



BENEMERITA UNIVESIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Caracterización morfológica y  
bioquímica de las neuronas intrínsecas de los  
testículos del cobayo Hartley

Tesis

Que para obtener el Grado de Maestra en  
Ciencias Químicas en el Área de Bioquímica y  
Biología Molecular

Presenta

QFB. Laura Cano Rosas

Director MC. Félix Luna Morales  
Profesor-Investigador FCQ-BUAP

Codirector D.C. Victorino Alatraste Bueno  
Profesor-Investigador FCQ-BUAP

Puebla a 30 de octubre de 2018

## Agradecimientos

Laura Cano Rosas fue becaria del consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) No. 785109 (periodo 2016-2018) y VIEP (periodo agosto-octubre 2018).

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neuroendocrinología, FCQ-BUAP y la dirección de Felix Luna, profesor-investigador titular. Las fotografías fueron tomadas en el laboratorio de Neurofarmacología del Dr. Daniel I. Limón Pérez de León.



**VIEP**  
Vicerrectoría de Investigación  
y Estudios de Posgrado

Mis mas sinceros agradecimientos a mis directores de tesis M.C. Félix Luna Morales y al Dr. Victorino G.S. Alatraste Bueno, así como a la comisión revisora conformada por la Dr. Isabel Martínez Gracia, Dra. Liliana Martínez Mendieta, el Dr. Daniel I. Limón Pérez de León y al Dr. Oscar Gonzales Flores, que con sus comentarios enriquecieron mi trabajo.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Abreviaturas	
Índice de figuras	
Resumen	
I. INTRODUCCIÓN -----	1
1.1 Desarrollo embrionario de las gónadas -----	1
1.2 Estructura celular de los testículos y desarrollo posnatal -----	2
1.3 Espermatogénesis -----	4
1.4 Regulación hormonal y neural de la espermatogénesis -----	6
1.5 NeuN como marcador de neuronas -----	9
1.6 Origen de las neuronas intrínsecas -----	9
1.7 Localización de neuronas intrínsecas en los testículos -----	10
1.8 Fibras nerviosas periféricas de los testículos de los mamíferos -----	12
1.9 Mensajeros químicos intratesticulares -----	13
1.9.1 Catecolaminas -----	13
1.9.2 Péptidos (SP y VEGF) -----	14
1.9.3 Receptores TRPV1-----	16
1.9.4 VEGF -----	17
1.9.5 Óxido Nítrico -----	18
II. JUSTIFICACIÓN -----	19
III. HIPÓTESIS -----	20
IV. OBJETIVO GENERAL -----	20
4.1 Objetivos particulares -----	20
V. DIAGRAMA DE TRABAJO -----	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS -----	22
6.1 Técnica de Golgi-Cox -----	22
6.2 Técnica de inmunohistoquímica -----	22
6.3 Técnica de histoquímica -----	23
6.4 Pruebas estadísticas -----	23
VII. RESULTADOS -----	25

7.1 Los cobayos adultos poseen mayor número de neuronas intrínsecas aisladas que los cobayos neonatos -----	25
7.2 Los cobayos adultos poseen mayor cantidad de fibras nerviosas que los cobayos neonatos -----	26
7.3 Los cobayos adultos poseen mayor cantidad de ganglios que los cobayos neonatos ---	27
7.4 Caracterización bioquímica de NIT por inmunohistoquímica -----	28
7.4.1 Neuronas intrínsecas cFos-positivas -----	28
7.4.2 Neuronas intrínsecas TH-positivas -----	29
7.4.3 Neuronas intrínsecas SP-positivas -----	30
7.4.4 Neuronas intrínsecas CGRP-positivas -----	31
7.4.5 Neuronas intrínsecas TRPV1-positivas -----	32
7.4.6 Neuronas intrínsecas VEGF-positivas -----	33
7.4.7 Los cobayos adultos Hartley poseen neuronas intrínsecas activas y expresan diferentes mensajeros bioquímicos -----	34
7.5 Células NADPHd-positivas -----	35
VIII. DISCUSIÓN -----	36
IX. CONCLUSIÓN -----	45
X. PRESPECTIVAS -----	45
XI. REFERENCIAS -----	46
XII. CONGRESOS -----	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Desarrollo embrionario de las gónadas -----	1
Figura 2 Barrera hemato-testicular (BTH) -----	3
Figura 3 Crecimiento testicular y espermatogénesis -----	6
Figura 4 Regulación hormonal y neural en el testículo -----	8
Figura 5 Esquema de la migración de las neuronas hacia las gónadas -----	10
Figura 6 Localización y distribución de neuronas y fibras nerviosas en testículo de mono <i>Rhesus</i> -----	11
Figura 7 Esquema de las fibras nerviosas en los testículos -----	13
Figura 8 Neuronas intrínsecas testiculares aisladas d cobayos adultos jóvenes -----	25
Figura 9 Fibras nerviosas en testículos de cobayos -----	26
Figura 10 Ganglios nerviosos en testículos de cobayos -----	27
Figura 11 Neuronas cFos-positivas -----	28
Figura 12 Neuronas tiroxina hidroxilasa positivas -----	29
Figura 13 Neuronas Sustancia P positivas -----	30
Figura 14 Neuronas positivas al péptido relacionado con el gen de la calcitonina -----	31
Figura 15 Neuronas reactivas al receptor TRPV1-----	32
Figura 16 Neuronas positivas al factor de crecimiento vascular endotelial -----	33
Figura 17 Los testículos de los cobayos Hartley poseen neuronas intrínsecas activas y expresan diversos mensajeros bioquímicos -----	34
Figura 18 Células NADPHd-positivas -----	32
Figura 19 Diagrama propuesto de la interacción de las NIT en los testículos de los cobayos ----	44

## ABREVIATURAS

A	Adrenalina
Ach	Acetilcolina
AEA	Anandamida
AMH	Hormona anti-mülleriana
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora 1
AR	Receptor a andrógenos
ATP	Adenosín trifosfato
BH <sub>4</sub>	tetrahidrobiopterina
BTB	Barrera hemato-testicular
CAP	Capsaicina
CAT	Catecolaminas
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CLR	Receptor de unión a calcitonina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CREB	Proteínas de unión a elementos de respuesta a AMPc
DA	Dopamina
DAG	Diacil glicerol
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DAT	Transportador de dopamina
DH	Dopamina hidroxilasa
dpc	Días después del coito
EEM	Error estándar de la media
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERK 1/2	Quinasas reguladas por señal extracelular
ES apical	Ectoplasma especializado apical
ES basal	Ectoplasma especializado basal
FAD	Flavín adenín dinucleótido
Fe <sup>2+</sup>	Hierro
FC	Factores de crecimiento

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMN	Flavín mononucleótido
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
hCG	Hormona coriónica gonadotrópica
HPG	Eje hipotálamo-hipófisis-gónada
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP <sub>3</sub>	Inositol 3-fosfato
kDa	Kilo Daltons
L-DOPA	L-3,4-DihidroxiL-fenilalanina
LH	Hormona luteinizante
LH-R	Receptor a hormona luteinizante
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos
MPT	Células mioides peritubulares
NA	Noradrenalina
NaCh	Canal de sodio dependiente de voltaje
NADPH	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido
NeuN	Proteína nuclear neuronal específica
NF200	Neurofilamento de 200 kD
NF-κβ	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIT	Neuronas intrínsecas testiculares
NK	Neuroquininas
NK1R	Receptor neuroquinina 1
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NPY	Neuropéptido Y
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
p57	Receptor de baja afinidad de neurotrofinas
PACAP	El péptido activador del adenilato ciclasa pituitaria



PEP	Péptidos
PI3K	Fosfatidil inositol 3 kinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
RAMP1	Proteína que modifica la actividad del receptor 1
RC	Receptor a catecolaminas
RFC	Receptores a factores de crecimiento
RPC	Proteína componente del receptor
RP	Receptor a péptidos
SNAP-25	Proteína asociada al sinaptosoma de 25 kD
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
SRY	Región determinante del sexo en el cromosoma Y
T	Testosterona
TH	Tiroxina hidroxilasa
TJ	Proteínas de unión estrecha
TnNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal trunca
TRPV1	Receptor de potencial transitorio a vanilooides 1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR-1	Receptor al factor de crecimiento endotelial vascular tipo 1
VEGFR-2	Receptor al factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2
XX	Cromosoma sexual femenino
XY	Cromosoma sexual masculino
$\beta$ -AN	Receptor $\beta$ -Adrenérgico

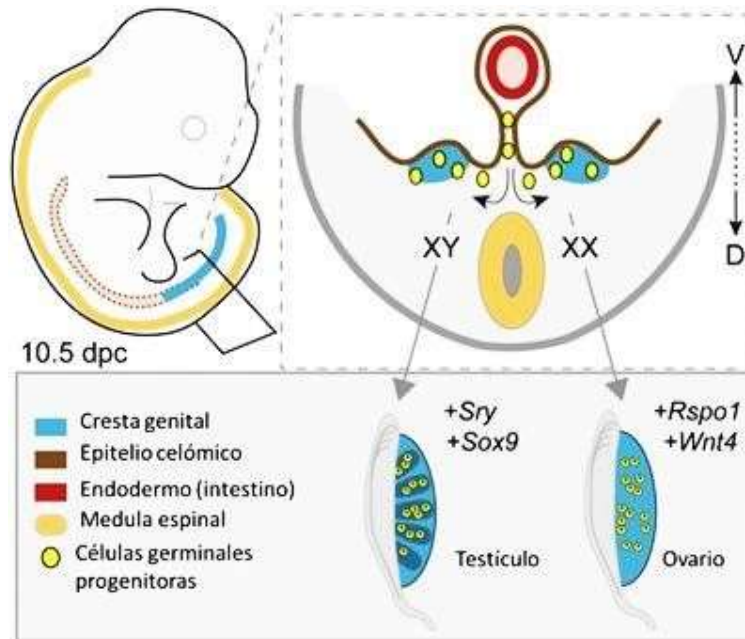
## **RESUMEN**

En los mamíferos, las neuronas intrínsecas gonadales han sido mejor caracterizadas en los ovarios, pero escasamente en los testículos. En esta tesis caracterizamos a las neuronas intrínsecas testiculares (NIT) de cobayos neonatos (0-2 días de edad) y cobayos adultos jóvenes (90 días de edad). Por la técnica de Golgi-Cox estudiamos la morfología, por histoquímica evaluamos la actividad NADPH-diaforasa y por inmunohistoquímica y anticuerpos específicos diversos mensajeros; NeuN, cFos, TH, CGRP, SP, VEGF y TRPV1. Las NIT fueron activas y estuvieron agrupadas en ganglios o aisladas, localizadas en el intersticio entre los tubos seminíferos, fueron redondas, fusiformes y multipolares. Resultaron NADPHd-, TH- CGRP-, SP-, VEGF y TRPV1-positivas y su número fue mayor en los adultos en comparación con los neonatos. Con base en nuestros resultados, las NIT del cobayo fueron catecolaminérgicas y peptidérgicas su mayor cantidad en los adultos coincide con la alta actividad hormonal y espermiática que caracteriza a los animales adultos jóvenes.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Desarrollo embrionario de las gónadas

En los mamíferos placentarios, el desarrollo del embrión es similar en ambos sexos de la etapa fetal. Las gónadas de los mamíferos surgen en ambos sexos de una estructura primordial común o cresta genital, que da origen a los ovarios o a los testículos (Figura 1) dependiendo de los genes expresados (Eggers y Sinclair, 2012; Svingen y Koopman, 2013; Tanaka y Nishinakamura, 2014). Aunque los testículos y los ovarios son funcionalmente análogos y surgen de una estructura primordial común, son órganos notablemente diferentes y su desarrollo está regulado por distintos programas de regulación génica y organización celular. El desarrollo de los testículos en el embrión requiere la formación y el ensamblaje de varios tipos de células; células de Sertoli, células de Leydig y espermatogonias que surgen del tejido precursor. Estos tipos de células no se diferencian de manera independiente, sino que dependen de las señales de las células de Sertoli que se diferencian bajo la influencia de los factores de transcripción SRY y SOX9 (Svingen y Koopman, 2013).

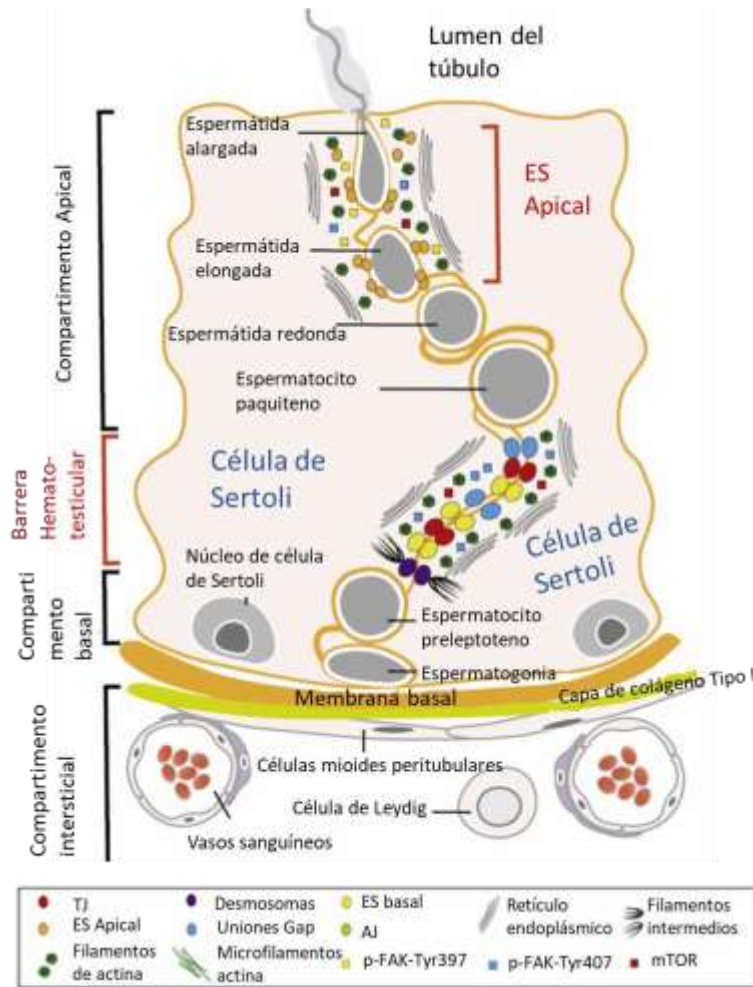


**Figura 1.** Desarrollo embrionario de las gónadas. En los mamíferos, las crestas genitales (azules) aparecen como bultos longitudinales a lo largo de las superficies del mesonefro en la cavidad celómica. En los ratones emergen a los 10 dpc mediante el reclutamiento de células del epitelio celómico (marrón). Las células germinales primordiales (amarillas) colonizan las crestas genitales (flechas), después de salir del intestino posterior (rojo) a través del mesenterio dorsal. En esta etapa, las crestas genitales pueden diferenciarse en testículos o en ovarios. A los 10,5 dpc, el gen *Sry* determina el sexo ligado al cromosoma Y, se expresa en las crestas genitales XY e inicia la expresión de *Sox9* y la diferenciación a testículos. En ausencia de *Sry*, ocurre la diferenciación a ovarios, se inicia por la acción de genes *Rspo1* y *Wnt4*. (D) dorsal; (V) ventral (Tomado y modificado de Svingen y Koopman, 2013).

## 1.2 Estructura celular de los testículos y desarrollo posnatal

El testículo del animal adulto joven tiene la función de producir hormonas y espermatozoides (Clermont, 1972; Lee y Cheng, 2008; Rolland *et al.*, 2008), posee dos divisiones celulares; los túbulos seminíferos y los espacios inter-tubulares. En los túbulos seminíferos, el epitelio está dividido en el compartimiento adluminal y el compartimiento basal por la barrera hemato-testicular (BTB) (Figura 2) (Lee y Cheng, 2008; Qing *et al.*, 2018). En el epitelio seminífero se encuentran las células de Sertoli y diversos tipos de células germinales; espermatogonias, espermatocitos y espermátidas. Las células mioideas peritubulares (MPT) son adyacentes a los túbulos y las células de Leydig residen en el espacio inter-tubular o intersticio. Cada tipo de célula realiza una función diferente, sin embargo, hay comunicación entre ellas para regular la producción de esperma durante la espermatogénesis (Huleihel y Lunenfeld, 2004, Dolores *et al.*, 2004). Por otro lado, la testosterona, se produce y se regula su concentración por las células de Leydig (Clermont, 1972; Kretser 2006; Rolland *et al.*, 2008; Koskenniemi *et al.*, 2017).

En la pubertad ocurre la maduración de los órganos genitales y el desarrollo de las características sexuales secundarias. Es un proceso regulado por el eje hipotalámico-pituitario-gónadas (HPG). Este eje de regulación es activo desde los primeros meses de vida, con niveles elevados de gonadotropinas, seguida por un período de reposo hasta la pubertad. La reactivación del eje HPG marca el inicio de la pubertad, aumenta la liberación pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y estimula la secreción la hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH), con esto activa la esteroidogénesis y la espermatogénesis en las gónadas (Tinggaarad *et al.*, 2012). Durante la pubertad, el aumento de volumen del testículo es evidente, un fenómeno con patrón sigmoideo en varias especies; ratón, toro, mono *Rhesus* y humanos (Rawlings *et al.*, 2008, Koskenniemi *et al.*, 2017).



**Figura 2.** Barrera hemato-testicular (BTH). En el testículo, la célula de Sertoli divide físicamente el epitelio seminífero dentro de un tubo seminífero, en compartimento apical y basal. La BTH se forma por las moléculas de adhesión entre las células de Sertoli creando un microambiente para el mantenimiento y diferenciación de las células germinales (Tomado y modificado de Qing *et al.*, 2018).

El tamaño de los testículos se duplica desde la infancia hasta la pubertad, teniendo un pico máximo en adultos jóvenes, siendo las células germinales las determinantes del volumen testicular. A pesar del efecto dominante de las células germinales, las células de Sertoli ejercen un efecto indirecto sobre el crecimiento testicular ya que determinan el número de células germinales (Rawlings *et al.*, 2008; Koskenniemi *et al.*, 2017). El número y la distribución de células de los testículos cambia con el crecimiento del órgano y ocurre antes de la pubertad, se debe a la elongación de los túbulos seminíferos como resultado de la proliferación de células de Sertoli durante el período neonatal y permanece en el periodo prepuberal. A diferencia del estado silente de la infancia, el crecimiento de los testículos en el periodo puberal es acelerado, principalmente debido al aumento en el diámetro de los

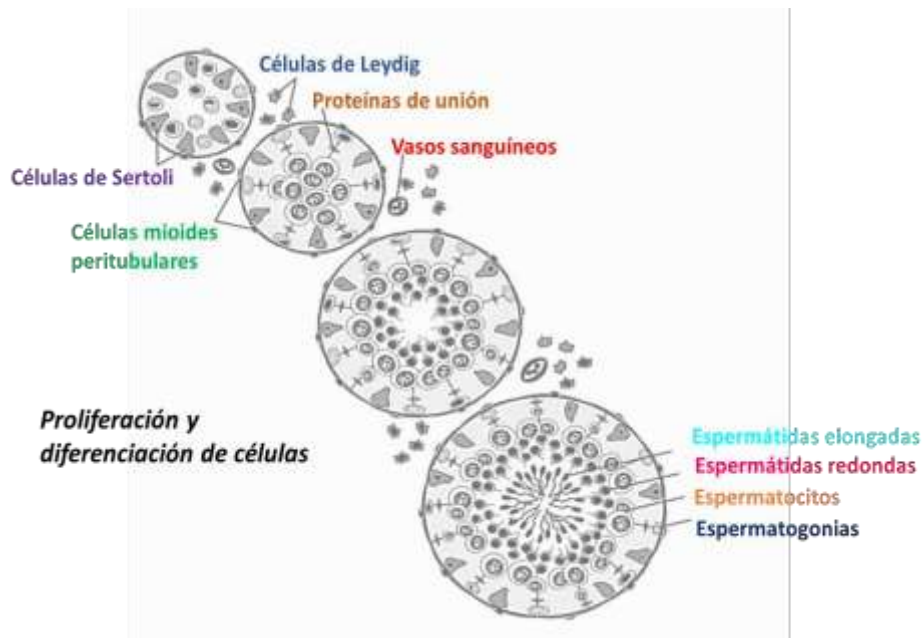
túbulos seminíferos por la proliferación, diferenciación y la expansión de las células germinales ya que inicia la espermatogénesis (Clermont, 1972, Rawlings *et al.*, 2008; Koskenniemi *et al.*, 2017). Es aceptado que en el periodo prepuberal y puberal la FSH promueve la proliferación y supervivencia de células de Sertoli y de las espermatogonias, mientras que la LH y los andrógenos son necesarias para la esteroidogénesis. Sin embargo, las tres hormonas (GnRH, FSH y LH) actúan en sinergia en la espermatogénesis normal que determinan el crecimiento de los testículos (Huleihel y Lunenfeld, 2004, Dolores *et al.*, 2004).

### 1.3 Espermatogénesis

La espermatogénesis ocurre en los tubos seminíferos, consiste en tres etapas; la proliferación de las espermatogonias y su transformación a espermatocitos. La reducción de los espermatocitos primarios y secundarios por divisiones meióticas que forman células haploides o espermátidas y la transformación de las espermátidas que conducen a la producción del espermatozoide (Clermont, 1972; Rolland *et al.*, 2008). A pesar de que la primera y la tercera fases de la espermatogénesis presentan características morfológicas específicas de la especie. Los espermatocitos tienen una morfología similar en diversas especies de mamíferos, además cada fase se puede subdividirse en pasos bien definidos. Una de ellas es que, la espermatogénesis tiene duración diferente por especie. Otra característica es, que un gran número de células madre o espermatogonias ingresan a la espermatogénesis de manera simultánea y sincrónica. En consecuencia, grandes grupos de células germinales, llamadas generaciones evolucionan sincrónicamente a lo largo del proceso espermatogénico, por lo tanto, el epitelio seminífero está compuesto por cinco o seis generaciones de células germinales que están dispuestas aleatoriamente pero que forman asociaciones de composición fija. Por lo cual se plantea la existencia de puentes intercelulares entre células vecinas que contribuyan al desarrollo sincronizado del de las células germinales; facilitando la difusión de sustancias intracitoplasmáticas, que pueden controlar la tasa de transformación de células germinales (Clermont, 1972). Se sabe que, en la pubertad durante la diferenciación de las células de Sertoli, las células forman uniones estrechas, que contribuyen a la formación de la barrera hemato-testicular que permite un microambiente especial necesario para la espermatogénesis (figura 3) (Lee y Cheng, 2008; Qing *et al.*, 2018). Estos cambios son

precedidos por el aumento de receptores a andrógenos (AR) en las células de Sertoli y coinciden con mayores niveles de testosterona circulante y niveles reducidos de la hormona anti-mulleriana (AMH), una proteína expresada exclusivamente en células de Sertoli en la vida fetal y que causa la regresión de los conductos de Müller, que da el fenotipo masculino (Koskenniemi *et al.*, 2017). Sin embargo, otros factores involucrados en el proceso para el ingreso simultáneo de espermatogonias a la espermatogénesis que están a distancia el uno del otro y no pueden ser conectados por puentes intercelulares. Se ha propuesto que las células de Sertoli, que están en contacto directo con todas las células germinales a través de sus largas prolongaciones citoplásmicas, podrían emitir sustancias que controla la tasa de desarrollo de estas células (Huleihel y Lunenfeld, 2004, Dolores *et al.*, 2004).

La espermatogénesis está soportada por las células de Sertoli que rodean y nutren las células germinales en desarrollo. La producción continua de espermatozoides por los túbulos seminíferos depende de la renovación de la población de espermatogonias. De hecho, nuevas espermatogonias deben surgir periódicamente para reemplazar aquellos que se diferencian en espermatocitos, que a su vez producen espermátidas y después espermatozoides. (Clermont, 1972), las células de Sertoli mantienen la renovación de las espermatogonias, de modo que las células germinales en desarrollo puedan producirse continuamente. Las células de Sertoli proporcionan factores de crecimiento y nutrientes para las células germinales en desarrollo (Huleihel y Lunenfeld, 2004, Dolores *et al.*, 2004). Además, las uniones de adhesión especializadas que se forman entre las células adyacentes de Sertoli que forman la BTB, funciona como filtro para pasar solo un determinado tipo de células diferenciadas hacia la zona del lumen (Qing *et al.*, 2018). Una vez que pasan la BTB, las células germinales continúan desarrollándose en espermatozoides de forma definida en un microambiente protegido. Sin embargo, debido a que la BTB evita el paso a las células germinales en el lumen y los factores suministrados por el sistema circulatorio, la célula de Sertoli satisface las necesidades de las células germinales más maduras (Dolores *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Crecimiento testicular y espermatogénesis. Durante la pubertad, la proliferación y diferenciación de las células germinales y células de Sertoli es activan y de esta manera aumenta el diámetro del tubo seminífero y el crecimiento de los testículos (Tomado y modificado de Rolland et al., 2008).

#### 1.4 Regulación hormonal y neural de la espermatogénesis

El sistema reproductor masculino está regulado por el sistema endocrino y el sistema nervioso. Dentro de la regulación hormonal, la FSH, la LH y la testosterona son las reguladoras principales, además del papel clave de las gonadotropinas y diversos neurotransmisores y factores de crecimiento secretados por las células intragonadales o por las terminales nerviosas periféricas, participan en la regulación testicular.

La fertilidad masculina depende de la persistencia exitosa de la espermatogénesis, y es aceptado que solo la testosterona secretada por las células de Leydig bajo el efecto de LH, es esencial en la espermatogénesis, en consecuencia, es importante la población final de células de Leydig en el testículo adulto y esta población se establece dependiendo de la proliferación y diferenciación de las células en la etapa prepuberal y se desarrollan en la edad adulta.

La testosterona, es el principal andrógeno en el testículo e interviene en cuatro procesos críticos; el mantenimiento de la barrera hemato-testicular, la meiosis, la adhesión de células de Sertoli-espermátidas y la liberación de esperma (Huleihel y Lunenfeld, 2004; Smith y Walker, 2014).



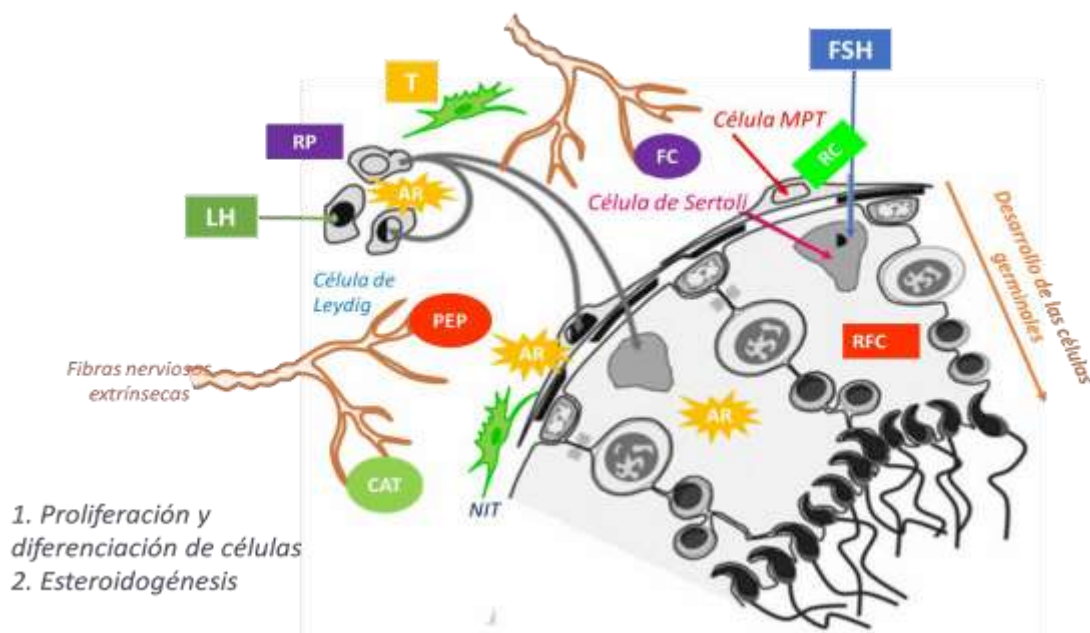
La acción de los andrógenos es mediada por el receptor a andrógenos (AR), a diferencia de las células germinales, las células de Sertoli, células mioides peritubulares y células de Leydig, células del músculo liso, arteriolas y células endoteliales vasculares expresan el receptor AR y estos receptores modulan los efectos de andrógenos sobre las células germinales y apoyan la espermatogénesis (Smith y Walker, 2014).

La testosterona actúa por vía paracrina y estimula el desarrollo de las células de Sertoli y las células mioides peritubulares (Smith y Walker, 2014). Por otro lado, la FSH induce la división y diferenciación de células de Sertoli y aumenta la capacidad espermatogénica (Figura 3) (Rolland *et al.*, 2008). En la adultez, la inhibina B, inhibe la secreción de FSH y la proliferación de células de Sertoli en el periodo peripuberal que precede a la espermatogénesis (Tinggaarad *et al.*, 2012). Las células de Sertoli, a su vez modulan el número de células germinales (Koskenniemi *et al.*, 2017).

A diferencia de los efectos hormonales bien establecidos, los efectos neurales sobre la espermatogénesis han sido poco estudiados. Las fibras simpáticas que inervan los testículos liberan diversos neurotransmisores como; neuropéptidos, acetilcolina y catecolaminas (Zhu *et al.*, 1995). Los diversos agentes químicos liberados son capaces de influir en la función de las células de Sertoli, las células de Leydig, las células mioides peritubulares y en la vasculatura a través de receptores específicos (Masufumi y Keiichi, 1973; Heindel *et al.* 1981, Mayerhofer *et al.*, 1992, Suburo *et al.*, 2002) además, pueden actuar como un mecanismo de respaldo para la producción de esteroides por las células de Leydig durante el estrés y para potenciar el efecto de las gonadotropinas durante las fases de desarrollo (Mayerhofer *et al.*, 1990). También hay evidencia que sugiere las catecolaminas y algunos péptidos pueden ser capaz de influir en desarrollo y diferenciación de las células intratesticulares (Shuying *et al.*, 2012). La fuente de los neurotransmisores en el testículo de los mamíferos proviene de la inervación extrínseca e intrínseca (Zhu *et al.*, 1995; Mayerhofer *et al.*, 1996; Frungieri *et al.*, 2000). También, se han localizado otras proteínas neuronales como la  $\beta$ -endorfina que modula los efectos de la FSH sobre la proliferación de las células de Sertoli, la secreción de inhibina y la proteína de unión a andrógenos, mediante la presencia de receptores opiáceos en células de Sertoli. Otras proteínas como NGF, el gen de proencefalina, NF-200, SNP25, NPY; en conjunto proporcionan apoyo para la regulación neuronal de la función de las células de Sertoli y quizás, de la espermatogénesis (Frungieri

*et al.*, 2000). Es importante precisar, que las células de Sertoli son los principales componentes celulares de los tubos seminíferos y proporcionan un adecuado entorno para la espermatogénesis (Clermont, 1972; Dolores *et al.*, 2004), los productos de las células de Sertoli son proteínas de transporte y de unión, proteasas, componentes de la matriz extracelular y una variedad de factores para la proliferación, diferenciación y metabolismo de las células germinales. Estos factores incluyen citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de señalización, péptidos bioactivos y hormonas (Dolores *et al.*, 2004).

La existencia de terminales nerviosas en el intersticio y rodeando a los tubos seminíferos, pero no en la proximidad cercana de las células de Sertoli (Prince, 1992) podría hablar de una relación no directa de la función neural, aunque se ha propuesto que algunos neurotransmisores pueden tener un efecto directo o indirecto mediante la modulación de secreción de los factores de crecimiento a través de las células de Sertoli y de esta manera desempeñar un papel en la comunicación de célula a célula que afectan la diferenciación, proliferación y función de las células testiculares (Figura 4) (Shuying *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Regulación hormonal y neural en el testículo. Las hormonas LH, FSH y testosterona (T) regulan la (1) diferenciación y proliferación de las células de Leydig, las células de Sertoli, las células mioideas peritubulares y células germinales a través de los receptores andrógenos (AR). Las fibras nerviosas y las neuronas intrínsecas (NIT) liberan catecolaminas (CAT), péptidos (PEP) y factores de crecimiento (FC). La acción de los neurotransmisores a través de sus receptores receptor a catecolaminas (RC), receptor a péptidos (RP) y recetores a factores de crecimiento (RFC) localizados en las células de Leydig, células de Sertoli y células mioideas peritubulares (MPT) (Tomado y modificado de Mayerhofer *et al* 1996; Dolores *et al.*, 2004; Smith y Walker, 2014).

### 1.5 NeuN como marcador de neuronas

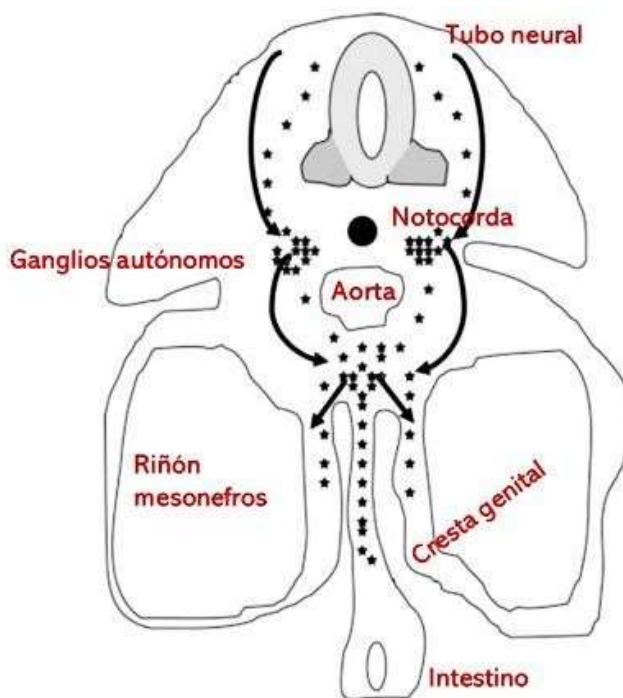
La proteína nuclear neuronal específica NeuN, se localiza en los núcleos y citoplasma de la mayoría de los tipos de células neuronales en el sistema nervioso central de los mamíferos. No se expresa en células gliales. Se han utilizado activamente anticuerpos monoclonales contra la proteína NeuN como marcador neuronal en la investigación inmunohistoquímica para la diferenciación de neuronas. NeuN tiñe principalmente el núcleo, pero el citoplasma también es inmunorreactivo, aunque en menor medida. Es posible que NeuN sea un factor de transcripción que se expresa en el núcleo y el citoplasma de las neuronas maduras, ya que no tiñe los núcleos de las células nerviosas inmaduras hasta que complete su desarrollo (Gusel'nikova *et al.*, 2015). Aunque las neuronas sanas normalmente expresan la proteína, se ha informado que la inmunoreactividad disminuye bajo diversas condiciones patológicas que afectan adversamente la viabilidad neuronal (Unal-Cevik *et al.*, 2004). Se ha establecido como un marcador universal para las neuronas, NeuN se ha utilizado como marcador de neuronas en ovarios y en testículos, (D'Albora *et al.*, 2000; Frungieri *et al.*, 2000, Dees *et al.*, 2006).

### 1.6 Origen de las neuronas intrínsecas testiculares (NIT)

Considerando que las gónadas tienen el mismo origen embriológico (Eggers y Sinclair, 2012; Svingen y Koopman, 2013; Tanaka y Nishinakamura, 2014) y que ambos, los ovarios y los testículos poseen neuronas intrínsecas (Frungieri *et al.*, 2000; D'Albora *et al.*, 2000; Luna *et al.*, 2015), se ha propuesto que las neuronas intrínsecas testiculares tienen el mismo origen que en los ovarios (Dees *et al.*, 2006).

Las neuronas intrínsecas provienen de la cresta neural que da origen al tubo neural, el cual es el precursor del cerebro y de la medula espinal (figura 5). Se originan durante desarrollo embrionario, migran de la cresta neural para formar ganglios autónomos bilaterales, denominada cadena simpática primaria, a lo largo de las partes dorsolaterales de la aorta, la migración neuronal continua desde los ganglios autónomos hasta la cresta genital. Emergen bilateralmente de los ganglios mesentérico superior y convergen en la línea media, debajo del borde ventral de la aorta y continúan su migración por la región ventral a lo largo de los bordes laterales de la aorta. Después llegan a la región medial por debajo de ella y continúan con su migración ventral hasta que divergen. Finalmente, la mayoría entran al

intestino, mientras que otras neuronas toman la ruta lateral e ingresan por la parte dorsal de la cresta genital en la superficie medial del riñón y después a las gónadas. Este fenómeno ocurre en el primer tercio del desarrollo fetal, y se ha reportado que las neuronas expresan p75 y la proteína nuclear neuronal NeuN (Dees *et al.*, 2006).



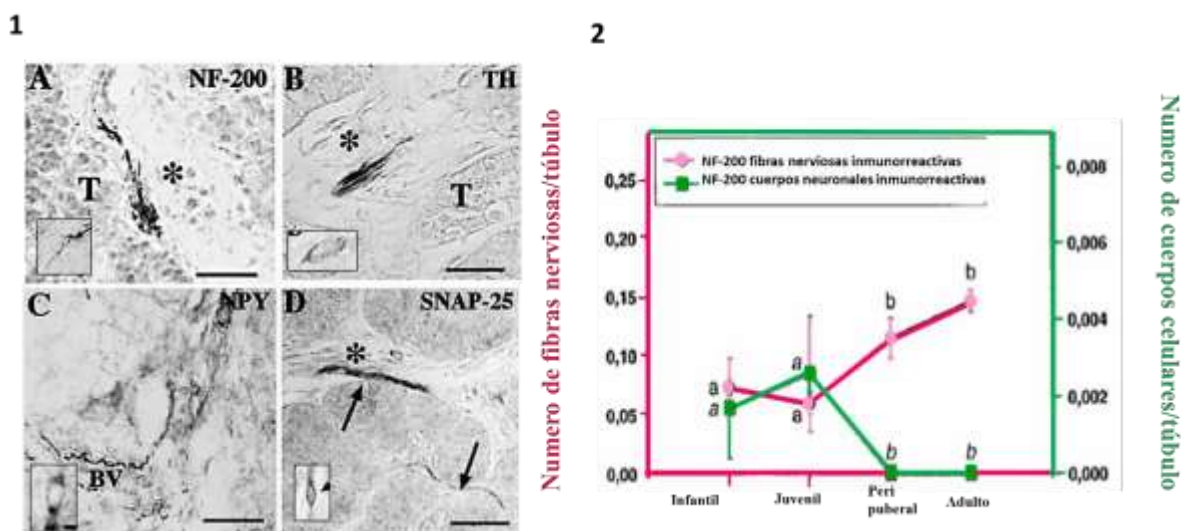
**Figura 5.** Esquema de la migración de las neuronas hacia las gónadas. La migración de las neuronas de la cresta neuronal a la cresta genital. Una población de estas neuronas emerge bilateralmente de los ganglios y continúa migrando ventralmente a lo largo de los bordes laterales de la aorta. Las neuronas finalmente se fusionan medialmente debajo de la aorta y luego continúan con una migración ventral hasta que divergen. En este punto, la mayoría de las neuronas continúan migrar ventralmente y entrar en el intestino en desarrollo, mientras que otras neuronas toman una ruta lateral para entrar en la cara dorsal de la cresta genital, situado en la superficie medial del riñón mesonefrico en desarrollo. A medida que el feto se desarrolla, las gónadas emergen de la cresta genital en desarrollo. Las flechas indican el camino de la migración neuronal hacia la cresta genital, y las estrellas representan las neuronas (Tomado y modificado de Dees *et al.*, 2006).

### 1.7 Localización de neuronas intrínsecas en los testículos

En el intersticio de los testículos de los monos *Rhesus* y de humano se han encontrado células similares a neuronas, fueron alargadas e inmunorreactivas a marcadores como tiroxina hidroxilasa, enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas, también al neurofilamento 200, a la proteína asociada al sinaptosoma (SAP-25), el neuropéptido Y (NPY), el canal de sodio dependiente de voltaje (NaCh) y el transportador activo de dopamina (DAT). Las neuronas se localizaron cercanas a los vasos sanguíneos entre las

células intersticiales y cerca de la pared de los tubos seminíferos, las células estuvieron aisladas y algunas cercanas a las fibras simpáticas, se propusieron como reguladoras de la espermatogénesis y moduladoras del flujo de sanguíneo (Frungieri *et al.*, 2000).

La cantidad de neuronas y de fibras cambió con la edad, hubo mayor cantidad de cuerpos neuronales en los testículos de los monos inmaduros en comparación con los animales sexualmente maduros, por el contrario, la cantidad de fibras aumentó con la edad (Figura 6) mientras que en testículos de humanos se encontró aumentado la densidad de fibras nerviosas y cuerpos celulares asociados a patologías testiculares como; el síndrome de Sertoli y hipoespermatozoospermia severo o detención de la célula germinal (SCO y GA) (Mayerhofer *et al* 1996, 1999; Frungieri *et al.*, 2000).



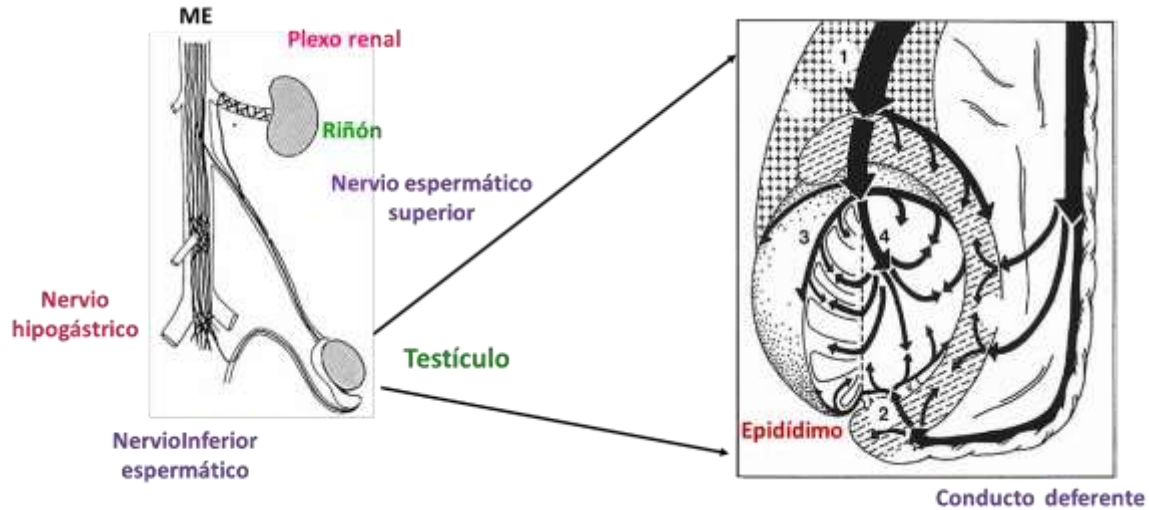
**Figura 6.** Localización y distribución de neuronas y fibras nerviosas en el testículo del mono Rhesus. 1) fibras y cuerpos neuronales reactivas a SNAP-25, NF-200, NPY, TH. 2) Cuantificación de fibras y cuerpos neuronales reactivos a NF-200 y cuerpos neuronales a diferentes edades. T= tubo seminífero, BV, vaso sanguíneo (Tomado y modificado de Frungieri *et al.*, 2000).

Estudios recientes han caracterizado a las neuronas intrínsecas de los ovarios de las cobayas Hartley, se reportaron neuronas intrínsecas con morfología diversa; neuronas redondas, fusiformes y multipolares, algunas de ellas estuvieron aislados y otras agrupadas formando ganglios y algunas neuronas formaron redes a través de sus dendritas. Bioquímicamente, las neuronas fueron NeuN/CGRP-, NeuN/TRPV1-, NeuN/TH- y NADPHd-positivas e indicadores de la variedad de mensajeros químicos que producen.

También fueron NeuN/cFos-positivas, un indicador de su actividad. Se propuso que las neuronas intrínsecas ováricas funcionan como sensores transmitiendo señales del estado fisiológico del ovario hacia el sistema nervioso central (Luna *et al.*, 2015).

### *1.8 Fibras nerviosas periféricas de los testículos de los mamíferos*

Los testículos poseen fibras de los nervios espermáticos superior e inferior. El nervio espermático superior se deriva del ganglio mesentérico caudal, es una rama del plexo renal y llegan a la cresta del testículo (Zhu *et al.*, 1995; Heinz y Birgit, 1998; Heinz *et al.*, 2000). Mientras que las fibras del nervio espermático inferior se derivan del plexo pélvico y entran al testículo por el polo opuesto junto con los vasos sanguíneos, posee fibras simpáticas y fibras parasimpáticas que corren a lo largo del conducto deferente y a la cauda del epidídimo, desde donde las fibras nerviosas alcanzan los testículos a través de la conexión entre la cola del epidídimo y la extremidad caudal del testículo (Figura 7). La distribución y la naturaleza de las fibras nerviosas del testículo se han estudiado mediante histoquímica, estableciendo diferencias en la distribución y la densidad de las fibras nerviosas en diferentes especies (Campos *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 2009). Se ha reportado que las fibras nerviosas se concentran en el intersticio, cercanas a las células de Leydig, en la lámina basal del tubo seminífero, sin penetrarlo, en la capa de musculo liso de venas y las arterias (Prince, 1992). Varios estudios han mostrado que los nervios testiculares regulan la secreción de hormonas y la espermatogénesis (Heinz y Anette, 2001; Suburo *et al.*, 2002).



**Figura 7.** Esquema de las fibras nerviosas en los testículos. Las ramas del nervio espermático superior alcanzan la cresta del testículo (1). Ramas del nervio espermático inferior acompañan al conducto deferente y alcanzan la extremidad caudal del testículo a través de un puente ligamentoso en la cola del epidídimo (2). En la extremidad anterior del testículo, los haces nerviosos se distribuyen en la túnica albugínea (3) y en el mediastino (4). Además, los haces nerviosos que alcanzan el extremo caudal también se distribuyen en la túnica albugínea y en los lóbulos testiculares (Tomado y modificado de Heinz y Anette, 2001).

## 1.9 Mensajeros químicos intratesticulares

### 1.9.1 Catecolaminas

Las catecolaminas pertenecen al grupo de transmisores llamados monoaminas. Contienen un núcleo catecol (3,4-dihidroxifenil), que es un grupo benceno con dos grupos hidroxilo adyacentes, así como una cadena lateral etilamina con un solo grupo amino que puede tener sustituciones adicionales; las catecolaminas existen en concentraciones bajas (micromolares) (Gnegy, 2012).

La tiroxina hidroxilasa (TH o tirosina 3-monooxigenasa) cataliza la conversión de sustratos L-tirosina y oxígeno molecular a L-3,4-Dihidroxil-fenilalanina (L-DOPA), el paso limitante de la biosíntesis de las catecolaminas: dopamina (DA), noradrenalina (NA) y adrenalina (A), algunas catecolaminas son neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico y también funcionan como hormonas en el sistema endocrino (Nagatsu, 2006). La TH requiere de cofactores, tetrahidropterina ( $BH_4$ ), oxígeno molecular ( $O_2$ ) y hierro ( $Fe^{2+}$ ). Es una enzima monomérica, consiste en cuatro subunidades idénticas de 60kDa, a cada una se une  $Fe^{2+}$  y  $BH_4$ . El N-terminal de cada subunidad tiene un dominio regulatorio que contiene numerosos sitios de fosforilaciones, mientras que el C-terminal contiene el dominio catalítico. La enzima es soluble y está unida a la membrana.

En los testículos, la noradrenalina (NA) y adrenalina (A) regulan las funciones testiculares en varias especies de mamíferos como ratas, ratones, monos y humanos, entre otros (Masufumi y Keiichi, 1973). Lo hacen a través de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos presentes en las células de Leydig y de Sertoli (Heindel *et al.*, 1981, Mayerhofer *et al.*, 1992). Modulan la producción de esteroides y de receptores a LH (Mayerhofer *et al.*, 1996), también el lactato y AMPc de las células de Sertoli (Kierszenbaum *et al.*, 1985) el tono vascular de las células musculares lisas (Mayerhofer *et al.*, 1990, Frungieri *et al.*, 2000) y la contracción de las células mioideas peritubulares (Miyake *et al.*, 1986).

Los receptores para NA y A, son los receptores adrenérgicos. Todos los receptores adrenérgicos son GPCRs (receptores acoplados a proteínas G), contiene siete dominios transmembranales, con el N-terminal extracelular y el segmento C-terminal intracelular. Los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, se acoplan a proteínas  $G_q/G_{11}$ , que activan la fosfolipasa C (PLC), lo que conduce a la liberación de  $Ca^{2+}$  y la activación de la proteína quinasa C (PKC), también activan la fosfolipasa D (PLD) y a las proteínas quinasa activados por mitógeno (MAPK). Mientras los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, están acoplados a proteína  $G_s$  y activan el adenilato ciclasa, incrementado los niveles del APMc, y la activación de la proteína quinasa A (PKA). Además, los receptores adrenérgicos están sujetos a múltiples modificaciones post-traduccionales: glicosilación, palmitoilación y la fosforilación, y que pueden regular al receptor (Graham *et al.*, 1996; Gnegy, 2012).

Las catecolaminas pueden ser potentes estimuladores fisiológicos de la secreción de testosterona y jugar un papel importante en el desarrollo y la regulación de la función testicular (Mayerhofer *et al.*, 1992, Shuying *et al.*, 2012), participan en la diferenciación y proliferación de las células de Leydig a través de sus receptores adrenérgicos, desde la etapa previa a la pubertad hasta la fase adulta (Shuying *et al.*, 2012).

### 1.9.2 Péptidos (SP y CGRP)

Los testículos también reciben inervación de tipo peptidérgica, con una diversidad de agentes bioquímicos (Suburo *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2009). Los péptidos son liberados por las terminales nerviosas e interactúan a través de receptores específicos localizados en otras células nerviosas, en células musculares lisas o las células intersticiales (Chiwataka *et al.*, 1991).



Los péptidos modulan la esteroidogénesis en las células de Leydig; el péptido activador del adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) estimula la secreción de testosterona de las células de Leydig mediante la activación de la proteína G (Gong *et al.*, 2009), la sustancia P (SP) reduce el número de sitios de unión a la LH en células de Leydig e inhibe la producción de testosterona (Kanchev *et al.*, 1995), el NPY también podría tener un papel en la esteroidogénesis testicular, además se ha sugerido estar asociado a la regulación del flujo sanguíneo por sus propiedades vasomotoras (Gong *et al.*, 2009)

La sustancia P (SP) es un péptido de 11 aminoácidos (RPKPQQFFGLM-NH<sub>2</sub>), presente en el sistema nervioso central y periférico. La SP traduce sus funciones al interactuar específicamente con los receptores de neuroquininas de alta afinidad (NK1R) acoplados a proteínas G. Los receptores NK1R se expresa en neuronas, células epiteliales, células endoteliales, células de musculo liso, entre otras (Mashaghi *et al.*, 2016). El acoplamiento de SP al receptor NK1R activan al adenilato ciclasa para producir AMPc, que posteriormente activa a PKA, además activan la fosfolipasa C, que genera DAG y IP<sub>3</sub>; IP<sub>3</sub> aumenta los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico y los DAG activan a la PKC, que finalmente activan a las MAPK; Las MAPK activan a ERK1/2, que se transloca al núcleo y media la expresión de genes, así como factores de transcripción como AP-1 y NF-κβ (Mashaghi *et al.*, 2016; Steinhoff *et al.*, 2014).

También se han identificado fibras positivas al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Suburo *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2009). El CGRP es un neuropéptido de 37 aminoácidos, resultado del “*splicing*” alternativo del gen de calcitonina, se localiza principalmente en las fibras sensoriales C y Aδ, al igual que SP. Estas fibras inervan ampliamente todo el cuerpo y tiene doble papel en la función sensorial y eferente (Wimalawansa, 1996). El receptor CGRP, está compuesto por dos heterodímeros: CLR, pertenece a la familia de los GPCR y RAMP1, una proteína de membrana que posee un gran dominio NH<sub>2</sub>-terminal extracelular. La heterodimerización de RAMP1 y CLR produce un receptor para CGRP. Sin embargo, se requiere de una proteína adicional, la proteína componente del receptor (RPC), para formar un receptor a CGRP con funcionalidad óptima. RPC, es una proteína pequeña (~17kDa), asociada a la membrana y es importante para la óptima transducción de la señal (Wimalawansa, 1996).

La unión de CGRP al receptor, activa a la proteína  $G\alpha_s$ , que a su vez activa al adenilato ciclasa, lo que conduce al incremento de AMPc, esta vía de señalización está relacionada con el efecto de CGRP en el musculo liso vascular y conduce a la vasodilatación. Además, CGRP puede proteger a las células musculares lisas vasculares contra la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (Russell *et al.*, 2014). Mientras, en células neuronales, el aumento de AMPc conduce a la activación de la PKA, la apertura de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP, también es capaz de activar a la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) a través de PKA, lo que sugiere que CGRP es capaz de afectar la transcripción de genes, también, CGRP activa a las MAPK, lo que puede conducir a la proliferación celular (Anderson & Seybold., 2004; Russell *et al.*, 2014).

### 1.9.3 Receptores TRPV1

Los receptores a vaniloides de potencial transitorio (TRPV1), son proteínas integrales de membrana que funcionan como homotetrámeros, cada monómero tiene seis repeticiones de anquirina en el dominio N-terminal citosólico y un dominio TRP en el extremo C-terminal citosólico, tiene seis dominios transmembranales (S1-S6) con un lazo P entre el dominio S5 y S6 que forman un canal catiónico no selectivo, son sensibles a cambios en la concentración de calcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) y se activan por estímulos nocivos, calor, temperatura superior a 42 °C, protones,  $pH < 5.9$ , varios productos naturales como la capsaicina (CAP) y lípidos endógenos como la anandamida (AEA) (Samanta *et al.*, 2018). En las neuronas sensoriales, los receptores son importantes en la nocicepción térmica y química (Samanta *et al.*, 2018), también se expresa en regiones neurogénicas del cerebro, donde hay diferenciación y plasticidad neuronal; Los receptores TRPV1 están involucrados en la dinámica del citoesqueleto, la migración celular, la supervivencia y la regeneración de las neuronas lesionadas, captan varios estímulos importantes para la neurogénesis y la integración de la red neuronal (Ramírez-Barrantes *et al.*, 2016). Además, se expresan en células no neuronales como: queratinocitos, vasos sanguíneos, entre otros.

En los testículos, la expresión de los receptores TRPV1 está presente en las células germinales, desde la espermatogonia hasta el espermatocito, e incluso en las células de Sertoli. Esta amplia expresión de TRPV1 dentro del tubo seminífero sugiere su participación en la regulación de la espermatogénesis (De Toni *et al.*, 2016). Los espermatozoides también

expresan el receptor TRPV1 en la región postacrosomal, donde desempeña un papel en la capacitación del espermatozoide, la activación del receptor TRPV1 a través de la unión de AEA ayuda a prevenir que la reacción espontánea de acrosoma ocurra de manera inoportuna antes de llegar al ovocito, el TRPV1 también participa en la motilidad espermática (Du Plessis, 2015).

#### 1.9.4 VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se le ha atribuido un papel en la fertilidad masculina, ya que se expresa por varios tipos de células en el tracto genital masculino, incluido las células de Leydig y Sertoli, células germinales, células peritubulares del epidídimo y el epitelio de la próstata y la vesícula seminal (Ergüna *et al.*, 1997; Korpelainen *et al.*, 1998; Nalbandian *et al.*, 2003), posee alta actividad angiogénica y se le ha atribuido propiedades sobre la proliferación y diferenciación de las células germinales (Nalbandian *et al.*, 2003) además, es necesario para la migración (Wang *et al.*, 2014) y la supervivencia de las de células endoteliales (Kliche & Waltenberger, 2008; Bott *et al.*, 2008; Sargent *et al.*, 2015). El VEGF también funciona como factor mitogénico y como vasodilatador, responsable de modular la vasculatura e influye en la permeabilidad de los capilares que pasan entre las células de Leydig y en la lámina propia de los túbulos seminíferos (Ergüna *et al.*, 1997).

El VEGF es una glicoproteína homodímera de 46-48 kDa y ejerce sus actividades mediante la unión de a dos receptores tirosin quinasa (VEGFR-1 y VEGFR-2), a pesar de su similitud estructural, los receptores de VEGF son funcionalmente diferentes: VEGFR-2 es responsable de inducir: proliferación, diferenciación y migración de celular, la liberación de óxido nítrico (NO), la supervivencia, la permeabilidad vascular y modula la expresión génica (Larrivé & Karsan, 2000; Kliche & Waltenberger, 2001), mientras que VEGFR-1, puede ser capaz de mediar respuesta de migración y adhesión celular y la organización de vasos sanguíneos (Larrivé & Karsan, 2000; Wang *et al.*, 2014). Ambos tipos de receptores se expresan en la microvasculatura testicular y diferentes tipos de células testiculares (Ergüna *et al.*, 1997; Korpelainen *et al.*, 1998; Nalbandian *et al.*, 2003).

### 1.9.5 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) se produce a partir de L-arginina a través del enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La reacción requiere oxígeno y cofactores como: nicotinámida adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), flavina mononucleótido (FMN), flavina adenina dinucleótido (FAD), calmodulina y calcio, lo que resulta en la formación de NO y un subproducto la L-citrulina. Existen 3 isoformas de la enzima NOS que ejercen su efecto a través de interacciones proteína-proteína y catalizan la reacción antes mencionada: 1) NOS endotelial (eNOS), 2) NOS inducible (iNOS) y 3) NOS neuronal (nNOS). Cada isoforma tiene un dominio reductasa que contiene un compuesto conocido como tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), esencial para la producción eficiente de NO (Lee y Cheng, 2008; Doshi *et al.*, 2012, (Buzadzic *et al.*, 2015). Las isoformas nNOS y eNOS sintetizan NO en el rango de nanomoles, a diferencia los micromoles generados por iNOS. El nivel excesivo de NO mayor 1µM, es perjudica para el sistema fisiológico por la producción de peroxinitrito, después de interactuar con oxígeno o superóxido. Por el contrario, la baja concentración de NO menor a 1µM, funciona como molécula reguladora (Lee y Cheng, 2008; Doshi *et al.*, 2012). Particularmente, en los testículos se ha identificado recientemente, una subclase específica de nNOS conocida como TnNOS que contribuye principalmente a la formación de NO. Se encuentra que la TnNOS se localiza únicamente en las células de Leydig, lo que sugiere su implicación en la esteroidogénesis (Wang *et al.*, 1997; Lee y Cheng, 2008). En general, estas isoformas se encuentran en varias células del testículo, incluidas las células de Sertoli, las células germinales, las células de Leydig, los miofibroblastos, las células mioides, las células endoteliales, incluso en los espermatozoides. La presencia ubicua de eNOS, iNOS y nNOS en el testículo es indicativa de la importancia de NOS para la espermatogénesis, la esteroidogénesis y la fertilidad (Lee y Cheng, 2008; Doshi *et al.*, 2012; Buzadzic *et al.*, 2015).

## II. JUSTIFICACIÓN

En los mamíferos, las neuronas intrínsecas gonadales han sido mejor caracterizadas en los ovarios, pero escasamente en los testículos. Se han reportaron en ovario neuronas intrínsecas con morfología diversa; neuronas redondas, fusiformes y multipolares, estuvieron aisladas o agrupadas en ganglios, algunas interconectadas por medio de sus dendritas. A través de técnicas inmunohistoquímicas y anticuerpos específicos, las neuronas fueron positivas a diversos marcadores como NeuN/CGRP-, NeuN/TRPV1-, NeuN/TH- y NADPHd-positivas siendo indicadores de la diversidad de mensajeros químicos que producen. También fueron positivas a NeuN/cFos indicador de activad. Los autores propusieron que las neuronas intrínsecas ováricas eran sensores y trasmitían señales locales del estado fisiológico intraovárico al sistema nervioso central (Luna *et al* 2015).

Aunque ya se ha descrito la presencia de fibras nerviosas y cuerpos neuronales en los testículos, aún se desconoce a detalle su morfología, tamaño y características bioquímicas (Mayerhofer *et al.*, 1996, 1999, Frungieri *et al.*, 2000). El estudio fue diseñado para examinar la distribución, la morfología y el fenotipo bioquímico de las neuronas intrínsecas de los testículos de cobayos neonatos (0-2 días de edad) y adultos jóvenes (90 días de edad). La información obtenida nos proporcionara una mayor información sobre el sistema de regulación intratesticular en individuos inmaduros y sexualmente maduros y si participación en la esteroidogénesis y la espermatogénesis.

### **III. HIPÓTESIS**

Los testículos del cobayo Hartley neonatos y adultos jóvenes poseen neuronas intrínsecas activas (NIT), de diversos tamaños, formas y expresan diversos mensajeros químicos.

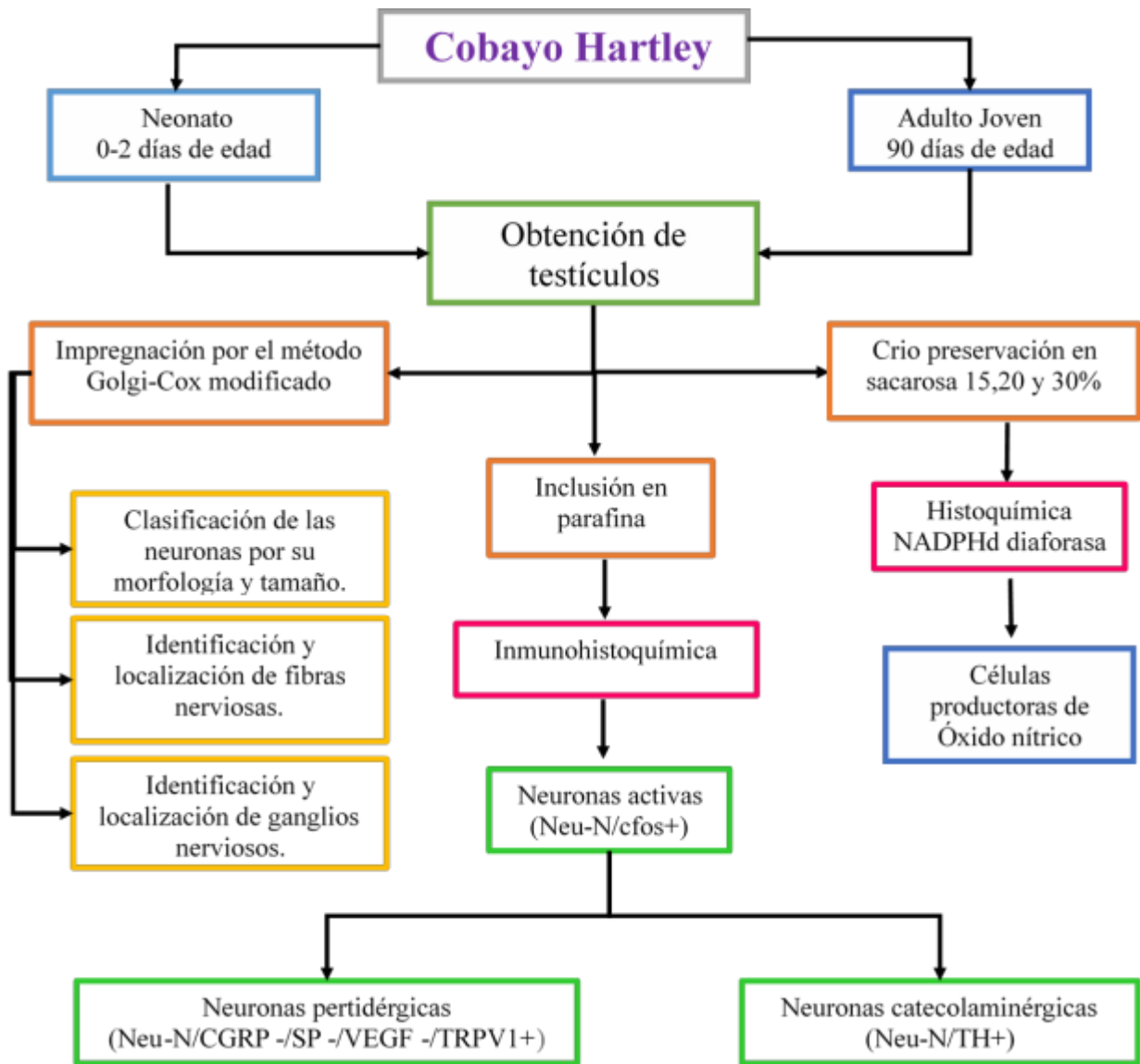
### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar las NIT de los cobayos neonatos y adultos jóvenes por su morfología, tamaño y fenotipo bioquímico.

#### *4.1 Objetivos particulares*

1. Comparar las poblaciones de NIT en el cobayo neonato y adulto joven, y su función en la madurez sexual.
2. Clasificar y cuantificar a las NIT por su tamaño y morfología, por medio de la técnica de Golgi- Cox.
3. Localizar y cuantificar fibras nerviosas y ganglios testiculares, por medio de la técnica de Golgi- Cox.
4. Cuantificar a las NIT activas, catecolaminérgicas, peptidérgicas y nitrérgicas, por medio de inmunohistoquímica e histoquímica.

## V. DIAGRAMA DE TRABAJO



## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron 20 cobayos; 10 neonatos de 1-2 días de edad y 10 adultos jóvenes de 90 días de edad. Para obtener los testículos fueron colocados en una cámara de CO<sub>2</sub> para inducir inconciencia. Inmediatamente después, por vía intracardiaca fueron perfundidos con solución salina isotónica (SSI) y posteriormente con paraformaldehído-salino (PFS). Finalmente, los testículos fueron disecados y post-fijados en paraformaldehído al 4%, el tiempo necesario para cada técnica.

### *6.1 Técnica de Golgi-Cox*

Los testículos estuvieron en la solución de Golgi-Cox y en oscuridad por 20 días con cambios de la solución cada 5 días. Después las muestras fueron enjuagadas con agua destilada y colocadas en solución de sacarosa al 30% por 15 días con cambios de solución a los 7 días. Posteriormente, se obtuvieron cortes histológicos a congelación de 60 µm de espesor. Los cortes se colocaron en portaobjetos recubiertos con grenetina al 2% para después realizar el revelado en oscuridad. Las laminillas fueron enjuagadas por 1 minuto con agua destilada, posteriormente se sumergieron en hidróxido de amonio al 30% por 30 minutos, seguido de un enjuague con agua destilada y posteriormente en fijador kodak al 50% por 30 minutos, los tejidos se deshidrataron con alcohol etílico a concentraciones crecientes (70, 96 y 100%) por 10 minutos cada uno, finalmente se cubrieron con el portaobjetos y sellaron con resina sintética.

### *6.2 Técnica de inmunohistoquímica*

Se usaron cortes histológicos de 7 µm de espesor, mismos que fueron desparafinados, hidratados y lavados en buffer de fosfatos y tritón al 2% (PBS-T). La recuperación de antígenos fue con buffer de citratos a pH=6 y a 55 grados Celsius y los epítopes fueron bloqueados con albumina libre de IgG. Después, los cortes histológicos fueron incubados en cámara húmeda con la mezcla de anticuerpos primarios por 20 horas a 4 grados Celsius; para identificar las neuronas usamos el anticuerpo policlonal contra FOX3/NeuN (1:250, Abcam); y para saber si eran activas usamos el anticuerpo policlonal contra cFos (1:500, Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, las laminillas fueron enjuagadas con PBS y después con PBS-T; las muestras fueron incubadas en cámara húmeda con los anticuerpos secundarios



por 3 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de conejo acoplado a Texas-red (1:300, Santa Cruz Biotechnology, CA) y anti-IgG de cabra acoplado a FITC (1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA). Después, los tejidos se enjuagaron con PBS y en seguida con agua bidestilada. Por último, las laminillas se sellaron con medio de montaje DAPI 1:200, Millipore-Vectashield.

Con la misma técnica, probamos la mezcla de anticuerpos primarios anti-NeuN (1:250) con anti-CGRP monoclonal (1:500, Enzo Life Sciences), anti-NeuN (1:250, Abcam) con anti-TRPV1/VR1 monoclonal (1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-FOX3/NeuN (1:250) con anti-VEGF policlonal (1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA) y anti-NeuN (1:250) con anti-SP monoclonal (1:1000, Abcam) para detectar neuronas peptidérgicas y la mezcla de anticuerpos anti-NeuN (1:250) con anti-TH policlonal (1:800, Abcam) para neuronas catecolaminérgicas.

### *6.3 Técnica de histoquímica*

Para probar si las NIT eran NADPHd-positivas usamos cortes histológicos de 120  $\mu\text{m}$  de espesor obtenidos a congelación, las laminillas fueron lavadas con PBS y PBS-T al 0.5% y posteriormente fueron incubados a 37 grados Celsius a oscuridad por 1 hora en una solución que contenía; 1.5 mM de nitroblue tetrazolium, 1mM de  $\beta$ -NADPH y 10mM de ácido málico en PBS-T al 0.5% en una relación 1:1:1. Después de la incubación, las secciones de tejido fueron lavados con buffer de fosfatos. Posteriormente, las muestras fueron cubiertas con cubreobjetos y selladas con resina sintética. Las muestras control se incubaron con una solución que carecía de  $\beta$ -NADPH.

### *6.4 Pruebas estadísticas*

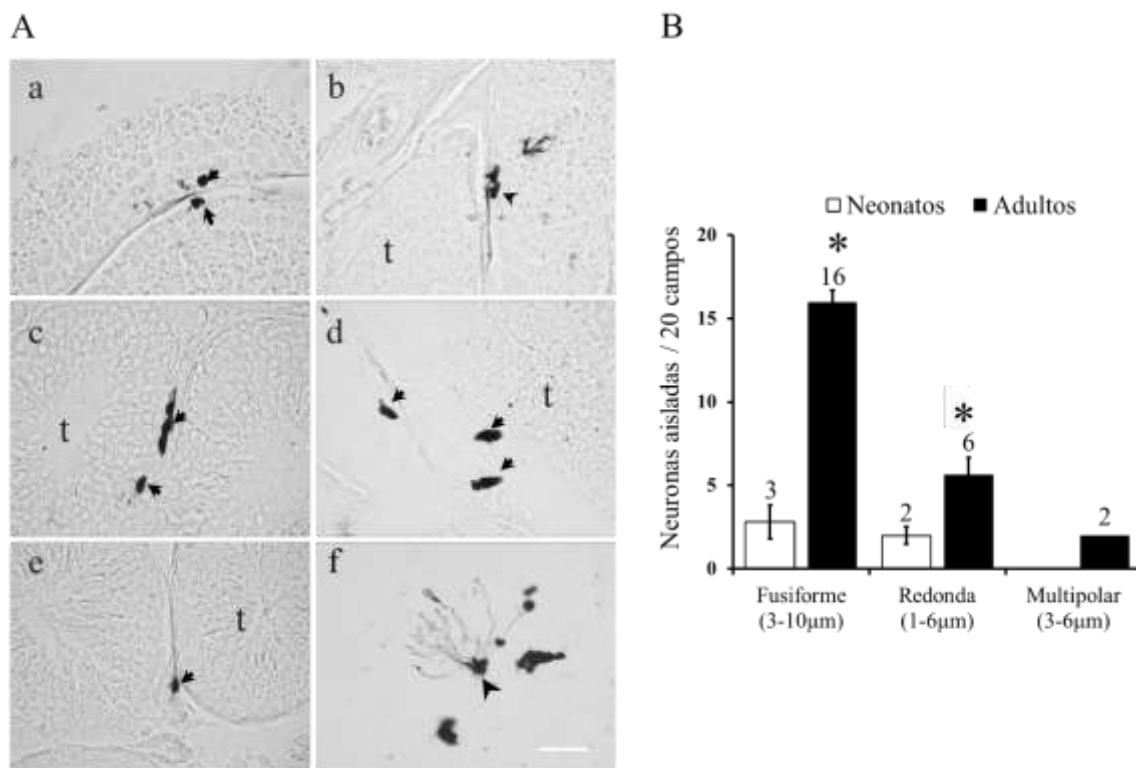
Las muestras tratadas por el método de Golgi-Cox fueron observados en un microscopio Zeiss de campo claro con el cual tomamos fotografías con una cámara Cannon S80 acoplada al microscopio y una PC con el programa Zoom Browser EX. De las imágenes obtenidas se contaron las neuronas en 20 campos de secciones representativas de 5 testículos de cobayos diferentes. Las neuronas fueron medidas con el programa Motic Imagen Plus 2.0. Las imágenes de las células positivas a fluoróforos fueron vistas y fotografiadas con un microscopio Leica DM100 y con el programa IM50, al igual que las imágenes obtenidas por

histoquímica. En ambos casos contamos las células positivas alrededor de 20 tubos seminíferos, tomando como criterio de inclusión aquellas que presentaban circunferencia definida (Frungeri *et al.*, 2000). Los datos se reportan como la media y error estándar de la media. La comparación estadística de los datos se realizó con la prueba t de Student no pareado y se consideraron diferentes cuando el valor de la probabilidad fue menor a 5%.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Los cobayos adultos poseen mayor número de neuronas intrínsecas aisladas que los cobayos neonatos

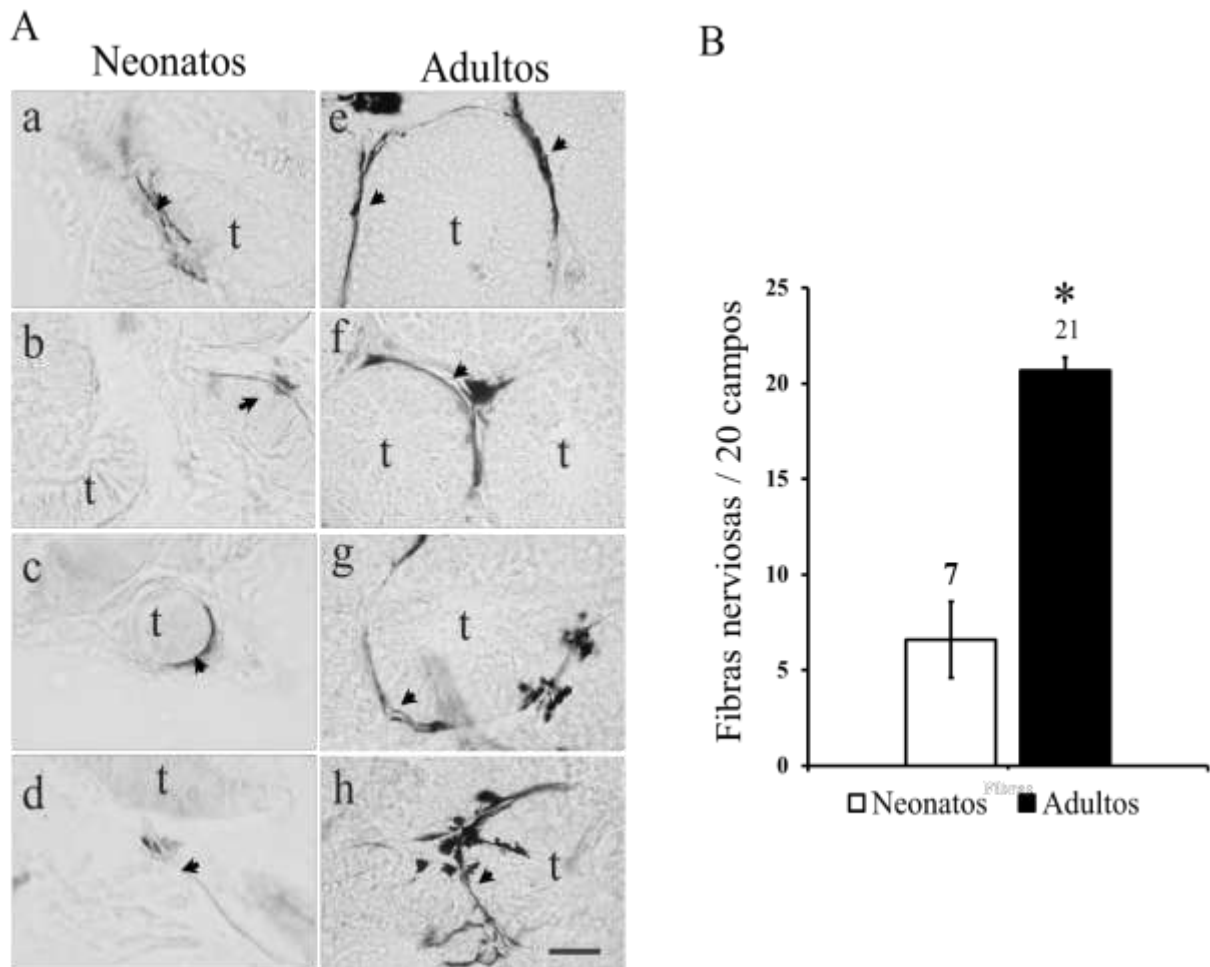
Por el método de Golgi-Cox identificamos la morfología, tamaño y localización de las neuronas intrínsecas aisladas. Las células neuronales se localizaron en el intersticio rodeando a los tubos seminíferos. Por su morfología, fueron redondas, fusiformes y multipolares (Figura 8A), algunas neuronas fusiformes presentaron una prolongación axonal (Figura 8A, e). Por el tamaño del soma, las neuronas redondas tuvieron 1-6  $\mu\text{m}$ , las fusiformes 3-10  $\mu\text{m}$  y las multipolares 3-6  $\mu\text{m}$  (Figura 8B). Además, la cantidad de neuronas fusiformes aisladas fue 5.3 veces mayor en cobayos adultos en comparación con los cobayos neonatos, las neuronas redondas fueron 3 veces mayor en cobayos adultos y no encontramos neuronas multipolares en los testículos de los cobayos neonatos.



**Figura 8.** Neuronas intrínsecas testiculares aisladas de cobayos adultos jóvenes. **A)** Morfología de las neuronas intrínsecas testiculares: a,b) neuronas redondas (1-6 $\mu\text{m}$ ), c,d) neuronas fusiformes (3-10 $\mu\text{m}$ ), e) neurona monopolar, f) neurona multipolar. **B)** Número de neuronas intrínsecas testiculares aisladas en cobayos neonatos y adultos jóvenes. t=tubo seminífero, las flechas indican el cuerpo neuronal. Las barras representan la media y el EEM (n=5 testículos diferentes). \*p<0.05, t de Student no pareado. Escala 20 $\mu\text{m}$ .

## 7.2 Los cobayos adultos poseen mayor cantidad de fibras nerviosas que los cobayos neonatos

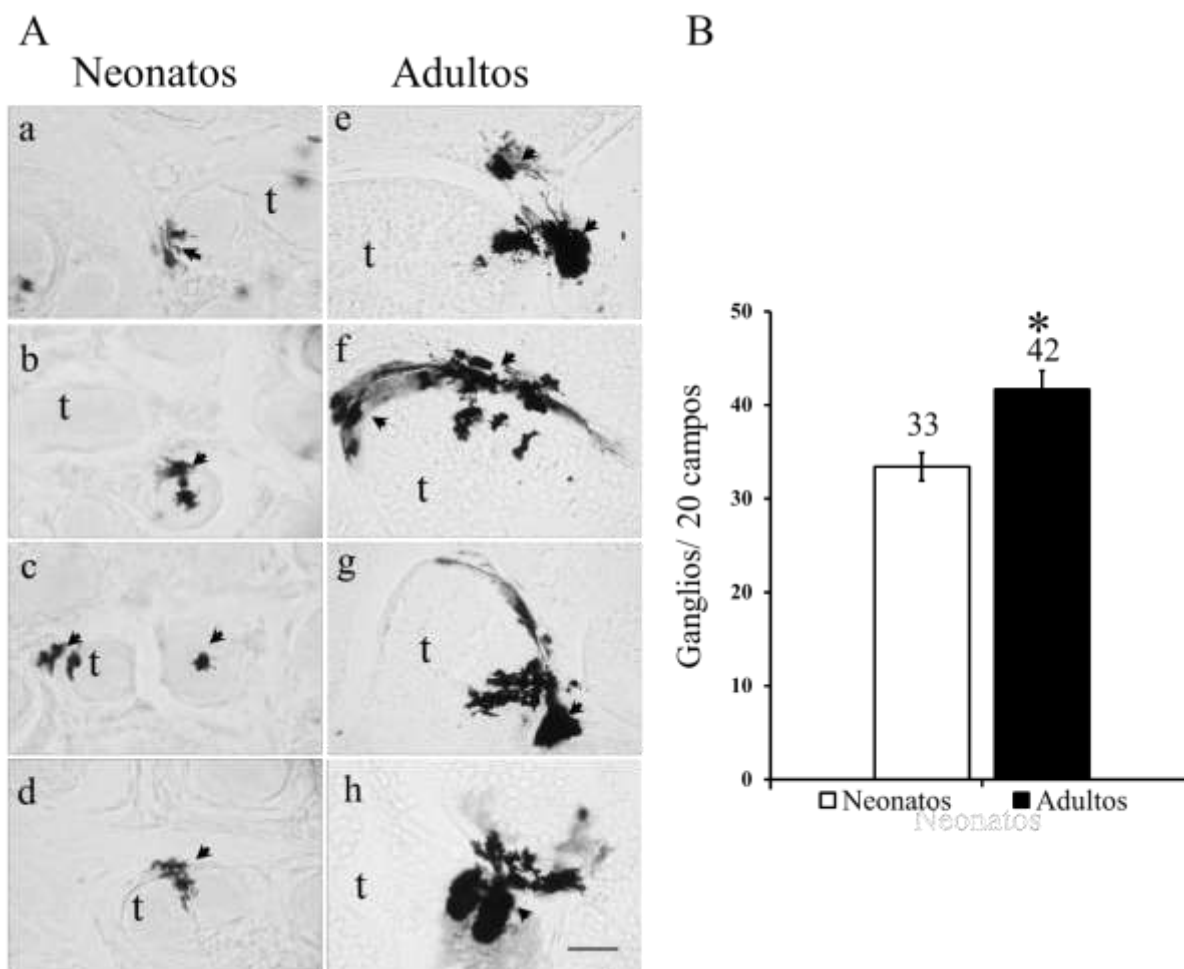
Localizamos fibras nerviosas tanto en los testículos de los cobayos neonatos como en los cobayos adultos (Figura 9A). Algunas fibras estuvieron aisladas, mientras que otras provenían de los ganglios (Figura 9A, f). Las fibras estuvieron rodeando a los tubos seminíferos y algunas de ellas se encontraron en el intersticio del testículo, la cantidad de fibras fue 3 veces mayor en cobayos adultos en comparación con los neonatos (Figura 9B).



**Figura 9.** Fibras nerviosas en testículos de cobayos. **A)** Las fibras nerviosas se localizaron alrededor de los tubos seminíferos. **B)** Número de fibras nerviosas en testículos de cobayos neonatos y adultos. *t*=tubo seminífero, la punta de flecha indica la fibra nerviosa. En la gráfica, las barras representan la media y el EEM ( $n=5$  testículos diferentes).  $*p<0.05$ , *t* de Student no pareado. Escala  $20\mu\text{m}$ .

### 7.3 Los cobayos adultos poseen mayor cantidad de ganglios que los cobayos neonatos

En ambas edades localizamos conjuntos de neuronas formando ganglios (Figura 10A). Hubo 1.2 veces mayor cantidad de ganglios en los cobayos adultos en comparación con los cobayos neonatos (Figura 10B). Los ganglios estuvieron en la zona del intersticio, entre los tubos seminíferos, el tamaño de los ganglios fue mayor en los cobayos adultos en comparación con los cobayos neonatos, incluso en algunos casos, se lograron observar prolongaciones dendríticas entre los ganglios vecinos (Figura 10A, e) y ganglios alejados.

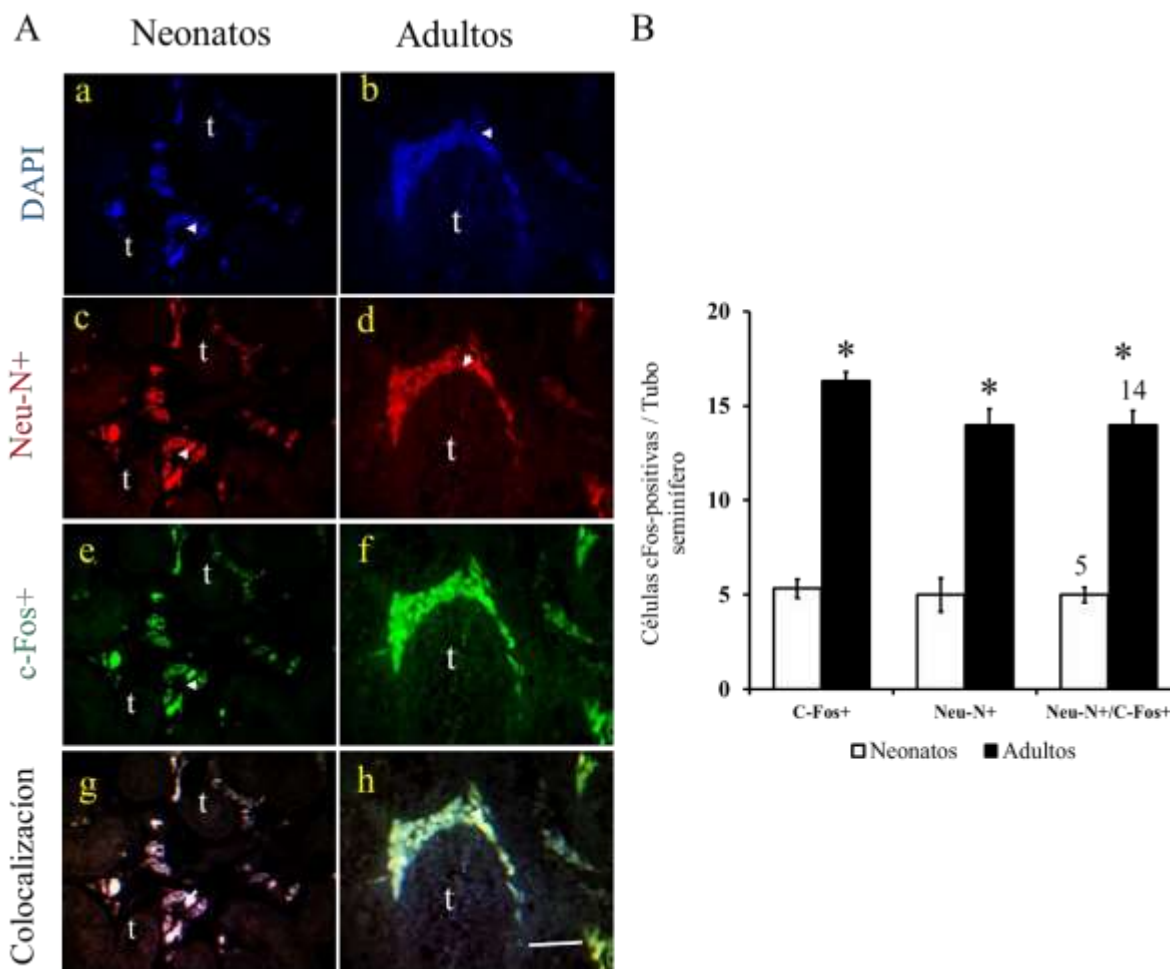


**Figura 10.** Ganglios nerviosos en los testículos de cobayos. **A)** los ganglios se ubicaron alrededor de los tubos seminíferos. **B)** número de ganglios en cobayos neonatos y adultos. *t*=tubo seminífero, la punta de flecha indica el cuerpo ganglionar. En la gráfica, las barras representan la media y el EEM ( $n=5$  testículos diferentes).  $*p<0.05$ , *t* de Student no pareado. Escala  $20\mu\text{m}$ .

## 7.4 Caracterización bioquímica de las NIT por inmunohistoquímica

### 7.4.1 Neuronas intrínsecas cFos-positivas

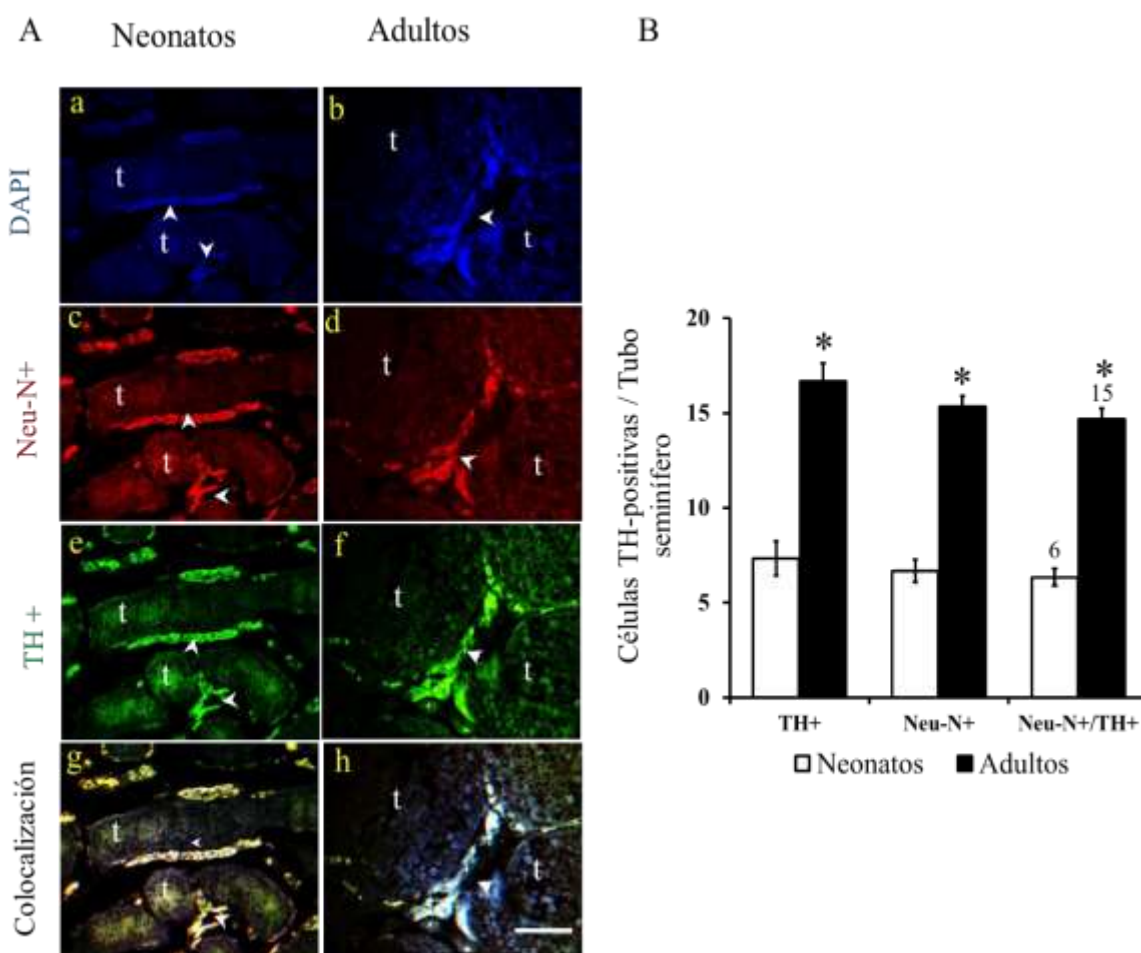
Identificamos neuronas intrínsecas activas por haber sido NeuN-/cFos-positivas. Las neuronas estuvieron aisladas o agrupadas, las encontramos en el intersticio entre tres tubos seminíferos (Figura 11A). El número de neuronas intrínsecas fue 2.8 veces mayor en cobayos adultos en comparación a los cobayos neonatos (Figura 11B).



**Figura 11.** Neuronas cFos-positivas. A) Células cFos-, NeuN- y NeuN-/cFos-positivas en los testículos de cobayos neonatos y adultos. En azul están los núcleos marcados con DAPI. (a, b), en rojo, las células NeuN-positivas marcadas con Texas-Red (c, d), en verde las células cFos-positivas marcadas con FITC (e, f), y en blanco, la co-localización (g, h). B) Número de células NeuN/cFos-positivas. t= tubo seminífero, la punta de flecha indica las células positivas. Las barras de la gráfica representan la media y el EEM (n=3 ensayos). \* $p < 0.05$ , t de Student no pareado. Amplificación 40X. Escala 20 $\mu$ m.

### 7.4.2 Neuronas intrínsecas TH-positivas

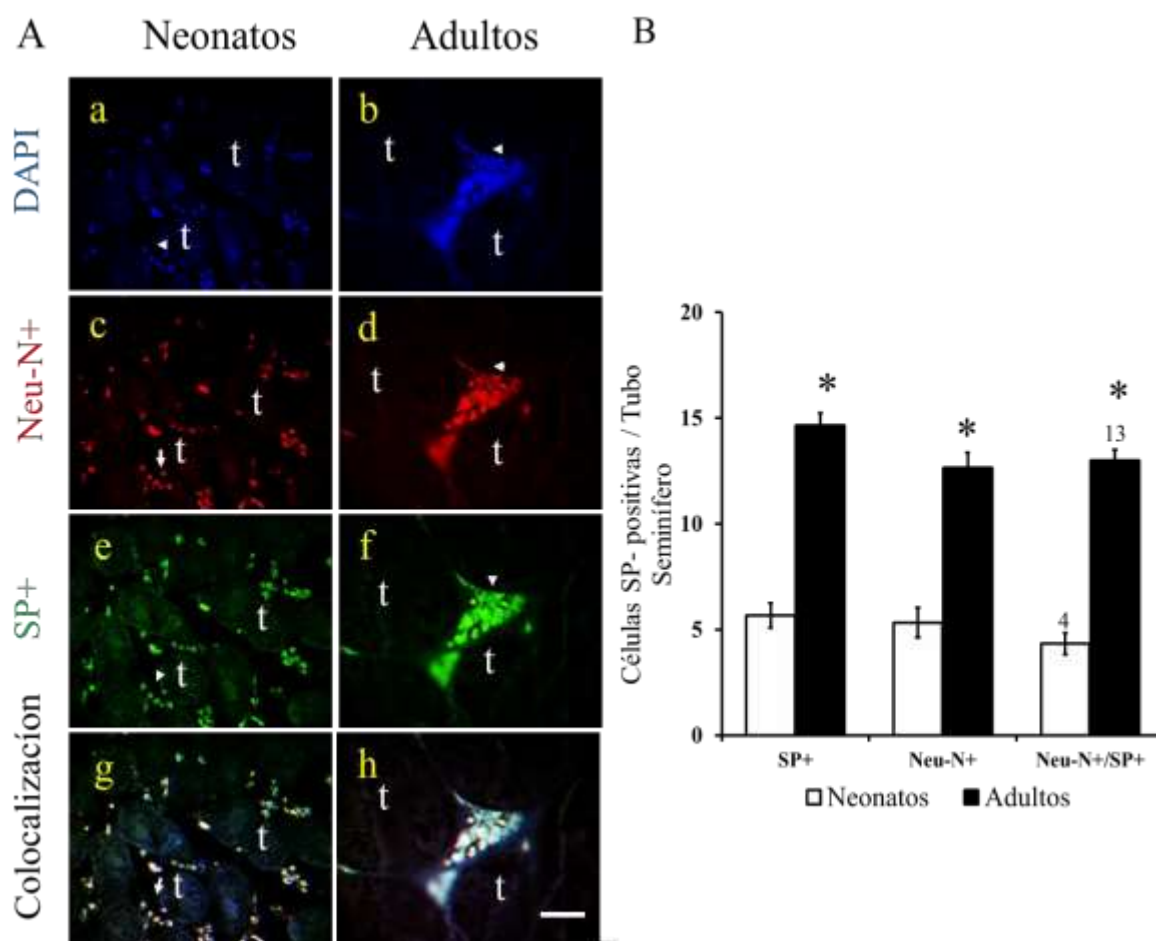
Las neuronas intrínsecas NeuN-/TH-positivas estuvieron agrupadas y aisladas, estuvieron alrededor de los tubos seminíferos y alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 12A). En los cobayos adultos, el número de neuronas intrínsecas TH-positivas fue 2.5 veces mayor con respecto a los cobayos neonatos (Figura 12B).



**Figura 12.** Neuronas tiroxina hidroxilasa positivas. **A)** Células TH-, NeuN- y NeuN-/TH-positivas en testículos de cobayos neonatos y adultos jóvenes. En azul están los núcleos marcados con DAPI. (a, b), en rojo las células NeuN-positivas marcadas con Texas-Red (c, d), en verde las células TH-positivas marcadas con FITC (e, f), y en blanco, la co-localización (g, h). **B)** Número de células NeuN-/TH-positivas, t= tubo seminífero, la punta de flecha indica las células positivas. Las barras de la gráfica representan la media y el EEM (n=3 ensayos). \* $p < 0.05$ , t de Student no pareado. Amplificación 40X. Escala 20 $\mu$ m.

### 7.4.3 Neuronas intrínsecas SP-positivas

Las neuronas NeuN-/SP-positivas fueron localizadas en la zona intersticial, alrededor de los tubos seminíferos y en los vasos sanguíneos (Figura 13A). En cobayos adultos las neuronas intrínsecas fueron 3.2 veces mayor y estuvieron distribuidas en toda la glándula, mientras que en cobayos neonatos las neuronas positivas estuvieron agrupadas y en menor proporción (Figura 13B).

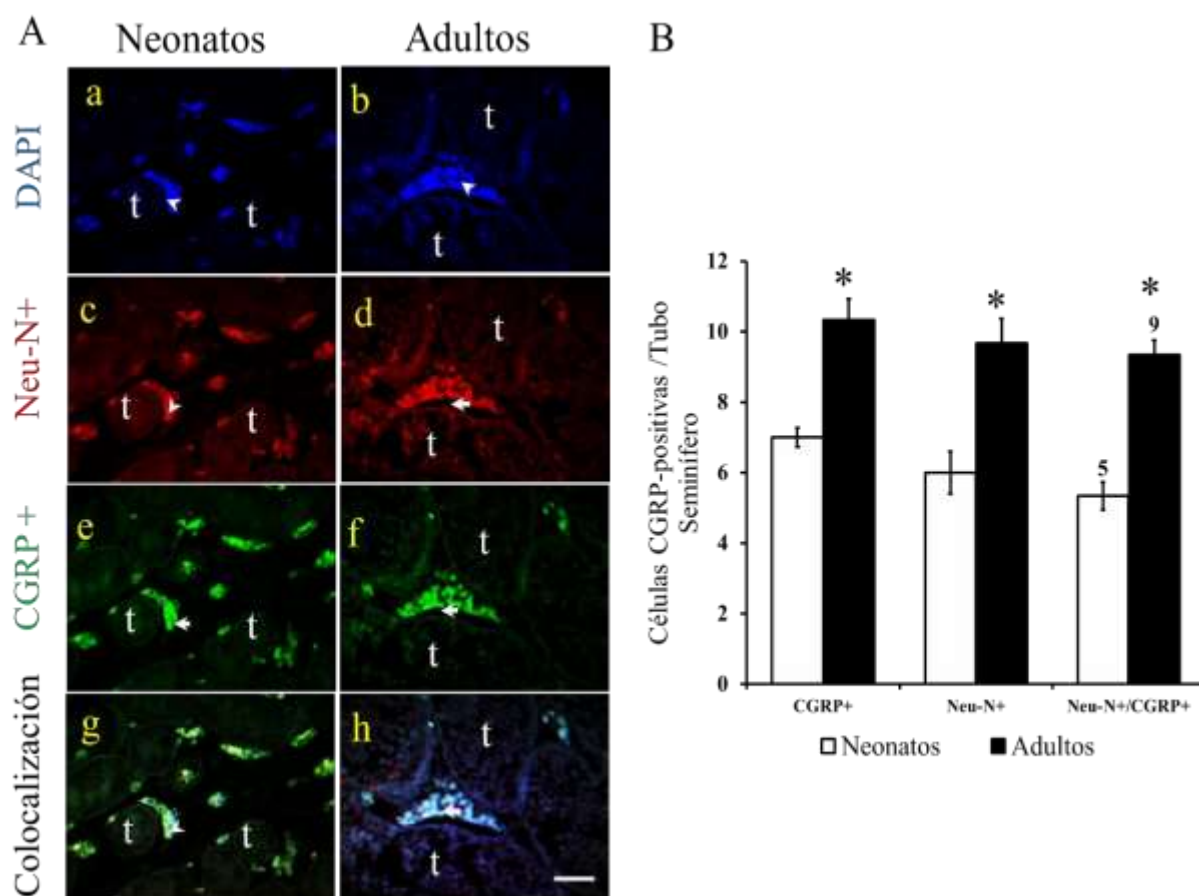


**Figura 13.** Neuronas Sustancia P positivas. **A)** Células SP-, NeuN- y NeuN-/SP-positivas en testículo de cobayos neonatos y adultos jóvenes. En azul están los núcleos marcados con DAPI. (a, b), en rojo las células NeuN-positivas marcadas con Texas-Red (c, d), en verde las células SP-positivas marcadas con FITC (e, f), y en blanco, la co-localización de las células positivas (g, h). **B)** Número de células NeuN/SP-positivas. t= tubo seminífero, la punta de flecha indica las células positivas. Las barras de la gráfica representan la media y el EEM (n=3 testículos diferentes), \*p<0.05, t de Student no pareado. Amplificación 40X. Escala 20µm.



#### 7.4.4 Neuronas intrínsecas CGRP-positivas

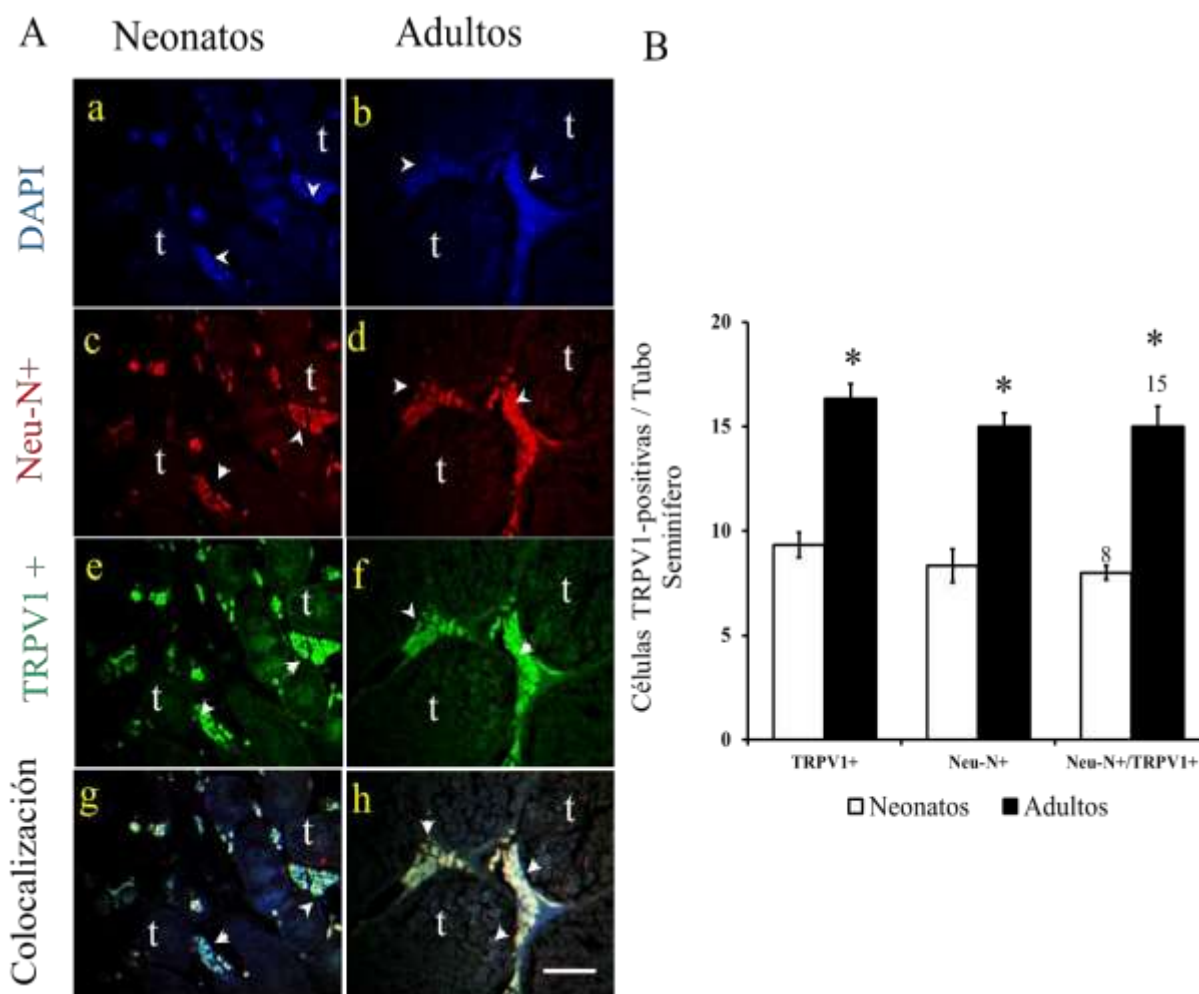
Localizamos neuronas CGRP-positivas en los testículos de los cobayos neonatos y adultos siendo en menor proporción en los cobayos neonatos. En los cobayos adultos la relación fue de 2 veces mayor, estuvieron aisladas o agrupadas en ganglios en el intersticio y alrededor de los tubos seminíferos, algunas de ellas estuvieron cercanas a los vasos sanguíneos. (Figura 14A, B).



**Figura 14.** Neuronas positivas al péptido relacionado con el gen de la calcitonina. **A)** Células CGRP-, NeuN- y NeuN-/CGRP-positivas en los testículos de cobayos neonatos y adultos jóvenes. En azul están los núcleos marcados con DAPI. (a, b), en rojo las células NeuN-positivas marcadas con Texas-Red (c, d), en verde las células CGRP-positivas marcadas con FITC (e, f), y en blanco, la co-localización (g, h). **B)** Número de células NeuN-/CGRP-positivas. t= tubo seminífero, la punta de flecha indica las células positivas. Las barras de la gráfica representan la media y el EEM (n=3 ensayos), \*p<0.05, t de Student no pareado. Amplificación 40X. Escala 20µm.

#### 7.4.5 Neuronas intrínsecas TRPV1-positivas

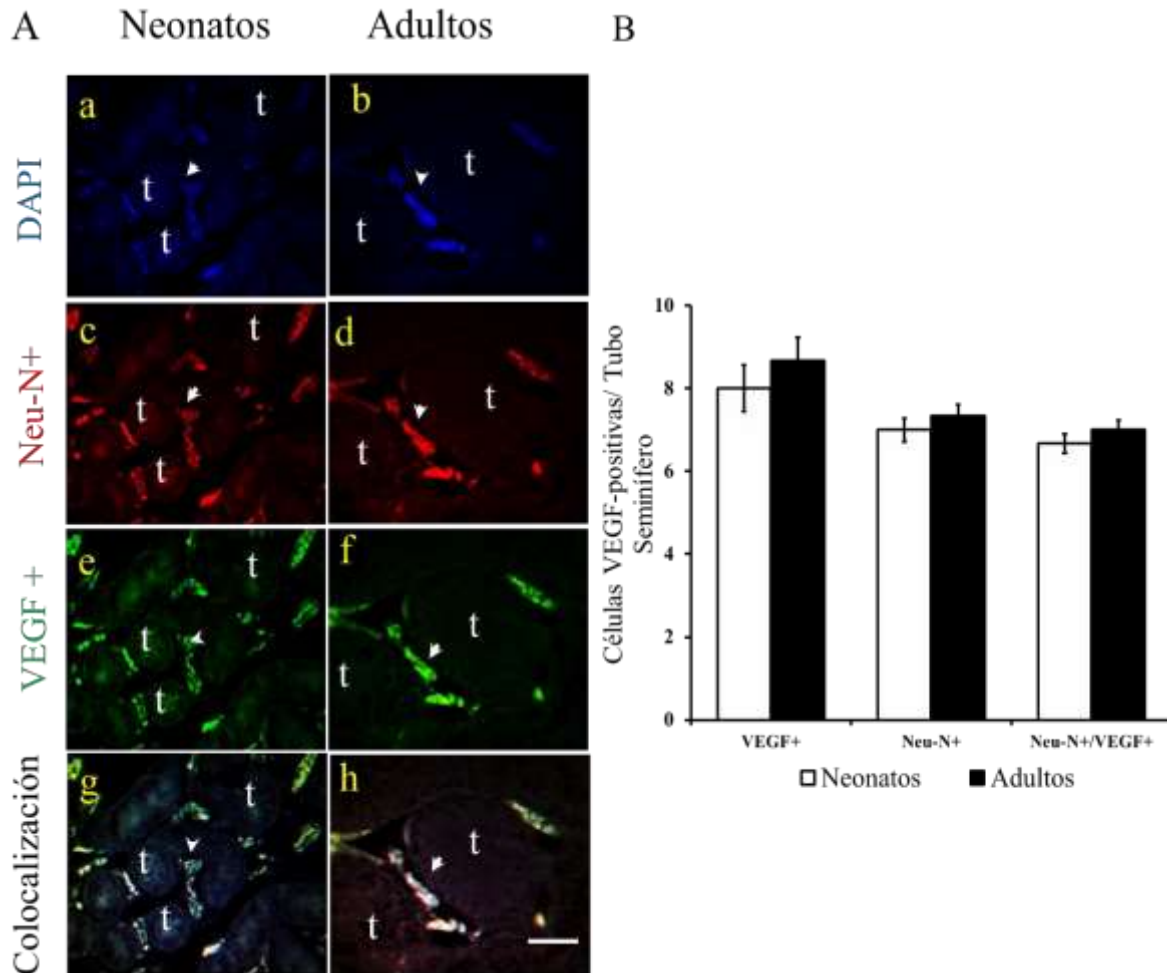
Identificamos neuronas intrínsecas TRPV1-positivas en los testículos de cobayos de las dos edades estudiadas, estuvieron aisladas y en grupos tanto en el espacio intersticial como a lo largo de los tubos seminíferos (Figura 15A) algunas neuronas intrínsecas estuvieron cercanas a los vasos sanguíneos, se encontró 2 veces mayor cantidad de neuronas intrínsecas en los testículos de los cobayos adultos en comparación con los testículos de cobayos neonatos (Figura 15B), cabe mencionar que algunas células dentro del tubo seminífero presentaron reactividad a TRPV1 (Figura 15A, h).



**Figura 15.** Neuronas reactivas al receptor TRPV1. **A)** Células TRPV1-, NeuN- y NeuN-/TRPV1-positivas en testículo de cobayos neonatos y adultos jóvenes. En azul están los núcleos marcados con DAPI. (a, b), en rojo las células NeuN-positivas marcadas con Texas-Red (c, d), en verde las células TRPV1-positivas marcadas con FITC (e, f), y en blanco, la co-localización de las células positivas (g, h). **B)** Número de células NeuN-/TRPV1-positivas. t= tubo seminífero, la punta de flecha indica las células positivas. Las barras de la gráfica representan la media y el EEM (n=3 ensayos), \*p<0.05, t de Student no pareado. Amplificación 40X. Escala 20µm.

#### 7.4.6 Neuronas intrínsecas VEGF-positivas

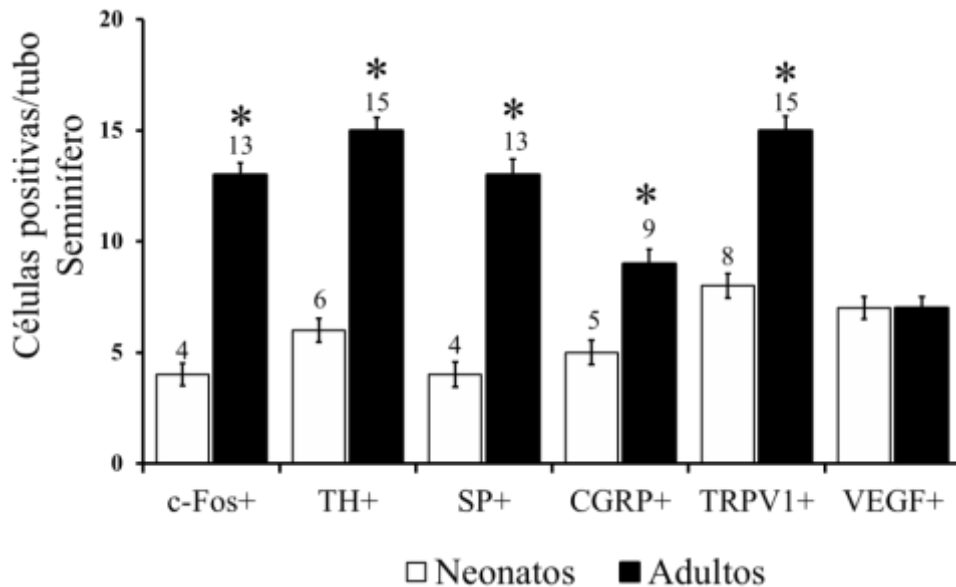
Localizamos neuronas intrínsecas VEGF-positivas aisladas en cobayos neonatos y en los adultos, estuvieron agrupadas en el espacio intersticial y alrededor de los tubos seminíferos, (figura 16A). En la población de neuronas intrínsecas positivas no presento diferencia entre las dos edades estudiadas (figura 16B).



**Figura 16.** Neuronas positivas al factor de crecimiento endotelial vascular. **A)** Células VEGF-, NeuN- y NeuN-/VEGF-positivas en testículo de cobayos neonatos y adultos. En azul están los núcleos marcados con DAPI. (a, b), en rojo las células NeuN-positivas marcadas con Texas-Red (c, d), en verde las células VEGF-positivas marcadas con FITC (e, f), y en blanco, la co-localización de las células positivas (g, h). **B)** Número de células NeuN-/VEGF-positivas. t= tubo seminífero, la punta de flecha indica las células positivas. Las barras de la gráfica representan la media y el EEM (n=3 ensayos), \*p<0.05, t de Student no pareado. Amplificación 40X. Escala 20µm.

7.4.7 *Los testículos de los cobayos Hartley poseen neuronas intrínsecas activas y expresan diversos mensajeros bioquímicos*

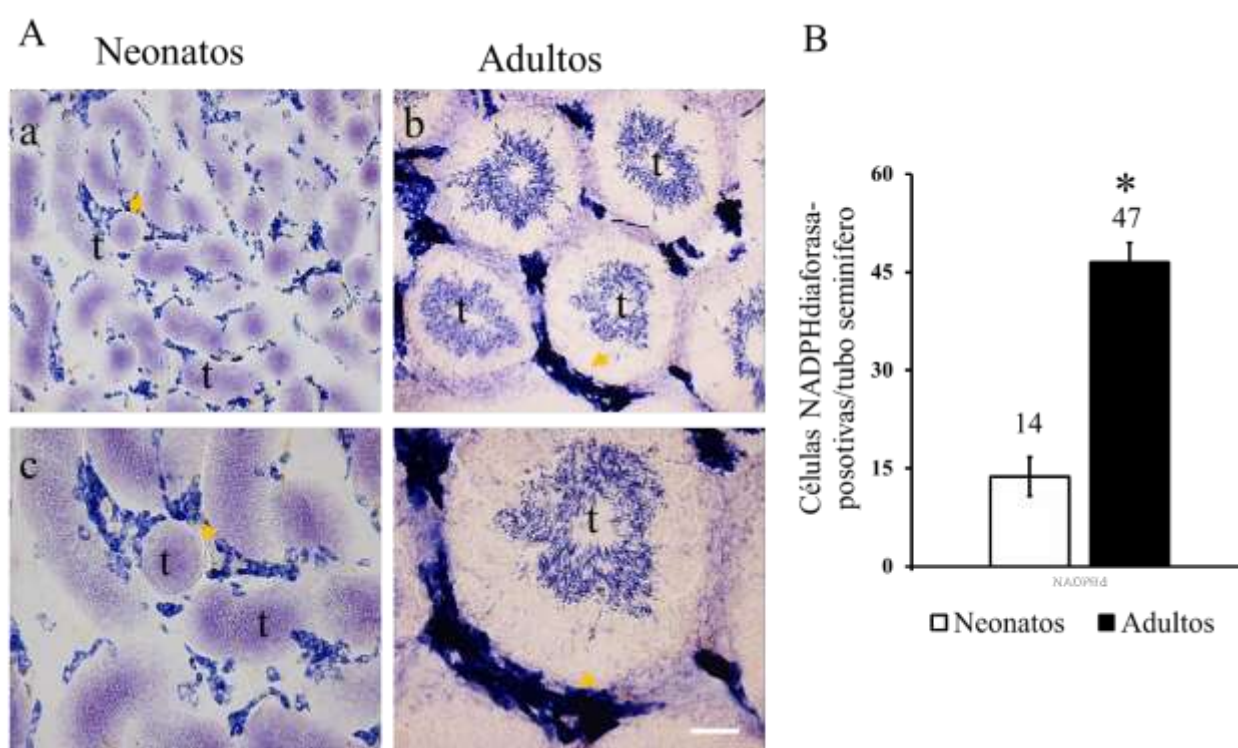
Los cobayos adultos y neonatos presentan neuronas activas por ser NeuN-/cFos, son neuronas peptidérgicas por ser NeuN-/SP, NeuN-/CGRP, NeuN-/TRPV1, NeuN-/VEGF-positivas y catecolaminérgicas por ser NeuN-/TH-positivas (Figura 17). Los cobayos adultos presentaron mayor número de células positivas en comparación de los cobayos neonatos, a excepción de las células VEGF-positivas, donde no se encuentra diferencias conforme la edad. La mayor prevalencia de células positivas en los cobayos adultos fueron las que expresan al TH y TRPV1, seguidas de SP, CGRP y VEGF.



**Figura 17.** Los testículos de los cobayos Hartley poseen neuronas intrínsecas activas y expresan diversos mensajeros bioquímicos. Son activas por ser NeuN-/cFos, catecolaminérgicas por ser NeuN-/TH y peptidérgicas por ser NeuN-/SP NeuN-/CGRP NeuN-/TRPV1 NeuN-/VEGF-positivas. Las barras representan la media y el EEM (n=3 ensayos), \*p<0.05, t de Student no pareado.

### 7.5 Células NADPHd-positivas

Usamos la actividad NADPHd para identificar células nitrérgicas. Observamos células alrededor de los tubos seminíferos en ambas edades (Figura 18A), encontramos 3.3 veces mayor número de células positivas en los testículos de los cobayos adultos en relación con los testículos de los cobayos neonatos (Figura 18B).



**Figura 18.** Células testiculares productoras de óxido nítrico. **A)** Células NADPHd-positivas en testículo de cobayos neonatos y adultos. En azul están las células positivas, señaladas con flecha naranja. **B)** Número de células NADPHd-positivas. t= Tubo seminifero. Las barras de la gráfica representan la media y el EEM (n=3 ensayos), \* $p < 0.05$ , t de Student no pareado. a y b) Amplificación 20X, c y d) Amplificación 40X. Escala 20 $\mu$ m.

## VIII. DISCUSIÓN

El presente trabajo confirma que los testículos del cobayo Hartley posee neuronas intrínsecas (NIT) fusiformes, redondas y multipolares, contienen fibras y ganglios nerviosos, con mayor cantidad en cobayos adultos jóvenes, que son animales sexualmente maduros en comparación con los cobayos neonatos, que son animales sexualmente inmaduros. También, identificamos neuronas catecolaminérgicas por su reactividad a tiroxina hidroxilasa (TH), neuronas peptidérgicas por haber sido positivas a CGRP, SP, TRPV1 y VEGF y neuronas nitrérgicas por su reactividad a NADPHd. Diversos reportes han informado la presencia de neuronas intrínsecas en ovarios de rata y cobaya (D´Albora *et al.*, 2000; Luna *et al.*, 2015) y de testículos de humano y mono (Mayerhofer *et al.*, 1996, 1999; Frungieri *et al.*, 2000,) aumentan al llegar a la pubertad. Nuestros resultados están en concordancia con los anteriores, ya que los cobayos sexualmente maduros presentaron mayor número de NIT.

Las neuronas intrínsecas no se expresan en la misma proporción en diversas especies, y esto fenómeno puede deberse a las diferencias evolutivas entre especies, por ejemplo: en

los monos, los cuerpos neuronales solo se encontraron en los testículos de animales inmaduros (Frungieri *et al.*, 2000) por otro lado, en la rata de la cepa *Sprague-Dawley* las neuronas intrínsecas ováricas están ausentes, en contraste con las ratas *Wistar* que tienen neuronas intrínsecas. Estos datos experimentales sugieren que la presencia o ausencia de neuronas intrínsecas juegan un papel importante en vida reproductiva (D´Albora *et al.*, 2000).

En los testículos de los cobayos Hartley encontramos abundante cantidad de neuronas intrínsecas, fibras nerviosas y ganglios, lo cual podría ser una característica evolutiva propia de la especie. Al contrario de las ratas, los cobayos al nacer tienen órganos y sistemas “maduros”; ojos y oídos abiertos, dientes, pelo, y minutos después de nacer ya ingieren alimento sólido.

La cantidad y la morfología de las NIT (redondas, fusiformes y multipolares con extensiones), en los testículos de los cobayos adultos, apoya la idea de la existencia de una mayor comunicación neuronal, habría mayores conexiones sinápticas y comunicación eficientemente entre las células de los testículos (Mayerhofer *et al.*, 1996; Frungieri *et al.*, 2000). Por otro lado, la cantidad de fibras nerviosas fue mayor en los testículos del cobayo adulto en comparación con el cobayo neonato, similar a lo reportado en testículos de monos *Rhesus*, las fibras aumentan al llegar a la pubertad, a la par que los niveles de las hormonas

LH y testosterona (Frungeri *et al.*, 2000). Algunas fibras nerviosas provienen de la innervación extrínseca del testículo (Heinz y Anette, 2001) sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que estas fibras provengan de las neuronas intrínsecas. La presencia de fibras nerviosas en los individuos inmaduros es indicativa que se requiere para el desarrollo fisiológico y morfológico normal de la gónada (Mayerhofer *et al.* 1992), mientras que los adultos, están participando en la liberación de neurotransmisores para mantener la función testicular.

También identificamos un gran número de ganglios en los testículos de los cobayos adultos, el tamaño de los ganglios fue marcado debido a un mayor número de neuronas y al aumento del cuerpo celular. El aumento del cuerpo neuronal y número de neuronas se ha reportado que aumenta al acercarse la pubertad, en los ovarios de las ratas y el hipotálamo de los hámsteres machos; (Urbanski *et al.*, 1998; D'Albora *et al.*, 2000). En ambos casos, se ha propuesto que el aumento en el tamaño de las células también refleja mayor actividad metabólica, y conforme el animal se aproxima a la madurez sexual; estado en el que aumenta la esteroidogénesis y la espermatogénesis, aumenta la síntesis y la capacidad secretora de hormonas como las GnRH y la LH.

En los cobayos adultos frecuentemente encontramos ganglios con prolongaciones dendríticas, sugiriendo que existe una mayor comunicación entre las células. Además, la presencia de neuronas aisladas fusiformes con axón sugiere redes de integración fisiológica. En los cobayos neonatos, al ser un sistema fisiológico inmaduro, el número de ganglios y neuronas aisladas fue menor. Con anticuerpos específicos confirmamos la naturaleza neuronal de las células, la positividad de las células a NeuN, una proteína específica del núcleo de las neuronas (Unal-Cevik *et al.* 2004; Gusel'nikova *et al.*, 2015) y a cFos, un indicador de su actividad en los testículos de los cobayos neonatos y adultos son evidencia de ser neuronas activas.

Los testículos se encargan de dos eventos principales: la esteroidogénesis y la espermatogénesis. Cada uno de los procesos es llevado a cabo por un determinado tipo de célula; las células de Leydig en el compartimento intersticial y las células de Sertoli, dentro del tubo seminífero. Ambas células están reguladas principalmente por la LH y FSH (Smith y Walker, 2014), sin embargo, existen otras sustancias que pueden ejercer una influencia moduladora sobre estas células testiculares, esta modulación parece llevarse a cabo, por

diferentes sustancias incluyendo péptidos, citocinas, catecolaminas, factores de crecimiento, actuando como factores autocrinos y paracrinos (Masufumi y Keiichi, 1973; Dolores *et al.*, 2004; Huleihel y Lunenfeld, 2004). Además, tanto las células de Leydig como de Sertoli no actúan solas, necesitan de otros tipos de células que también apoyan a dichos procesos, como las células mioideas peritubulares, las células vasculares y las neuronas intrínsecas (Mayerhofer *et al.*, 1996; Frungieri *et al.*, 2000). Todos los componentes testiculares son participantes mutuamente para llevar a cabo la función testicular.

Las posibles funciones que ejercerán las neuronas intrínsecas en el testículo, está en relación con su ubicación y su distribución en la gónada y para ello utilizamos diversos marcadores bioquímicos. Localizamos a las NIT aisladas, fibras y ganglios en la zona intersticial del testículo, rodeando al tubo seminífero y en la vecindad de los vasos sanguíneos fue similar a las dos edades estudiadas. Por lo que se sugiere, que están en contacto directo con las células de Leydig, las células vasculares y las células mioideas peritubulares, participando en la liberación de hormonas, regulando el flujo de sangre y la contracción del tubo seminífero y de forma indirecta estaría modulado la función de las células de Sertoli y la maduración de las espermatogonias.

Los resultados mostrados en el presente trabajo muestran que los cobayos neonatos y adultos, expresan neuronas intrínsecas TH-positivas. Las células TH-positivas, se localizaron entre los tubos seminíferos, en la zona intersticial, por lo cual están cercanas a las células de Leydig y a los vasos sanguíneos. Es aceptado que las células de Leydig, células de Sertoli, células mioideas peritubulares y las células musculares de los vasos sanguíneos, expresan receptores  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ -adrenergicos (Heindel *et al.*, 1981; Mayerhofer *et al.*, 1992; Miyake *et al.*, 1986). Además, las células Leydig de los individuos neonatos son inmaduras, sin embargo, proliferan y se diferencian durante la etapa infantil y a finales de la pubertad, se completa el desarrollo y la población de las células de Leydig. Además de LH, NA y Ach también regulan el desarrollo de las células de Leydig (Shuying *et al.*, 2012), puede llevarse a cabo a través de los receptores  $\alpha_1$ -adrenergicos que activan respuestas mitogénicas, activando genes tempranos como c-Fos, c-Jun, Erg-1 que regulan el crecimiento y proliferación de las células (Cotecchia, 2010). También, la NA puede ser un potente estimulador fisiológico de la producción de testosterona como ocurre en los hámsteres inmaduros en ausencia de las gonadotropinas (Mayerhofer *et al.*, 1992).



Por otro lado, en los cobayos adultos, encontramos mayor cantidad de neuronas TH-positivas. Sin bien, en edades adultas la proliferación y diferenciación de células de Leydig ya no es activa; La esteroidogénesis y la espermatogénesis sí. Las catecolaminas pueden aumentar la acción estimuladora de la hormona gonadotropina coriónica (hCG) en la producción de testosterona en animales adultos, mientras NA, puede regular el número de receptores a LH (LH-R) y facilitar la respuesta a LH en el testículo y como consecuencia afecta la función de las células de Leydig en la producción de testosterona (Moger *et al.*, 1982; Mayerhofer *et al.*, 1992).

En las células de Sertoli, a través de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, mediante la acumulación de AMPc, estimulan la secreción de factores de crecimiento, de lactato y podrían regular el desarrollo del epitelio germinal y por lo tanto la espermatogénesis (Heindel *et al.*, 1981, Kierszenbaum *et al* 1985). Los receptores adrenérgicos también se encuentran en las células musculares de vasos sanguíneos, donde la NA y A, provoca la contracción y relajación de las células musculares y modula el tono vascular (Sheng & Zhu, 2018), para un mayor aporte de nutrientes y posiblemente la regulación de la temperatura. Finalmente, en las células mioideas peritubulares, que son células similares a las células musculares, mediante los receptores adrenérgicos, apoyan la contracción del tubo seminífero y de esta manera el transporte de espermatozoides hacia el epidídimo (Miyake *et al.*, 1986). Con base en nuestros resultados proponemos que las catecolaminas tienen un papel fisiológico importante en el desarrollo y la regulación de la función testicular tanto en los cobayos neonatos como adultos.

Igualmente, localizamos células SP-positivas en los cobayos neonatos y adultos, localizadas entre los tubos seminíferos. Se ha reportado que SP, en etapas neonatales y prepuberales estimula la secreción de testosterona, por el contrario, en las edades adultas, la SP modifica la producción basal de testosterona en células de Leydig en cultivo (Chiwataka *et al.*, 1991). Se ha propuesto que SP, influye en las propiedades de unión a los receptores LH, esto puede deberse a la activación de factores adicionales que regulan la expresión génica de la esteroidogénesis o por la activación de diferentes segundos mensajeros (Kanchev *et al.*, 1995), por lo cual se ha propuesto como un posible regulador local en las células de Leydig.

Por otro lado, se sabe que la actividad secretora de las células de Sertoli, esta modulada por diferentes taquininas, entre ellas la SP (Angelova *et al.*, 1991) y puede jugar un papel importante en el mecanismo de control local de la espermatogénesis (Chiwataka *et*

*al.*, 1991). También, se ha reportado que la SP, está presente en el esperma humano, modulando la motilidad, en consecuencia, los genes codificados para el péptido se transcriben en las células germinales en cualquier etapa durante la espermatogénesis (Pinto *et al.*, 2010).

También localizamos células SP-positivas cercanas a los vasos sanguíneos. Se sabe que la SP, ejerce una amplia gama de efectos fisiológicos y patológicos, a través de los receptores NK1R que se expresa en neuronas, células epiteliales, células endoteliales, células de musculo liso, entre otras (Mashaghi *et al.*, 2016). Las funciones más conocidas de SP, son la nocicepción y la inflamación neurogénica, ambas mediadas por el receptor NK1R. Sin embargo, la expresión de NK1R en varios tipos de células no neuronales, sugiere otras funciones, incluidos efectos que promueven el crecimiento en las células musculares lisas, la regulación de la angiogénesis y la vasodilatación controlando la liberación de óxido nítrico (Ziche *et al.*, 1994). Dado que las células SP-positivas estuvieron presentes en edades neonatales y adultas, proponemos que, además de estar modulando la producción de testosterona y la espermatogénesis, también actúan como moduladores neuronales para sistemas vasculares intratesticulares, considerando que las neuronas estuvieron junto a los vasos sanguíneos. La SP, puede estar involucrado en la regulación local, actuando como factor autocrino y paracrino de las diferentes células intratesticulares.

También localizamos células CGRP-positivas en cobayos adultos y neonatos. Se ha descrito que CGRP es vasodilatador microvascular potente, es 10 más potente que las prostaglandinas y 100 veces mayor que Ach y SP y sus efectos pueden ser más duraderos que otros vasodilatadores (Russell *et al.*, 2014). El CGRP en cobayos neonatos, puede estar involucrado en proliferación y remodelación de las células endoteliales, ya que se ha descrito que CGRP se encuentra localizado en células progenitoras endoteliales, además junto con SP podría estar regulando este proceso (Wimalawansa, 1996).

Mientras, en los cobayos adultos, algunas neuronas se observaron a lo largo de los tubos seminíferos, que podrían estar implicados en la contracción de las células musculares mioideas peritubulares, debido a que el CGRP actúa como modulador del movimiento de la musculatura lisa no vascular, por vía del AMPc y la posterior activación de PKA que puede llevar a la fosforilación y apertura de los canales de potasio ( $K^+$ ) sensibles al ATP, y la producción de ON, lo que resulta en la relajación (Russell *et al.*, 2014). En los testículos, la reactividad a CGRP ha estado cerca de los vasos sanguíneos y se le han atribuido funciones

vasodilatadoras potentes, produciendo relajación del músculo liso vascular, se ha sugerido que regulan el flujo sanguíneo y la temperatura de los testículos (Sheng y Zhu, 2018; Suburo *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos proporcionan que, el mayor número de neuronas CGRP y SP que observamos en los testículos de los cobayos adultos se correlaciona con los procesos de esteroidogénesis y espermatogénesis activa, por consiguiente, se requiere de un mayor transporte de nutrientes necesarios para la espermatogénesis mediante la regulación del flujo sanguíneo.

Los cobayos neonatos y adultos expresan al receptor TRPV1 localizado en el intersticio, alrededor de los tubos seminíferos, algunas células dentro del tubo seminífero también mostraron reactividad hacia el receptor. La cantidad de células TRPV1-positivas fue mayor en los cobayos adultos. El papel fisiológico de los receptores TRPV1 en los testículos ha sido poco estudiado, sin embargo, se han localizado en células de la línea germinal y en las células de Sertoli (De Toni *et al.*, 2016) por consiguiente, se le ha atribuido un papel en la espermatogénesis. Durante la espermatogénesis, se lleva a cabo la proliferación y diferenciación de las células germinales y se sabe que el TRPV1 promueve la diferenciación y proliferación celular en células neuronales y no neuronales (Ramírez-Barrantes *et al.*, 2016), evento que proponemos puede estar pasando en los cobayos neonatos con la expresión del receptor. En contraste, en los cobayos adultos los receptores TRPV1, puede estar jugando un papel primordial en las células testiculares como: los espermatozoides, modulando la termotaxis, regulando la reacción acrosoma y la motilidad espermática (De Toni *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, las propiedades neurogénicas del receptor, podría explicar el mayor aumento de neuronas TRPV1-positivas en los animales adultos (Ramírez-Barrantes *et al.*, 2016). Del mismo modo, la activación de los receptores TRPV1 estimula la liberación de péptido como el CGRP y SP que estaría trabajando en sinergia para mantener las funciones testiculares, regulando el flujo sanguíneo y la temperatura testicular. Con los datos obtenidos, proponemos que las células TRPV1-positivas son sensores de estímulos locales y hacia el sistema nervioso central.

En el presente trabajo, también localizamos células VEGF-positivas en cobayos neonatos y adultos. Se ha descrito que ambos receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se han localizado en diferentes células testiculares, además de las células vasculares. La expresión

de los receptores tiene una correlación inversa conforme el estado de desarrollo del individuo (Ergüna *et al.*, 1997; Korpelainen *et al.*, 1998; Nalbandian *et al.*, 2003).

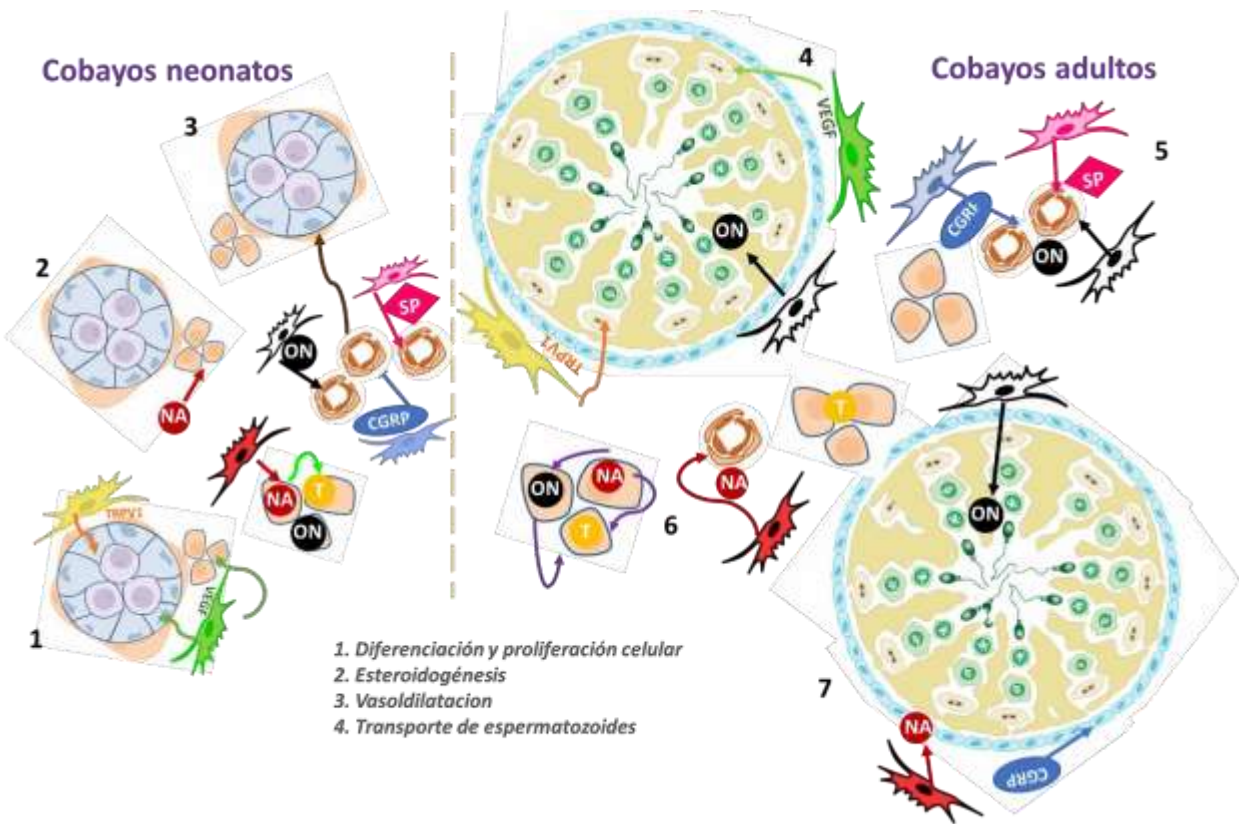
Los receptores VEGFR-2 se ha expresado en mayor cantidad en animales inmaduros, principalmente expresado en células germinales indiferenciadas, por lo que proponemos que en los cobayos neonatos, el VEGF a través del receptor VEGFR-2 podría estar modulando la proliferación y diferenciación de las células germinales, regulando la angiogénesis: modulando la migración de las células endoteliales y la organización de los vasos sanguíneos, estos efectos son debido a que posee alta actividad angiogénica y migratoria y es capaz de modular la expresión génica (Larrivé & Karsan, 2000; Nalbandian *et al.*, 2003). La expresión de VEGFR-2 en animales maduros se ve disminuido, sin embargo, se encuentra altamente expresado el receptor VEGFR-1 (Nalbandian *et al.*, 2003), con lo cual proponemos, que en los cobayos adultos, que el VEGF mediante su receptor estarían regulando la permeabilidad de las células, la supervivencia y posiblemente tenga un papel en la regulación de la espermatogénesis, ya que se ha encontrado expresado en las células de Leydig, que es la principal fuente de testosterona (Korpelainen *et al.*, 1998; Nalbandian *et al.*, 2003). Otra función del VEGF es la de vasodilatador, ya que en los animales adultos no hay angiogénesis activa, el VEGF estaría regulando el flujo sanguíneo, la temperatura y el aporte de nutrientes, la viabilidad celular y mejorando la comunicación local (Kliche & Waltenberger, 2001). También se sabe que VEGF promueve la migración de células, por lo cual podemos proponer que este factor de crecimiento, junto con TRPV1 estimula la migración y diferenciación de precursores neurales locales (Wang *et al.*, 2014, (Ramírez-Barrantes *et al.*, 2016).

Finalmente, en los cobayos neonatos y adultos localizamos células NADPHd-positivas. Se sabe que el óxido nítrico (NO), tiene un papel regulador en las células germinales, células de Sertoli, células de Leydig, las células mioides peritubulares, las células endoteliales y los espermatozoides (Doshi *et al.*, 2012). En los cobayos neonatos, el ON interviene en el desarrollo y en la diferenciación celular modulando la apoptosis y manteniendo la alta proporción de células de Sertoli que soportan y nutren las células germinales, con ello se asegura la eficacia en la producción de espermatozoides y en consecuencia en la fertilidad (Qing *et al.*, 2018) igualmente, el ON es una molécula que interviene en la permeabilidad de las células y es excelente vasodilatador (Lee y Cheng, 2008)

por lo cual proponemos que a la par con NA, CGRP y VEGF se encuentran modulando el tono vascular, en edades tempranas como en la adultez.

En los cobayos adultos, el ON tiene un papel importante en la espermatogénesis, ya que actúa como segundo mensajero, interviniendo en la movilidad y en la migración de las espermatogonias a través de la barrera hemato-testicular (Qing *et al.*, 2018). Igualmente se ha reportado que el ON participa en el proceso de la esteroidogénesis, regulando los niveles de hormonas y de citosinas en los testículos (Lee y Cheng, 2008). En las células de Leydig, el principal estímulo trófico para la biosíntesis de testosterona es la hormona LH, sin embargo, también se ha sugerido que otros factores locales como el ON modulan la estructura y la función de las células de Leydig; La testosterona, es esencial para la diferenciación sexual y la fertilidad (Smith y Walker, 2014). El ON también es un mediador de estrés y juega un papel importante en la inflamación inducida por infecciones, que pueden llevar a la infertilidad (Weissman *et al.*, 2005). El ON producido por las células de NADPHd-positivas actúa principalmente de forma paracrina, puede actuar como un mensajero entre las células de Leydig vecinas, las células de Sertoli, células endoteliales vasculares y las células mioideas peritubulares, y de esta manera mediar la acción de numerosas sustancias neuroactivas intracelulares y extracelulares y factores de crecimiento para regular el flujo sanguíneo local, la permeabilidad celular y la contracción del tubo seminífero (Davidoff *et al.*, 1995).

Los resultados de este trabajo confirman que los testículos del cobayo tienen dos componentes nerviosos, las fibras periféricas y las neuronas intrínsecas (NIT) catecolaminérgicas, peptidérgicas y nitrérgicas. Ambos componentes mostraron marcado grado de plasticidad e interconexión siendo especialmente alto en la edad adulta. La ubicación intratesticular de las NIT, ganglios y fibras, sugiere que sus mensajeros tienen múltiples sitios de acción; las células de Leydig, células mioideas peritubulares (MPT), células de Sertoli y células vasculares. La correlación que existe entre el mayor número de neuronas en los adultos es sugerente de su dependencia hormonal, en contraste con los cobayos neonatos (Figura 19).



**Figura 19.** Diagrama propuesto de la interacción de las NIT en los testículos de los cobayos. En los neonatos el VEGF (verde) y TRPV1 (naranja) modularían la diferenciación y migración de las células (1). La TH (rojo) diferenciaría y proliferaría células de Leydig y producción de T. (2) y el CGRP (azul) y SP (rosa), ON (negro) modularían el flujo sanguíneo y el aporte de nutrientes (3). En los adultos, el VEGF, ON y TRPV1 modularían la maduración de las células germinales por la BTH (4) y a la vez estimularían la producción de T (amarillo) en las células de Leydig (6). El CGRP y SP modularían el tono vascular y la temperatura (5). El ON y la NA y el CGRP favorecen la contractilidad de las células MPT (7). Las NIT son importantes en la homeostasis, producción de hormonas y fertilidad de los individuos.

## **IX. CONCLUSIÓN**

Los testículos de los cobayos neonatos y adultos jóvenes poseen neuronas (NeuN<sup>+</sup>) activas (cFos<sup>+</sup>), fueron redondas, fusiformes y multipolares. Hubo neuronas catecolaminérgicas (TH<sup>+</sup>), peptidérgicas (SP<sup>+</sup>, CGRP<sup>+</sup>, TRPV1<sup>+</sup>, VEGF<sup>+</sup>) y nitrérgicas (NADPHd<sup>+</sup>). Los testículos de los cobayos adultos tuvieron mayor cantidad de neuronas, mayores ramificaciones y mayor cantidad de fibras sugiriendo mayor conectividad. Las diferencias que existe entre los cobayos neonatos y adultos coinciden con la esteroidogénesis y espermatogénesis alta que caracteriza a los animales adultos jóvenes.

## **X. PRESPECTIVAS**

Caracterizar a las NIT en cobayos puberales y seniles.

## XI. REFERENCIAS

1. **Anderson LE, Seybold VS.** Calcitonin gene-related peptide regulates gene transcription in primary afferent neurons. *Journal of Neurochemistry*, 2004, (91):1417-1429.
2. **Angelova PA, Davidoff MS, Kanchev LN.** Substance P-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Andrology*, 1991. (23):325-327.
3. **Bott R, Clopton D, Cupp AA.** Proposed Role for VEGF Isoforms in Sex-Specific Vasculature Development in the Gonad. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008. 43(2): 310-316.
4. **Buzadzic B, Vucetic M, Jankovic A, Stancic A, Korac A, Korac B, Otasevic V.** New insights into male infertility: the importance of NO. *British Journal of Pharmacology*. 2015. 172(6):1455-1467.
5. **Campos MB, Vitale ML, Calandra SR, Chiochio SR.** Serotonergic innervation of the rat testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1990, (88):475-479.
6. **Chiwataka C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R.** Tachykinin (Substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology*, 1991,128(5):2441-2448.
7. **Clermont Y.** Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, 1972. 52 (1):198-236.
8. **Cotecchia S.** The  $\alpha_1$ -adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2010, 30(6):410-419.
9. **D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR.** Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 2000, (300):47-56.
10. **Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, Holstein A.** Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. *Arch Histol Cytol*, 1995:58(1):17-30.
11. **De Toni L, Garolla A, Menegazzo M, Magagna S, Di Nisio A, Sabovic I, Foresta C.** Heat sensing receptor TRPV1 is a mediator of thermotaxis in human Spermatozoa. *PLoS ONE*, 2016. 11(12):167-187.
12. **Dees WL, Hiney JK, Mc Arthur NH, Johnson GA, Dissen GA, Ojeda SR.** Origin and ontogeny of mammalian ovarian neurons. *Endocrinology*, 2006. 147(8): 3789-3796.



13. **Dolores D, Mruk C, Yan C.** Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 2004, 25(5): 747-806.
14. **Doshi SB, Khullar K, Sharma RK, Agarwal A.** Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012, (10):109-115.
15. **Du Plessis SS, Agarwal A, Syriac A.** Marijuana, phytocannabinoids, the endocannabinoid system, and male fertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2015. 32(11):1575-1588.
16. **Eggers S, Sinclair A.** Mammalian sex determination-insights from humans and mice. *Chromosome Research*, 2012. 20(1): 215-238.
17. **Ergüna S, Kilica N, Fiedlerb, Mukhopadhyayc AK.** Vascular endothelial growth factor and its receptor in normal human testicular tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1997, (131):9-20.
18. **Frungieri MB, Urbanski HF, Höhne-Zell B, Meyerhofer A.** Neuronal elements in the testis of the rhesus monkey: ontogeny, characterization and relationship to testicular cells. *Neuroendocrinology*, 2000, (71):43-50.
19. **Gnegy ME.** Catecholamines. Chapter 14. Basic Neurochemistry. Principles of molecular, cellular and medical neurobiology. Eighth edition, 2012. pp. 283-299.
20. **Gong YG, Feng MM, Hu XN, Wang YQ, Gu M, Zhang W, Ge RS.** Nonmonoaminergic peptidergic fibers profusely innervate the young adult human testicle. *Journal of Anatomy*, 2009, (3):330-338.
21. **Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT.**  $\alpha$ 1-Adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function and signaling. *Circulation Research*, 1996, 78:737-749.
22. **Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE.** NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Nature*, 2015, 7(2): 42-47.
23. **Heindel JJ, Steinberger A y Strada SJ.** Identification and characterization of a  $\beta$ <sub>1</sub>-Adrenergic receptor in the rat Sertoli cell. *Molecular and cellular Endocrinology*, 1981, (22), 349-358.
24. **Heinz KW, Anette G.** The nerve distribution in the testis of the cat. *Annals of Anatomy*, 2001, (183):279-308.

25. **Heinz KW, Birgit B.** The autonomous innervation of the porcine testis in the period from to adulthood. *Annals of Anatomy*, 1998, (180):145-16.
26. **Heinz KW, Mohamed N, Kamel M.** On the innervation of the donkey testis. *Annals of Anatomy*, 2000, (182):13-22.
27. **Huleihel M y Lunenfeld E.** Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Journal Andrology*, 2004. (6):259-268.
28. **Kanchev LN, Konakchieva R, Angelova PA, Davidoff MS.** Substance P modulating effect on the binding capacity of hamster Leydig cell LH receptors. *Life Sciences*, 1995. (19):1631-1637.
29. **Kierszenbaum AL, Spruill AW, White MG, Tres LL, Perkins JP.** Rat Sertoli cells acquire a  $\beta$ -adrenergic response during primary culture. *Proc Natl Acad Sci*, 1985. 82:2049-2053.
30. **Kliche S, Waltenberger J.** VEGF receptor signaling and endothelial function. *IUBMB Life*, 2001.52:61-66.
31. **Korpelainen EI, Karkkainen MJ, Tenhunen A, Lakso M, Rauvala H, Vierula M, Alitalo K.** Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: evidence for nonendothelial targets for VEGF. *The Journal of Cell Biology*, 1998. 143(6):1705-1712.
32. **Koskeniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J.** Testicular growth and development in puberty. *Current Opinion Endocrinology Diabetes Obesity*, 2017, (24):215-224.
33. **Kretser MD.** Male reproductive system. *Physiology of Reproduction*. Knobil and Neill's Third Edition, Vol 1, 2006. pp 771-810.
34. **Larrivé B, Karsan A.** Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (Review). *International Journal of molecular medicine*, 2000. (5):447-456.
35. **Lee NP, Cheng CY.** Nitric oxide and cyclic nucleotides: Their roles in junction dynamics and spermatogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2008, (11): 25-32.
36. **Luna F, Barrientos E, Alatríste V, Martínez I, Limón I, González-Flores O.** Morphology and chemical phenotype of the ovarian intrinsic neurons in neonate and sexually mature reproductive guinea pig. *Advances in Reproductive Sciences*, 2015, (3):13-26.

37. **Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace PM, Pothoulakis C, Dana R.** Neuropeptide substance P and the immune response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(22):4249–4264.
38. **Masufumi S, Keiichi S.** A histochemical investigation of the distribution of adrenergic and cholinergic nerves in the human male genital organs. *Journal Experimental Medicine*, 1973, (111):281-291.
39. **Mayerhofer A, Amador AG, Sterger RW, Bartke A.** Testicular function after local injection of 6-Hydroxydopamine or norepinephrine in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Andrology*, 1990, (11):301-311.
40. **Mayerhofer A, Danilchik M, Pau FK, Lara HE, Russell LD, Ojeda RS.** Testis of prepubertal Rhesus monkeys received a dual catecholaminergic input provided by the extrinsic innervation and an intragonadal source of catecholamines. *Biology of Reproduction*, 1996, (55): 509-518.
41. **Mayerhofer A, Frungieri MB, Fritz S, Bulling A, Jessberger B, Vogt HJ.** Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies. *Journal of Andrology*, 1999, (20): 341-347.
42. **Mayerhofer A, Steger RW, Gow G, Bartke A.** Catecholamines stimulate testicular testosterone release of the immature golden hamster via interaction with Alpha- and beta-adrenergic receptors. *Journal Endocrinology*. 1992, 127:526-30.
43. **Miyake K, Yamamoto M, Mitsuya H.** Pharmacological and histological evidence for adrenergic innervation of the myoid cells in the rat seminiferous tubule. *Tohoku journal Exp. Med*, 1986, 149(1):79-87.
44. **Moger WH, Murphy PR, Casper RF.** Catecholamine stimulation of androgen production by mouse interstitial cells in primary culture. *Journal Andrology*, 1982, (3):227-231.
45. **Nagatsu T.** The catecholamine system in health and disease. Relation to tyrosine 3-monooxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 2006. 82(10): 388-415.
46. **Nalbandian A, Dettin L, Dym M, Ravindranath N.** Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. *Biology of Reproduction*, 2003. 69(3):985-994.

47. **Pinto FM, Ravina CG, Subiran N, Cejudo-Román A, Fernández-Sánchez M, Irazusta J, Candenas L.** Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2010, 8:104.
48. **Prince FP.** Ultrastructural evidence of indirect and direct autonomic innervation of human Leydig cells: comparison of neonatal, childhood and pubertal ages. *Cell & Tissue Research*, 1992 (269):383-390.
49. **Qing W, Elizabeth I, Tang YG, Tito TJ, Darren S, Chu WM, Lee CKC, Wong Yi-XL, Xiang X, Silvestrini BC, Yan C.** Signaling pathways regulating blood-tissue barriers-lesson from the testis. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-Biomembranes*, 2018, (18):141-153.
50. **Ramírez-Barrantes R, Cordova C, Poblete H, Muñoz P, Marchant I, Wianny F, Olivero P.** Perspectives of TRPV1 function on the neurogenesis and neural plasticity. *Neural Plasticity*, 2016, (15): 1-12
51. **Rawlings N, Evans ACO, Chandolia RK y Bagu ET.** Sexual maturation in the bull. *Reproduction Domestic Animals*, 2008, 3(2):295-301.
52. **Rolland AD, Bernad J, Pineau C.** Testicular development and spermatogenesis. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, 2008, (3):18-37.
53. **Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD.** Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 2014, 94(4), 1099–1142.
54. **Samanta A, Hughes TE, Moiseenkova-Bell VY.** Transient receptor potential (TRP) channels. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2018, (87):141-165.
55. **Sargent KM, Renee M, McFee, Spuri RG, Cupp AS.** VEGFA: just one of multiple mechanisms for Sex-Specific vascular development within the testis? *Journal Endocrinology*, 2015, (13):31-50.
56. **Sheng Y, Zhu L.** The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 2018. 10(1):7–28.
57. **Shuying H, Xiuhui Z, Xianjun W, Yurong L.** Effects of norepinephrine and acetylcholine on the development of cultured Leydig cells in mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, (12):1-8.

58. **Smith LB, Walker WH.** The Regulation of Spermatogenesis by Androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2014, (2): 2-13.
59. **Steinhoff MS, Von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW.** Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiological Reviews*, 2014, 94(1): 265-301.
60. **Suburo AM, Chiocchio SR, Soler VC, Nieponice A, Tramezzani JH.** Peptidergic innervation of blood vessels and interstitial cells in the testis of the cat. *Journal of Andrology*, 2002, (23):121-134.
61. **Svingen T, Koopman P.** Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes & Development*, 2013. 27(22):2409-2426.
62. **Tanaka SS, Nishinakamura R.** Regulation of male sex determination: genital ridge formation and SRY activation in mice. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71(24): 4781-4802.
63. **Tinggaarad J, Mieritz MG, Sorensen K, Mouritsen A, Hagen CP, Aksglaede L, Wohlfahrt-Veje C, Juul A.** The physiology and timing of male puberty. *Current Opinion Endocrinology Diabetes Obesity*, 2012, (19):197-203
64. **Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T.** Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Research*, 2004 (15):169-174.
65. **Urbanski HF, Doan A, Pierce M, Fahrenbach H, Collins PM.** Maturation of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of male syrian Hamsters. *Biology of Reproduction*, 1998, (46):991-996.
66. **Wang H, Wang X, Qu J, Yue Q, Hu Y, Zhang H.** VEGF enhances the migration of MSCs in neural differentiation by regulating focal adhesion turnover. *Journal of Cellular Physiology*. 2014, (19): 2728-2742.
67. **Wang Y, Gologorsky MS, Lin M, Wilcox JN, Marsden PA.** A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH<sub>2</sub>-terminal truncated nitric-oxide synthase. *Journal Biol. Chem* 1997, (272):11392-11401.

68. **Weissman BA, Niu E, Ge R, Sottas CM, Holmes M, Hutson JC, Hardy MP.** Paracrine Modulation of Androgen Synthesis in Rat Leydig Cells by Nitric Oxide. *Journal of Andrology*. 2005, (3):369-378.
69. **Wimalawansa SJ.** Calcitonin gene-related peptide and its receptors: Molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocrinology Rev*,1996. 17(5):533-85.
70. **Zhu CB, Chiochio SR, Suburo AM, Tramezzani JH.** Monoaminergic and peptidergic contributions of the superior and inferior spermatic nerves to the innervation of the testis in the rat. *Journal of Andrology*, 1995. 16 (3): 248-258.
71. **Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Armerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F.** Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by Substance P. *Journal Clinical Investigation*, 1994, 94:2036-2044.

## XII. COMUNICACIÓN EN CONGRESO NACIONAL



### **Morfología y bioquímica de neuronas intrínsecas testiculares de los cobayos Hartley sexualmente inmaduros y maduros**

**Cano Laura** (estudiante de posgrado), Alatraste Victorino, Martínez Liliana, Limón I. Daniel y Luna Félix

Laboratorio de Neuroendocrinología, FCQ-BUAP. CP72570, Puebla México

Las neuronas intrínsecas han sido bien caracterizadas en el sistema digestivo, pero poco estudiadas en las gónadas, sin embargo, pueden ser claves en la comunicación con el sistema nervioso central y periférico. En este trabajo identificamos y caracterizamos bioquímicamente a las neuronas intrínsecas testiculares (NIT) en dos momentos del desarrollo sexual de los cobayos; inmaduros (0-5 días de edad, P0) y maduros (90 días de edad, P90). Para la caracterización morfológica de las neuronas, ganglios y fibras nerviosas usamos la técnica de Golgi-Cox modificada, mientras para la caracterización bioquímica evaluamos la positividad a la NADPH-diaforasa (NADPHd) y diversos anticuerpos específicos. Como marcador neuronal usamos a la proteína nuclear neuronal (anti-NeuN). Como medidor de la actividad al cFos (anti-cFos) y para conocer la bioquímica usamos a la tiroxina hidroxilasa (anti-TH), al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (anti-CGRP), a la sustancia P (anti-SP), al factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) y al receptor a vaniloides de potencial transitorio (anti-TRPV1). Las neuronas intrínsecas fueron localizadas en el intersticio del testículo, principalmente alrededor de los tubos seminíferos, identificamos neuronas agrupadas formando ganglios y neuronas aisladas, algunas de ellas tuvieron cuerpo celular redondo, otras fueron fusiformes, las fibras nerviosas estuvieron rodeando a los tubos seminíferos. Identificamos tres subpoblaciones de neuronas; nitrérgicas (NADPHd-positivas), catecolaminérgicas (TH-positivas) y sensoriales (CGRP-, SP-, TRPV1- y VEGF-positivas), estas neuronas fueron localizadas alrededor de los tubos seminíferos, aunque algunas de ellas estuvieron cercanas a los vasos sanguíneos. El número de NIT fue mayor en los cobayos sexualmente maduros en comparación con los cobayos inmaduros. Se ha propuesto que estos mensajeros químicos participan en la diferenciación de las espermatogonias, la esteroidogénesis, la contracción de tubo seminífero y en la regulación del flujo sanguíneo en los testículos.