



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO Y L-CARNITINA SOBRE LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE NEURONAS CA1 DEL HIPOCAMPO DE RATAS MACHO ADULTAS.

Tesis que para obtener el título de:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

CLAUDIA ISABELBARRANCO PALMA

DIRECTOR: M. EN C. UBALDO QUIROZ LÓPEZ

FEBRERO, 2018



AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas por proporcionarme las bases teóricas y prácticas para mi formación profesional.

Le extiendo mi agradecimiento al M. en C. Ubaldo Quiroz López por su incondicional apoyo para la realización del proyecto así como de su valiosa cooperación y paciencia para su término. De igual manera reconozco sus aportaciones constructivas en mi desempeño académico.

Al Dr. Gonzalo Flores Álvarez y a su equipo de personal y material del laboratorio de Neuropsiquiatría por su colaboración con el material químico y práctico para la realización de este trabajo.

Agradezco también a la Dra. Rosalina Reyes Luna y Dra. Dolores López Morales por su tiempo dedicado y por sus constructivos comentarios sobre este trabajo.

Finalmente me gustaría agradecer sustancial y resaltadamente a mis Padres y Hermanos, porque su apoyo incondicional ha permitido que hoy culmine un peldaño más en mi vida.

También agradecer a Abigail, Ruth, Magy, por acompañarme en los momentos buenos y malos:.

Desde lo personal reconozco su incondicional estímulo emocional y sostén a Samuel.

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	5
Antecedentes	6
• 1. Inervación del sistema reproductor masculino	9
• 2. Sistema colinérgico en hipocampo	15
• 3. Carnitina	22
Justificación	28
Hipótesis	29
Objetivos	30
Material y método	31
Resultados	35
Discusión	42
Conclusión	46
Referencias bibliográficas	47
Anexo 1	53

RESUMEN

La fertilidad masculina está bajo la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-testículos. Sin embargo hay evidencia de una comunicación neural multisináptica independiente de la hipófisis entre estructuras del SNC y las gónadas masculinas. El sistema colinérgico sería uno de los sistemas que conforman una comunicación neural bidireccional entre el SNC y las gónadas. Una de éstas estructuras sería el hipocampo quién presenta aferencias colinérgicas. Por otra parte, se ha reportado la existencia del sistema colinérgico dentro del testículo de mamíferos, mediante la presencia de enzimas para la señalización colinérgica en el testículo de la rata. Se sabe que la L-carnitina es un precursor de acetilcolina y ejerce una acción excitadora sobre células sensibles a acetilcolina. Este estudio se centró en evaluar la participación de L-carnitina (L-Car) y el sistema colinérgico en la morfología dendrítica de neuronas piramidales de la subregión CA1 del hipocampo de ratas macho, de esta manera se determinó la longitud dendrítica, arborización y densidad de espinas de las neuronas. Se utilizaron cinco tratamientos: testigo absoluto (TA), vehículo (Vh) con solución salina, L-Carnitina (L-Car), atropina (Atr) y carnitina más atropina (L-Car + Atr) se administraron a los 21 días de edad con L-carnitina (L-Car) o su vehículo (Vh) y con administración de Atropina (Atr) o su vehículo a los 84 días de edad, así como la combinación de los tratamientos L-Carnitina + Atropina (L-Car + Atr). Se sacrificaron y se procesaron los cerebros con la tinción Golgi-Cox y se analizaron con el método Sholl. Nuestros resultados del análisis morfológico dendrítico de las neuronas piramidales CA1 del hipocampo revelaron un incremento de la longitud y arborización dendrítica de los individuos tratados solo con Atropina comparada con su vehículo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para longitud, arborización y densidad de espinas dendríticas entre los tratamientos L-Car, L-Car + Atr, con relación a su grupo control. Nuestros resultados nos permiten sugerir que el bloqueo del sistema colinérgico estimula mecanismos plásticos que conducen a un incremento de la arborización y longitud dendrítica en neuronas piramidales de la subregión CA1 del hipocampo de la rata adulta.

INTRODUCCIÓN

En tiempos recientes, la infertilidad masculina es un problema importante que afecta a las parejas, debido a trastornos hormonales, moleculares, vasculares, infecciosos y factores ambientales; incluso factores neurológicos. Según la OMS ~30 % de la población masculina presenta infertilidad; mientras que en Norte América las tasas de infertilidad son entre 4.5 – 6 % en la población (Agarwalet *al*, 2015). Por lo que este estudio se enfocará en evaluar la participación de L-carnitina y el sistema colinérgico sobre a la morfología dendrítica de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas macho; de esta manera se pretende que L-carnitina presente una mayor densidad dendrítica en neuronas piramidales.

Como lo establece un estudio donde se lesiono parcialmente una importante vía hipocampal de ratas macho adultas y al tratarlas con un derivado de L-carnitina, encontraron una restauración enzimática colinérgica en dicho grupo comparado con el grupo control sin lesionar; con ello pudo observar el efecto neuroprotector de L-carnitina. (Piovesan *et al.* 1995). Esto permitió reconocer la existencia de una contribución de L-carnitina en el sistema colinérgico neuronal del hipocampo de ratas macho.

Considerando que la síntesis y secreción de hormonas sexuales masculinas están reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, Gerendai y colaboradores sugieren que existe una conexión, a través de vías neurales multisinápticas, entre el cerebro y órganos reproductivos masculinos como control de funciones gonadales (Gerendai *et al*, 2005)

ANTECEDENTES

Las entradas neuronales a los órganos reproductivos, como lo son los testículos, a través de nervios autonómicos son señales integradas que incluyen impulsos neuronales de diferentes partes del SNC. Sin embargo, las estructuras cerebrales, que contribuyen a la modulación de entradas neuronales a las gónadas se desconocieron anteriormente.

El hallazgo de que el número de células marcadas se reduce en ciertas estructuras cerebrales sugiere que estos núcleos, por un lado, están interconectados con neuronas simpáticas preganglionares de la médula espinal, y por otro lado que estos grupos celulares reciben fibras relacionadas con las gónadas, también, a través de núcleos vagales (Gerendai, 2005). La demostración de conexiones neuronales entre el cerebro y las gónadas utilizando la técnica de rastreo viral transináptico ha proporcionado la evidencia neuromorfológica de la existencia de la vía neural. Se ha reportado que la participación de algunos componentes de la vía, como el hipotálamo, la amígdala y la corteza insular, está involucrada en el control de funciones gonadales por un mecanismo neuronal pituitario-independiente (figura 1).

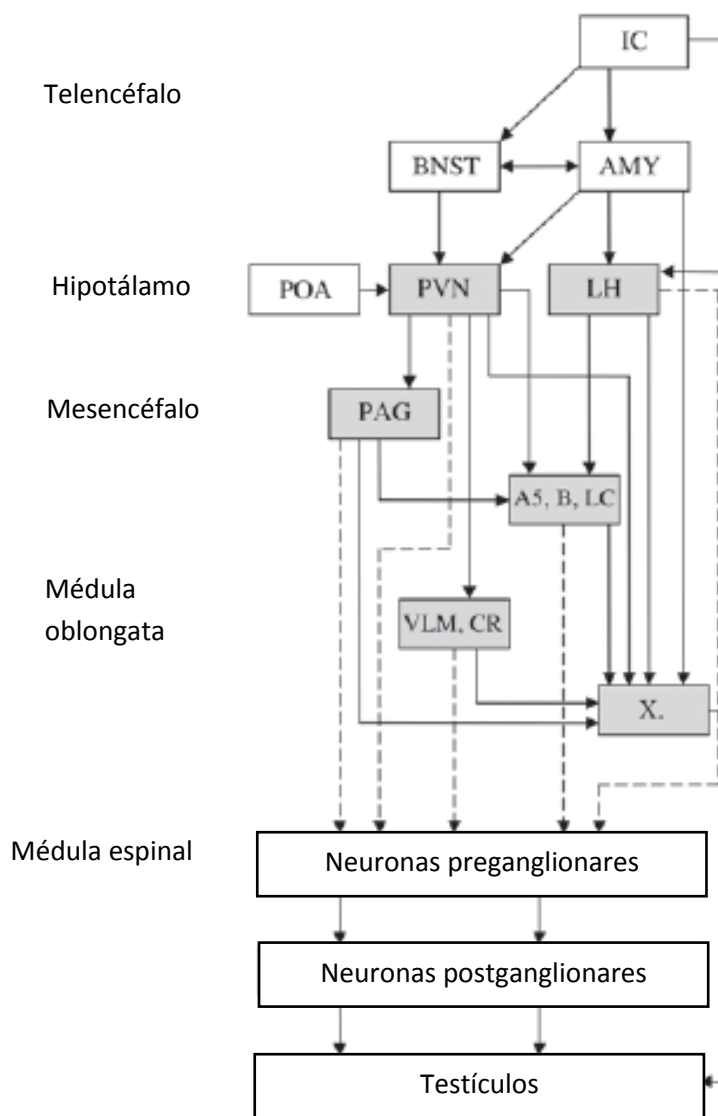


Figura 1. Esquema que muestra las conexiones descendentes del SNC y los testículos. IC: corteza insular, AMY: amígdala, PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo, LH: hipotálamo lateral, A5: células noradrenérgicas, B: núcleo Barrington, LC: locus coeruleus, VLM: medula ventrolateral, CR: núcleo caudal de raphe, X: núcleo vagal. Modificado de Gerendai 2005.

SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO.

El aparato reproductor masculino en mamíferos está compuesto de los testículos, que se encargan de sintetizar andrógenos, el epidídimo que conduce a los espermatozoides hacia los conductos deferentes, al conducto eyaculador y la uretra, hasta ser expulsados del organismo. Los órganos accesorios, en especial las glándulas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales, liberan secreciones a los conductos eyaculadores y la uretra. Los genitales externos incluyen el escroto, el cual rodea a los testículos, y el pene, un órgano eréctil que contiene la porción distal de la uretra (figura 2) (Martini *et al.*, 2009).

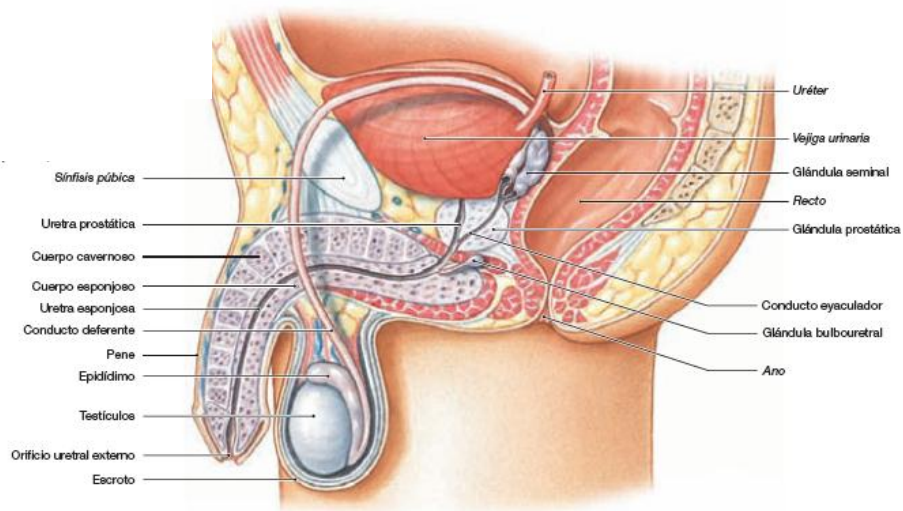


Figura 2. Esquema que muestra el aparato reproductor masculino humano. Tomado de Martini, Timmons y Tallitsch

Los testículos producen espermatozoides maduros que son incapaces de llevar a cabo la fecundación dado que aún no están dotados de capacidad de movimiento. El epidídimo se dispone a lo largo del margen posterior de los testículos. El conducto deferente, también conocido como vaso deferente, comienza en la cola del epidídimo y asciende hacia la cavidad abdomino-pélvica a través del conducto inguinal dentro del cordón espermático y desemboca en la uretra. La uretra comprende desde la vejiga urinaria hasta la porción proximal del pene y tiene una longitud de unos 15 a 20 cm. La uretra masculina es un canal que forma parte tanto del aparato urinario como del

reproductor. Las glándulas seminales, o vesículas seminales, se encuentran entre la pared posterior de la vejiga urinaria y la pared anterior del recto; son unas glándulas secretoras muy activas tapizadas por un epitelio cilíndrico o cúbico pseudoestratificado. La próstata es un pequeño órgano muscular redondo, ésta glándula engloba a la uretra prostática que sale de la vejiga urinaria. La pareja de glándulas bulbouretrales, o glándulas de Cowper, son unas estructuras redondas de un diámetro cercano a 10 mm. El conducto de cada glándula sigue la trayectoria de la uretra hasta desembocar en la luz de la uretra. El pene es un órgano cilíndrico que contiene la porción distal de la uretra. A través de él se expulsa la orina al exterior y se introduce el semen en la vagina de la mujer durante el coito (Martini *et al.*, 2009).

1. INERVACIÓN DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO

El sistema reproductor masculino está inervado por diversas fibras nerviosas con sus correspondientes neurotransmisores y/o neuropéptidos; así como por células nerviosas que se encuentran a diferentes niveles de epitelio en los órganos reproductores masculinos.

El sistema reproductor masculino está inervado por fibras aferentes y eferentes de origen visceral con ganglios cercanos a la médula espinal, tal es el caso de los ganglios celiacos, aórtico, caudal mesentérico, hipogástrico y por el ganglio pélvico (Setchell & Breed, 2006), así como por la inervación extrínseca, constituida por los nervios espermáticos superior e inferior; inervación simpática, con la presencia de nervios simpáticos postganglionares; intrínseca, encontrando neuronas en los testículos, y la intrínseca colinérgica, con receptores y transportadores para Ach.

1.1 INERVACIÓN EXTRÍNSECA

El testículo está innervado principalmente por el nervio espermático superior y el nervio espermático inferior (figura 3). El nervio espermático superior es el principal contribuyente de la innervación del testículo, se origina del plexo celíaco y la aorta y viaja junto con los vasos testiculares. Los cuerpos celulares de las fibras simpáticas preganglionares se encuentran en los segmentos torácicos T10 y T11 de la médula espinal. El componente parasimpático del nervio pertenece al nervio vago (Gerendai, 2004)

Mientras que el nervio espermático inferior acompaña al conducto deferente, luego viaja dentro del epidídimo y llega a los testículos en su polo inferior. Las fibras simpáticas del nervio se originan en el plexo mesentérico inferior e hipogástrico, mientras que las fibras parasimpáticas son las ramas del nervio pélvico. Entre los neurotransmisores que son liberados en fibras nerviosas del testículo se encuentran las catecolaminas: noradrenalina, adrenalina, acetilcolina, así como algunos neuropéptidos como la serotonina, VIP (péptido vasointestinal activo), SP (sustancia P) y CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) (Gerendai, 2004)

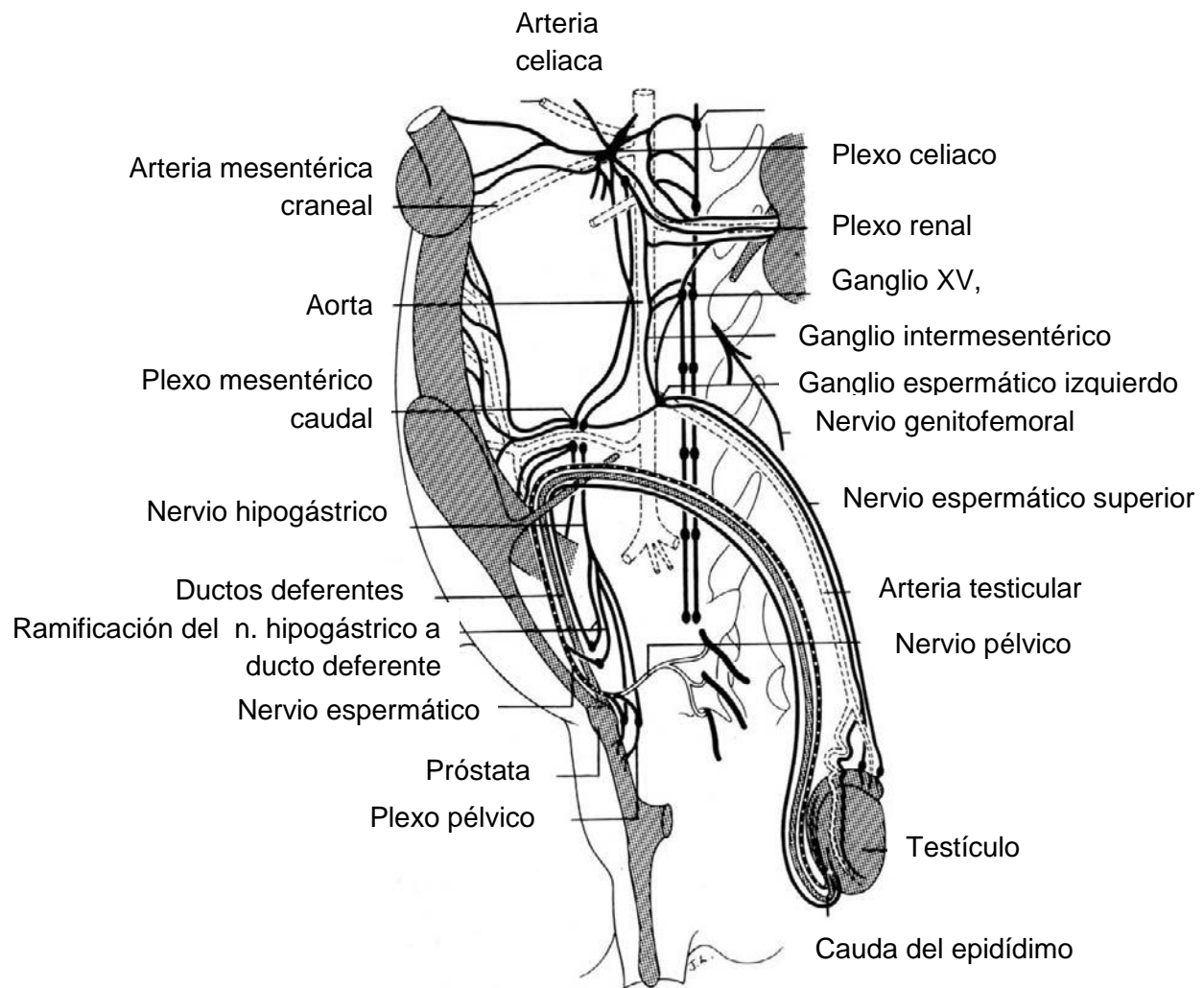


Figura 3. Esquema que muestra la innervación de los testículos y el epidídimo de mamífero (gato). Modificado de Setchell & Breed, 2006.

El desarrollo de los túbulos seminíferos y la espermatogénesis son procesos en los que participa activamente los nervios espermáticos. Por ejemplo, se ha demostrado que en la rata prepuberal la sección de los nervios espermáticos superior e inferior provoca apoptosis de células germinales como de las células de Leydig. Estos

datos nos permiten reforzar la idea de que la inervación que reciben los testículos participa de manera estimuladora en la espermatogénesis y la producción de andrógenos (Huo *et al.*, 2010)

1.1.1 INERVACIÓN SIMPÁTICA

Davis et al (1970) establecen que las células del músculo liso y las fibras nerviosas fluorescentes de catecolaminas así como de noradrenalina neuronal demuestran estar presentes en la cápsula testicular de rata. Los nervios simpáticos postganglionares que abastecen a músculos lisos son capaces de almacenar y liberar noradrenalina y ATP, induciendo respuestas contráctiles vía adrenoreceptores postsinápticos y receptores P2 purinérgicos, respectivamente (Jurkiewicz *et al.*, 2006).

Diversas fibras nerviosas y sus neurotransmisores peptidérgicos correspondientes se encuentran inervando al testículo de mamíferos. En un estudio realizado en testículo de cerdo de 3-5 semanas de edad, se identificaron por técnicas inmunohistoquímicas a los siguientes neuropeptidos: NPY (neuropeptido Y), CGRP (proteína relacionado al gen de la calcitonina), VIP (péptido vasointestinal activo) y SP (sustancia P). Se encontró que 75 % de las fibras analizadas fueron positivas a NPY en el órgano vascular testicular mientras que para VIP, CGRP y SP fue menor la presencia de fibras alcanzando un 10 % de reacción. Cabe mencionar que las fibras previamente mencionadas están relacionadas a la vascularización del testículo mostrando una importante función vasomotora en éste órgano (Wrobel *et al.*, 1998).

De esta manera se denota la importante función de neuropeptidos en la regulación neuroendocrina de los mamíferos. Por su parte, la kisseptina es un neuropeptido sintetizado y liberado en neuronas GNRH del hipotálamo; donde según un estudio la ausencia en la expresión de kisseptina y su receptor produce alteraciones en las gónadas de ratones hembras y machos así como bajos niveles séricos de LH y FSH e infertilidad. (Novaira *et al.*, 2014)

Por otro lado, se ha reportado la presencia de nervios colinérgicos asociados a las paredes de arterias del epidídimo, a través de técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos dirigidos a acetilcolinesterasa y colina acetiltransferasa.

Se encuentran inervando al órgano testicular terminaciones de fibras colinérgicas en la pared de arteriolas de tamaño mediano situado dentro el testículo: el mediastino, septula y lóbulos testiculares alcanzando la túnica albugínea de felinos (Rabel, 2001).

1.2 INERVACIÓN INTRÍNSECA

Se han demostrado que el sistema catecolaminérgico participa en la regulación de la función testicular. Este sistema puede ser de origen neural o no neural. El grupo de Mayerhofer mediante un estudio inmunohistoquímico para tirosina hidroxilasa mostró la presencia de células semejantes a neuronas catecolaminérgicas en el testículo del humano adulto. Estas células también expresaron la proteína NF200, una proteína de neurofilamento del cuerpo celular, como parte de los elementos neuronales testiculares. Interesantemente observaron un incremento significativo de la inmunoreactividad a TH y NF200 en biopsias de pacientes con síndromes de “Sólo células de Sertoli” y con hipoespermatogénesis. Estos datos permiten sugerir a los autores que existe una participación importante de la inervación intrínseca catecolaminérgica en patologías asociadas a la espermatogénesis (Mayerhofer *et al.* 1999).

En primates no humanos se ha reportado la presencia de neuronas intrínsecas inmunoreactivas a TH y NPY en los testículos de animales inmaduros o prepúberes. Sin embargo la inmunoreactividad cae drásticamente conforme se acerca a la pubertad y más aún en el adulto (Frugier *et al.*, 2000).

Hay evidencia de una inervación intrínseca (células neuronales) y extrínseca (fibras nerviosas) en el testículo de mamíferos. Estas vías liberan neurotransmisores catecolaminérgicos y neuropeptidérgicos que nos permiten sugerir que la inervación

intrínseca participa en la regulación de las funciones del testículo y que su papel varía a lo largo de la vida del animal.

1.2.1 INERVACIÓN INTRÍNSECA COLINÉRGICA

Se ha reportado la existencia del sistema colinérgico dentro del testículo de mamíferos, por ejemplo en la rata macho Wistar-Firth mediante inmunohistoquímica se han encontrado receptores funcionales y diferentes transportadores para acetilcolina (ACh) en las células germinales y en las células de Sertoli (Schimer, 2011).

El sistema colinérgico se encuentra asociado a tejido nervioso y no nervioso. En el tejido no nervioso se ha demostrado, a través de estudios moleculares como la expresión de RNAm de receptores a acetilcolina y la presencia de enzimas para la señalización colinérgica en el testículo de la rata. Por otro lado, en el tejido neuronal se ha establecido la función de la acetilcolina como neuromodulador de otros tipos de neurotransmisión como glutamato, GABA, dopamina, serotonina y norepinefrina (Picciotto, 2012).

Como parte del sistema colinérgico, los diversos efectos de la acetilcolina dependen del sitio de liberación, de los subtipos de receptores y de la población neuronal diana; además de que potencia los comportamientos adaptables a los estímulos ambientales y disminuye las respuestas a los estímulos en curso que no requieren una respuesta inmediata.

El sistema colinérgico consta de acetilcolina, enzimas sintetizadoras, transportadoras y receptoras; su funcionalidad no está restringida a células neurales. De esta manera se ha reportado la presencia de este sistema en tejido completamente carente de inervación colinérgica, como se esperaba en el tejido testicular de rata. Según un estudio donde se midieron los niveles de ACh y los patrones de expresión de receptores y diferentes tipos de transportadores (de cationes orgánicos y vesiculares) para ACh en

cultivo de tejido testicular de rata; mediante técnicas moleculares e inmunohistoquímicas; los autores encontraron un alto nivel de Ach en la capsula testicular de individuos inmaduros y adultos, sin embargo observaron altos niveles en el parénquima testicular de ratas adultas. Por otro lado se expresó RNAm de enzimas sintetizadoras en túbulos seminíferos, mientras que proteínas transportadoras (de cationes orgánicas y vesiculares) se expresaron moderadamente en espermatoцитos primarios. Estos resultados sugieren potencialmente un rol importante para la Ach no neuronal y de sus receptores en la diferenciación de células germinales (Schimeret *al.*, 2011).

De esta manera se establece que la liberación de acetilcolina y su funcionalidad no está restringida a su sitio de liberación, sino que difunde hacia estructuras del SNC y SNP; asimismo participa activamente en patrones fisiológicos de disparo de señales de interneuronas colinérgicas así como de neuronas GABA- y glutamatérgicas (Picciotto, 2012).

La ACh en el cerebro altera la excitabilidad neuronal, influye en la transmisión sináptica, induce plasticidad sináptica y coordina el disparo de grupos de neuronas como puede ser la activación de interneuronas excitatorias y/o inhibitoras, así, la Ach actúa como un neuromodulador en el cerebro (Picciotto *et al.*, 2012).

2. SISTEMA COLINÉRGICO EN HIPOCAMPO

Una de las estructuras subcorticales con importantes entradas y circuitos colinérgicos es el hipocampo. Esta estructura presenta un rol importante en el aprendizaje y memoria y es crítica en la adaptación y respuesta al estrés del individuo.

El hipocampo recibe un alto nivel de entradas colinérgicas desde el septo medial, del tabique mediano y la banda diagonal de Broca (figura 4). Las neuronas que provienen del septum medial y de la banda diagonal de Broca inervan al hipocampo estableciendo la vía septo-hipocámpica. Las neuronas del tabique mediano y de la banda diagonal de Broca inciden en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en toda la estructura. Un

papel para la ACh en la regulación de la excitabilidad del hipocampo es a través de la liberación presináptica de glutamato y GABA (Piccioto *et al.* 2012; Orta-Salazar *et al.* 2014).

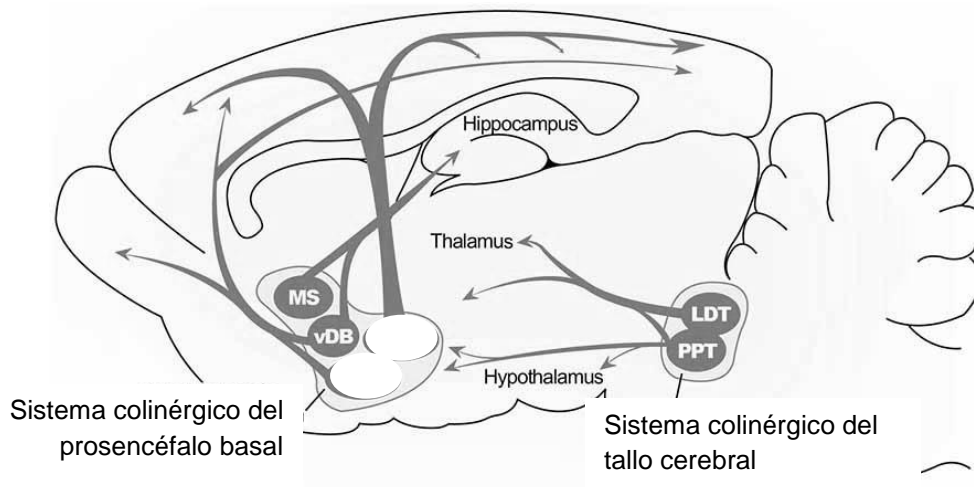


Figura 4. Esquema que muestra las entradas colinérgicas hacia el hipocampo de ratona; MS: Septum medial, vDB: banda diagonal de Broca; LDT: núcleo tegmental laterodorsal y PPT: núcleo tegmental pedunculopontino proyectan al tálamo, hipotálamo y prosencefalo basal. Modificado de Paul *et al.*, 2015.

2.1 CONEXIONES EXTRÍNSECAS E INTRÍNSECAS DEL HIPOCAMPO

El hipocampo se encuentra dividido en dos partes: la formación hipocámpal y la región parahipocámpal. La primera está compuesta por el giro dentado, los núcleos CA1, CA2, CA3 y el subículum presentando un nivel mayor de aferencias unidireccionales para la estructura así como para conexiones intrínsecas (Witter y Amaral,2004).

Las principales vías aferentes a la formación hipocámpal se encuentran en un haz angular de fibras que se originan en la corteza entorrinal y llegan hasta niveles septotemporales como el giro dentado, núcleos CA y el subículum (Andersen *et al.*, 2007).

La entrada excitatoria de la corteza entorrinal ingresa al hipocampo principalmente a través de células granulares del giro dentado, que a su vez se conectan a través de las sinapsis de fibras musgosas a las neuronas piramidales CA3. Las neuronas piramidales CA3 procesan la entrada de información a través de una red densa de conexiones recurrentes y envían su salida a través de las colaterales de Schaffer haciendo sinapsis sobre las células piramidales CA1. Finalmente, las neuronas piramidales CA1 envían la información procesada por el hipocampo a través del subículo de vuelta a la corteza (figura 5) (Andersen *et al.*, 2007).

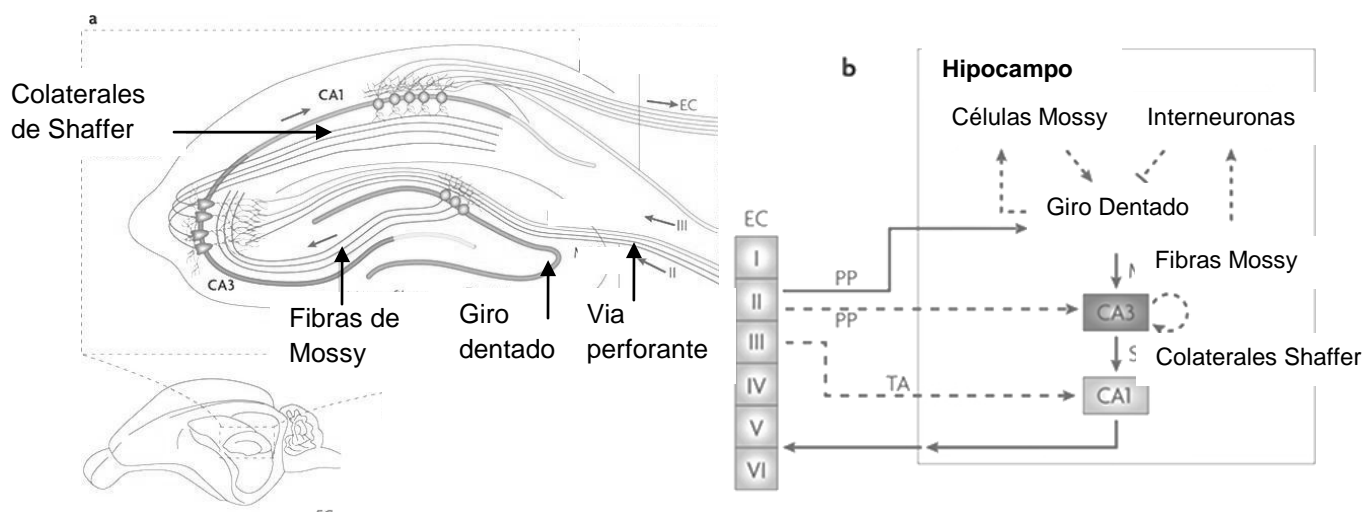


Figura 5. Diagrama de la red neuronal del hipocampo. La vía trisináptica excitatoria: EC: corteza entorrinal, giro dentado-CA3-CA1-EC y corteza cerebral (flechas sólidas). Modificado de Deng W. *et al.* 2010.

2.1.1 AFERENCIAS HIPOCAMPALES

La entrada principal al giro dentado es de la corteza entorrinal y no recibe entradas directas de otras estructuras corticales (figura 4). Las entradas subcorticales al giro dentado se originan principalmente de los núcleos septal, de la región supramamilar del hipotálamo posterior, y de varios núcleos monoaminérgicos en el tronco encefálico, especialmente el locus coeruleus y el núcleo de raphe (Witter y Amaral, 2004).

Todos los subcampos del hipocampo reciben abundantes aferencias extrínsecas, que pueden agruparse en tres clases: entradas glutamatérgicas (originadas en la corteza entorrinal y otras subregiones hipocámpicas ipsilaterales y contralaterales); la proyección GABAérgica septo-hipocámpica; y varias vías de los núcleos del tronco encefálico y del cerebro anterior, liberando neurotransmisores que a menudo se denominan "neuromoduladores", entre ellos la acetilcolina, la dopamina, la serotonina y la noradrenalina (norepinefrina).

La proyección hipotalámica mayor en el giro dentado surge del área supramammilar, y la mayoría de las fibras supramammilares terminan en las dendritas proximales de las células granulares del giro dentado. Dicha proyección es excitatoria y es probable que se use el glutamato como neurotransmisor primario (Witter y Amaral, 2004).

2.1.2 EFERENCIAS HIPOCAMPALES

La información recibida y procesada por la vía trisináptica del hipocampo es enviada a diferentes estructuras, tal es el caso del hipotálamo. Como parte del sistema de haz de fibras que conectan al hipocampo con otras estructuras se encuentran 3 vías. La primera conecta y lleva información de la corteza entorrinal al hipocampo denominado haz de fibras angulares; la segunda vía es fimbria-fórnix donde el hipocampo se interconecta con regiones basales del prosencefalo, al hipotálamo y del tronco encefálico. La tercera donde hay conexiones comisurales dorsales y ventrales. De esta manera la vía fimbria-fórnix es de interés para los objetivos de este estudio.

El área supramamilar del hipotálamo ha demostrado tener influencia sobre la plasticidad hipocámpal en la memoria y aprendizaje, mediante conexiones anatómicas entre el hipotálamo e hipocampo. Gran parte es en el control del comportamiento y su activación está dada por clases específicas de estímulos en una estrecha relación con el hipocampo. Se ha postulado la participación importante del área supramamilar en la regulación del ritmo theta del hipocampo en la cognición y particularmente la memoria sobre el comportamiento (Pan y McNaughton, 2004).

La salida del hipocampo está cartografiada topográficamente de tal manera que la información destinada al área supramamilar (SuM) surge en el área CA3 y se retransmite primero en el tabique lateral, mientras que la información destinada a cuerpos celulares mamilares surge en el subículo y se transfiere directamente a SuM. La formación hipocámpal completamente se ha mapeado topográficamente en el septum lateral y este, en cambio, es mapeado topográficamente en el área supramamilar del hipotálamo. Así, se indica que las proyecciones del hipocampo al hipotálamo tienen una relación anatómica y funcional (Pan y McNaughton, 2004)

2.1.3 AFERENCIAS Y EFERENCIAS DE CA1

El hipocampo propiamente está formado por el giro dentado, el subiculum y los núcleos, Cornus Ammonis, según la terminología de Lorente de Nó dichos núcleos se subdividen en CA3, CA2 y CA1. Presentan diferencias evidentes en relación al tamaño celular de cada núcleo lo que lleva a establecer diferentes conexiones entre sí (Witter y Amaral, 2004)

Cada núcleo del hipocampo está organizado y bien diferenciado en estratos, específicamente para CA1 hay cuatro estratos: estrato lacunosum-moleculare que corresponde a un penacho dendrítico originado de la dendrita apical; estrato radiatum aquí se encuentra la mayor parte de la dendrita apical; estrato piramidal que concierne al cuerpo celular de la neurona y el estrato oriens que pertenece a las dendritas basales (figura 6). Las conexiones van a ser específicas al estrato del núcleo que estén inervando.

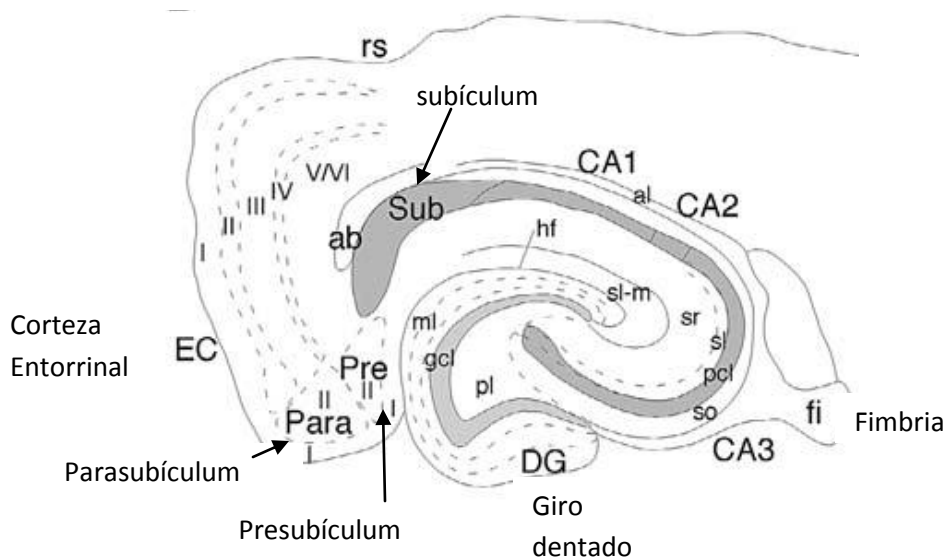


Figura 6. Esquema que muestra los estratos de los núcleos del hipocampo de rata. Corteza entorrinal capa I,II,III, IV, V/VI; so: estrato oriens, *pcl*: capa celular piramidal, *sl*:estrato lucidum, *sr*: estrato radiatum y *sl-m*: estrato lacunosum-moleculare; *hf*: fisura hipocámpica, *gcl*: capa celular granular, *pl*: capa piramidal, *al*: alveus; *ab*: haz angular. Modificado de Andersen *et al.*, 2007

Las aferencias del hipocampo, específicamente a CA1 son fibras entorrinales que se originan de la capa III siendo una vía directa de conexión corteza entorrinal -CA1; sus terminaciones se distribuyen topográficamente, terminando a lo largo del estrato lacunosum-moleculare de CA1. Dependiendo de donde se localiza una célula piramidal CA1 en el eje transversal del hipocampo, recibe entradas de una porción diferente de la corteza entorrinal, de esta forma mantienen una topografía específica de conexiones hacia CA1.

Además de recibir proyecciones directas de la corteza entorrinal, CA1, recibe un importante y sustancial predominio de entradas originadas en CA3. Las vías colaterales de shafferson una ruta sináptica entre CA3 y CA1, viajan a través del estrato radiatum y oriens provenientes de CA3. Las dendritas apicales de CA3 se encuentran asociadas con el estrato radiatum de CA1 y las dendritas basales de CA3 con el estrato oriens de las neuronas CA1 (Witter y Amaral, 2004).

Por otro lado, fibras eferentes de CA1 envía retroproyecciones a la corteza entorrinal, de este modo, las células CA1 proximales se proyectan hacia la corteza entorrinal medial, mientras que las células distales CA1 se proyectan hacia el área entorrinal lateral.

A diferencia de CA3, las células piramidales en CA1 dan lugar a una proyección asociacional mucho más limitada. A medida que los axones CA1 viajan en el alveus o el estrato oriens hacia el subiculum, se generan colaterales ocasionales que entran en el estrato oriens y la capa de células piramidales, muy probablemente contactando interneuronas tales como células de cesta en el estrato oriens y a su vez inhibiendo células piramidales CA1. También es concebible que estos colaterales puedan entrar en contacto con las dendritas basales de otras células CA1. De manera similar, aunque parece estar presente una proyección comisural débil a la CA1 contralateral, no existe una proyección comisural extensa que se origine en CA1, como es el caso en CA3 (Witter y Amaral, 2004).

CA1 recibe entradas de diferentes estructuras corticales y subcorticales, corticales desde la región parahipocampal principalmente y de la corteza entorrinal y subcorticales de proyecciones CA3. Dos tercios del núcleo CA1 recibe sustancialmente entradas del

complejo amigdaloides (nucleo basal) y llegan al estrato oriens y radiatum (Witter y Amaral, 2004).

El campo CA1 da lugar a dos proyecciones intrahipocámpicas. La primera es una proyección organizada topográficamente al subículo adyacente. La segunda es a las capas profundas de la corteza entorrinal. Hay evidencia sustancial de que la entrada proveniente de hipotálamo o proyecciones supramamilares hacia giro dentado es excitatoria. El campo CA1 recibe una proyección septal sustancialmente más ligera que CA3, pero las fibras también están más densamente distribuidas en el estrato oriens (Witter y Amaral, 2004).

3. CARNITINA

L-Carnitina es un aminoácido (figura 7) que participa en la transferencia de ácidos grasos del citosol hacia la matriz mitocondrial y los peroxisomas. Es sintetizada en el cerebro humano, hígado y riñón por la enzima acetilcarnitina transferasa que facilita la absorción de acetil Co en la mitocondria durante la oxidación de los ácidos grasos, de esta manera mejora la producción de acetilcolina. El proceso de la β -oxidación de los ácidos grasos es relativamente bajo en neuronas de cerebros adultos.

L-carnitina es sintetizada de forma natural en el organismo a partir de lisina y metionina; se han observado sus efectos positivos en el metabolismo de células neuronales colinérgicas asociadas a alteraciones de memoria como el Alzheimer, además de ser un factor neurotrófico para esta población celular.

Se ha encontrado que la carnitina y sus derivados acilo, son químicamente similares a la colina y la acetilcolina y pueden desempeñar un papel en la neurotransmisión para la síntesis de acetilcolina (Nalecz *et al*, 2004).

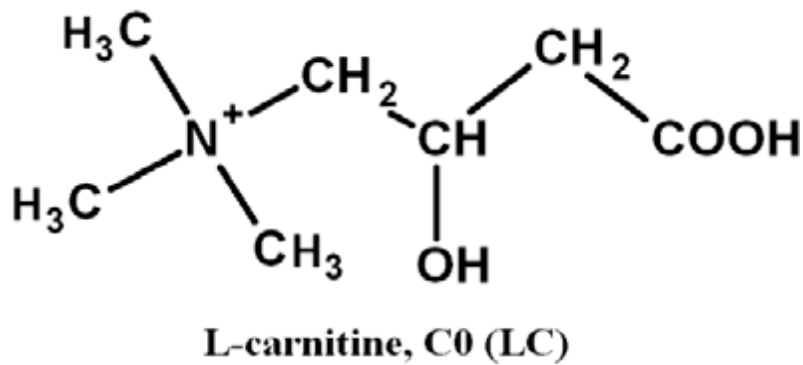


Figura 7. Estructura de L-Carnitina. Tomado de Jones.

3.1 CARNITINA EN SNC

Estudios recientes han reportan un efecto positivo de L-carnitina sobre población neuronal, en estas afecciones se encuentra asociada a enfermedades neurológicas y desordenes cognitivos que afectan a la memoria; siendo esta última importante para la supervivencia del individuo

Las acilcarnitinas, así como coenzima A libre (CoA), son productos derivados de la transferencia de grupos acilo de acil-Coenzima A (acil-CoA) a carnitina por la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1). Las acilcarnitinas cerebrales pueden funcionar en la síntesis de lípidos, alterando y estabilizando la composición de la membrana, modulando genes y proteínas, mejorando la función mitocondrial, aumentando la actividad antioxidante y potenciando la neurotransmisión colinérgica. La carnitina también puede ser transportada al cerebro, a través de la barrera hematoencefálica, mediante dos transportadores: OCTN2, un transportador dependiente de Na^+ y el transportador de aminoácidos dependiente de Na^+ y Cl^- , ATB^{0+} expresado en el hipocampo (Jones *et al.*, 2010).

En altas concentraciones L-carnitina reduce la muerte celular neuronal de manera dosis-dependiente, esto según un estudio realizado por Kim *et al.*, donde evaluaron el efecto neuroprotector de L-carnitina sobre un bloqueo de oxígeno-glucosa en cultivo primario de neuronas corticales de ratas. Así, redujo la liberación de especies reactivas

de oxígeno a una concentración de 10 y 100 μM comparado con su grupo sin tratamiento. La aplicación de L-carnitina a 100 μM disminuyó significativamente la citotoxicidad e inhibió la apoptosis celular (Kim *et al.*, 2012).

3.2 CARNITINA EN SISTEMA COLINÉRGICO

L-carnitina tiene participación sobre neuronas corticales y se indica que podría actuar como un portador del grupo acetilo a través de la membrana mitocondrial interna. De esta manera, un derivado de carnitina, la acetil carnitina ejerce una acción excitatoria sobre células sensibles a acetilcolina además de su semejanza estructural, sugiriendo ser un precursor potencial de acetilcolina. Simone *et al.*, (1991) encontraron un incremento en la expresión de NGF (factor de crecimiento neural) y de la actividad enzimática CHAT posterior a la administración exógena i.c.v. de acetilcarnitina, sugiriendo que el efecto del fármaco sea de forma indirecta en las neuronas colinérgicas cerebrales (Simone, 1991).

Según un estudio donde se evaluó la actividad colinérgica en ratas macho adultas lesionadas parcialmente en la vía septo-hipocampal específicamente en el haz de fimbria-fornix unilateral hipocampal hallaron diferencias entre individuos tratados con acetilcarnitina y sin el tratamiento. En el grupo lesionado y tratado con acetilcarnitina se observó una restauración a valores basales de colina acetiltransferasa (ChAT) en fibras y neuronas de la misma estructura; mientras que para acetilcolinesterasa (AChE) el tratamiento fue incapaz de restaurar la mencionada enzima. Por otro lado en las ratas lesionadas y sin tratamiento con acetilcarnitina se observó una reducción significativa de actividad enzimática colinérgica ipsilateral a la lesión comparada con el hipocampo contralateral. De esta manera se demuestra la incidencia del tratamiento con acetilcarnitina en determinadas enzimas colinérgicas del hipocampo (Piovesan *et al.*, 1995).

3.3 EFECTO DE CARNITINA EN NEURONAS GABA Y GLUTAMATÉRGICAS

El estrés oxidativo, es provocado por una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y se considera una de las principales causas de la degeneración neuronal. Los antioxidantes, como L-carnitina, son conocidos por sus propiedades neuroprotectoras contra especies reactivas de oxígeno en neuronas (Wu *et al.*, 2014).

En un estudio donde se evaluó el periodo y duración de los disparos eléctricos en neuronas de cultivo celular de ratón, se encontraron registros electrofisiológicos que marcaban una reducida cantidad de disparos eléctricos así como la duración de éstos en muestras con L-carnitina. De esta forma Wu *et al* ha demostrado que L-carnitina modula la actividad de disparos eléctricos a través de la activación del receptor GABA_A en neuronas corticales de ratón conduciendo a la inhibición de la actividad neuronal proporcionando mecanismos protectores de L-carnitina contra el estrés oxidativo. La actividad de disparo de las neuronas corticales disminuyó a una concentración de 2.0 mM de L-carnitina (Wu *et al.*, 2014).

En un estudio donde se evaluó la participación de L acetilcarnitina en ratas macho sometidas a un daño de la medula espinal (nervio ciático) y en ratas intactas que estuvieron sometidas a un tratamiento de 24 días con inyecciones repetidas de L-acetilcarnitina que provocaron analgesia. Se observó un aumento en la expresión de los receptores metabotrópicos glutamato 2 (mGlu) en el segmento lumbar de la médula espinal y en corteza cerebral. También se observó una expresión aumentada de receptores mGlu2/3 en la corteza cerebral pero no en el hipocampo de los animales tratados con LAC. Los autores especulan que la activación endógena de los receptores mGlu2 adquieren la capacidad de controlar la liberación de glutamato a partir de fibras aferentes primarias sólo en animales tratados con LAC en los que hay una mayor probabilidad de que el glutamato liberado endógenamente reclute los autoreceptores presinápticos mGlu2. La selectividad regional del efecto de LAC sugiere que el gen del receptor mGlu2 no es un sensor de los cambios metabólicos inducidos por el tratamiento de LAC en células nerviosas (Chiechio *et al.*, 2002).

3.4 CARNITINA EN LA REPRODUCCIÓN

Se han encontrado hallazgos de carnitina endógena secretada por el epidídimo que está involucrada en la maduración del espermatozoide. Según un estudio donde se evaluó el efecto de la L-carnitina y su derivado, acetil carnitina (LAC), sobre la motilidad espermática y la calidad de la cromatina en muestras de espermatozoides de testículo de ratón. Los autores encontraron un incremento de los parámetros de motilidad espermáticos con el tratamiento de L-carnitina, acetilcarnitina y pentofixilina en todos los tiempos evaluados (30, 90 y 180 minutos) de incubación con los fármacos. La calidad de cromatina no presentó un aumento significativo como en los parámetros espermáticos. Estos resultados sugieren que L-carnitina y LAC condujeron a un aumento significativo en el porcentaje de los espermatozoides testiculares móviles. Así como un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides con histona normal y contenido de protamina, de esta forma hay un mejoramiento en la calidad de la cromatina in vitro (Aliabadiet *al.*, 2012).

Se ha observado que la carnitina, como suplemento nutricional, en un cultivo de células de Sertoli de ratas pre púberes incremento el metabolismo de carbohidratos, como lo es en la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa llevando a una mayor producción de lactato y piruvato así como en el transporte de hexosas. Así, la carnitina conduce a una mejora en la nutrición de células germinales sugiriendo una influencia positiva en la función testicular. (Palmero *et al.*, 2000)

El tratamiento con L-carnitina ha demostrado su efecto protector contra fármacos anticancerígenos utilizados en quimioterapias y que dañan a células germinales y espermáticas. Esto es señalado por un estudio donde se analizaron a mediano y largo plazo a ratas macho pre púberes tratados con L-carnitina previo a la administración de doxorubicina, un fármaco anticancerígeno. En ratas de 64 días mostraron una disminución en la apoptosis de células germinales, del mismo modo en ratas con 100

días de edad tratadas con L-carnitina se redujo la fragmentación de DNA de espermatozoides. La L-carnitina redujo un daño apoptoticoespermático y testicular provocado por doxorubicina de ratas pre púberes proporcionando una citoprotección parcial (Cabral *et al.*, 2014).

L-carnitina puede incrementar el volumen y la motilidad en pacientes con problemas de infertilidad conforme es citada según un estudio donde se evaluó a la L-carnitina en parámetros espermáticos así como su participación en el sistema colinérgico. Se encontró que el tratamiento con L-Carnitina favorece parcialmente los parámetros de motilidad, viabilidad y concentración espermática de ratas cuyos receptores de acetilcolina fueron inhibidos por Atropina de esta manera se sugiere un efecto protector de L-carnitina sobre los espermatozoides (Vera, 2017).

JUSTIFICACIÓN

La L-carnitina actúa como un estimulador de la actividad del sistema colinérgico del SNC capaz de restaurar enzimas colinérgicas en células previamente lesionadas, además posee funciones neuroprotectoras sobre células bajo estrés oxidativo reduciendo el nivel de apoptosis.

En este estudio nos proponemos evaluar si hay una participación del sistema colinérgico y L-carnitina sobre la morfología dendrítica hipocámpal, ya que debido al actual incremento del consumo de L-carnitina para reducir los niveles de grasa y proporcionar mayor disponibilidad de energía en la población masculina joven se ha visto una serie de beneficios en torno al empleo de este fármaco. Esto permitiría reconocer si existe una contribución de L-carnitina en el sistema colinérgico neuronal del hipocampo de ratas macho, además de si existe una comunicación neural de estructuras del SNC con actividades reproductivas a través de este sistema de comunicación colinérgico.

HIPÓTESIS

L-carnitina funciona como mimetizador químico de acetilcolina en el sistema colinérgico del SNC donde se espera un incremento de los parámetros morfológicos dendríticos como son longitud y arborización dendrítica total, así como de la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1 de rata macho adulta tratadas con L-carnitina, sulfato de atropina y en su combinación.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del sistema colinérgico y la L-carnitina sobre la morfología dendrítica de neuronas de CA1 del hipocampo de ratas macho adultas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la longitud dendrítica total de neuronas de CA1 del hipocampo de ratas macho adultas tratadas con L-carnitina, sulfato de atropina y en su combinación.

Evaluar la arborización dendrítica total de neuronas de CA1 del hipocampo de ratas macho adultas tratadas con L-carnitina, sulfato de atropina y en su combinación.

Cuantificar la densidad de espinas dendríticas de neuronas CA1 del hipocampo de ratas macho adultas tratadas con L-carnitina, sulfato de atropina y en su combinación.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Long Evans de 21 días de edad mantenidas en condiciones convencionales de Bioterio con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad con agua y alimento *ad libitum*. Durante todo el experimento se mantuvieron en el bioterio Claude Bernard de la BUAP. Se agruparon en cinco tratamientos que a continuación se describen: Testigo absoluto (TA), Vehículo (Vh), L-Carnitina (L-Car), Atropina (Atr) y L-Carnitina + Atropina (L+A).

Los grupos se conformaron con 12 individuos para cada uno, a un grupo se le administró diariamente a partir del día 21 hasta el 27 de edad una dosis de 125 mg/Kg i.p. de L-Carnitina (L-Car). A otro grupo se le aplicó desde el día 84 hasta el 91 de edad 125 mg/kg de sulfato de atropina (A) vía oral, otro más se les administró ambos fármacos (L-Car + A) en el mismo tiempo y forma que los fármacos individuales, un grupo se le aplicó únicamente solución salina (Vh) como grupo control y finalmente otro grupo no recibió nada como grupo testigo absoluto (TA).

TINCIÓN GOLGI COX

Para el sacrificio de los animales, se anestesiaron previamente con 0.2 mg/Kg de peso corporal de cada individuo mediante el uso de pentobarbital sódico. Posteriormente se realizó una perfusión cardiaca donde se expuso la caja torácica y principalmente el corazón, se introdujo una aguja con solución salina en el ventrículo izquierdo y se hizo una incisión en el ventrículo derecho (figura 8). Es así que se extrajeron los cerebros de las ratas y se mantuvieron en solución Golgi-Cox ($K_2Cr_2O_7$ 170 mM, $HgCl_2$ 200 mM, K_2CrO_4 200 mM) obtenida del Laboratorio de Neuropsiquiatría del Instituto de Fisiología BUAP durante una semana y después se cambió a nueva solución Golgi-Cox donde permanecieron hasta por 3 semanas más en total oscuridad. Luego se cambió a solución de sacarosa al 30 % 5 días antes de su disección (este último paso por

sacarosa confiere al tejido flexibilidad, por lo que es menos propenso a la resequead y a la fractura cuando se corta).

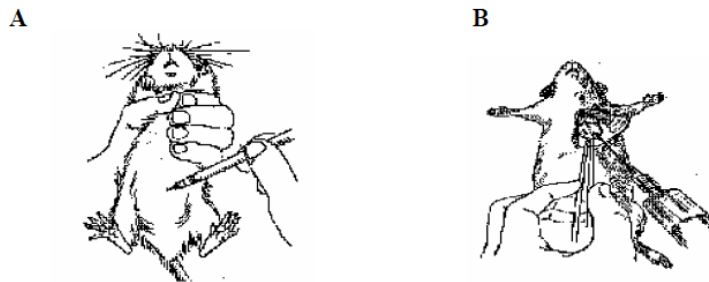


Figura 8. Administración de pentobarbital sódico (0.20 mg/Kg) a la rata (A) y perfusión intraventricular con solución salina (B).

Para los cortes histológicos se utilizó el vibratomo motorizado (Camden Instrument, MA750). Se montó el cerebro en la platina utilizando cianoacrílico como pegamento para posteriormente ser cubierto con solución de sacarosa al 6% o agua destilada. Se realizaron cortes coronales de 200 μ m, se fijaron en laminillas previamente gelatinizadas al 2% presionándolas uniformemente con papel filtro (figura 9). Dichas láminas se mantuvieron en una cámara húmeda y se procedió a realizar el protocolo de revelado de la tinción en total oscuridad. Tomada y modificada la técnica de Gibb, 1998.



Figura 9. Montaje de los cortes sobre los portaobjetos gelatinizados.

Se utilizó el método de tinción Golgi-Cox que a continuación se describe.

- Se sumergieron las laminillas en agua destilada durante 1 minuto
- Se colocaron en hidróxido de amonio durante 30 minutos en oscuridad.
- Se enjuago en agua destilada durante 1 min.
- Enseguida se colocaron en el fijador Kodak para película (1:1) por 30 minutos en oscuridad.
- Se enjuagaron en agua destilada durante 1 min
- Se colocaron en diferentes concentraciones de alcohol:
 - alcohol 50 % por 1 min
 - alcohol 70 % por 1 min
 - alcohol 95 % por 1 min
 - alcohol 100 % durante 5 min
 - alcohol 100 % durante 5 min
- posteriormente se colocaron en xileno por 15 minutos para aclarar el tejido.
- finalmente se cubrieron las secciones con resina

DIBUJO DE NEURONAS

Posteriormente se realizaron dibujos de neuronas piramidales mediante un microscopio óptico con una cámara lucida acoplada (figura 10). Se identificó el núcleo CA1 (Paxinos y Watson, 1986) e inmediatamente 10 neuronas piramidales que se encontraran aisladas, con 3 dendritas basales diferenciadas y completamente teñidas. Las neuronas piramidales del núcleo CA1 se dibujaron con el objetivo 40X de un microscopio óptico marca Leica.

Las espinas dendríticas se dibujaron con el mismo microscopio y con el objetivo 100X, para el análisis de las espinas se distinguió la dendrita más distal de una neurona previamente dibujada. Se realizaron 10 contabilizaciones por cerebro.

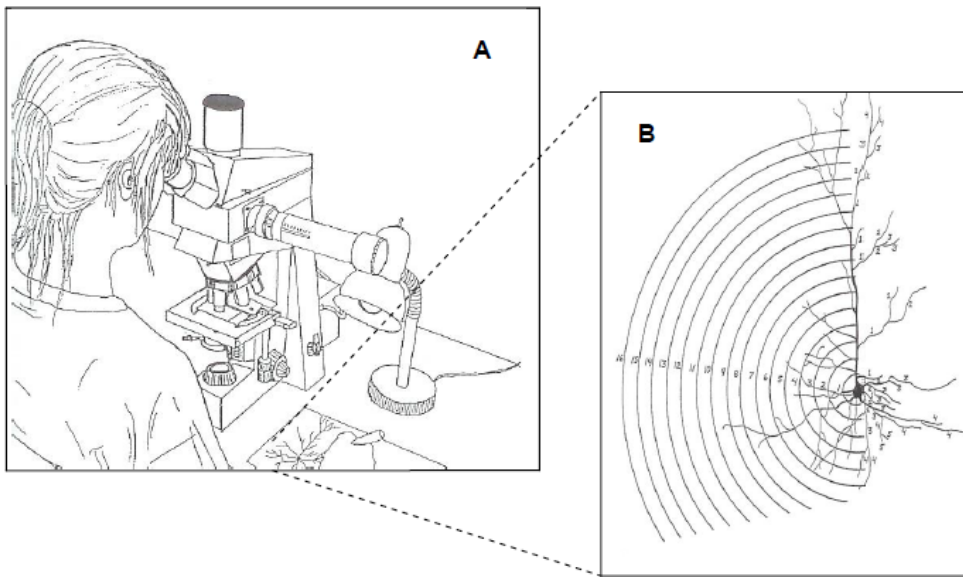


Figura 10. Esquema que muestra la observacion del dibujo de las neuronas piramidales con una camara lucida acoplada al microscopio Leica.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Los dibujos de las neuronas se analizaron mediante el método de Sholl el cual consiste en sobreponer una serie de círculos concéntricos alrededor del soma de la neurona, de los cuales el centro debe coincidir con el soma, de esta manera se determina el número de dendritas que interceptan cada uno de los círculos subsecuentes, lo cual nos permitió evaluar la longitud dendrítica por segmento de $10\mu\text{m}$ y el total, así como el número de ramificaciones, pudiendo determinar así el número máximo de orden dendrítico por cada neurona analizada entintar de un color diferente a cada dendrita según su orden de ramificación reconociéndolas como primero, segundo, tercero,..etc. n orden.

Para la evaluación de la densidad de espinas, se dibujó aproximadamente 6 cm de la dendrita distal, cada 1.8 cm representa $10\mu\text{m}$, por lo tanto se contabilizan las espinas que se encuentren dentro de los 5 cm y se divide entre 3, promediando el número de espinas. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), con una $p \leq 0.05$

RESULTADOS

PESO CORPORAL

Nuestros resultados mostraron que la administración de L-carnitina o atropina o su combinación en la rata macho prepúber no modificó significativamente el peso corporal así como de los grupos tratados con solución salina y testigo (Fig. 11). No se encontró diferencia significativa entre los grupos Vh y TA por lo que se omitió la comparación de TA con los demás tratamientos.

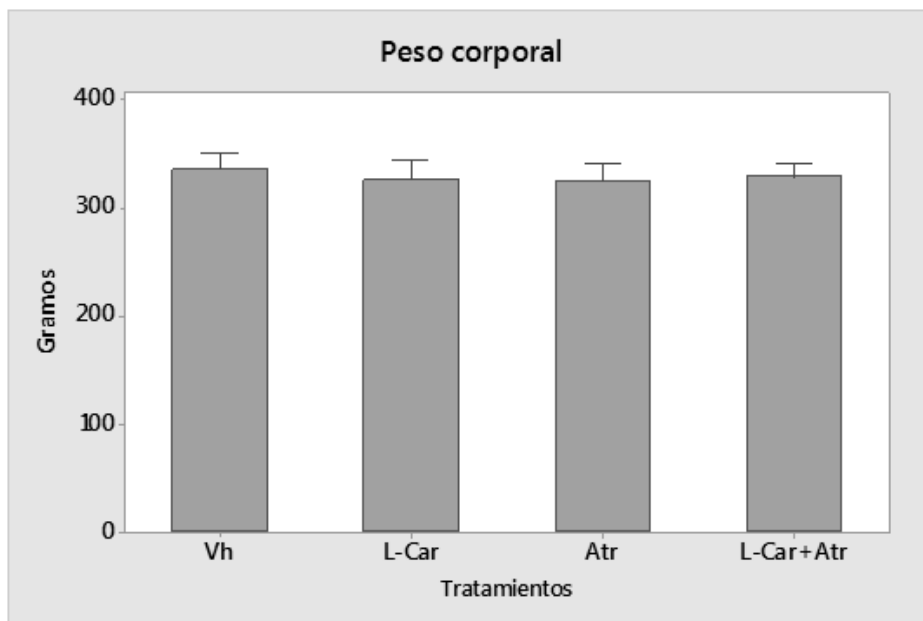


Figura 11. Gráfica que muestra la media del peso corporal de ratas tratadas a los 21 días de edad con L-carnitina (L-car) o su vehículo (Vh) y con administración de Atropina (Atr) o su vehículo a los 84 días de edad, así como la combinación de los tratamientos L-Carnitina+ Atropina (L-car+Atr). No hubo diferencias significativas del peso corporal entre los tratamientos.

LONGITUD DENDRITICA

Se analizó la longitud dendrítica total de las neuronas piramidales de la región CA1 para todos los tratamientos. Las neuronas piramidales tratadas con Atr mostraron significativamente un incremento en la longitud dendrítica de su árbol basal (Fig. 12) Hay diferencias significativas únicamente entre los tratamientos Atr y Vh.

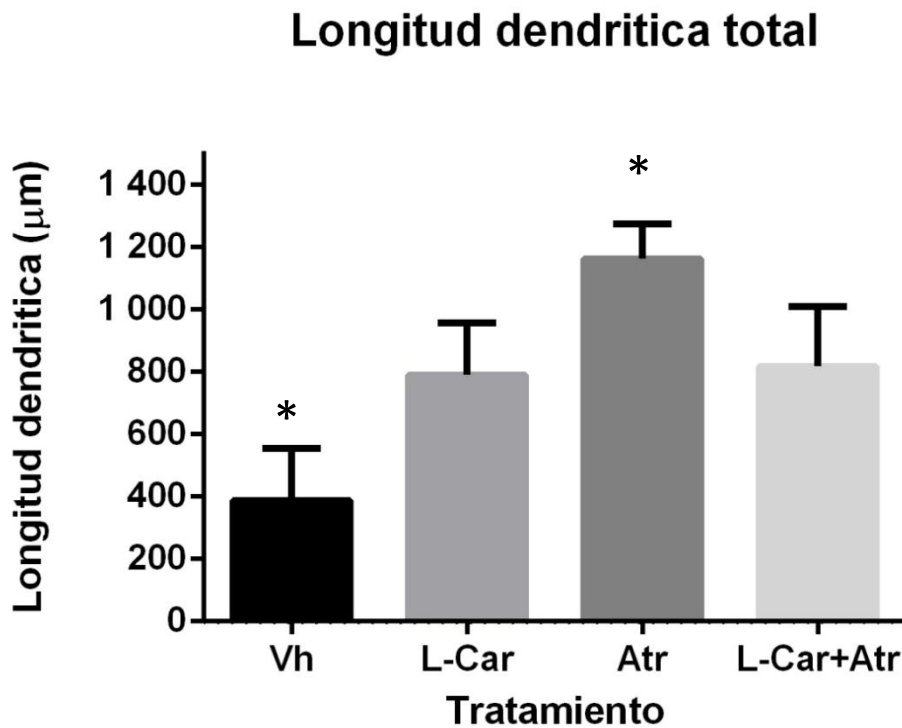


Figura 12. Grafica que muestra la longitud dendrítica de neuronas piramidales de CA1 para todos los tratamientos; se encontró diferencia significativa entre el grupo vehículo (Vh) y atropina (Atr). Atropina mostro un incremento de la longitud dendrítica total comparado con vehículo, con una $p \leq 0.05$

ARBORIZACIÓN DENDRÍTICA

La arborización dendrítica se observó mediante el análisis de Sholl, esto es, cuantificando el número de intersecciones de dendritas por cada círculo de Sholl, donde cada círculo representa 10 μm de longitud a partir del soma

Se realizó una evaluación de la arborización dendrítica de neuronas piramidales de la región CA1 para cada tratamiento utilizado. El análisis cuantitativo de las neuronas piramidales demostró que hubo un aumento significativo de la arborización dendrítica en el grupo Atr (Fig. 13)

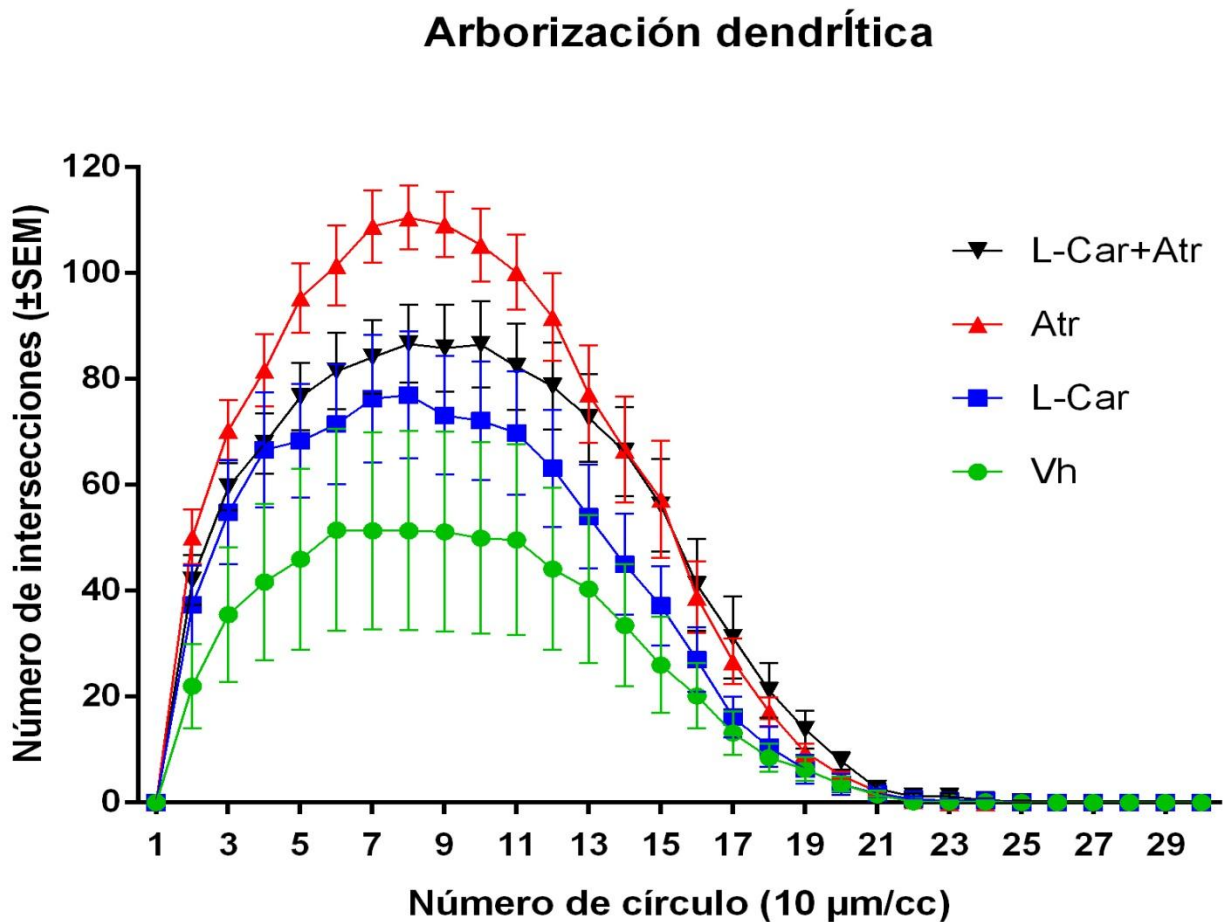


Figura 13. Gráfica que muestra el número de intersecciones por cada círculo en el análisis de Sholl. Se observa que el grupo tratado con atropina (Atr) presentó un aumento en el número de intersecciones con relación al grupo vehículo (Vh) $p \leq 0.05$

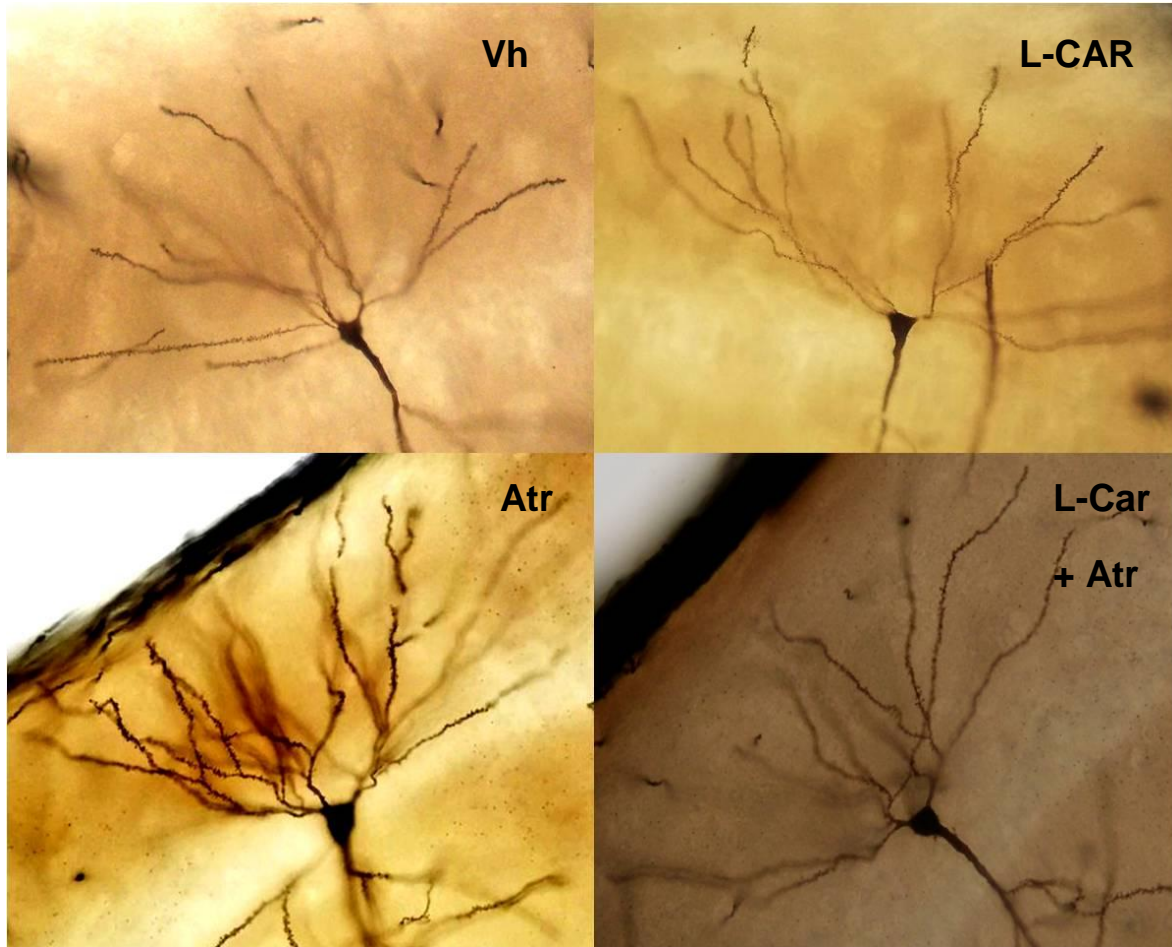


Figura 14. Fotografías representativas de neuronas impregnadas con la tinción Golgi-Cox que muestran la arborización dendrítica basal de las neuronas piramidales de la región CA1. Se observa la arborización dendrítica para el grupo tratado con Atr y se advierte el aumento de la arborización Tomadas a 40X.

Los resultados indican importantes diferencias significativas entre Vh y Atr; donde el grupo Atr reveló mayor arborización dendrítica comparada con el grupo Vh.

La comparación entre los grupos que presentaron diferencias significativas son Atr y Vh para el análisis de la arborización dendrítica (Fig. 15). El tratamiento con Atr mostró un aumento en el número de intersecciones por círculo, indicando así una mayor arborización dendrítica de las bifurcaciones basales de las neuronas piramidales CA1

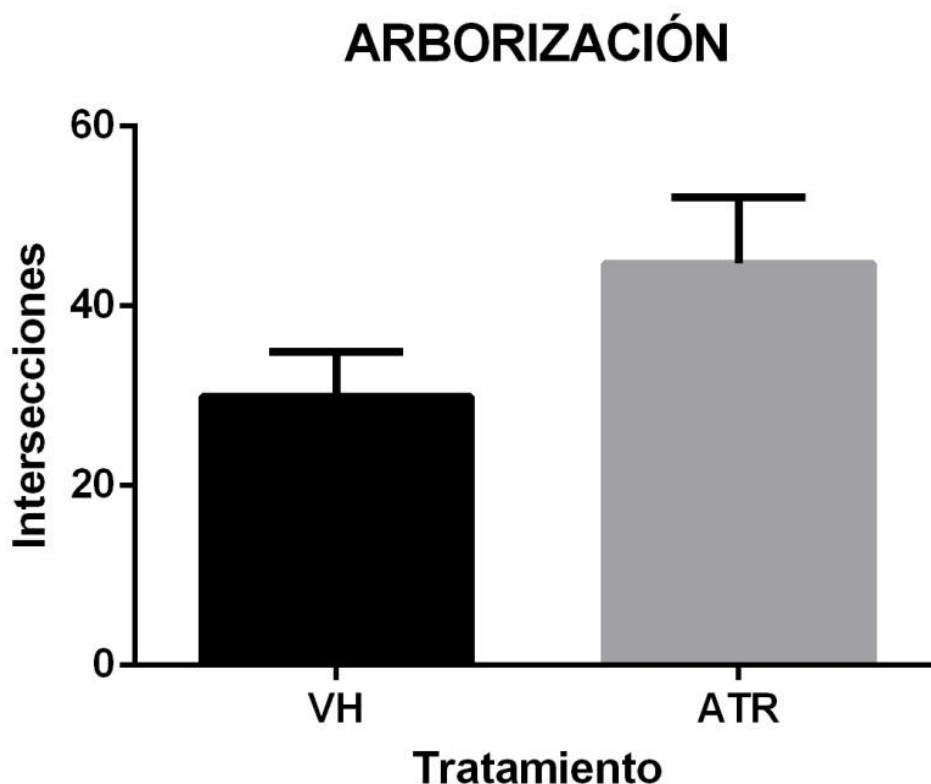


Figura 15. Grafica que señala la comparación del grupo tratado con Atr y Vh con diferencias significativas en su arborización. El grupo tratado con Atr presenta un incremento en la arborización dendrítica total contrapuesto con el grupo Vh.

DENSIDAD DE ESPINAS

Se analizó la densidad de espinas de las dendritas de neuronas piramidales que fueron incluidas en el análisis de Sholl. No se encontró diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 16). Los resultados obtenidos de las espinas impregnadas con la tinción Golgi-Cox son presentadas con ilustraciones de espinas de ramificaciones pertenecientes al árbol dendrítico basal de las neuronas piramidales en la Fig. 17.

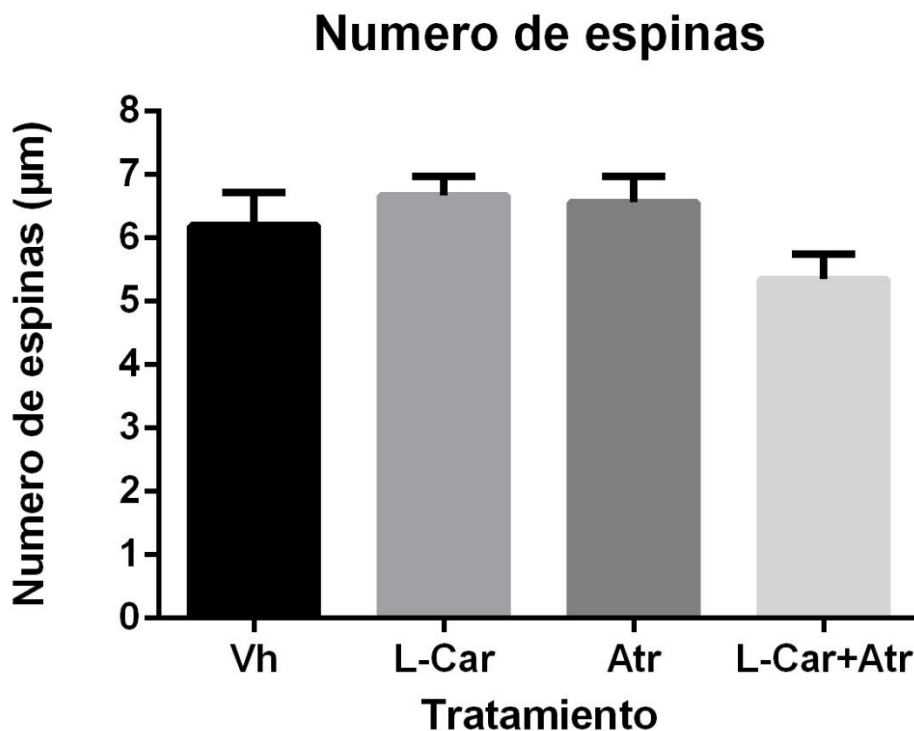


Figura 16. Gráfica que muestra la densidad de espinas de dendritas distales de neuronas que fueron incluidas en el análisis de Sholl. No hay diferencias significativas entre los tratamientos.

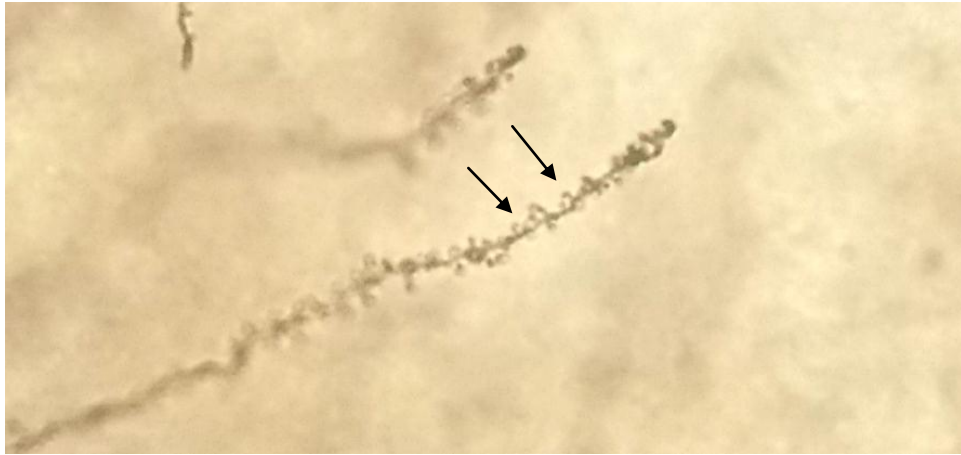


Figura 17. Se observan las espinas dendríticas señaladas con flechas oscuras. Tomadas con el objetivo 100X.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que en la rata macho adulta sólo la administración de atropina provocó un incremento de la longitud y arborización dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo dorsal. La administración previa de L-carnitina a la de atropina bloquea dichos cambios en la morfología dendrítica de las neuronas piramidales. Se ha mostrado que la acetilcolina puede ser una influencia negativa en el crecimiento de las neuritas en las neuronas de mamíferos, ya que los antagonistas nicotínicos mejoran el crecimiento dendrítico de células del ganglio retiniano de rata *in vitro*, presumiblemente bloqueando los efectos inhibidores de la ACh liberada de las neuronas amacrinas en el medio de cultivo (Lauder&Schambra, 1999). Este estudio concuerda con nuestros resultados por lo que en las ratas macho de 12 semanas de edad el bloqueo colinérgico inducido mediante la administración de la atropina pudo activar los mecanismos plásticos que incrementaron la longitud y arborización dendrítica en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo una semana después del bloqueo colinérgico.

Por otra parte, existen varias evidencias que sugieren que la L- carnitina y la acetil-L-carnitina estimulan el sistema colinérgico (Simone 1991, Picciotto 2012, Traina 2016). Por ejemplo Piovesan et al. (1995) mostraron que en la rata macho adulta con lesión de la vía septo-hipocampal la administración de acetil-L-carnitina durante 4 semanas restaura los niveles de actividad de las enzimas colinérgicas ChAT y AChE del septum, del núcleo basal magnocelular y de la corteza prefrontal. Lo anterior apoya nuestros resultados que mostraron los animales del grupo L-car + Atr donde la administración previa de L-Carnitina evitó un incremento de la longitud y arborización dendrítica de las neuronas piramidales hipocampales de la región CA1. De igual forma explicaría cómo la L-carnitina, por vía del sistema colinérgico, tendría efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la arborización dendrítica de las neuronas piramidales del hipocampo.

De acuerdo a los receptores de neurotransmisores y neuropéptidos encontrados en tejido testicular asimismo se han encontrado en el hipocampo receptores a estas mismas proteínas, por ejemplo somatostatina y neuropéptido Y, así como receptores a moduladores como serotonina, esteroides, endocannabinoides y acetilcolina que juegan un rol importante en el hipocampo Witter *et al* (2004). El sistema colinérgico está presente en células neuronales y no neuronales, la presencia de receptores podría indicar un efecto modulador de ACh actuando a diferentes niveles por ejemplo en tejido de parénquima testicular ejerce efectos en la diferenciación de células germinales. Schirmer *et al* (2011).

El sistema colinérgico está asociado a tejido no neuronal en epitelio y neuronal actuando como un neuromodulador desde el hipocampo a través de alguna vía neural hacia tejido reproductor, los testículos. Schirmer *et al* (2011) encontraron maquinaria enzimática colinérgica expresándose en espermatogonias y espermatoцитos.

Previamente mostramos que en la rata la administración de atropina a las 12 semanas de vida provoca una disminución significativa del número de espermatozoides, de la viabilidad y la motilidad, así como una reducción de la fertilidad (Vera 2017). Estos cambios pueden estar asociados al bloqueo colinérgico como ya ha sido mostrado por otros autores (Sato *et al*. 2005, Yoshiki *et al*. 2002,). Nuestro estudio puede aportar evidencias de que esta disminución de la fertilidad en parte es mediada por cambios en la información neural que presentan de manera bidireccional los testículos y diversas regiones del SNC, es decir que el incremento de la longitud y arborización dendrítica en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas tratadas con atropina pueden asociarse a información nerviosa que lleve a una disminución de la fertilidad.

Previamente mostramos que en la rata prepúber la hemiorquidectomía unilateral izquierda provoca en la etapa adulta un aumento significativo en la arborización dendrítica y en la longitud dendrítica por número de orden de las neuronas piramidales del hipocampo en la región CA1, mientras que el efecto es contrario cuando se realiza una hemiorquidectomía unilateral derecha (Santos 2017). Al momento no existe en la literatura suficientes evidencias que apoyen la participación del hipocampo en la

regulación de la reproducción. Nuestro grupo de trabajo está aportando evidencias experimentales que permitan considerar al hipocampo como una estructura más del SNC que participan en la regulación de los mecanismos neuroendócrinos y neurales que regulan la espermatogénesis.

Existe un estudio que muestra que la activación de los receptores muscarínicos a acetilcolina de la región de CA1 del hipocampo regula la excitabilidad glutamatergica. Mediante registros electrofisiológicos *in vitro* de secciones hipocampales CA1 han mostrado que la acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica, mediante la inhibición de la AChE provoca la activación de receptores muscarínicos acetilcolinérgicos y que éstos disminuyen la transmisión glutamatergica (Narimatsu *et al.* 2010). En ese sentido hay toda una heterogeneidad de receptores colinérgicos en terminales pre y postsinápticos de células del hipocampo, el nAChR (receptor colinérgico nicotínico) localizado en terminales presinápticas. Éste receptor puede regular la liberación de otros neurotransmisores, mientras que si se encuentra en membranas postsinápticas regula la transmisión sináptica colinérgica. Cabe mencionar que la activación del nAChR regula la permeabilidad de Ca^{2+} en los diferentes compartimentos neuronales y está asociada al incremento intracelular de los niveles de cAMP (Cheng & Yakel 2015). También esta vía que implica la activación de proteínas G lleva a desencadenar mecanismos plásticos en las neuronas piramidales de CA1 y CA3 como es una disminución del crecimiento axonal (Cheng y Yakel, 2015; Nordman y Kabbani, 2014; Nordman *et al.*, 2014).

Existen evidencias que muestran una relación entre el sistema colinérgico y los sistemas de transmisión sinápticas excitatorias. Por ejemplo, en cortes coronales de hipocampo de la rata adulta el bloqueo del sistema colinérgico a través de la administración de atropina (un antagonista de los receptores muscarínicos) provoca un incremento de los potenciales postsinápticos excitatorios en neuronas piramidales de CA1. Lo contrario se observa si se administra un inhibidor de la enzima AChE. El tratamiento combinado de ambos fármacos mantiene el incremento de transmisión sináptica excitatoria (Narimatsu *et al.*; 2010). Lo anterior apoya nuestros resultados, dado que mostramos un incremento de la arborización y longitud dendrítica en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo de ratas adultas tratadas con atropina.

Los resultados de Wu et al. (2014) indican que el antioxidante L-carnitina en una concentración de 2.0mM inhibe completamente la actividad eléctrica de redes corticales de ratón principalmente a través de la activación de receptores GABAérgicos. Así, los autores sugieren la participación de mecanismos GABAérgicos que tal vez contribuyen a las acciones protectoras de L-carnitina.

Existe evidencia que sugiere una participación del NGF sobre neuronas colinérgicas (Niewiadomska et al 2011, Traina 2016) especialmente sintetizado en neuronas del hipocampo Niewiadomska et al (2011). El NGF endógeno y exógeno regula tanto el tamaño celular de las neuronas colinérgicas así como la extensión de su arborización terminal recayendo así sus efectos sobre la cantidad de sinapsis colinérgicas disponibles para la transmisión de información. La expresión de NGF en el hipocampo está regulada por actividad neuronal, los aumentos son causados por la neurotransmisión glutamatérgica y colinérgica Niewiadomska et al (2011). A pesar de que no hubo cambios estadísticamente significativos entre los grupos de L-car y TA; se observó un paralelismo en la longitud y arborización dendrítica de las neuronas piramidales tratadas solo con L-Carnitina, esto podría ser explicado por la posible producción de NGF en las neuronas piramidales del hipocampo bajo una neurotransmisión colinérgica efectuada por L-Carnitina.

La disminución en la expresión de NGF en neuronas colinérgicas es causada por la neurotransmisión GABAérgica. NGF envía retrógradamente señalización proapoptótica hacia el cuerpo celular para promover apoptosis (Niewiadomska et al., 2011). El hipocampo presenta una importante inervación GABAérgica y este tipo de neurotransmisión estaría disminuyendo la expresión de NGF en las neuronas evaluadas indicando que no incrementó la longitud dendrítica de las neuronas tratadas con L-carnitina. De esta manera, el grupo tratado con L-carnitina y atropina, a pesar de no encontrar diferencias significativas, consiguió una correspondencia entre los fármacos, pudiendo ser explicado por la síntesis de NGF por neuronas piramidales que ejerció un efecto proapoptótico o incluso apoptótico de las dendritas evaluadas produciendo la disminución de su arborización y longitud.

CONCLUSIONES

- La administración de Atropina incrementa la arborización y longitud dendrítica total de neuronas piramidales CA1 del hipocampo de ratas macho tratadas a los 84 días de edad debido a mecanismos plásticos activados por el bloqueo colinérgico.

- La administración previa de L-Carnitina a la de atropina, no permite un incremento de la longitud y arborización dendrítica de las neuronas piramidales hipocámpales de la región CA1 teniendo efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la arborización dendrítica de las neuronas piramidales del hipocampo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal A., Mulgun A., Hamada a., Chyatte M., (2015). A unique view on male infertility around the globe *Reproductive biology and endocrinology* Vol. 13 Pp. 1-9
- Aliabad E., Merahnjani M.S., Borzoei Z., Talaei-Khozani T., Mirkhani H., Tabesh H. (2012) Effects of L-carnitine and L-acetylcarnitine on testicular sperm motility and chromatin quality *Journal of reproduction medicine* Vol. 10 Pp. 77-82
- Ban Y., Sato T., Nakatsuka T., Kemi M., Samura K., Matsumoto H., Cukierski M., Van Zwiten M. J. (2002) Impairment of male fertility induced by muscarinic receptor antagonists in rats *Reproductive toxicology* Vol. 16 Pp: 757-765
- Cabral R.E., Okada F.K., Stumpp T., Vendramini V., Miraglia S.M. (2014) Carnitine partially protects the rat testis against the late damage produced by doxorubicin administered during pre-puberty *Andrology* Vol. 2 Pp. 931-942
- Cheng Q. & Yakel J. L., (2015) The effect of $\alpha 7$ nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus *Biochemical pharmacology* Vol. 97 Pp. 439-444
- Chiechio S., Caricasole A., Barletta E., Storto M., Catania M.V., Copani A., ...Nicoletti F., (2002) L-acetylcarnitine induces analgesia by selectively up-regulating mGlu2 metabotropic glutamate receptors *Molecular pharmacology* Vol. 61 Pp. 989-996

Deng W., Aimone J. B., Gage F. H. (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Neuroscience* Vol. 11 Pág. 340

De Simone R., Ramacci M.T., Aloe L. (1991) Effect of acetyl-L-carnitine on forebrain cholinergic neurons of developing rats *Journal neuroscience* Vol. 9 Pp. 39-46

Furriery M.B., Urbanski H. F., Hohne-Zell B., Mayerhofer A. (2000) Neuronal elements in the testis of the rhesus monkey: ontogeny, characterization and relationship to testicular cells *Neuroendocrinology* Vol. 71 Pp. 43-50

Gerendai I., (2004) New on the neural control of gonadal function supraspinal innervation of the gonads. Vol. 54 Pp. 218-224

Gerendai I., Banczerowski P., HalászB., (2005). Functional significance of the innervation of the gonads *Endocrine* 28 Pp. 309-318

Gibb R. y Kobb B., (1998) A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole Rat brain *Journal of neuroscience method* Vol. 79 Pp. 1-4

Huo S., Xu Z., Zhang X., Zhang J., Cui S. (2010) Testicular denervation in prepuberty rat inhibits seminiferous tubules development and spermatogenesis. *Journal of reproduction and development* Vol.56 Pp. 370-378

Jones L., Mc Donald D.A., Borum P.R., (2010) Acylcarnitines: role in brain *Progress in Lipid Research* Vol. 49 Pp. 61-75

Jurkiewicz N. H., Caricati-Neto A., Ferreira V. L., Avellar W. A. C. Resende R. H., Jurkiewicz A. (2006). Sympathetic neurotransmission in the rat testicular capsule: functional characterization and identification of mRNA encoding α 1-adrenoceptor subtypes *European journal of pharmacology* Vol.543 Pp. 141-150

Kim Y.J., Kim S.Y., Sung D.K., Chang Y.S., Park W.S. (2012) Neuroprotective effects of L-carnitine against oxygen-glucose deprivation in rat primary cortical neurons. *The Korean pediatric society* Vol. 55 Pp. 238-248

Lauder J.M. &Schambra U.B., (1999) Morphogenetic Roles of Acetylcholine *Environmental Health Perspectives* Vol. 107 Pp. 65-69

Mayerhofer A.,Frumgieri M. B., Fritz S., Bulling A., Jessberger B., Vogt H-J. (1999) Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicularpathologies *Journal of andrology*Vol. 20 Pp. 341-347

Martini F.H., Timmons M.J. &Tallitsh R.B. (2009) Anatomía humana 6a. edición Pearson educación Madrid editorial Gea consultoría

Narimatsu E., Niiya T., Kawamata T., Kawamata M., Yamakage M., (2010) Effects of atropine and pralidoxime on neuronal actions of paraoxon in rat hippocampal slices *Neuroscience Research*Vol. 68 Pp. 276-284

Niewiadomska G., Mietelska-Porowska A., Mazurkiewicz M. (2011) The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton *Behavioural Brain Research* Vol. 221 Pp. 515-526

Novaira H. J., Sonko L. M., Hoffman G., Koo Y., Ko C., Wolfe A., Radovick S., (2014) Disrupted Kisspeptin Signaling in GnRH Neurons Leads to Hypogonadotropic Hypogonadism *Molecular endocrinology* Vol. 28 Pp. 225-238

Nalecz K.A., Miecz D., Berezowski V., (2004) Carnitine: transport and physiological functions in the brain. *Molecular aspects of medicine* Vol. 25 Pp. 551-567

Orta-Salazar E., Cuellar-Lemus C.A., Diaz-Cintra S., Feria-Velasco A.I. (2014) Marcaje colinérgico en la corteza cerebral y el hipocampo en algunas especies animales y su relación con la enfermedad de Alzheimer *Neurología* Vol. 29 Pp. 497-503

Palmero S., Botazzi C., Costa M., Leone M., Fugassa E. (2000) Metabolic effects of L-carnitine on prepubertal rat sertoli cells. *Hormone and metabolic Research* Vol. 32 Pp. 87-90

Paxinos G., Watson, C., 1998. The Rat Brain in Stereotactic Coordinates Academic Press, New York.

Piccioto M. R., Higley M. J., Mineur Y. S., (2012) Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* Vol. 76 Pp. 116-129 DOI: 10.1016/j.neuron.2012.08.036

Piovesan P., Quatrini G., Pacifici L., Tagliatela G., Angelucci L., (1995) Acetyl L-carnitine restores choline acetyltransferase activity in the hippocampus of rat with partial unilateral fimbria-fornix transection *Journal development and neuroscience* Vol. 13 Pp. 13-19

Pan W. X., McNaughton N. (2004) The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus *Progress in neurobiology* Vol. 74 Pp. 127-166

Santos N., (2017) Efectos de la orquidectomía unilateral sobre la morfología dendrítica de neuronas piramidales del hipocampo de la rata adulta (Tesis de licenciatura) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

Sato T., Ban Y., Uchida M., Gondo E., Yamamoto M., Sekiguchi Y., Sakaue A., Kemi M. and Nakatsuka T. (2005) Atropine-induced inhibition of sperm and semen transport impairs fertility in male rats *The journal toxicological sciences* Vol. 30 Pp. 207-212

Setchell B.P. & Breed W.G. (2006) Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract capítulo 17 Knobil and Neill's *Physiology of reproduction* (Pp 834) Elsevier

Schirmer S.U., Eckhardt I., Lau H., Klein J., DeGraaf Y.C., Lips K.S., Pineau C., Gibbins L., Kummer W., Meinhardt A., Haberberger R.V., (2011) The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. *Reproduction* Vol. 142 Pp. 157-166

Traina G. (2016) The neurobiology of acetyl-L-carnitine *Frontiers of bioscience* Vol. 21
Pp. 1314-1329

Vera R., (2017) El papel de la L-carnitina y el sistema colinérgico sobre la fertilidad de la
rata macho (Tesis de licenciatura) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
Puebla, México.

Wrobel K. H., Brandl B., (1998). The autonomous innervation of the porcine testis in the
period from birth to adulthood *Annals of anatomy* Vol. 180 Pp. 145-156

Wrobel K. H., Gurtler A., (2001) The nerve distribution in the testis of the cat *Annals of
anatomy* Vol. 183 Pp. 297-308

Witter Menno P., Amaral David G., (2004) Hippocampal formation capítulo 21 The rat
nervous system, tercera edición, Elsevier USA Pp. 635-704

Wu C., Gopal K. V., Moore E.J., and Gross G.W., (2014) Antioxidants L-carnitine and D-
methionine modulate neuronal activity through GABAergic inhibition *Journal of
Neural Transmission* Vol. 121 Pp. 683-693

ANEXO 1

ABREVIATURAS

Ach: acetilcolina

Atr: atropina

CA1: CornisAmonis 1

CA2: CornisAmonis 2

CA3: CornisAmonis 3

DNA ácido desoxribonucleico

FSH: hormona folículo estimulante

GABA: ácido Yaminobutirico

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

i.c.v.: intracerebro ventricular

L-Car: carnitina

L-Car+Atr: carnitina mas atropina

LH: hormona luteinizante

NGF: factor de crecimiento neural

OMS: organización mundial de la salud

RNAm: ácido ribonucleico mensajero

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

TA: testigo absoluto

Vh: vehículo