A y B incluye a los espermatocitos primarios y secundarios, y las espermátides redondas y elongadas. Su desarrollo inicia en la base del epitelio seminífero y se desplazan en forma ascendente hacia la superficie libre, a medida que se diferencian a espermatozoides (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007).

Las espermatogonias tipo A son células con forma de cúpula que se ubican sobre la lámina basal del epitelio seminífero, tienen un núcleo ovoide que contienen poca heterocromatina y dos nucléolos que se localizan adyacentes a la membrana nuclear. Las espermatogonias tipo B, se distinguen por su núcleo más redondeado, en el que se observan grumos de heterocromatina, así como un nucléolo central (Banks, 1986; Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007).

Los espermatocitos primarios son células grandes y redondeadas que siguen a la espermatogonia, mientras que los espermatocitos secundarios son células más pequeñas que los espermatocitos primarios (Banks, 1986; Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007).

Las espermátides, son células más pequeñas que los espermatozoides y se localizan en zonas superiores del epitelio hacia la luz del túbulo. Son redondeadas, sus núcleos carecen de grumos de heterocromatina, su citoplasma contiene mitocondrias pequeñas tubulares, retículo endoplásmico y un aparato de Golgi bien desarrollado.

El espermatozoide, se compone de una cabeza y una cola. La cabeza es aplanada con un núcleo condensado y con un acrosoma que rodea de modo parcial la cara anterior del núcleo. La cola se subdivide en cuatro regiones: el cuello, la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007).

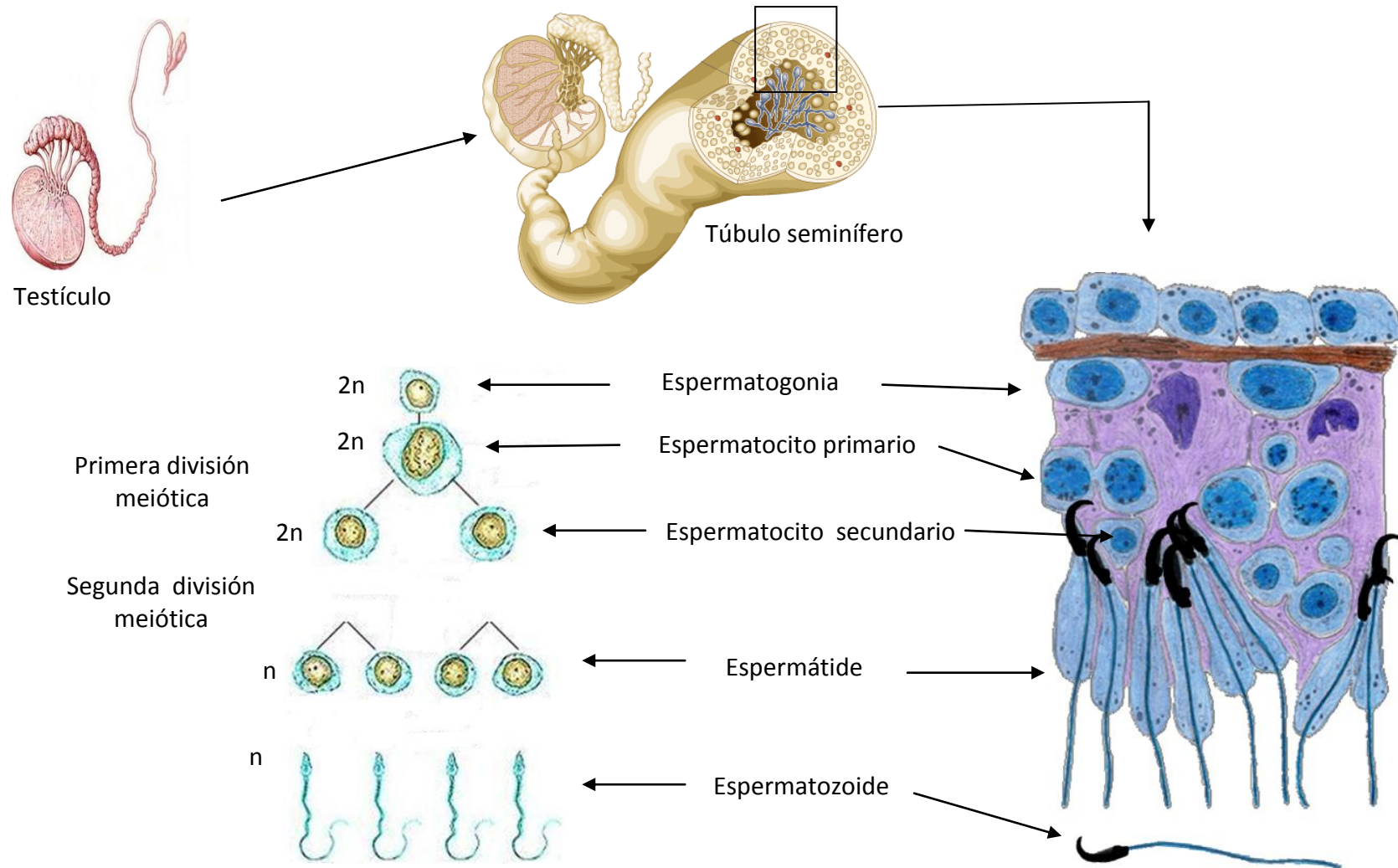


Fig. 5. Túbulo seminífero, tipos celulares presentes y espermatogénesis (Modificado de Amann y Schanbacher, 1983; Candia, 2009; Gartner y Hiatt, 2007).

Durante la espermatogénesis, se incrementa el número de las espermatogonias de tipo A y como resultado de la mitosis se forman las espermatogonia tipo B (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007), las cuales atraviesan la barrera hematotesticular, para formar los espermatocitos primarios (Guyton y Hall, 2007). En estos, se inicia la profase de la primera división meiótica y como resultado se forma el espermatocito secundario que permanece en la interfase por un período de tiempo corto y al concluir la segunda división meiótica se forman las espermátides redondas con un número haploide de cromosomas (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007).

En las espermátides se produce una secuencia de transformaciones citológicas que se dividen en cuatro fases: de Golgi, de cubierta, acrosómica y de maduración (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 2007). Cuando se completa la espermatogénesis, los espermatozoides se desprenden de las células de Sertoli y son liberados al lumen del túbulo para su transporte al sistema de conductos que conforman al aparato reproductor (O'Donnell y col., 2006).

En el túbulo seminífero las células germinales forman asociaciones celulares. La secuencia completa de etapas o asociaciones celulares constituyen un ciclo del epitelio seminífero. En la rata, el ciclo del epitelio seminífero se divide para su estudio en catorce etapas enumeradas del I a la XIV (O'Donnell y col., 2006; Rusell y col., 1990) (Fig. 6).

Cada etapa del ciclo del epitelio seminífero se clasifica con base en los tipos celulares presentes, en la morfología del núcleo, del acrosoma y en el grado de diferenciación de la espermátida. En las etapas I a la VIII se identifican espermatogonias, espermatocitos, espermátides redondas y espermatozoides. En las etapas IX a la XIV se observan espermatocitos y espermátides en diferentes estadios de desarrollo (Fawcett, 1995; Rusell y col., 1990).

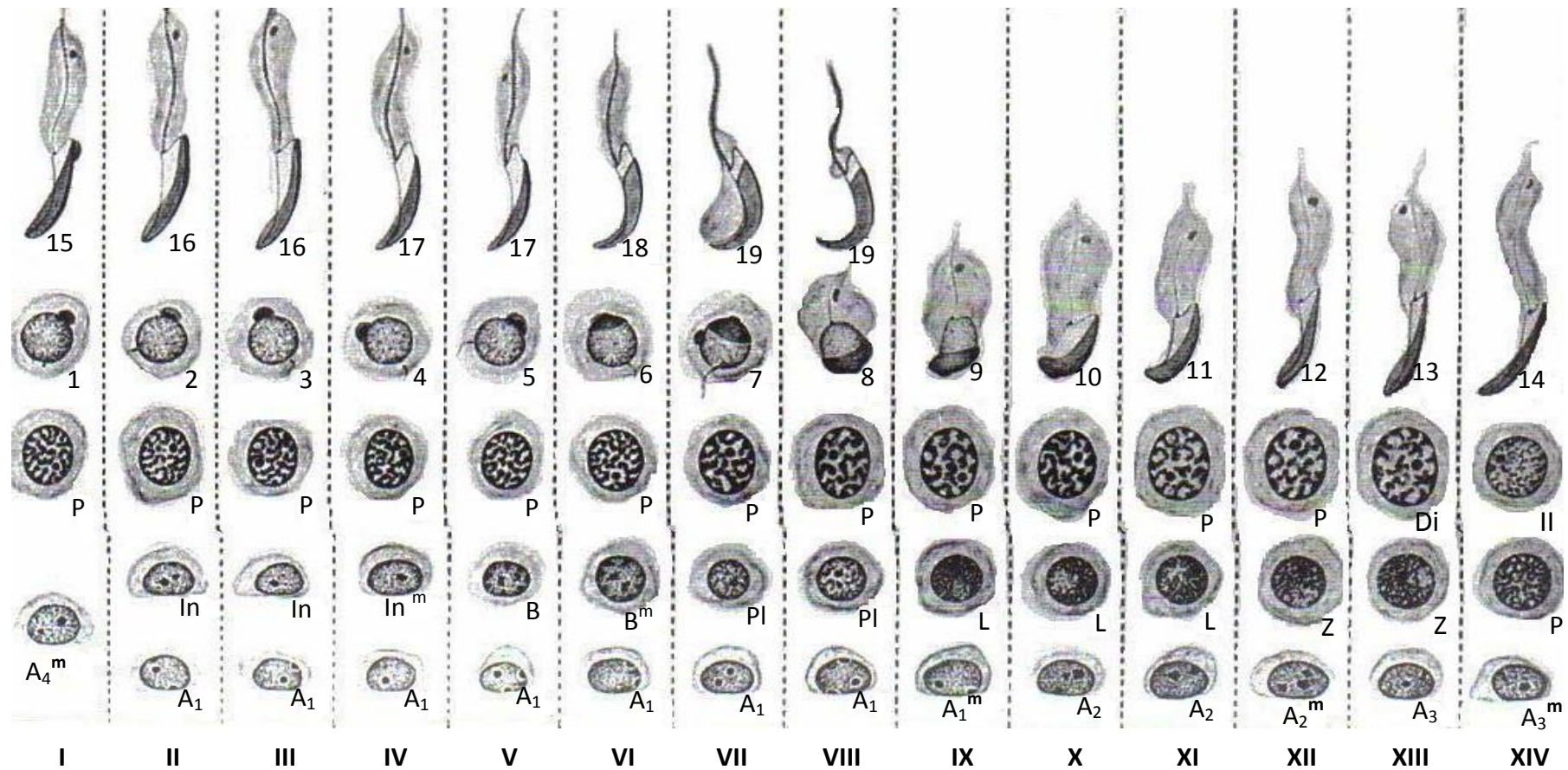


Fig. 6. Representación de las 14 etapas del ciclo del epitelio seminífero en la rata. Espermatogonia (A_{1,2,3,4}), mitosis de la espermatogonia A (A_{1,2,3,4}^m), Espermatogonia B (B), mitosis de la espermatogonia B (B^m), Espermatogonia intermedia (In), mitosis de la espermatogonia intermedia (In^m), Espermatocito preleptoteno (PI), Leptoteno (L), Zigoteno (Z), Paquiteno (P), segunda división meiótica (II), fases de las espermátides del 1 al 19 (Modificado de Kretser y Kerr, 1994).

Esteroidogénesis

El testículo es capaz de sintetizar esteroides a partir del colesterol, esto se conoce como esteroidogénesis (Veiga y col., 2004) (Fig. 7). En las células de Leydig, la producción de esteroides está relacionada con la cantidad de retículo endoplasmático liso, ya que es ahí donde el colesterol es producido y almacenado como compuesto libre o esterificado (Amann y Schanbacher, 1983; Barrios, 2002).

En las células de Leydig se movilizan los depósitos de ésteres de colesterol de las vacuolas del citoplasma y se inicia la síntesis de esteroides (Guyton y Hall, 2007). Estas células sintetizan el colesterol a partir del acetato o lo obtiene de la sangre de las lipoproteínas plasmáticas, como la LDL (lipoproteínas de baja densidad). En la célula de Leydig, el colesterol se reesterifica y acumula en gotitas lipídicas en el citoplasma (Díaz, 2004).

La hormona luteinizante (LH) al unirse a sus receptores de membrana en la célula de Leydig activa la síntesis intracelular del adenosín monofosfato cíclico AMPc, que actúa como segundo mensajero y activa a las enzimas esterasas, responsables de la hidrólisis de los ésteres del colesterol y como consecuencia se inicia la síntesis de los esteroides (Díaz, 2004).

El primer paso de la síntesis de las hormonas esteroides inicia en la membrana interna de las mitocondrias, donde a partir del colesterol se forma la pregnenolona por acción de la enzima monooxigenasa P-450_{scc} (Díaz, 2004).

A partir de la pregnenolona hay dos vías alternativas para la síntesis de testosterona. La vía que se conoce como $\Delta 4$ y que requiere el paso a progesterona, 17- α -hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona; y la vía $\Delta 5$ cuyos compuestos formados son la 17- α -hidroxipregnenolona y la dehidroepiandrosterona (DHEA). En la rata se lleva a cabo la vía $\Delta 4$.

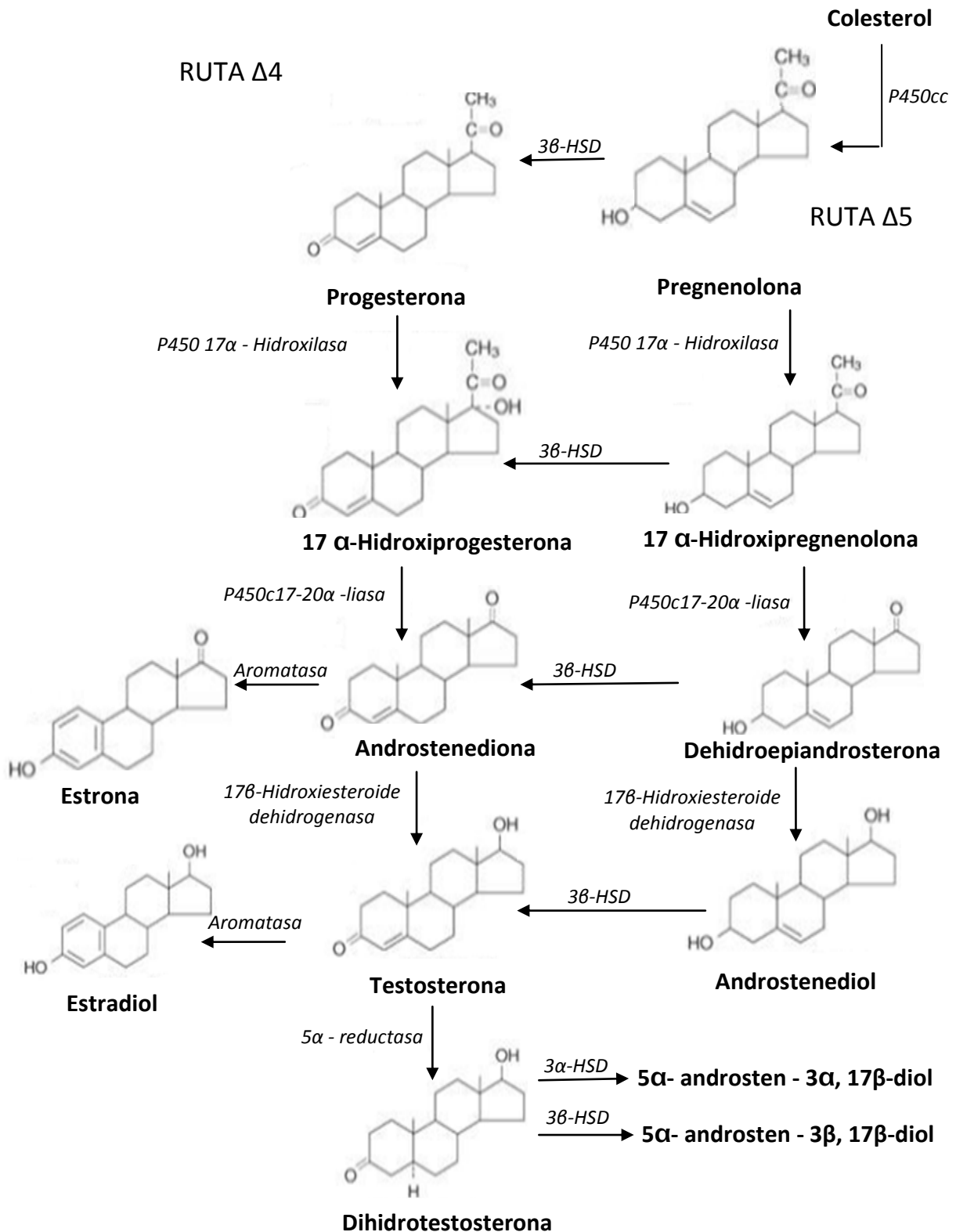


Fig. 7 Esteroidogénesis. Enzimas: P450scc, P45017 α -Hidroxilasa, P450c1720 α -liasa, 17 β -Hidroxiesteroide dehidrogenasa, Aromatasa, 5 α -reductasa, 3 α -HSD (3 α -Hidroxiesteroide dehidrogenasa), 3 β -HSD (3 β -Hidroxiesteroide dehidrogenasa) (Modificado de Colón, 2007).

La testosterona se aromatiza a estrógenos por acción de la enzima aromatasa, p-450 (Díaz, 2004). Debido a que los esteroides son muy liposolubles, una vez sintetizados se difunden a través de la membrana celular y penetran en el líquido intersticial y después a la sangre (Guyton y Hall, 2007).

El testículo también tiene la capacidad de producir estrógenos (Distingher y col., 1989). En la rata inmadura, el principal sitio de aromatización de los andrógenos a estrógenos son las células de Sertoli (Van der Molen y col., 1981), esta actividad es estimulada por la FSH (Le Magueresse y Légou, 1986) y por un factor producido por las células de Sertoli (Carreau y col., 1988). Mientras que en el adulto se produce principalmente en las células de Leydig. También se ha mostrado que en el ratón las espermatídes redondas y elongadas expresan la enzima aromatasa, p-450 y que el estradiol es un factor importante en la regulación de las funciones del testículo (Nitta y col., 1993).

Regulación de las Funciones del Testículo

El funcionamiento del testículo es regulado por la FSH, LH y testosterona. (Dufau y col., 1993) (Fig. 8). Así como por mensajeros químicos que actúan como moduladores autócrinos o parácrinos. Entre estos factores se encuentran los andrógenos y el factor liberador de la corticotropina (CRF) que son producidos por las células de Leydig (Hansson y col., 1975) y las producidas por las células de Sertoli, como la inhibina, activina y factores de crecimiento (Dufau y col., 1993; Holdcraft y Braun, 2004).

En el hipotálamo se secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que al actuar en la hipófisis estimula la liberación de las gonadotropinas (FSH y LH), las que respectivamente regulan la espermatogénesis y la secreción de esteroides sexuales por el testículo (Guyton y Hall, 2007; Holdcraft y Braun, 2004).

La secreción de la GnRH es regulada por las hormonas producidas por el testículo. La testosterona sale a circulación y es transportada hasta el hipotálamo

en donde por un mecanismo de retroalimentación negativo inhibe la secreción de la GnRH y de la LH. Como resultado de esta inhibición, disminuye la secreción de testosterona. La célula de Sertoli secreta la inhibina que actúa en la hipófisis y suprime la secreción de FSH (Amann y Schanbacher, 1983).

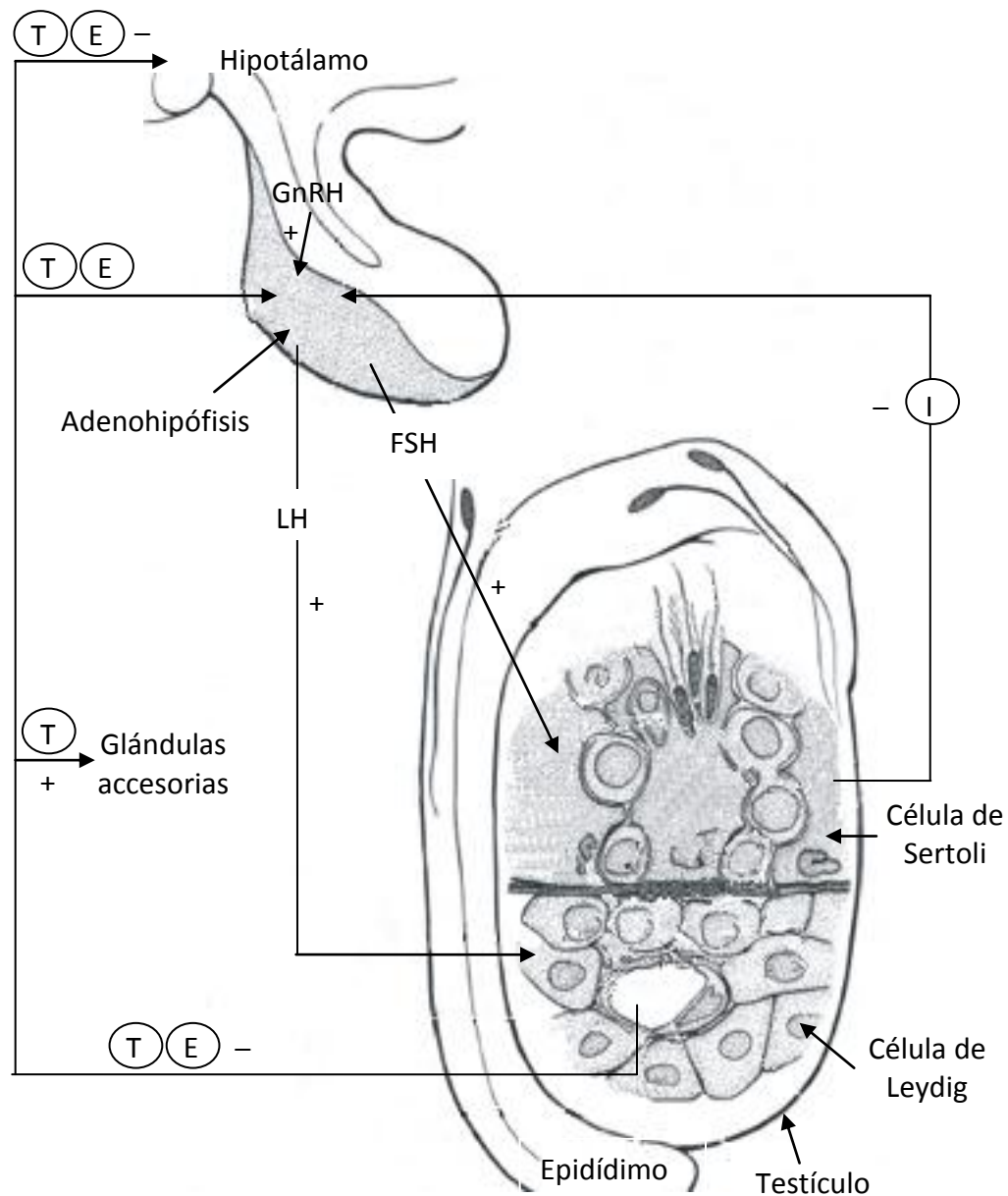


Fig. 8. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Testosterona (T), Estrógenos (E), Inhibina (I), Hormona Folículo Estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), estimulación (+), inhibición (-) (Modificado de Amann y Schanbacher, 1983).

La iniciación de la espermatogénesis y el desarrollo de la capacidad reproductiva del macho requiere de altas concentraciones de testosterona y FSH (Griswold, 1998; Marina, 2003). Los metabolitos de la testosterona, la dihidrotestosterona (DHT) y el estradiol (E2), también ejercen un papel importante en la regulación de la multiplicación y diferenciación de las células germinales (Holdcraft y Braun, 2004).

Se ha sugerido que la FSH es esencial en la iniciación, mantenimiento y restauración de la espermatogénesis (Plant y Marshall, 2001), debido a que en el testículo de la rata inmadura es necesaria para que se inicien las divisiones de las células germinales y también estimula las divisiones meiótica de los espermátocitos primarios hasta que se forman las espermátides (Weinbauer y Nieschlag, 1993). También se ha mostrado que esta hormona interviene en el establecimiento de la talla del testículo (Griswold, 1998).

Russell y colaboradores (1998), mostraron que cuando a ratas inmaduras con hipofisectomía se les administra la flutamida, un antagonista del receptor a la testosterona, se observa que disminuye el peso del testículo, el diámetro del túbulo seminífero, así como la concentración de testosterona. Cuando a estos animales se les administra FSH se observa la recuperación de los parámetros antes mencionados, además en el túbulo seminífero no se modifica el ciclo del epitelio seminífero. Estos datos apoyan la idea de que la FSH y la testosterona son factores esenciales en el mantenimiento de los diferentes tipos celulares del epitelio y como consecuencia en la regulación de una de las funciones del testículo, la espermatogénesis. Estos autores también sugieren que la FSH mantiene esta función testicular en ausencia de testosterona.

En la célula de Sertoli se encuentran los receptores para la FSH, hormona que al interactuar con su receptor, activa una cascada de señalización que culmina con la producción de la ABP, proteína que al unirse a la testosterona asegura la presencia y disponibilidad del andrógeno en el túbulo seminífero. Esta es la vía por la que la FSH aumenta la acción de los andrógenos para el mantenimiento de la espermatogénesis (Hansson y col., 1975).

Chemes y colaboradores (1976) mostraron que la testosterona, dihidrotestosterona (DHT) y 5α -androsteno 3α , 17β diol, ejercen un efecto estimulante en la espermatogénesis, principalmente en la meiosis, debido a que cuando ratas macho prepúberes son tratadas con benzoato de estradiol, disminuye el peso del testículo, el número de células germinales, los espermatozoides en paquiteno y diploteno y la concentración de andrógenos en suero. Cuando a estos animales se les administra un implante de estradiol + testosterona, DHT o 17β diol se previenen los cambios producidos por el benzoato de estradiol, por lo que los autores sugieren que el inicio de la espermatogénesis (primera división meiótica) depende de la presencia en el túbulo seminífero de la testosterona y sus metabolitos.

O'Donnell y colaboradores (1996), mostraron que cuando a ratas macho adultas se les coloca un implante de testosterona por una semana, para suprimir la liberación de LH y después uno de estradiol, para disminuir la secreción de testosterona, disminuye el peso del testículo y el número de espermátides elongadas (etapa VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero). Con base en estos resultados los autores proponen que la testosterona evita la degeneración de las espermátides redondas y por lo tanto es esencial para que se complete el ciclo del epitelio seminífero.

El estradiol, es una hormona que se le asocia con la función del ovario y de los componentes del tracto reproductor de la hembra, pero el hecho de que las células de Leydig expresen receptores a esta hormona (Brinkmann y col., 1980), permite sugerir que este esteroide ejerce un papel en la modulación de las funciones del testículo, como la espermatogénesis. Ebling y colaboradores (2000) mostraron que cuando a ratones con hipogonadismo se les coloca un implante de estradiol, se incrementa el peso del testículo y después de los 35 días del tratamiento, se observan espermátides elongadas, se completa la espermatogénesis. Estos resultados permitieron a los autores proponer que el estradiol favorece la espermatogénesis.

Se ha mostrado que cuando a ratas macho adultas se les colocan implantes con dosis bajas de estradiol, no se producen cambios significativos en

el peso testicular, ni en el número de espermátidas y espermatozoides, mientras que la concentración de LH y de testosterona disminuye. Cuando en el implante se colocan dosis altas del esteroide, disminuyen todos los parámetros antes mencionados. Con base en estas evidencias se sugiere que el estradiol ejerce un papel inhibitorio en la modulación de las funciones del testículo (Robaire y col., 1979).

Cuando a ratas macho se les administra el etinil estradiol del día 2 al 12 de vida y se sacrifican en la etapa adulta, disminuye el peso del testículo, células germinales y de Sertoli, el diámetro de los túbulos seminíferos, la concentración de testosterona, pero no se modifica la concentración de FSH y LH, ni el volumen de las células de Leydig. Estos resultados llevaron a los autores a proponer que los estrógenos durante los primeros días de vida ejercen un efecto inhibitorio en las funciones del testículo (Atanassova y col., 1999).

Con base en la información reportada en la bibliografía se sugiere que el estradiol inhibe (Atanassova y col., 1999; Robaire y col., 1979) o estimula (Ebling y col., 2000) las funciones del testículo, sin embargo, no se sabe con exactitud cual es el papel de esta hormona esteroide en el mantenimiento de la estructura del testículo y en la esteroidogénesis.

Serotonina y funciones del testículo

Con base en estudios de inmunohistoquímica se ha mostrado que las neuronas que producen la GnRH tienen contacto directo con las neuronas serotoninérgicas, que se originan en los núcleos NDR y NMR (Jennes y col., 1982; Smith y Jennes, 2001). Estos datos anatómicos apoyan la idea de que la serotonina participa en la modulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas.

Pinilla y colaboradores (1994), mostraron que cuando a ratas macho prepúberes se les administra la p-clorofenilalanina, un inhibidor de la síntesis de serotonina, no se modifica la secreción de FSH. Estos resultados les permitieron

sugerir que el sistema serotoninérgico no participa en el control de la secreción de gonadotropinas. Cuando los animales son castrados y se les administra 5-HTP, se incrementa la concentración de FSH, lo anterior indica que la serotonina estimula la secreción de esta gonadotropina.

La posibilidad de que la serotonina module la función testicular también se ha mostrado cuando en la rata prepúber se realizan implantes de serotonina y se observa la disminución en la concentración de testosterona, por ello los autores sugieren que la serotonina es capaz de inhibir la función testicular, principalmente la esteroidogénesis (Kinson y Liu, 1973).

La idea de que la serotonina ejerce un papel esencial en la modulación de las funciones del testículo se apoya en el hecho de que, cuando a ratas macho prepúberes se les administra por vía sistémica la p-cloroanfetamina, inhibidor de la síntesis de serotonina, se observa que en la etapa adulta disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo y esto se acompaña de la disminución del número y viabilidad de los espermatozoides (Aragón y col., 2005). También en la rata macho prepúber la administración de p-clorofenilalanina entre los 40 y 44 días de edad, disminuye la espermatogénesis y la función endocrina del testículo, evaluada por la producción de testosterona. Sin embargo, cuando el fármaco se administra entre los 30 a 34 días de edad se activa la función endocrina del testículo debido a que aumenta la concentración de este andrógeno (Shishkina y Borondin, 1988).

Hasta el momento los resultados que se han generado sobre la interrelación funcional que existe entre la inervación serotoninérgica que se origina en los NDR y NMR y la secreción de la GnRH en la rata macho son escasos. Algunos autores consideran que en la rata hembra la inervación que se origina en el NDR estimula la secreción de las gonadotropinas (Ayala y col., 1997), mientras que la que se origina en el NMR parece ejercer un efecto inhibitorio o no participa (Kordón y col., 1994, Monroy y col., 2003).

En la hembra se ha estudiado ampliamente la importancia de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR en la modulación de la

función ovárica. Morello y colaboradores (1985) mostraron que cuando a ratas hembras en proestro se les lesiona el NDR, la concentración de LH disminuye y se bloquea la ovulación. Mientras que, cuando se realiza la estimulación de las neuronas del NDR, no se modifican estos parámetros. Pero cuando a estos animales se les administra un agonista del receptor 2A/2C de la serotonina, (+/-)-DOI, el 80% de los animales ovula y se observa un incremento de la concentración de LH (Maekawa y col., 1999). Conjuntamente estos resultados permiten plantear que el NDR estimula la secreción de LH (Vitale y col., 1987) y la ovulación y que el receptor 2A/2C está involucrado en estos procesos.

Existe poca información relacionada con el análisis de la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR en la regulación de las funciones del testículo. Entre los estudios que abordan este aspecto se encuentran los de Van de Kar y colaboradores (1980), quienes mostraron que cuando a ratas macho adultas se les administra en el NDR la 5,7-dihidroxitriptamina, (neurotóxico del sistema serotoninérgico), se observa la disminución en la concentración de serotonina en el área preóptica media, núcleo hipotalámico ventromedial, arcuato, amígdala central y basal, así como de la LH en el suero, estas evidencias llevaron a los autores a sugerir que la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR ejerce un efecto estimulante en la secreción de esta hormona.

Cuando se induce daño directamente a la inervación serotoninérgica del hipotálamo, también se modifica la estructura y función testicular. En relación a esto se mostró que cuando a ratas adultas se les administra en el tercer ventrículo la 5,6-dihidroxitriptamina, neurotóxico selectivo de las neuronas serotoninérgicas, se induce la degeneración de las espermátides de la etapa 7 del ciclo del epitelio seminífero, disminuye la serotonina cerebral, la concentración de testosterona en el suero (Das y col., 1985). Un efecto similar se observa en la concentración de FSH cuando el neurotóxico se administra en la rata macho prepúber (Collu y col., 1974).

5,6-Dihidroxitriptamina

La 5,6- Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) (Fig. 9) es un neurotóxico que se usa farmacológicamente por la habilidad que tiene de destruir de forma selectiva las terminales nerviosas serotoninérgicas (Commins y col., 1987; Singh y Dryhurst, 1990; Sinhababu y col., 1985). La toxicidad de la 5,6-DHT inicia por su autoxidación, la cual genera compuestos como: quinona, H_2O_2 , O_2^- y HO, que provocan la oxidación de lípidos y proteínas, lo cual lleva a la muerte celular (Singh y Dryhurst, 1990; Sinhababu y col., 1985).

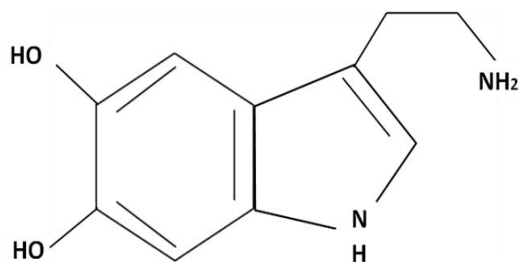


Fig. 9. Estructura química de la 5,6-Dihidroxitriptamina (Modificado de Sinhababu y col., 1985).

JUSTIFICACIÓN

En el hipotálamo existe comunicación anatómica entre las neuronas que secretan la GnRH y las serotoninérgicas que se originan en el NDR. Así mismo, se ha mostrado que cuando se utiliza a la rata como modelo de estudio y se administran por vía sistémica fármacos que modifican la actividad de este sistema de neurotransmisión, se altera la secreción de las gonadotropinas y las funciones del testículo. Sin embargo, hasta el presente no se tiene información sobre la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR sobre el mantenimiento de la estructura del testículo y como consecuencia en su funcionamiento (espermatogénesis y secreción de hormonas esteroides).

Por lo anterior, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de la lesión química de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR, por medio de la microinyección de la 5,6-Dihidroxitriptamina, neurotóxico de las neuronas serotoninérgicas, en las concentraciones de serotonina y 5-HIAA en el hipotálamo, de FSH en el suero y en el ciclo del epitelio seminífero; así como su posible correlación con la producción de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y 17β -estradiol) en la rata prepúber.

HIPÓTESIS

En la rata macho prepúber, la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR ejerce un papel estimulante en la secreción de las gonadotropinas y de los esteroides, por lo tanto la eliminación de esta inervación provocará la disminución en la secreción de la FSH, progesterona, testosterona y 17β -estradiol, así como alteraciones en la estructura del epitelio seminífero.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la lesión química del NDR inducida por la 5,6-Dihidroxitriptamina sobre la estructura del testículo y la secreción de FSH, progesterona, testosterona y 17β -estradiol durante la etapa prepuberal de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-Dihidroxitriptamina en el NDR, en la concentración de 5-HT y 5-HIAA en el hipotálamo (anterior, medio y posterior) en la rata prepúber.
- Estudiar el efecto de la microinyección de la 5,6-Dihidroxitriptamina en el NDR, en la secreción de FSH en la rata prepúber.
- Evaluar el efecto de la microinyección de la 5,6-Dihidroxitriptamina en el NDR, en la producción de progesterona, testosterona y 17β -estradiol en la rata prepúber.
- Analizar el efecto de la microinyección de la 5,6-Dihidroxitriptamina en el NDR, en el ciclo del epitelio seminífero en la rata prepúber.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas macho de la cepa CII-ZV, mantenidas bajo condiciones controladas de iluminación (14 horas luz, 10 horas oscuridad), con libre acceso a la madre hasta el destete (día 21) y posteriormente al agua y al alimento. Los animales se dividieron al azar en tres grupos experimentales (Fig. 10).

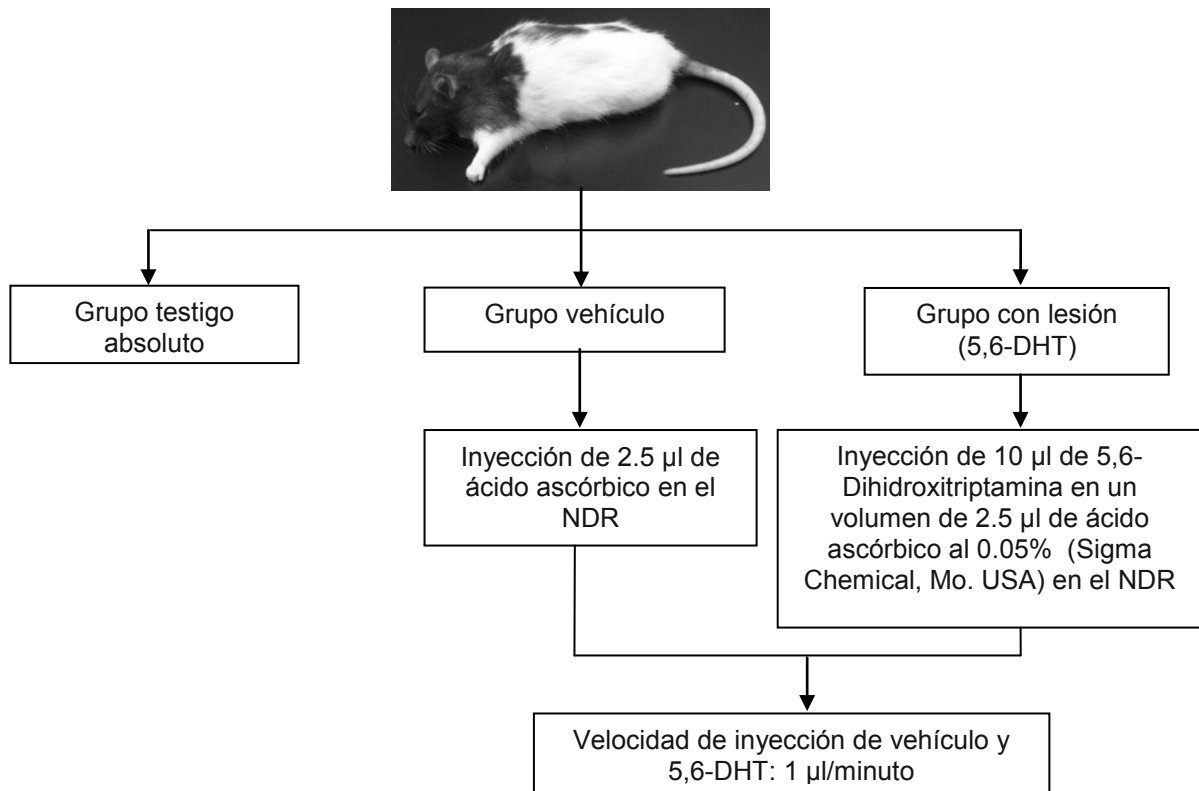


Fig. 10. Asignación de los animales en los diferentes grupos experimentales.

Lesión del núcleo dorsal del raquí

Se utilizaron animales de 30 días con un peso de 70 a 90 g. La lesión del NDR se efectuó entre las 10:00 y 12:30 horas. Los animales se anestesiaron con pentobarbital (Anestésal, Smith Kline Norden de México, México) (40mg/kg) por vía intraperitoneal y se utilizó éter como anestesia complementaria cuando era necesario. La lesión se realizó utilizando un aparato estereotáxico (Fig. 11). Se cortó la piel y con agua oxigenada (1:1) se eliminaron los residuos de tejido hasta limpiar completamente el cráneo. Se procedió a identificar la intersección lambda para localizar NDR siguiendo las coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson

(1982) (Apéndice 1). La aguja de microinyección se inclinó en un ángulo de 30°, se perforó el cráneo con una fresa odontológica y se introdujo la aguja de microinyección hasta el NDR y se procedió a inyectar el ácido ascórbico o la 5,6-Dihidroxitriptamina.

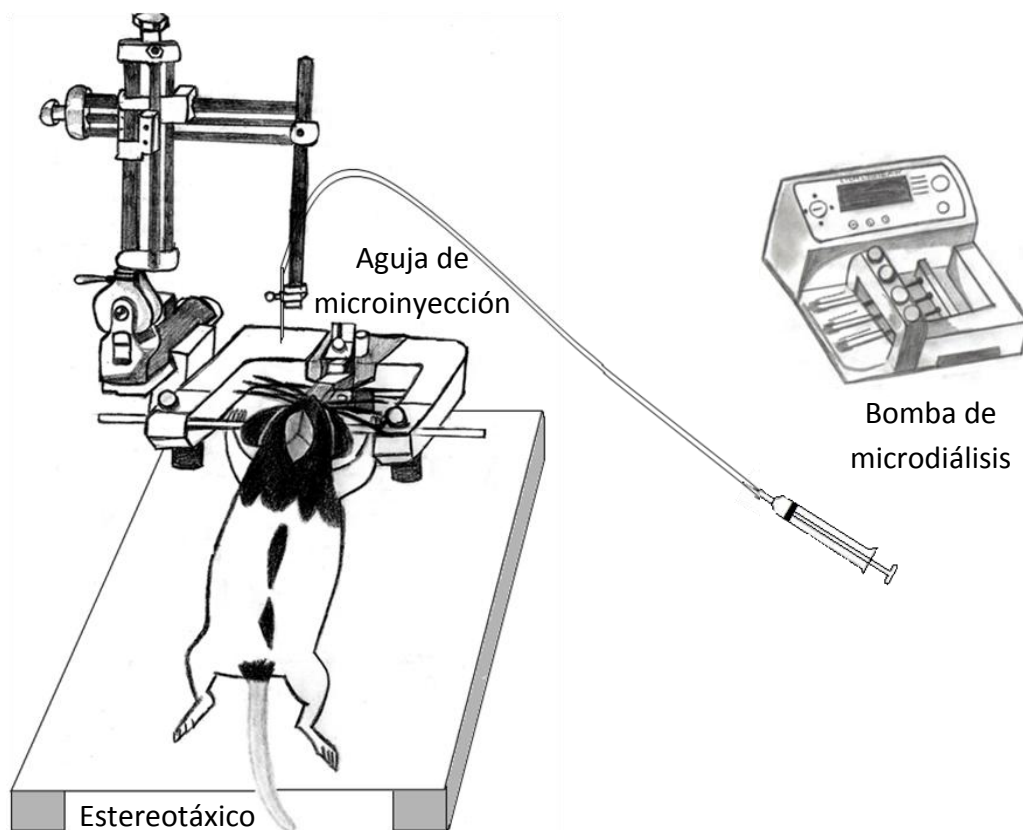


Fig. 11. Esquema donde se muestra la posición del animal en el estereotáxico.

Procedimiento de autopsia

Animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron por decapitación a los 45 ó 65 días de edad, este procedimiento se realizó entre las 12:00 y 13:00 horas. Se colectó la sangre del tronco, para posteriormente centrifugar a una velocidad de 3500 rpm durante 15 minutos. Después se colectó el suero y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior cuantificación de FSH, progesterona, testosterona y 17β -estradiol por radioinmunoanálisis.

En el momento del sacrificio se extrajo el cerebro, se congeló con nitrógeno líquido y se realizó la disección del hipotálamo anterior, medio y posterior (Fig. 12).

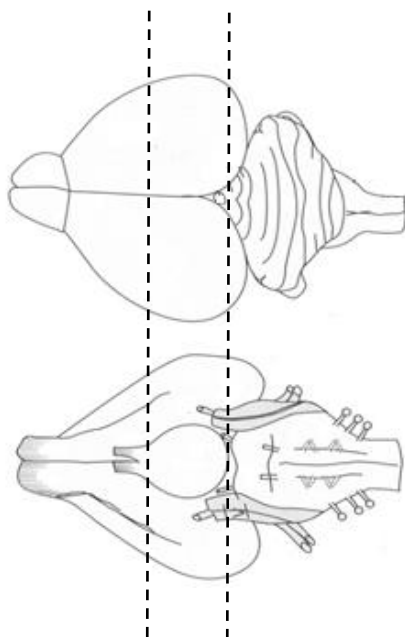


Fig. 12. Vista dorsal y ventral del cerebro donde se muestra la ubicación del hipotálamo (Modificado de Hedrich y Bullock, 2004).

Estas muestras se congelaron a -70° C para la cuantificación de serotonina y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético por la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). La región posterior del cerebro se fijó en formol al 10% para la identificación de la zona de lesión.

En el momento del sacrificio también se realizó la disección de los testículos, que se fijaron en paraformaldehído al 4% para el posterior procesamiento y estudio del ciclo del epitelio seminífero.

Cuantificación de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)

Para cuantificar serotonina y el 5-HIAA se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (Fig. 13). Las condiciones para trabajar fueron las siguientes: la bomba trabajó a un flujo de 1.2 y se encontraba conectada un detector electroquímico, cuyas condiciones de trabajo fueron:

rango de 5 y voltaje de 850 mV y sensibilidad menor de 1000. El detector a su vez se conectó a un integrador. Antes de la evaluación de serotonina y su metabolito en el hipotálamo de los animales de experimentación, el equipo de cromatografía se calibró con estándares de concentración conocida (cuadro 1) y se consideró que el equipo quedó calibrado cuando tenía una correlación de 0.95 a 0.99 entre la concentración y la medida.

Cuadro 1. Preparación de los estándares para calibración del sistema.

Estándar		Acido perclórico 0.1 N
2 ng	50 µl de solución A*	1200 µl
1 ng	500 µl del estándar 2	500 µl
0.5 ng	500 µl del estándar 1	500 µl
0.1 ng	100 µl de estándar 1	900 µl
* Solución A: mezcla de los siguientes estándares: 5-HT y 5-HIAA disueltos en ácido perclórico 0.1 N, concentración: 400 ng.		

Posteriormente las muestras de hipotálamo anterior, medio y posterior se colocaron en un tubo eppendorf y se pesaron en una balanza analítica, se suspendieron en 300 µl de ácido perclórico 0.1 N y se homogeneizaron

Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 30 minutos a -4° C. Posteriormente se colectó el sobrenadante, el cual se filtró. Se tomó una alícuota de 100 µl del filtrado y se inyectó en el sistema de HPLC. La concentración de cada neurotransmisor se expresó en ng/mg, la cual se calculó por la siguiente fórmula:

$$[\text{ng/mg}] = [\text{experimental}] \times \mu\text{l de suspensión} / \mu\text{l alícuota} / \text{peso del hipotálamo}$$

También se calculó la actividad de la neurona serotoninérgica con la fórmula propuesta por Shanon y colaboradores (1986): = [5-HIAA] / [5-HT]

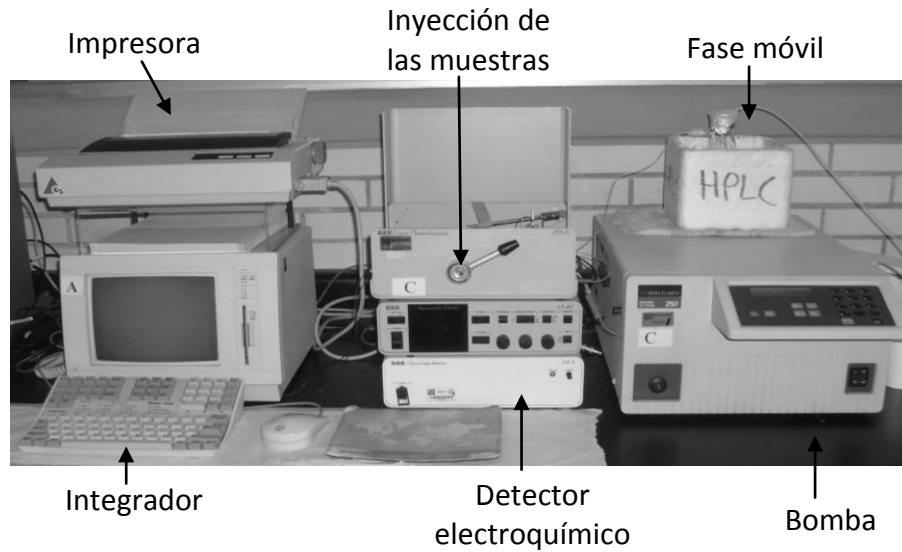


Fig. 13. Sistema de cromatografía de alta resolución.

Identificación de la zona de lesión

Para analizar el sitio de lesión y la trayectoria de la aguja de microinyección, en un vibratomo se realizaron cortes coronales de la región posterior del cerebro de 20 μm de grosor y con ayuda de un estereoscopio se procedió a realizar la identificación del sitio de lesión y sólo se consideraron los resultados que se obtuvieron en los animales a los que se les lesionó completamente el NDR (Fig. 14).

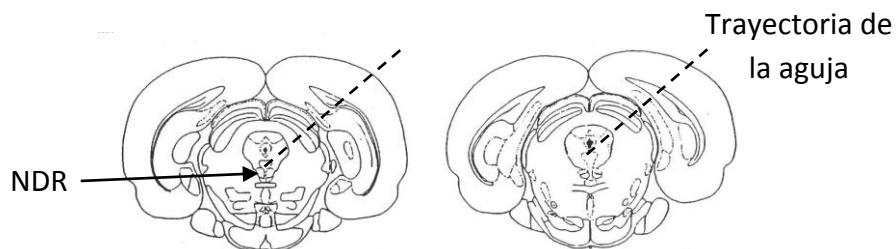


Fig. 14. Esquema de la localización del NDR y trayectoria de la aguja de inyección (Modificado del atlas de Paxinos y Watson, 1982).

Inclusión y tinción de testículo

Los testículos se deshidrataron e incluyeron en parafina, posteriormente en un microtomo se realizaron cortes histológicos de 5 μm de grosor y se tiñeron con la técnica Hematoxilina-PAS y se procedió a realizar la evaluación del ciclo del epitelio seminífero.

Evaluación del ciclo del epitelio seminífero

Para el análisis de las etapas del ciclo del epitelio seminífero en el testículo de los diferentes grupos experimentales, se analizaron al azar 100 túbulos seminíferos, a los cuales se les midió el diámetro mayor y el perpendicular a éste, con un ocular micrométrico y en ese momento se determinó la etapa del ciclo del epitelio seminífero del túbulo medido, siguiendo los criterios de Rusell y colaboradores (1990) (Cuadro 2). También se evaluó si los túbulos presentaban una organización anormal en el epitelio.

Cuadro 2. Características para la identificación de las etapas del ciclo del epitelio seminífero.

Etapa del ciclo	Características
I	Espermatogonias tipo A pálidas y oscuras, espermatocitos en paquiteno y espermátides.
II	Espermatogonias tipo B, espermatocitos en paquiteno y espermátides.
III	Espermatogonias tipo A pálidas, espermatocitos primarios en leptoteno y paquiteno y espermátides.
IV	Espermatogonias tipo A oscuras, espermatocitos primarios en leptoteno y paquiteno y espermátides.
V	Espermatogonias tipo A oscuras, espermatocitos en leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno y espermátides.
VI	Espermatogonias tipo A pálidas, espermatocitos primario en división y secundarios en interfase y espermátides.
VII	Espermatogonias, espermatocitos, espermátides redondas y espermatozoides.
VIII	Espermatogonias, espermatocitos, espermátides redondas y espermatozoides.

IX	Espermatocitos y espermátides en diferentes estadios de desarrollo. Las diferentes etapas de espermátides es evaluaron con base en la diferenciación del acrosoma.
X	
XI	
XII	
XIII	
XIV	

Cuantificación de FSH, progesterona, testosterona y 17 β -estradiol en suero

La evaluación de la concentración de FSH se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo, utilizando NIAMDD-Rat-FSH-RP-2. La concentración de esta hormona se expresó en ng/ml. La cuantificación de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, para lo cual se utilizó un kit Coat-A-count, USA, la concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/ml y la de 17 β -estradiol en pg/ml.

Análisis estadístico de resultados

Las concentraciones de serotonina, del ácido 5-hidroxiindolacético, FSH, progesterona, testosterona, 17 β -estradiol, diámetro y etapa de los túbulos seminíferos, la distribución de túbulos anormales por estadio se analizaron por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA) seguida por la de Tukey. El porcentaje de túbulos anormales se analizó por la prueba de Ji cuadrada. Se consideraron diferencias significativas entre los grupos cuando la p era igual o menor del 0.05.

RESULTADOS

Concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético

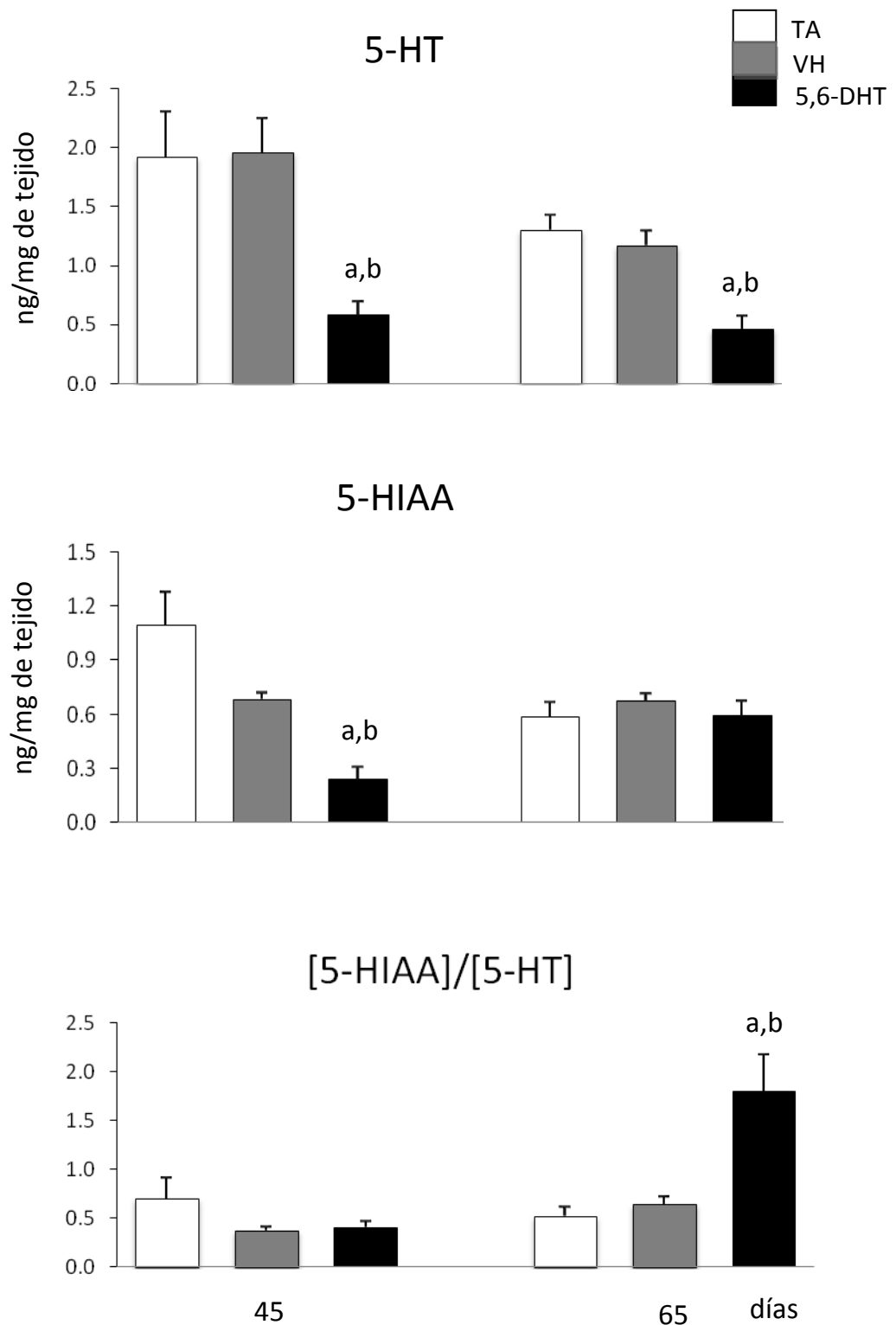
En los animales con microinyección de ácido ascórbico en el NDR y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad, la concentración de serotonina, del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ en el hipotálamo anterior, medio y posterior no se modificó en comparación con el grupo testigo, únicamente se observó la disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo medio de los animales sacrificados a los 65 días (Figs. 15, 16 y 17).

En el hipotálamo anterior y medio de los animales con lesión del NDR inducida por la microinyección de la 5,6-DHT y sacrificados a los 45 ó 65 días, la concentración de serotonina disminuyó significativamente en relación con el grupo TA o con VH (Figs. 15 y 16).

En comparación con el grupo testigo y vehículo, en el hipotálamo medio de los animales con microinyección de 5,6-DHT y sacrificados a los 45 ó 65 días, la concentración del 5-HIAA disminuyó, mientras que en el hipotálamo anterior se observa este comportamiento únicamente en los animales sacrificados a los 45 días (Figs. 15 y 16).

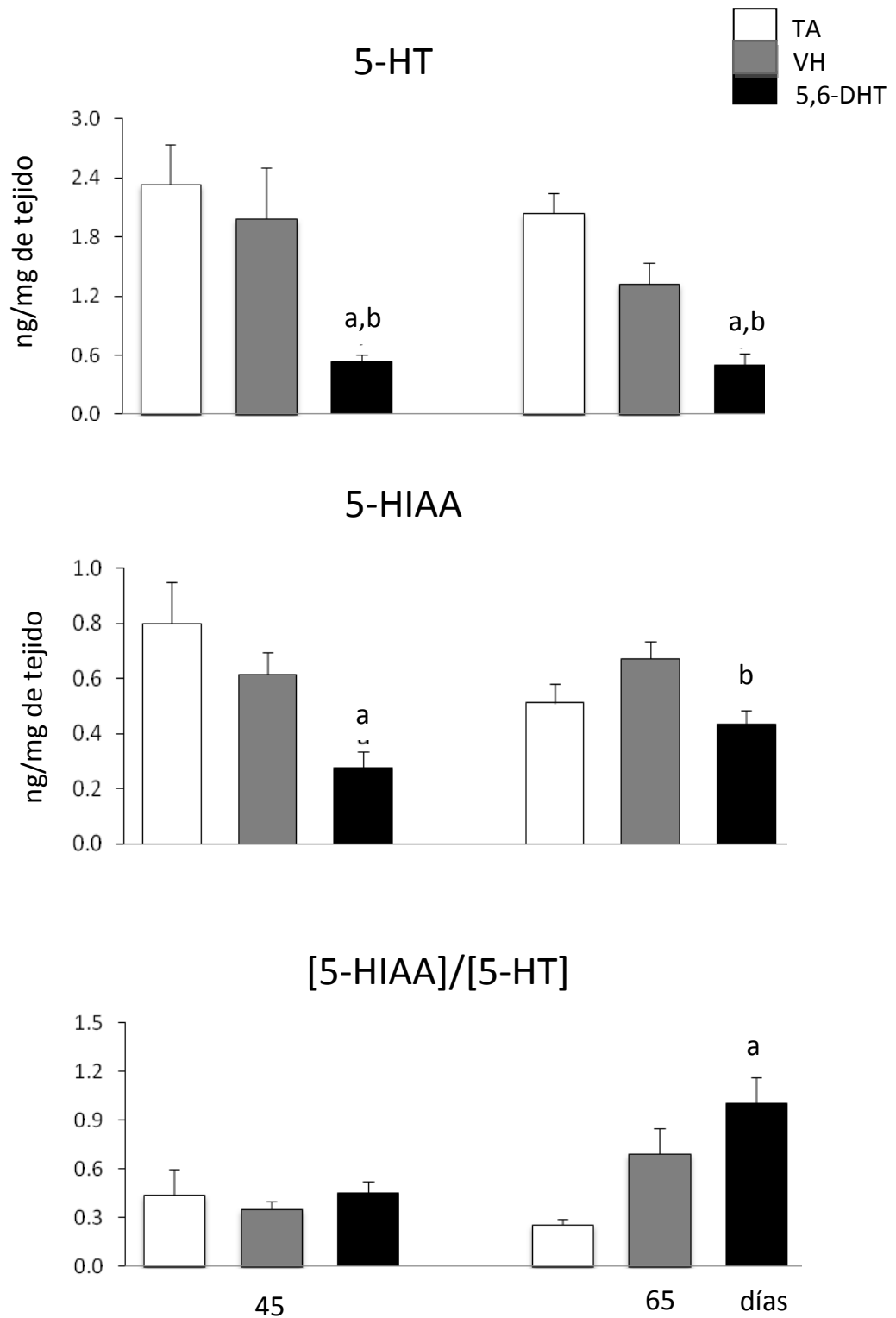
En el hipotálamo anterior y medio de los animales con lesión del NDR y sacrificados a los 65 días, la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ aumentó, mientras que en los animales sacrificados a los 45 días no se observaron cambios en ninguna de las regiones del hipotálamo en comparación con el grupo TA o VH (Figs. 15, 16 y 17).

En los animales con microinyección de 5,6-DHT y sacrificados a los 45 ó 65 días se observó una disminución en la concentración de serotonina en comparación con el grupo testigo o vehículo en el hipotálamo posterior, mientras que la concentración del metabolito así como la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ no se modificó (Fig. 17).



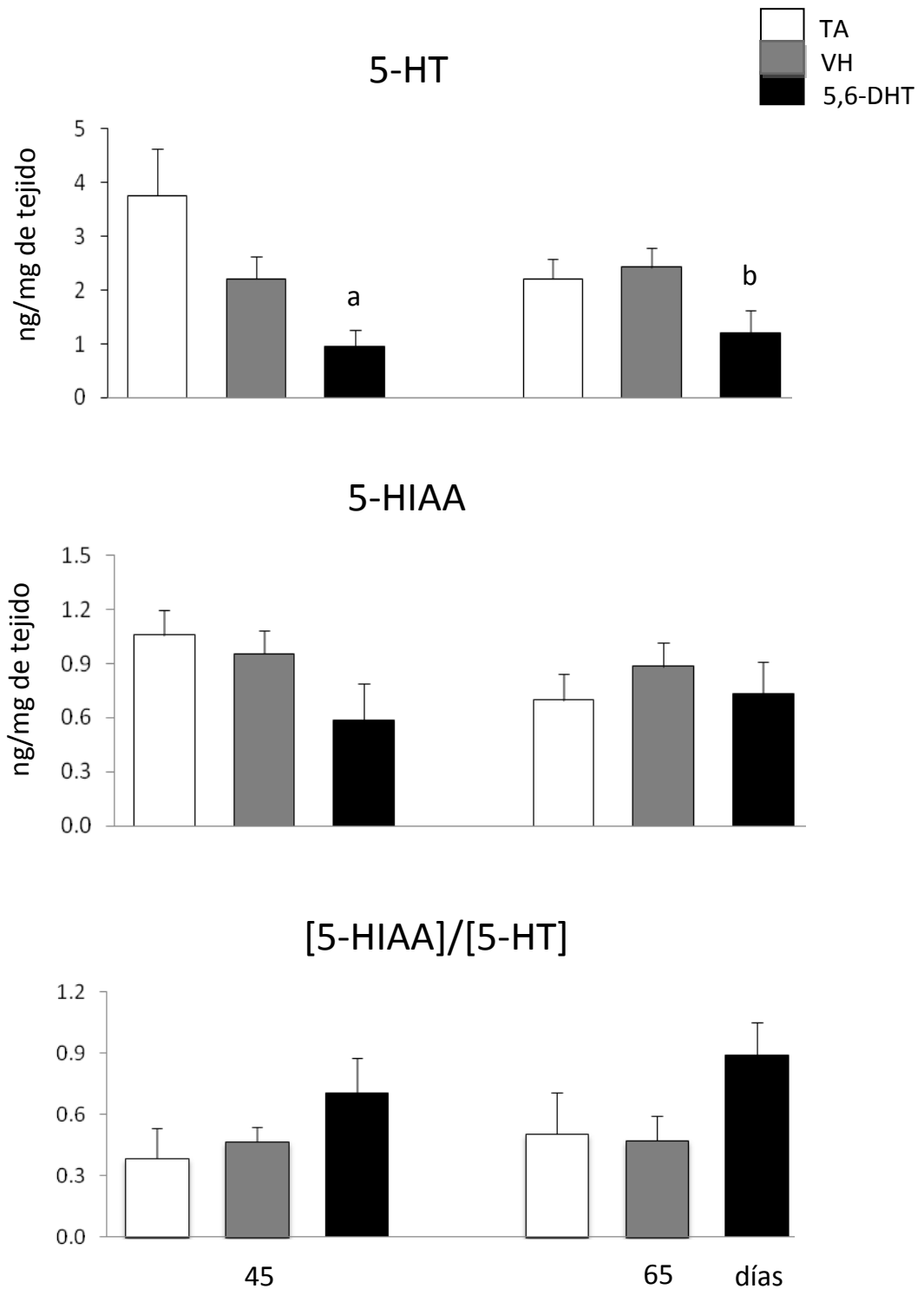
a, $p < 0.05$ vs. TA; b, $p < 0.05$ vs. VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Fig. 15. Concentración (media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo anterior de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 ó 65 días de edad.



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

Fig. 16. Concentración (media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo medio de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 ó 65 días de edad.



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

Fig. 17. Concentración (media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo posterior de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 ó 65 días de edad.

Concentración de FSH, progesterona, testosterona y 17 β -estradiol

La concentración de FSH y progesterona en el suero de los animales con microinyección de ácido ascórbico o 5,6-DHT en el NDR no se modificó en comparación con el grupo de animales testigo absoluto (Figs. 18 y 19).

En los animales con lesión en el NDR y sacrificados a los 45 ó 65 días, la concentración de testosterona y 17 β -estradiol en el suero disminuyó significativamente en comparación con el grupo testigo o con vehículo (Fig. 19).

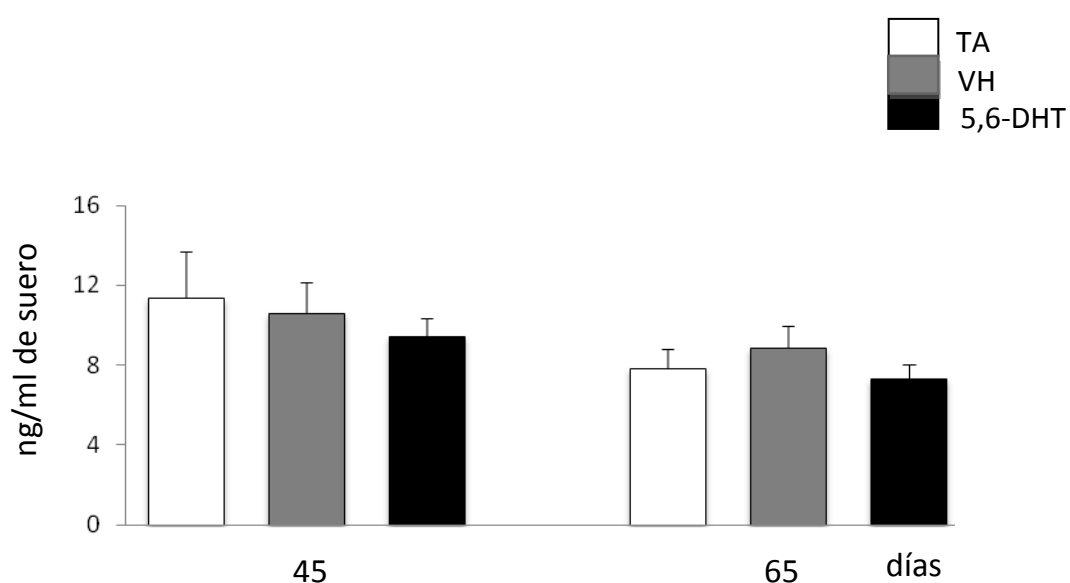
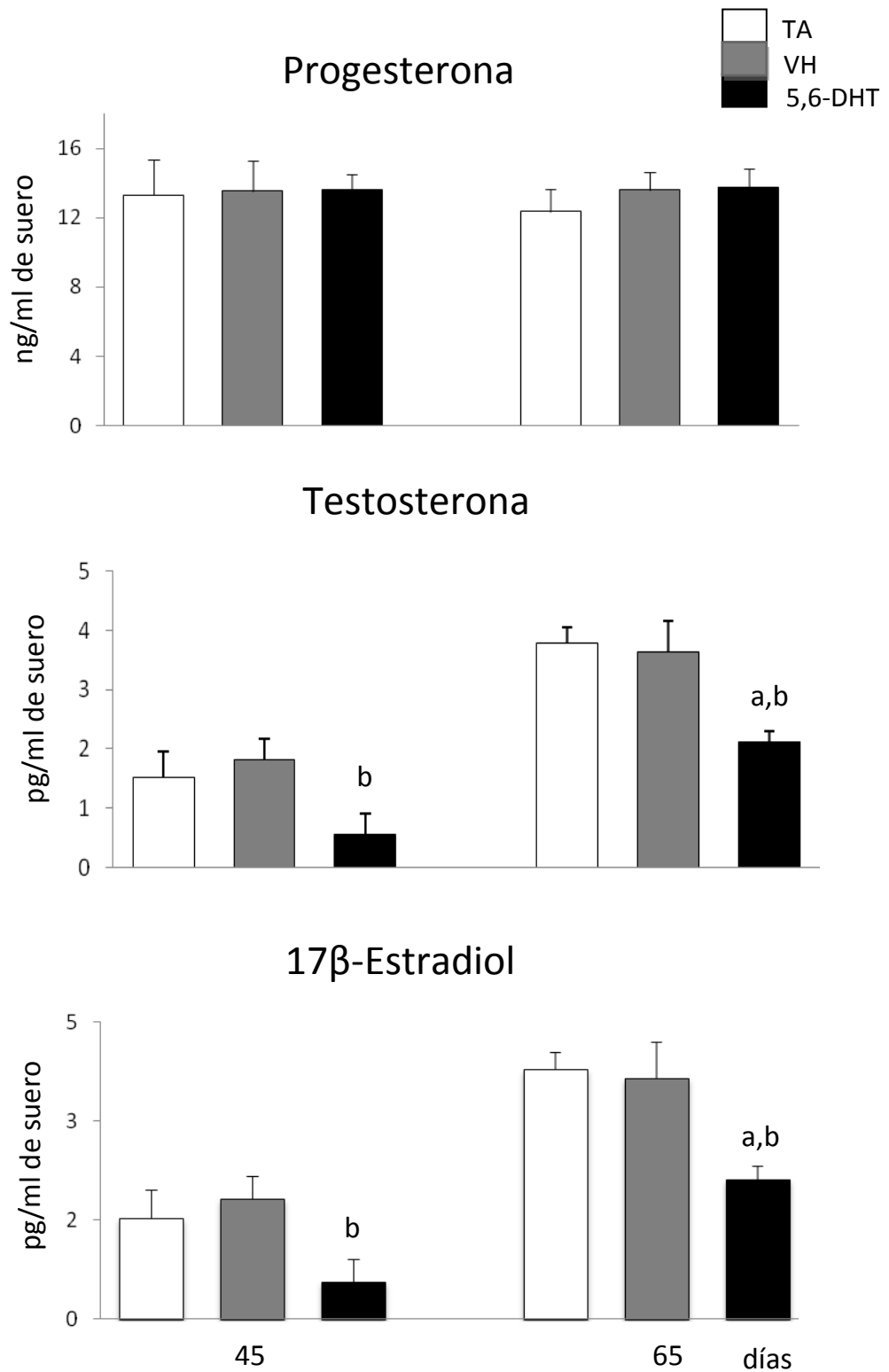


Fig. 18. Concentración (media \pm e.e.m.) de la hormona foliculo estimulante (FSH) en el suero de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 ó 65 días de edad.



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

Fig. 19. Concentración (media \pm e.e.m.) de progesterona, testosterona y 17β -estradiol en el suero de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 ó 65 días de edad.

Ciclo del epitelio seminífero

La microinyección de ácido ascórbico o de 5,6-DHT en el NDR no modificó el diámetro (Fig. 20), ni en el número de túbulos seminíferos por estadios en los animales sacrificados a los 45 ó 65 días en comparación con el grupo testigo o con VH (Figs. 21 y 22).

En los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR y sacrificados a los 45 ó 65 días, se observó el aumento significativo en el porcentaje de túbulos seminíferos anormales en comparación con el grupo testigo o con vehículo (Fig. 23).

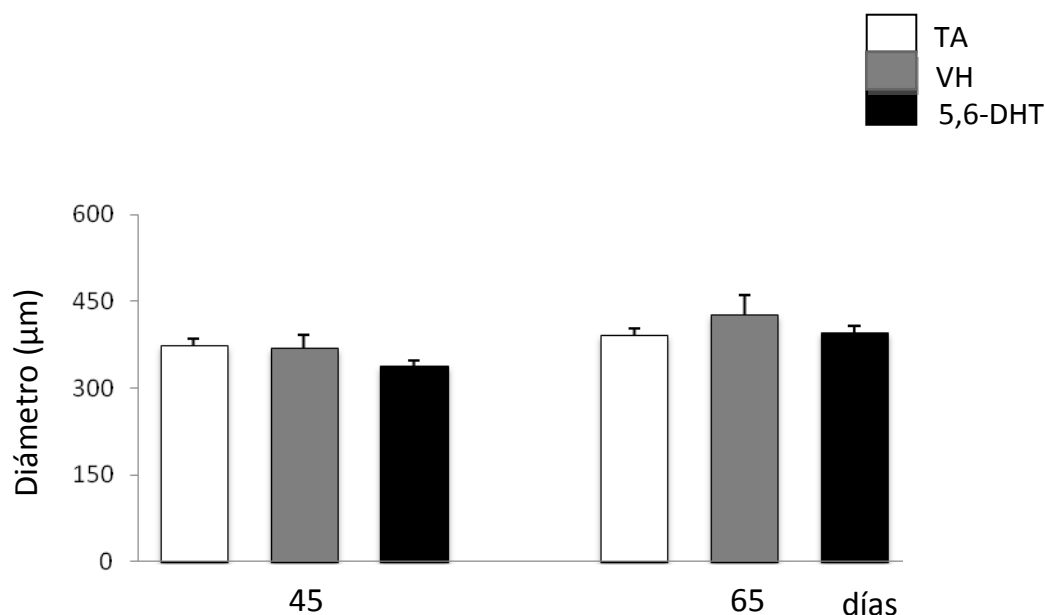


Fig. 20. Diámetro de los túbulos seminíferos (media \pm e.e.m.) de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 ó 65 días de edad.

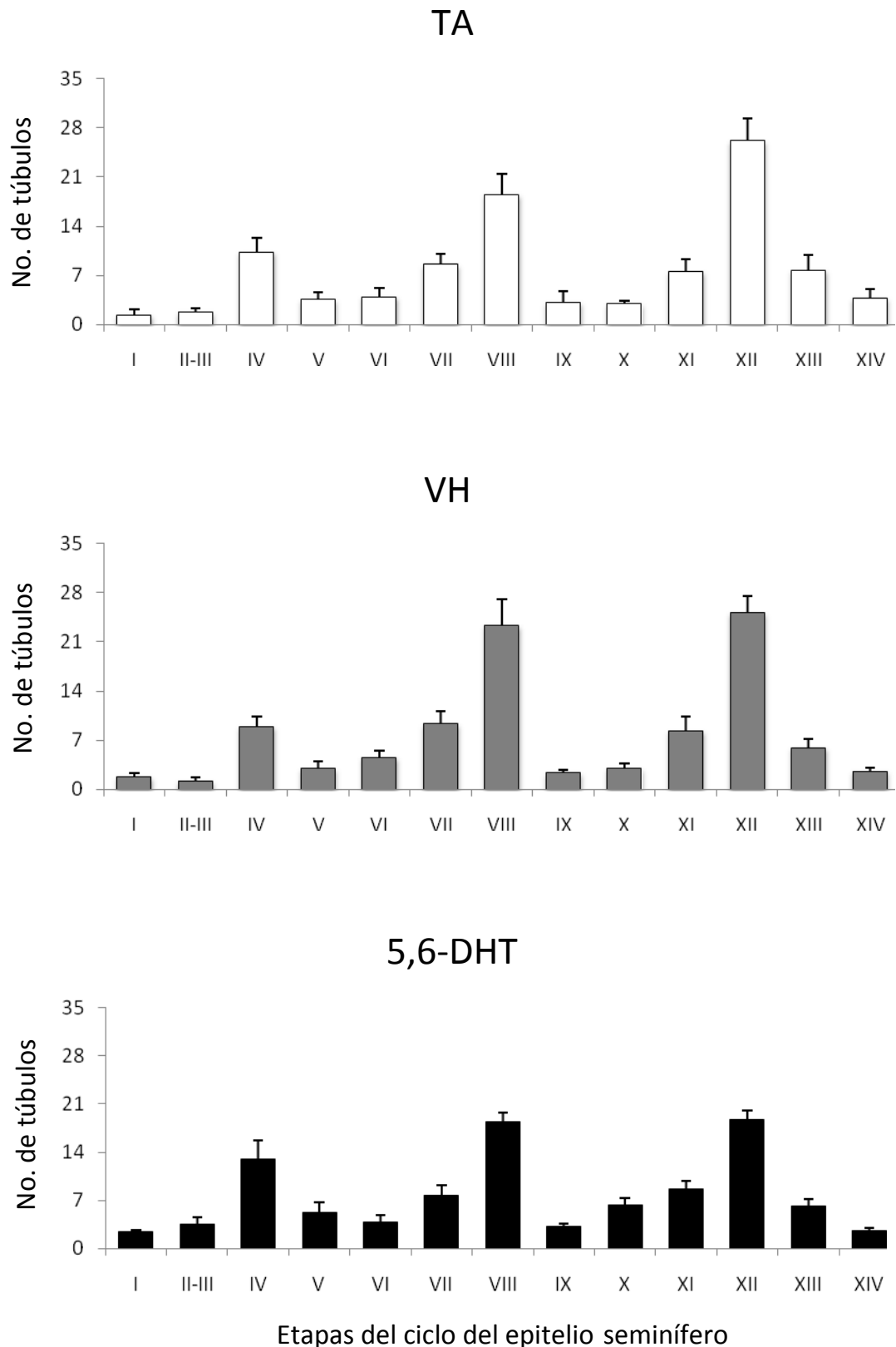


Fig. 21. Distribución de túbulos seminíferos (media \pm e.e.m.) en los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 días de edad.

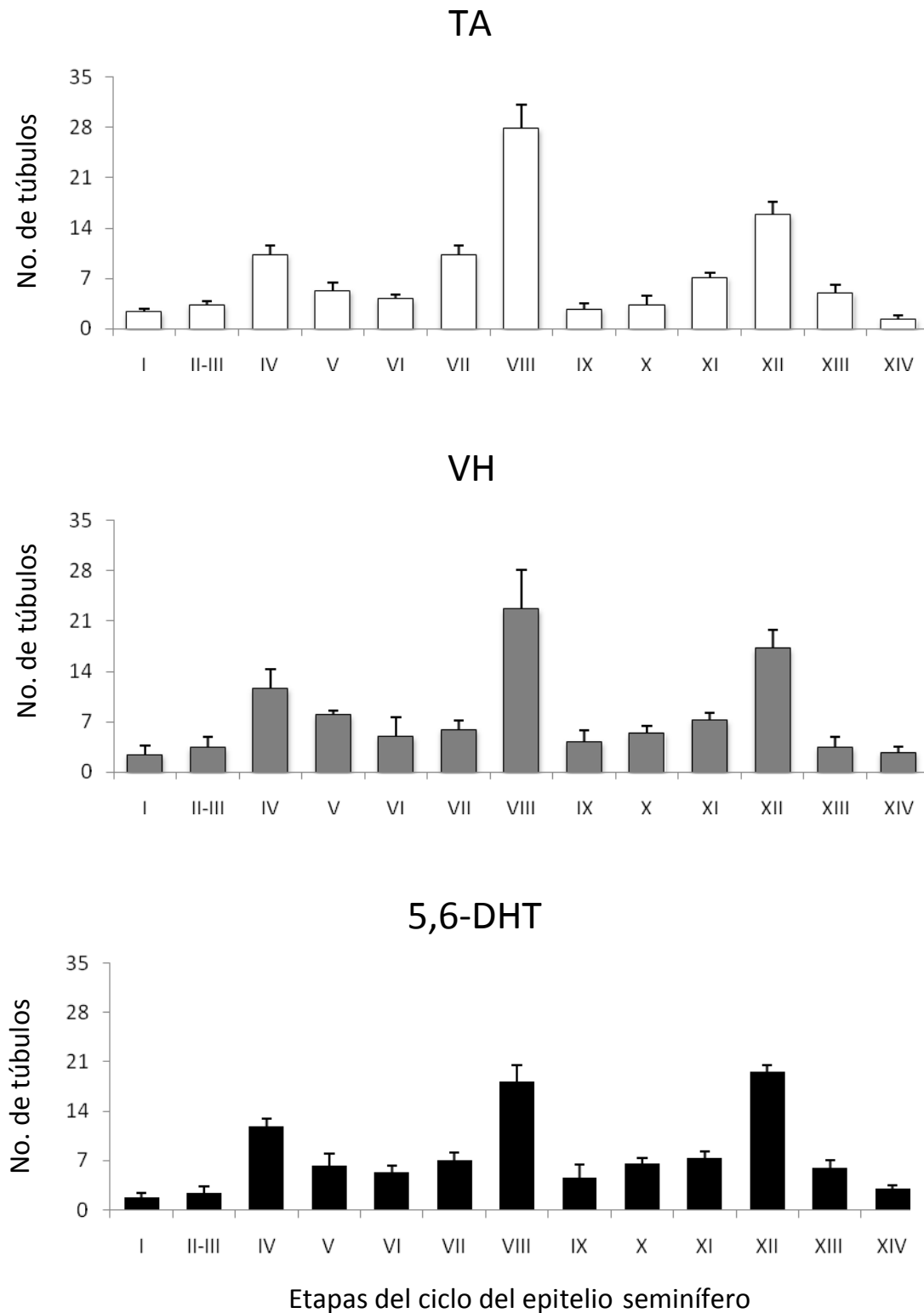
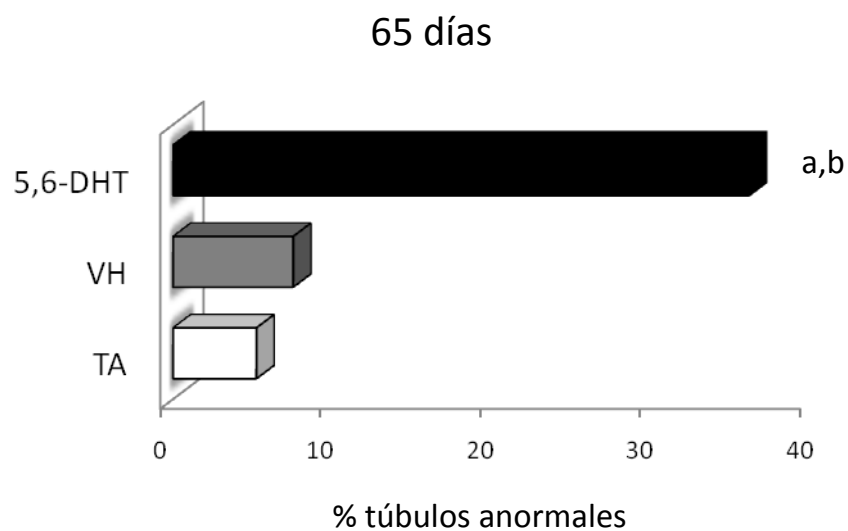
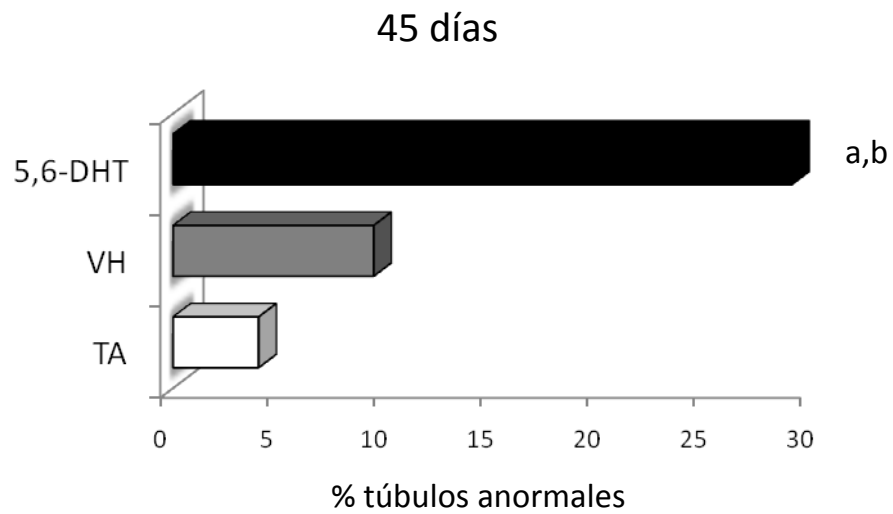


Fig. 22. Distribución de túbulos seminíferos (media \pm e.e.m.) en los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 65 días de edad.



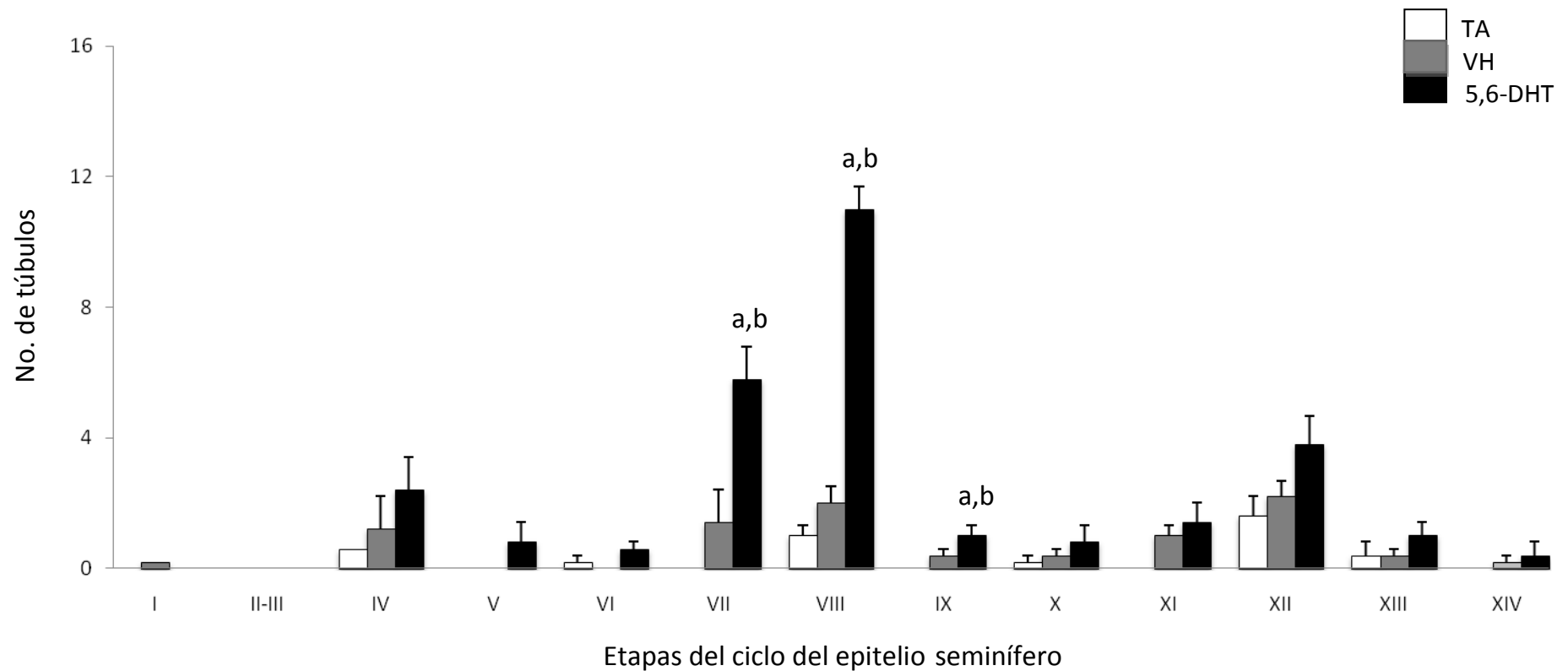
a, $p < 0.05$ vs TA; b, $p < 0.05$ vs VH (prueba de χ^2)

Fig. 23. Porcentaje de túbulos anormales de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 ó 65 días de edad.

En los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR y sacrificados a los 45 días, se observaron túbulos seminíferos con una forma circular pero con un mayor porcentaje de anomalías en comparación con el grupo TA o VH (5,6-DHT 29%, VH 9% vs TA 4%, $p < 0.05$) caracterizados por la presencia de alteraciones en el arreglo de las células germinales en los túbulos cuyo epitelio presentaba y que se caracterizan por tener en su epitelio: espermatogonias A, espermatocitos en preleptoteno, paquitenos, espermátides redondas y espermatozoides (VII y VIII); espermatogonias A, espermatocitos en leptoteno, paquitenos y espermátides alargadas (XI) (Fig. 24).

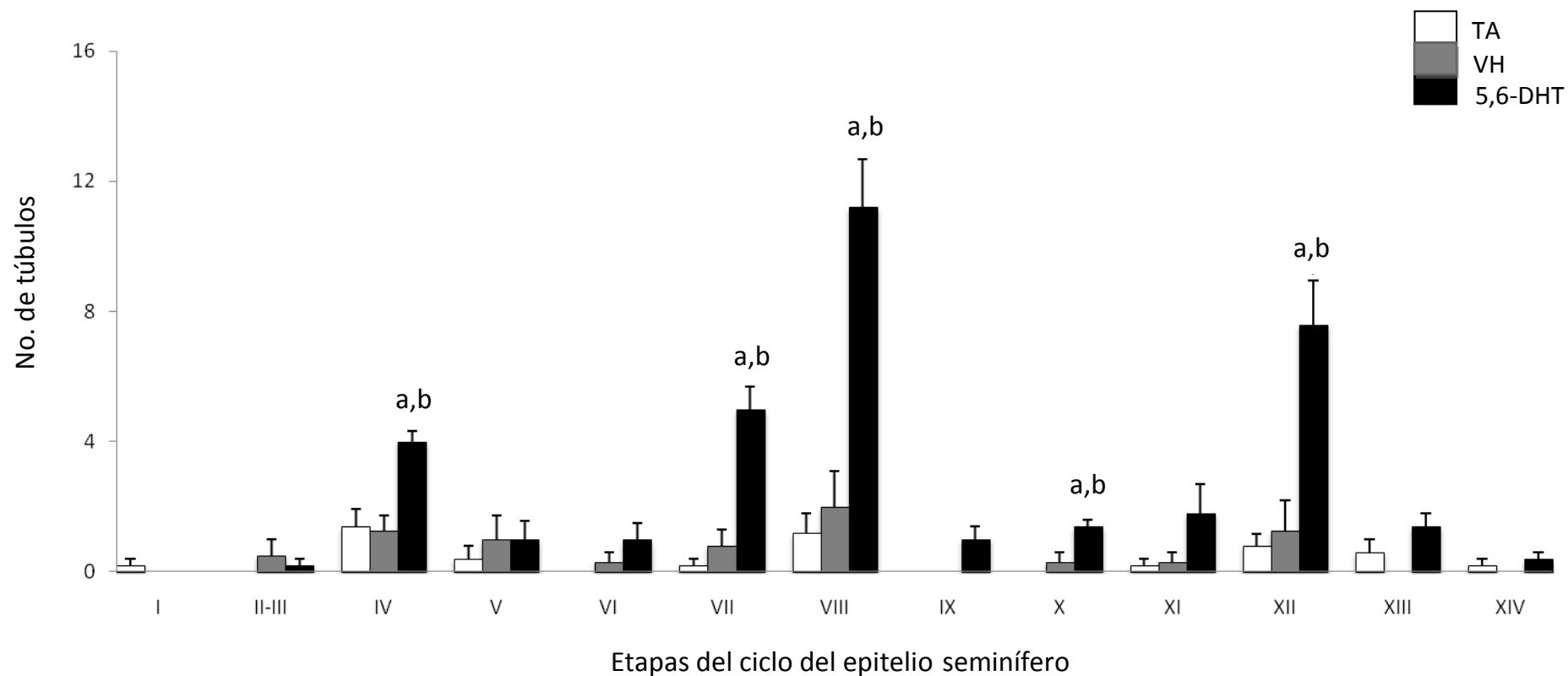
Mientras que en los animales con microinyección de 5,6-DHT y sacrificados a los 65 días, también se observó un mayor porcentaje de anomalías (5,6-DHT 36%, VH 7.5% vs TA 5.2%, $p < 0.05$), estas alteraciones fueron evidentes en los túbulos en estadios IV, VII, VIII, X y XII (Fig. 25) que se caracterizan por tener en su epitelio: espermatogonias A, espermatocitos en preleptoteno, paquitenos, espermátides redondas y espermatozoides (VII y VIII); espermatogonias A, intermedias, espermatocitos en paquitenos, espermátides redondas y alargadas (IV); espermatogonias A, espermatocitos en leptoteno, paquitenos, espermátides alargadas (X); espermatogonias A, espermatocitos en zigoteno, paquitenos, espermátides alargadas (XII).

Los tipos de anomalías que se presentaron en los animales con microinyección de 5,6-DHT en el NDR y sacrificados a los 45 y 65 días fue la presencia de espermátides y cabeza de espermatozoides sin flagelo en el lumen de los túbulos (Figs. 26,27 y 28). Siendo la primera la que se encontró en mayor proporción.



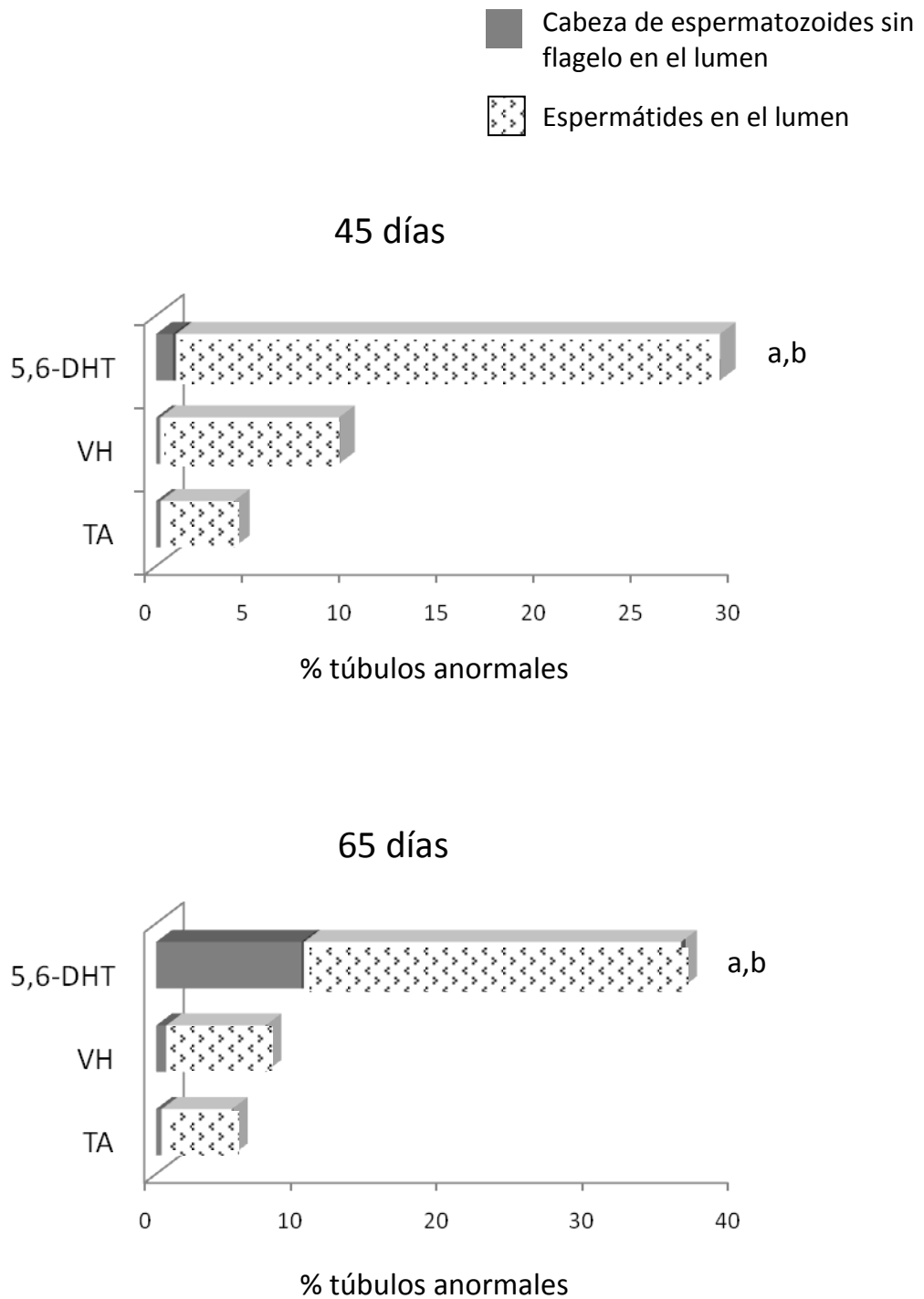
a, $p < 0.05$ vs TA; b, $p < 0.05$ vs VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Fig. 24. Distribución de túbulos anormales (media \pm e.e.m) en los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 días de edad.



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

Fig. 25. Distribución de túbulos anormales (media \pm e.e.m) en los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR y sacrificadas a los 65 días de edad.



a, $p < 0.05$ vs TA; b, $p < 0.05$ vs VH (prueba de χ^2)

Fig. 26. Tipo de anomalías en los túbulos seminíferos de ratas sin tratamiento (TA), con microinyección de ácido ascórbico (VH) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6- DHT) en el NDR y sacrificadas a los 45 o 65 días de edad.

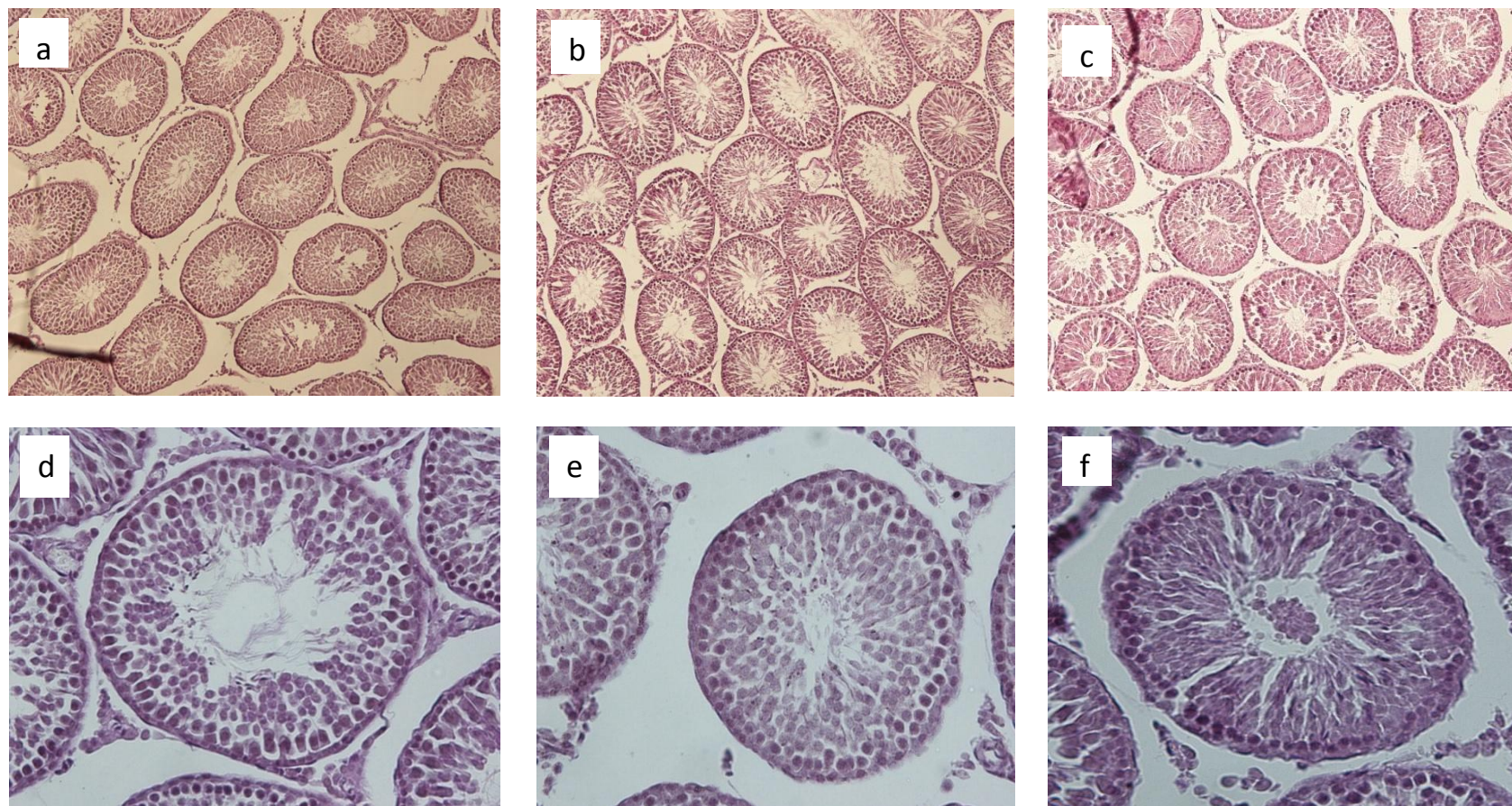


Fig. 27. Fotografías de cortes histológicos de testículo de ratas sin tratamiento (TA) (a), con microinyección de ácido ascórbico (VH) (b) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) (c) en el NDR y sacrificadas a los 45 días de edad (10x) o 40x (d, e, f) respectivamente, en donde se observan túbulos normales (d,e) y anormales, con espermátides (f) en el lumen.

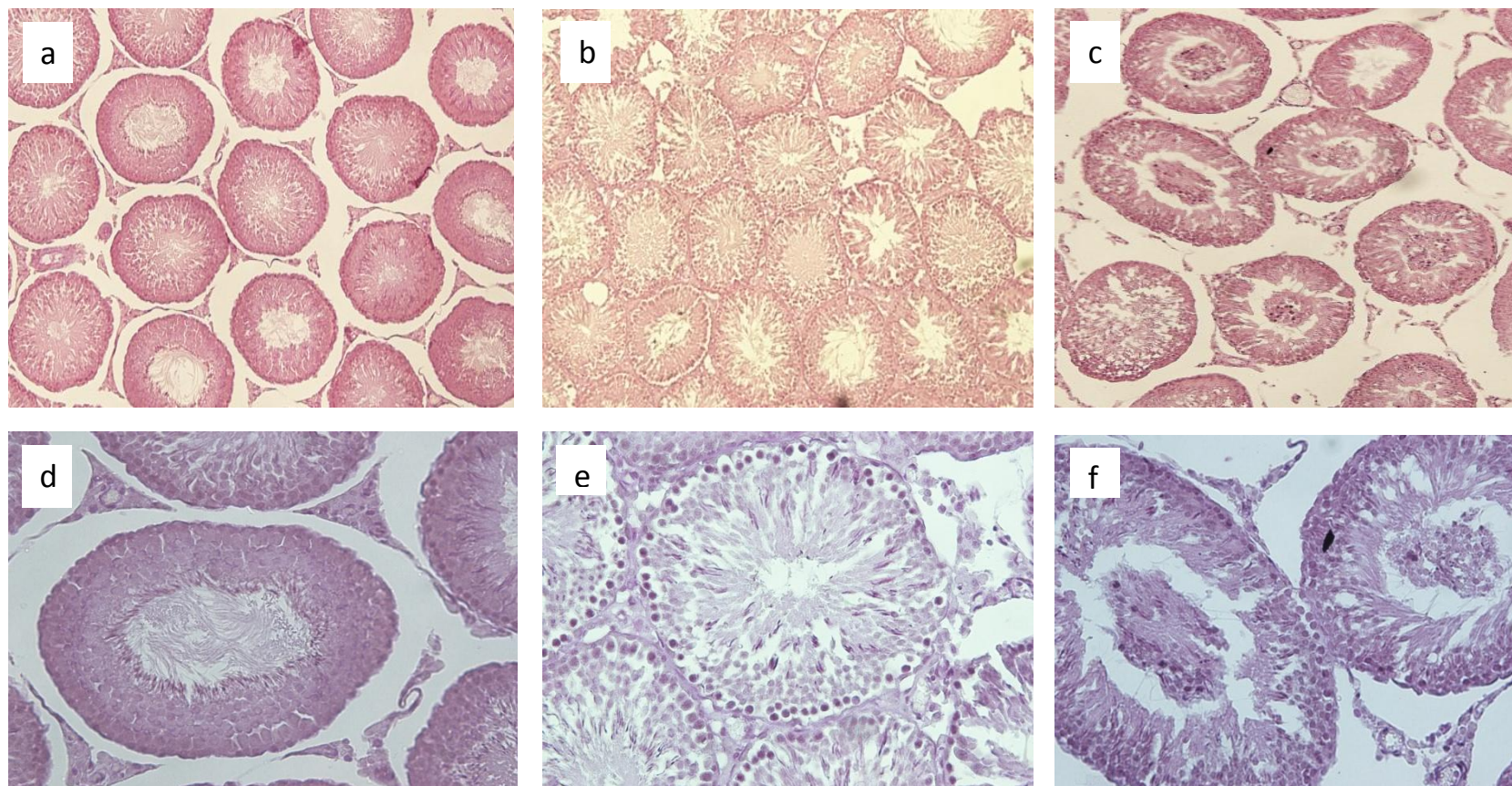


Fig. 28. Fotografías de cortes histológicos de testículo de ratas sin tratamiento (TA) (a), con microinyección de ácido ascórbico (VH) (b) o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT) (c) en el NDR y sacrificadas a los 65 días de edad (10x) o 40x (d, e, f) respectivamente, en donde se observan túbulos normales (d,e) y anormales, con espermátides (f) en el lumen.

DISCUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos se sugiere que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR no participa en la regulación de la secreción de FSH y progesterona, pero si interviene de forma estimulante en la secreción de testosterona, 17β -estradiol y en el mantenimiento de la estructura del ciclo del epitelio seminífero.

La lesión del NDR inducido por la microinyección de la 5,6-Dihidroxitriptamina provocó la disminución en la concentración de serotonina y su metabolito, por lo que estos resultados coinciden con el hecho de que se ha demostrado que este fármaco es un neurotóxico selectivo que destruye las neuronas serotoninérgicas. La neurotoxicidad del fármaco inicia con su autoxidación, la cual genera compuestos como: quinona, H_2O_2 , O_2^- y HO, que provocan la oxidación de lípidos y proteínas, lo cual conduce a la muerte de la neurona (Singh y Dryhurst, 1990; Sinhababu y col., 1985) y esto se acompaña de una menor biosíntesis del neurotransmisor.

La falta de cambios en la concentración de 5-HIAA en el hipotálamo anterior en los animales sacrificados a los 65 días, posiblemente está relacionada con la existencia de inervación serotoninérgica del hipotálamo que proviene de otra fuente como el núcleo medial del rafe, lo que explica que continúa la síntesis y degradación de la serotonina. En relación a esto, en diferentes estudios anatómicos se ha mostrado que algunos núcleos hipotalámicos también reciben inervación que se origina en el NMR (Larsen y col., 1996; Morin y Meyer-Bernstein, 1999), como el área preóptica media, núcleo arcuato, amigdaloides central y basal (Van de Kar y Lorens, 1979). Además se ha comprobado que la serotonina se sintetiza por neuronas que se encuentran en el propio hipotálamo, como en el núcleo hipotalámico dorsal (Meguid y col., 2000), y en otras regiones del encéfalo como en el área postrema, ventral y sustancia negra (Takeuchi, 1988).

En los animales sacrificados a los 45 días no se observaron cambios en la relación $[5-HIAA]/[5-HT]$ en ninguna de las regiones hipotalámicas, lo que

demuestra que hay un paralelismo entre la disminución de la síntesis y la degradación de la serotonina. Mientras que, en los animales sacrificados a los 65 días, se observa un incremento en esta relación, lo que permite pensar que en estos animales se están dañando las terminales de la neurona serotoninérgica, y posiblemente está disminuida la actividad del triptófano hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de serotonina, lo que indica que se dañó funcionalmente a las neuronas serotoninérgicas.

La falta de cambios en la concentración de FSH de los animales con lesión del NDR permite pensar que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR no participa en la modulación de la secreción de la FSH. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pinilla y colaboradores (1994), quienes mostraron que cuando a la rata macho prepúber se le administra la p-clorofenilalanina, fármaco que inhibe la síntesis de serotonina no se modifica la concentración de FSH.

Lo antes reportado difiere a lo propuesto en otros estudios, en los que se ha demostrado que en la rata macho, la serotonina participa en la regulación de la secreción de GnRH y de la FSH. Esta idea se basa en el hecho de que cuando a ratas macho castradas a los 16 días de edad, se les administra intraperitonealmente el 5-hidroxitriptófano (5-HTP), precursor en la síntesis de la serotonina, se observa un aumento en la concentración de FSH (Aguilar y col., 1993; Justo y col., 1989; Pinilla y col., 1994). Por otra parte, cuando a ratas macho prepúberes se les inyecta intraventricularmente la 5,6-DHT, neurotóxico de las neuronas serotoninérgicas se observa la disminución en la concentración de FSH solo en la cuarta semana del tratamiento (Collu y col., 1974). Por lo que se sugiere que la serotonina cerebral está involucrada en la síntesis y/o secreción de la FSH.

La discrepancia en cuanto a lo observado en otros estudios y el nuestro, posiblemente este asociada al tipo de receptor a serotonina que se expresa. En relación a esto se ha mostrado que dependiendo del subtipo de receptor al que se une la amina induce efectos diferenciales sobre la secreción de FSH (Pinilla y col., 2003) y de LH (Maekawa, 1999).

Pinilla y colaboradores (2003) utilizaron ratas machos de 16 a 23 días de edad a las cuales les administraron 8-OH-DPAT (agonista del receptor 5-HT_{1A}), DOI y maleato (agonistas del receptor 5-HT₂) o 1-PHE (agonista del receptor 5-HT₃) y observaron que la concentración de LH no cambió con ninguno de los tres agonistas, sin embargo, la concentración de FSH disminuyó cuando se administraron los agonistas en el día 16. Por lo que los autores sugieren que la serotonina participa de manera diferencial en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, ya que al parecer este sistema de neurotransmisión ejerce un efecto inhibitorio en la regulación de la secreción de FSH y no participa en la de LH.

Esta participación diferencial de los receptores a serotonina en la regulación de la secreción de las gonadotropinas también se ha mostrado en la hembra. Lacau-Mengido y colaboradores (1996) observaron que cuando a ratas hembras inmaduras se les administra ketanserina o metilsergide, bloqueadores de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} respectivamente, no se modifica la secreción de FSH y LH. Mientras que cuando administra, el ondansetron, antagonista de los receptores 5-HT₃, se bloquea la secreción de ambas gonadotropinas. Con base a estos resultados se sugiere que en ratas hembras inmaduras, la serotonina actúa a través del receptor 5-HT₃ regulando la liberación de LH y FSH, mientras que los receptores 5-HT_{2C} o 2A no participa en este proceso.

Otra posible explicación a las discrepancias observadas entre nuestro estudio y lo reportado por otros autores, posiblemente sea el resultado de que se trabajan con modelos biológicos diferentes como la edad o el sexo del animal. En relación a este último punto, Justo y colaboradores (1989), mostraron que cuando se administra intraperitonealmente a ratas macho o hembras prepúberes y adultas 5-hidroxitriptófano, precursor de la síntesis de serotonina, a ratas machos de 16, 20, 30 ó 60 días de edad, observaron el incremento en la concentración de FSH, mientras que en cuando el mismo tratamiento se aplica a hembras de las mismas edades no se modificó la concentración de esta hormona en ninguna de las edades estudiadas. Por lo que los autores sugieren

la existencia de una diferencia sexual en el efecto del sistema serotoninérgico sobre la secreción de FSH.

En este estudio, no se encontraron diferencias en la concentración de progesterona en los animales con lesión del NDR, lo que indica que posiblemente no se afecta la secreción de la LH, gonadotropina que participa en la regulación de la esteroidogénesis en el testículo. En relación a esto, se ha mostrado que en la rata macho la serotonina no participa en la regulación de la secreción de la LH (Justo y col., 1989; Pinilla y col., 1994). Por lo tanto al no modificarse la secreción de LH, esto se reflejó en la producción normal de progesterona, ya que esta gonadotropina al unirse a sus receptores en la célula de Leydig, estimula la transformación del colesterol a pregnenolona y posteriormente esta se transforma a progesterona (ruta $\Delta 4$ de la esteroidogénesis) (Díaz, 2004).

La idea de que modificaciones en la concentración de progesterona se relacionan con cambios en la secreción de LH se apoyan en los resultados de Ravi y colaboradores (2000), quienes mostraron que en la rata macho adulta cuando disminuye la concentración de LH, como resultado de la administración de corticosterona-21-acetato dos veces al día durante 15 días, se acompaña de la disminución del número de receptores de LH en las células de Leydig, así como la actividad de las enzimas esteroidogénicas 3β -HSD (3β - Hidroxiesteroide dehidrogenasa) y 17β -HSD (17β -Hidroxiesteroide dehidrogenasa) encargadas de la transformación de pregnenolona a progesterona.

Otra posible explicación a la falta de cambios en la concentración de progesterona es que además del ovario, las glándulas adrenales también secretan esta hormona, en respuesta a la acción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) secretada por la hipófisis (Guyton y Hall, 2007). En relación a esto se mostró que cuando a ratas hembras se les administra dexametasona, agente bloqueador de la secreción de la ACTH, se observa la disminución en la concentración de progesterona circulante (Piva y col., 1973).

La disminución en la concentración de testosterona observada en los animales con lesión del NDR permite pensar que la inervación serotoninérgica

del hipotálamo que se origina en el NDR participa en la modulación de esta hormona. En relación a esto, se ha observado que cuando a ratas adultas se les administra la 5,6-DHT en el tercer ventrículo, disminuye la serotonina cerebral así como la concentración de testosterona en el suero. Por lo que los autores sugieren que la serotonina participa de forma estimulante en la modulación de la esteroidogénesis por el testículo (Das y col., 1985).

Otra posible explicación de la disminución de la testosterona, permite pensar que se dañó una vía de comunicación neural entre el hipotálamo y el testículo. Gerendai y colaboradores (2000), por estudios de inmunohistoquímica observaron que cuando a ratas adultas les administran el virus de la pseudorabia en el testículo, este virus se identifica en diferentes núcleos del hipotálamo, como el paraventricular. Por su parte, Selvaje y Rivier (2003) demostraron que cuando a ratas macho adultas se les realiza la inyección intracerebroventricular de CFR en ratas adultas, se activan las células del núcleo paraventricular y se acompaña de la disminución en la concentración de testosterona sin un cambio en la concentración de LH. Por ello se sugiere que el núcleo paraventricular representa un sitio importante de la conexión neural entre el cerebro y el testículo.

El hecho de que no exista un paralelismo entre la disminución en la concentración de testosterona y la falta de cambios en progesterona en el suero de los animales con lesión del NDR, posiblemente está relacionado con el metabolismo de este esteroide. Toda la progesterona que es sintetizada por el testículo y que no es convertida en testosterona, ingresa al torrente sanguíneo y a medida que la sangre fluye a través de cada tejido del cuerpo, cierta cantidad de la hormona es removida o extraída y pasa principalmente al hígado, donde se transforma por una serie de reacciones y se forman los metabolitos inactivos, la 20 α -hidroxi-delta-4 α -pregnanolona y el 3 α ,5 β -pregnandiol (pregnandiol), los cuales son excretados en la orina (Yen y col., 2001).

La disminución en la concentración de 17 β -estradiol en el suero de los animales con lesión del NDR no se acompañó de modificaciones en la concentración de FSH, hormona que en la rata prepúber, al unirse a sus receptores de membrana en las células de Sertoli, estimula a la enzima

aromatasa, que cataliza la transformación de la testosterona en estradiol (González y Piferrer, 2003), por ello, la disminución en la concentración en la testosterona repercute en una menor concentración de 17β -estradiol. Estos resultados se apoyan en estudios de Shi y colaboradores (2007) que utilizaron ratas macho a las cuales les administraron oralmente por 14 días una dosis de 1, 5 o 10 mg de ácido perfluorododecanoico (PFDoA) y observaron la disminución en la concentración de testosterona, así como en la concentración de estradiol.

La falta de cambios en la concentración de FSH en los animales con lesión del NDR concuerda con el hecho de que no se presentaran cambios en el diámetro de los túbulos, ni en el número de túbulos por estadio del ciclo del epitelio seminífero en los animales lesionados. Esto nos permite sugerir que la serotonina no influye en los parámetros antes mencionados del testículo.

Madhwa y Dym (1976) observaron que cuando a ratas de 20 días de edad, se les administra subcutáneamente antisuero de FSH por 14 días, provoca una reducción en la talla de los testículos, del diámetro de los túbulos seminíferos, de espermátocitos en paquiteno, las espermátides se encontraban en fase de degeneración, mientras que la concentración de testosterona no cambió. Por su parte, Chemes y colaboradores (1979) al administrar también este antisuero en ratas desde su nacimiento hasta los 32 días de edad, observaron la disminución del diámetro de los túbulos seminíferos, de espermátocitos preleptoténicos y de las espermátides de los estadios VII y VIII. Por lo que se sugiere que la FSH es esencial durante el comienzo de la espermatogénesis para que se lleve a cabo este proceso normalmente en la rata inmadura.

En los animales con lesión del NDR a pesar de que no se presentaron cambios en el diámetro del túbulo seminífero, si se observaron alteraciones en estas estructuras testiculares. Las anomalías en el arreglo de las células germinales se observaron generalmente en las etapas VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero, posiblemente esto se relacione con la disminución en la concentración de testosterona, ya que se ha demostrado que este andrógeno es esencial para que se lleve a cabo la espermatogénesis (Ahmad y col., 1973), principalmente en la espermiogénesis (O'Donnell y col., 1996). La participación de

este andrógeno es esencial para que se desarrollen las etapas VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero (Sharpe, 1992), que se caracterizan por la presencia de espermatogonias A, espermátocitos en preleptoteno, paquiteno, espermátides redondas y espermatozoides (Parvinen y col., 1984). Además se ha demostrado que durante estas etapas del ciclo del epitelio seminífero la concentración de testosterona es alta (Parvinen y Ruokonen, 1982),

La posibilidad de que las anomalías que se observaron en los túbulos seminíferos en los animales con lesión del NDR, coincide con los resultados de Das y colaboradores (1985), quienes observaron que cuando a ratas adultas se les administra intraventricularmente la 5,6-Dihidroxitriptamina, se inhibe la producción de testosterona, así mismo se produce una degeneración de las espermátides en el estadio VII del ciclo del epitelio seminífero.

De la misma forma, cuando a ratas adultas se les administra sulfonato de dimetano, sustancia que destruye las células de Leydig, se elimina completamente la secreción de testosterona, y se observa una degeneración de las células germinales en el estadio VII del ciclo del epitelio seminífero. Pero cuando se les administran 25 mg de testosterona cada tercer día, se mantiene la espermatogénesis normal (Sharpe y col., 1992).

Las anomalías que se observaron en los túbulos seminíferos en las etapas VI-VII posiblemente también estén asociadas al daño en las células de Sertoli, ya que estas permiten a las células germinales en desarrollo moverse a través del epitelio seminífero.

Se sugiere que existen variaciones en el volumen de las células de Sertoli dependiendo de la etapa del ciclo del epitelio seminífero, y en las etapas previas a la espermiación, liberación de los espermatozoides del epitelio hacia la luz del túbulo, se reporta un mayor volumen de la célula de Sertoli (Bugge y Plöen, 1986).

En ratas adultas se ha demostrado que la disminución en la secreción de la testosterona testicular inducidas por implantes de este andrógeno más estradiol causa la separación prematura de las espermátides del estadio VIII de las células de Sertoli (O'Donnell y col., 1996), los autores sugieren que los

defectos en la adhesión de las moléculas entre las células de Sertoli y las espermátides están probablemente asociados a la deficiencia en la testosterona (O'Donnell y col., 2000).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que:

- La inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR no participa en la regulación de la secreción de FSH.
- La inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR ejerce un efecto estimulante en la secreción de testosterona y 17β -estradiol y no participa en la modulación de la secreción de progesterona.
- La inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el NDR es esencial para el mantenimiento de la estructura del túbulo seminífero.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar E., Ranchal A. Aguilar R., Pinilla I. (1993). Gonadotropin and prolactin secretion in prepubertal female rats treated with 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin. **Journal of Neural Transmission**; 94: 165-173.
- Ahmad N., Haltmeyer GC., Eik-Nes KB. (1973). Maintenance of Spermatogenesis in Rats with Intratesticular Implants Containing Testosterone or Dihydrotestosterone (DHT). **Biology of Reproduction**; 8: 411-419.
- Amann RP., Schanbacher BD. (1983). Physiology of male Reproduction. **Journal of animal Science**; 57(2): 380-403.
- Amenta F., Vega JA., Ricci A., Collier W. L., (1992). Localization of 5-hydroxytryptamine -like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. **Anatomical Record**; 233(3): 478-484.
- Amireault P., Dubé F. (2005). Serotonin and antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. **Biology of Reproduction**; 73: 358-365.
- Aragón A., Ayala ME., Marín M., Avilés A., Matsumara P., Domínguez R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. **Reproduction**; 129: 717-727.
- Atanassova N., McKinnell C., Walker M., Turner KJ., Fisher JS., Morley M., Millar MR., Groome NP., Sharpe RM. (1999). Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. **Endocrinology**; 140(11): 5364-5373.
- Ayala ME. (2009). Brain serotonin, psychoactive drugs, and effects on reproduction. **Central nervous systems agents in medicinal chemistry**; 9(4):258-76.
- Ayala ME., Monroy J., Morales L., Castro ME., Domínguez R. (1997). 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.

- Banks WJ. (1986). Histología veterinaria aplicada. Ed. El Manual Moderno. México, pp. 606 – 621.
- Barrios DR. (2002). Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. XI Congreso venezolano de producción e industria animal; 1-14.
- Brinkmann AO., Leemborg FG., Roodnat EM., Jong FH., Van der Molen HJ. (1980). A specific action of estradiol on enzymes involved in testicular steroidogenesis. **Biology of Reproduction**; 23: 801-809.
- Bugge HP., Plöen L. (1986). Changes in the volume of Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Journal of Reproduction and Fertility**; 76: 39-42.
- Candia S. (2009). Consultado el 24 de septiembre de 2009, de: <http://biol2medio.blogspot.com/2009/04/espermatogenesiis.html>
- Campos MB., Vitale ML., Calandra RS., Chiocchio SR. (1990). Serotonergic innervation of the rat testis. **Journals of Reproduction & Fertility**; 88: 475-479.
- Carreau S., Papadopoulos V., Drosowsky MA. (1988). Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. **Endocrinology**; 122: 1103-1109.
- Celada P., Casanovas JM., Paez X., Artigas F. (2002). Control of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus by the lateral hypothalamus. **Brain Research**; 932: 79-90.
- Chemes HE., Podesta E., Rivarola MA. (1976). Action of testosterone, dihydrotestosterone and 5α androstane 3α , 17β diol on the spermatogenesis of immature rats. **Biology of Reproduction**; 14: 332-338.
- Chemes EE., Dym M., Raj HGM. (1979). The Role of Gonadotropins and Testosterone on Initiation of Spermatogenesis in the Immature Rat. **Biology of Reproduction**; 21: 241-249.
- Cheng CY., Mruk DD. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. **Physiological Reviews**; 82:825-874.

- Colón E. (2007). Autocrine and paracrine regulation of Leydig cell survival in the postnatal testis. *The Endocrine Society*; 1-53.
- Collu R., Jéquier JC., Letarte J., Leboeuf G., Ducharme JR. (1974). Endocrine Effects of Brain Serotonin Depletion by 5,6-Dihydroxytryptamine in Prepuberal Male Rats. **Neuroendocrinology**; 14(3-4):139-150.
- Commins DL., Axt KJ., Vosmer G., Seiden LS. (1987). 5,6-Dihydroxytryptamine, a serotonergic neurotoxin, is formed endogenously in the rat brain. **Brain Research**; 403(1): 7-14.
- Contreras NA., Mancillas LG. (2007). El papel de la serotonina en la dependencia al alcohol. *Médica Sur*; 12(1): 3-10.
- Das TK, Mazumder 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(3):395-400.
- Díaz BN. (2004). Bioquímica básica de las hormonas esteroideas: Biología y clínica del cáncer. **Biocáncer**; 2: 1-22.
- Distingher T., Gaillard JL., Zwain I., Bouchamide R., Silberzahn P. (1989). Synthesis and aromatisation of 19-norandrogenes in the stallion testis. **Journal of Steroid Biochemistry**; 32: 537-544.
- Dufau ML., Tinajero JC., Fabbri A. (1993). Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. **The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**; 7: 299-307.
- Ebling JP., Brooks AN., Cronin AS., Ford H., Kerr JB. (2000). Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse. **Endocrinology**; 141(8): 2861-2869.
- Fawcett DW. (1995). Tratado de Histología. Duodécima edición. Ed. Mc Graw Hill. España, pp. 833-884.
- Frazer A., Hensler JG. (1999). Serotonin. En: Basic Neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. Ed. Raven Press. New York, pp. 263-292.

- Ganong WF. (1996). Fisiología médica. 6ta. edición. Ed. El Manual Moderno. México, pp. 471-482.
- Gartner LP., Hiatt JL. (2007). Texto Atlas de Histología. Tercera edición. Ed. Mc Graw Hill. México, pp. 489 - 510.
- Geneser F. (2000). Histología. Tercera edición. Ed. Médica Panamericana, España, pp. 638-660.
- Gerendai I., Toth IE., Boldogkői Z., Medveczky I., Halász B. (2000). Central Nervous System Structures Labelled from the Testis Using the Transsynaptic Viral Tracing Technique. **Journal of Neuroendocrinology**; 12: 1087-1095.
- González A., Piferrer F. (2003). Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. **Gen Comp Endocrinology**; 132(2):223-230.
- Griswold MD. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**; 9: 411-416.
- Guyton AC., Hall JE. (2007). Tratado de Fisiología Médica. 11 edición. Ed. Elsevier. España, pp. 996 – 1008.
- Hansson V., Weddington SC., McLean WS., Smith AA., Nayfeh SN., French FS., Ritzen EM. (1975). Regulation of seminiferous tubular function by FSH and androgen. **Journal of Reproduction and Fertility**; 44: 363-375.
- Hedger MP., Khatab S., Gonzales G., Krester MD. (1995). Acute and short-term actions of serotonin administration on the pituitary-testicular axis in the adult rat. **Reproduction, Fertility and Development**; 7: 1101-1109.
- Hedrich HJ., Bullock G. (2004). The laboratory mouse. The handbook of experimental animals. Ed. Elsevier. USA, pp. 1230 – 130.
- Holdcraft RW., Braun RE. (2004). Hormonal regulation of spermatogenesis. **International Journal of Andrology**; 27: 335-342.
- Jacobs BL., Azmitia EC. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological Reviews**; 72: 165-229.

- Jennes L., Beckman WC., Stumpf WE., Grzanna R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenalinergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. **Experimental Brain Research**; 46: 331-338.
- Jiménez-Trejo F., Tapia-Rodríguez M., Queiroz DB., Padilla P., Avellar MC., Rivas P., Manjarrez-Gutiérrez G., Gutiérrez-Ospina C. (2007). Serotonin Concentration, Synthesis, Cell Origin, and Targets in the Rat Caput Epididymis During Sexual Maturation and Variations Associated With Adult Mating Status: Morphological and Biochemical Studies. **Journal of Andrology**; 28(1): 136-149.
- Justo SN, Rossano GL, Szwarcfarb B, Rubio MC, Moguilevsky JA. (1989). Effect of serotonergic system on FSH secretion in male and female rats: evidence for stimulatory and inhibitory actions. **Neuroendocrinology**; 4: 382 – 386.
- Kinson GA., Liu CC. (1973). Testicular responses to melatonin and serotonin implanted peripherally in immature rats. **Life science**; 12(4): 173-184.
- Kordon C., Drouvas SV., Martínez de la Escalera EG., Weiner RI. (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation on luteinizing hormone and prolactin. En: The Physiology of Reproduction. E. Knobil y JD. Neill. (Edits.) Vol. 1, segunda edición. Ed. Raven Press, EUA, pp. 1621-1681.
- Kretser DM., Kerr JB. (1994). The cytology of the testis. En: The Physiology of Reproduction. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, pp. 1621 – 1682.
- Lacau-Mengido IM, Libertun C, Becú-Villalobos D. (1996). Different serotonin receptor types participate in 5-hydroxytryptophan-induced gonadotropins and prolactin release in the female infantile rat. **Neuroendocrinology**; 63(5):415-21.
- Larsen PJ., Hay-Schmidt A., Vrang N., Mikkelsen JD. (1996). Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: A combined retrograde and anterograde tracing study. **Neuroscience**; 70(4): 963-988.

- Latarjet M., Ruiz A. (1999). Anatomía Humana. Volumen II. Tercera edición. Ed. Médica Panamericana, España, pp.1693-1704.
- Le Magueresse B., Jégou B. (1986). Possible involvement of germ cells in the regulation of oestradio-17 β and ABP secretion by immature rat Sertoli cells (in vitro studies). **Biochemical and biophysical research communications**; 141: 861-869.
- Lesch KP., R Mössner R. (1998). Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders?. **Biological Psychiatry**; 44(3): 179-192.
- Lui WY., Mruk D., Lee WM., Cheng CY. (2003). Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. **Biology of Reproduction**; 68: 1087–1097.
- Madhwa HG., Dym M. (1976). The Effects of Selective Withdrawal of FSH or LH on Spermatogenesis in the Immature Rat. **Biology of Reproduction**; 14:489-494.
- Maekawa F., Tsukahara S., Tsukamura H., Maeda K., Yamanouchi K. (1999). Prevention of inhibitory effect of dorsal raphe nucleus lesions on ovulation and LH surge by 5-HT 2A:2C receptor agonists in female rats. **Neuroscience Research**; 35: 291-298.
- Marina S. (2003). Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. **Revista Iberoamericana de Fertilidad**; 4(2): 213-223.
- Mattson MP., Maudsley S., Martin B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**; 27(10): 589-594.
- McQuade R., Sharp T. (1997). Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. **Journal of Neurochemistry**; 69: 791-796.
- Meguid, MM., Fetissof SO., Blaha V; Yang ZJ. (2000). Dopamine and serotonin VMN release is related to feeding status in obese and lean Zucker rats. **NeuroReport**; 11(10): 2069-2072.
- Mendoza N. (2008). Farmacología médica. Ed. Médica Panamericana. México, pp. 269-271.

- 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.
- Morello H., Taleisnik S. (1985). Changes of the Release of Luteinizing Hormone (LH) on the Day of Proestrus After Lesions or Stimulation of the Raphe Nuclei in Rats. **Brain research**; 360: 311-317.
- Morin LP., Meyer-Bernstein EL. (1999). The ascending serotonergic system in the hamster: comparison with projections of the dorsal and median raphe nuclei. **Neuroscience**; 91(1): 81-105.
- Nitta H., Bunick D., Hess RA., Janulis L., Newton SC., Millette CF., Osawa Y., Shizuta Y., Toda K., Bahr JM. (1993). Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**; 132: 1396-1401.
- Norman WA., Litwack G. (1997). Hormones. Second edition. Academic Press, New York, pp. 341-360.
- O'Donnell L., McLachlan RI., Wreford NG., Krester DM., Robertson DM. (1996). Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. **Biology of Reproduction**; 55: 895-901.
- O'Donnell L., Stanton PG., Bartles JR., Robertson DM. (2000). Sertoli Cell Ectoplasmic Specializations in the Seminiferous Epithelium of the Testosterone-Suppressed Adult Rat. **Biology of Reproduction**; 63: 99-108.
- O'Donnell L., Stanton PG., Bartles JR., Robertson DM. (2000). Sertoli Cell Ectoplasmic Specializations in the Seminiferous Epithelium of the Testosterone-Suppressed Adult Rat. **Biology of Reproduction**; 63: 99-108.
- O'Donnell L., Meauchem SJ., Staton PG., McLachlan RI. (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. En: Physiology of Reproduction. (eds) J. Neill. 3^a Edition. Academic Press Elsevier, New York pp:1017-1054.

- Parvinen M., Nikula H., Huhtaniemi I. (1984). Influence of rat seminiferous tubules on Leydig cell testosterone production in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**; 37: 331-336.
- Parvinen M., Ruokonen A. (1982). Endogenous Steroids in the Rat Seminiferous Tubules. Comparison of the Stages of the Epithelial Cycle Isolated by Transillumination-Assisted Microdissection. **Journal of Andrology**; 3: 211 -220.
- Paxinos G., Watson C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, EUA.
- Pinilla L., Ranchal A., Aguilar R., Aguilar E. (1994). Role of the serotonergic system in the control of gonadotropin secretion in prepubertal male rats. **European Journal of Endocrinology**; 130: 617-624.
- Pinilla L., Gonzalez LC., Tena-Sempere M., Aguilar E. (2003). 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor activation reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-stimulated LH secretion in prepubertal male and female rats. **European Journal of Endocrinology**; 148: 121–127.
- Piva F., Gagliano P., Motta M., Martini L. (1973). Adrenal Progesterone: Factors Controlling Its Secretion. **Endocrinology**; 93(5): 1178-1184.
- Plant TM., Marshall GR. (2001). The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. **Endocrine Reviews**; 22(6):764–786.
- Ravi B., Maran RR., Sivakumar R., Govindarajulu P., Balasubramanian K. (2000). Chronic administration of corticosterone impairs LH signal transduction and steroidogenesis in rat Leydig cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**; 72(3-4): 155-162.
- Robaire B., Ewing LL., Irby DC., Desjardins C. (1979). Interactions of testosterone and estradiol-17 β on the reproductive tract of the male rat. **Biology of Reproduction**; 21: 455-463.
- Ross CM., Romrell LJ., Kayne GL. (1997). Histología. Texto y atlas. Tercera edición. Ed. Médica Panamericana. México, pp. 634-646.
- Rouviere H., Delmas A. (2005). Anatomía Humana. Tomo 2, 11 edición. Ed. Masson. España, pp. 596 – 609.

- Rusell LD., Sinha Hikim A.P., Ettlín RA., Clegg ED. (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testes. Ed. Cache River Press. U.S.A., pp. 63-120.
- Rusell LD., Kershaw M., Borg KE., Shennawy AE., Rulli SS., Gates RJ., Calandra RS. (1998). Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: FSH maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. *Journal of Andrology*; 19(3): 308-319.
- Selvaje DJ., Rivier C. (2003). Importance of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus as a Component of a Neural Pathway between the Brain and the Testes that Modulates Testosterone Secretion Independently of the Pituitary. **Endocrinology**; 144(2):594–598.
- Setchel B., Maddocks S., Brooks DE. (1994). Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y JD. Neill. (Edits.) Vol. 1. Ed. Raven Press. EUA. pp. 1063-1170.
- Shanon (1986) Shannon N. J., Gunnet J. W., Moore K. E. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neural activity following electrical stimulation of the raphe nucleus. **Journal Neurochemistry**; 47: 959-965.
- Sharpe RM., Maddocks S., Millar M., Kerr JB., Saunders PTK, McKinnell M. (1992). Testosterone and Spermatogenesis. Identification of Stage-Specific, Androgen-Regulated Proteins Secreted by Adult Rat Seminiferous Tubules. **Journal of Andrology**; 13(2): 172-184.
- Shi Z., Zhang H., Liu Y., Xu M., Dai J. (2007). Alterations in Gene Expression and Testosterone Synthesis in the Testes of Male Rats Exposed to Perfluorododecanoic Acid. **Toxicological Sciences**; 98(1): 206–215.
- Singh S., Dryhurst G. (1990). Reactions of the serotonergic neurotoxin 5,6-Dihydroxytryptamine with glutathione. **The Journal of Organic Chemistry**; 5: 1767-1773.
- Shishkina GT., Borondin PM. (1988). Role of brain serotonin in the regulation of sexual maturation in male rats. **Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova**; 74(1):118-23.

- Sinhababu AK., Ghosh AK., Borchardt RT. (1985). Molecular mechanism of action of 5,6- Dihydroxytryptamine. Synthesis and biological evaluation of 4-methyl-, 7-methyl-, and 4,7-dimethyl-5,6- Dihydroxytryptamines. **Journal of Medicinal Chemistry**; 28: 1273-1279.
- Smith MJ, Jennes L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. **Reproduction**; 122: 1-10.
- Stig H. (2007). Studies on the neuroendocrine role of serotonin. **Danish Medical Bulletin**; 4(54): 266-288.
- Takeuchi Y. (1988). Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. En: Neuronal Serotonin. N. N. Osborne, M. Hamon (Edits.). John Wiley & Sons Press, New York, EUA, 25-53.
- Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca DR., Dufau ML. (1993). Serotonin Secretion from Rat Leydig Cells. **Endocrinology**; 133(6): 3026-3029.
- Van der 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 Research**; 162: 45-54.
- Van der Kar LD., Lorens SA., Vodraska A., Allers G., Green M., Van der Orden DE., Van Orden LS. (1980). Effect of selective midbrain and diencephalic 5,7-Dihydroxytryptamine lesions on serotonin content individual preopticohypothalamic nuclei and on serum luteinizing hormone level. **Neuroendocrinology**; 31: 309-315.
- Van der Molen H., Brinkmann BO., de Jong FH., Rommerts FFG. (1981). Testicular oestrogens. **Journal of Endocrinology**; 88: 33P-46P.
- Veiga S., García-Segura LM., Azcoitia I. (2004). Propiedades neuroprotectoras de los esteroides sexuales y los neuroesteroides. **Revista de Neurología**; 39(11): 1043-1051.
- Velasco, MA. (2000). Farmacología. Ed. Mc Graw Hill. España, pp. 152-165.
- Vitale ML., Villar MJ., Chiochio SR., Tramezzani JH. (1987). Dorsal Raphe Lesion Alters the Estrous Cycle and the Preovulatory Gonadotropin Release. **Neuroendocrinology**; 46: 252-257.

- Weinbauer GF., Nieschlag E. (1993). Gonadotrophin-releasing hormone analogue-induced manipulation of testicular function in the monkey. **European Society of Human Reproduction and Embryology**; 2(8): 45-50.
- Whitaker- Azmitia PM. (1999). The discovery of serotonin and its role in neuroscience. **Neuropsychopharmacology**; 21: 2S – 8S.
- Yen SSC., Jaffe RB., Barbieri RL. (2001). Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. Cuarta edición, Editorial Médica Panamericana, Argentina, pp. 118-143.

Apéndice 1. Coordenadas teóricas para la localización del NDR en el estereotáxico (Atlas de Paxinos y Watson, 1982).

Peso	70-75 g	76-80 g	81-84 g	85-90 g
Planos (mm)				
Antero-posterior	0.6	0.6	0.6	0.7
Lateral	3.0	3.0	3.1	3.2
Ventral	6.3	6.3	6.4	6.4



Intersección
lambda

