Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

“Efecto de la capsaicina en concentración 1nM y 10 nM sobre gónadas de rata macho Wistar”

Tesis que para obtener el título de

Licenciada en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

p.Q.F.B. Karla Martínez Cornelio

Director de tesis

D.C Victorino G.S. Alatriste Bueno
Laboratorio de Neuroendocrinología
Departamento de Análisis Clínicos FCQ-BUAP

Puebla, pue. **Octubre de 2020**

«La vanidad echa a perder las mejores cualidades. El talento y la bondad nunca pasan inadvertidos y, aunque así fuera, la conciencia de tenerlos y hacer buen uso de ellos debería bastar. Las virtudes quedan ensalzadas por la modestia.»

Mujercitas -Louisa May Scott

Agradecimientos

A mi director de tesis:
D.C Victorino G.S. Alatriste Bueno

Al jurado revisor de la tesis

M.C. Sandra Cuellar Herrera

M.C. María Adriana González flores
D.C.I Daniel Limón Pérez de León

Dedicado a

Mi madre por enseñarme, cuidarme, hacer de mi la persona que soy, gracias por ser la mujer que me impulsa siempre a seguir adelante con mis metas.

Mi padre por fomentar mi amor por las ciencias y apoyar mi curiosidad mostrándome el mundo.

Mi cómplice, compañero de risas, enojos, peleas a quien sin importar lo que pueda pasar siempre está conmigo a mi hermano quien siempre busca apoyarme y alentarme a mejorar como persona.

Los maestros que transmitieron su conocimiento y para mí son ejemplos a seguir.

Para quien me muestra su apoyo y amor en todo momento.

Para las personas que ya no me acompañan, pero siempre confiaron en mí.

Gracias a todos ellos por creer en mí y que puedo mejorar día a día por orientarme, brindarme su amistad, demostrarme su amor, su confianza y compartir conmigo su tiempo.

INDICE

Abreviaturas 3
1. INTRODUCCIÓN 4
1.1 Pubertad en mamíferos 4
1.2 sistema Genital Masculino 6
1.3 Eje hipotálamo hipófisis gónadas 8
1.4 Hormonas reguladoras 9
1.4.1 Hormonas Hipotalámicas 9
Hormona liberadora de gonadotropina 9
1.4.2 Hormonas Hipofisiarias 9
Hormona foliculoestimulante 9
Hormona luteinizante 9
1.4.3 Hormonas peptídicas 9
Inhibina 9
1.4.4 Hormonas testiculares 10
Testosterona 10
Dihidrotestosterona 10
1.5 Catecolaminas 12
1.6 Desarrollo del testículo desde el recién nacido 13
1.7 Histología celular de los testículos 17
1.8 Espermatogénesis 19
1.9 Irrigación Testicular de rata 21
1.10 Inervación testicular de rata 22
1.11 Receptores TRPV1 Receptor de Potencial Transitorio a Vanilloide Tipo 1 25
1.12 Acción de TRPV1 en testículos 28
1.13 Capsaicina como herramienta farmacológica para estimular receptores TRPV1 28
2. JUSTIFICACIÓN 31
3. HIPÓTESIS 32
4. OBJETIVOS 32
Objetivo general 32
Objetivos particulares 32
5. DIAGRAMA DE TRABAJO 33
6. MATERIALES Y METODOS 35

Metodología 35
Animales: 35
Procedimiento 36
Administración de Capsaicina 37
Eutanasia y obtención los tejidos 37
Tratamiento de los tejidos y análisis 37
7. RESULTADOS 42
DISCUSIÓN DE RESULTADOS 51
CONCLUSIONES 57
ANEXOS 57
REFERENCIAS 58

Abreviaturas

12-HPETE: ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico

CA: Catecolaminas

Ca2+: Calcio

CAM: calmodulina

CAMKII: quinasa dependiente de calmodulina

Cap.: Capsaicina

FSH: Hormona foliculoestimulante

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

H&E: hematoxilina-eosina

HHG: Eje hipotálamo hipófisis gónadas

LH: Hormona luteinizante

NADA: N-araquidonoil-dopamina

P: Postnatal

PKC: proteína quinasa C

TDF: factor determinante de los testículos

TRPV1: Receptor de potencial transitorio de canales catiónicos

1. INTRODUCCIÓN

La pubertad es considerada el periodo de transición entre la infancia y la edad adulta, donde tienen lugar importantes cambios físicos, funcionales, psicológicos e interrelaciones. Permitiendo así generar características físicas, produciendo cambios fisiológicos relacionados a la identidad sexual en las cuales se encuentra la percepción de hormonas del sexo opuesto, y generar atracción las cuales permiten la preservación de diferentes especies (Muñoz et. al., 2007).

En los machos, debe de existir la maduración espermática, proceso mediado por actividad endocrina y regulado por el eje hipotálamo hipófisis gónadas (HHG), dando un orden a la secreción de andrógenos. Lo que permite que el macho pueda fecundar durante la cópula, donde el espermatozoide y el óvulo se unen, ocurriendo la fertilización que se continúa con el desarrollo del embrión preimplantacional (Lacqua, et al., 2017).

1.1 Pubertad en mamíferos

La pubertad presenta una amplia relación con los cambios neuroendocrinos que permiten la activación del eje HHG (Güemes et. Al., 2017). Mediante procesos fisiológicos, biológicos y químicos generados en la maduración sexual se inicia la maduración de genitales, glándulas suprarrenales, así como la adquisición del pico de masa ósea, grasa y muscular y se logra la talla adulta. (Kaplan, 2004).

El inicio de la pubertad está regulado principalmente por el cerebro, particularmente con los núcleos del hipotálamo. Estos núcleos son la región anterior, principalmente el núcleo preóptico, el área periventricular y el núcleo arcuato.

En estos núcleos están las neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). GnRH estimula la síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) en la hipófisis. Tanto FSH y LH actuaran en testículos permitiendo la liberación de esteroides sexuales por las gónadas. Los impulsos hormonales permitirán cambios característicos de la pubertad, tanto somáticos como de comportamiento, originados en el eje HHG (Juárez, Quevedo & Reséndiz, 2013).

A. Núcleo Preóptico medio: Localizado descienden hacia el tronco encefálico (Figura 1) Relacionado a la a diferenciación sexual del cerebro. Esta hormona puede influenciar el metabolismo de los neurotransmisores, los que finalmente tendrían el rol de producir la diferenciación sexual del cerebro. Generando la liberación de dopamina siendo la que induce la motivación sexual, los reflejos genitales, y la copulación, tanto en machos como en hembras (López C, Jiménez F 2015).

B. Núcleo Arcuato: Localizado en el hipotálamo medio en la porción más ventral del tercer ventrículo, cerca de la entrada del receso infundíbulo. (Figura 1) Actuando como importante activador de la liberación de GnRH, sobre el que actúan inhibitoriamente el estrés, la hipoglucemia y el lipopolisacárido (López C, Jiménez F 2015).

C. Área Periventricular : pequeño grupo de neuronas a lo largo de la pared del péptido natriurético auricular del tercer ventrículo (Figura1) sitio clave para la expresión de kisspeptin1, un neuropéptido que regula la hormona liberadora de gonatropina y la reproducción sexual (Semaan *et al.* , 2012).

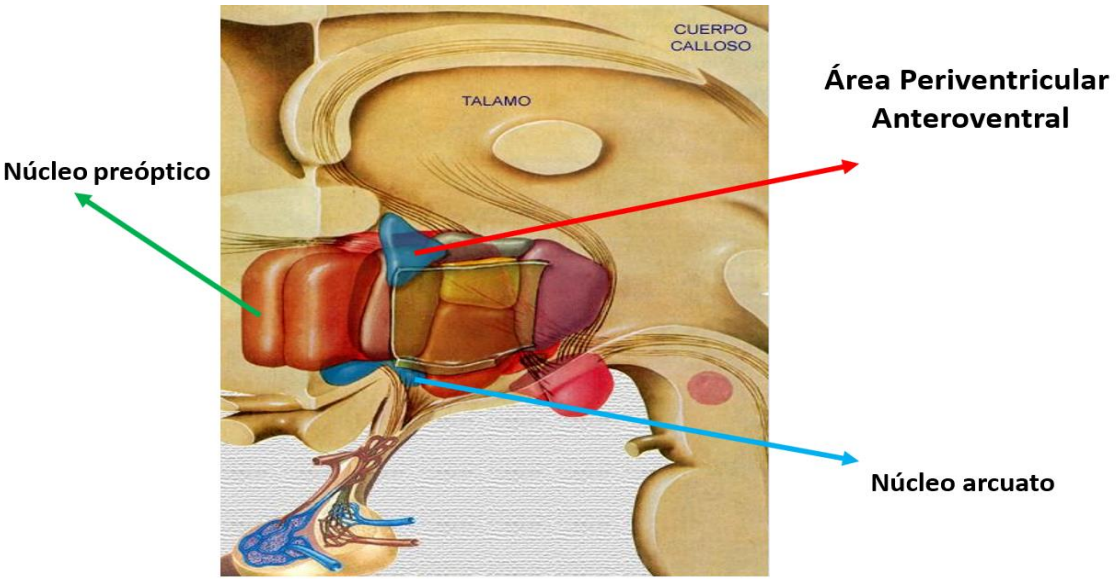


Figura 1: *Localización de núcleos con funciones primordiales de liberación hormonal, durante el proceso de pubertad. Localizando Núcleo Preóptico, Núcleo arcuato y Área Periventricular Antero ventral (López C, Jiménez F 2015).*

1.2 Sistema Genital Masculino

El sistema reproductor masculino está compuesto por los testículos, un sistema de canales que incluye las vesículas seminales y glándulas sexuales accesorias como la próstata, además de unas estructuras de soporte como el escroto y el pene (David G., Shoback D.2013)

a) Pene: Órgano copulador, situado por debajo de la sínfisis pubis y por arriba del escroto (Figura2) encargado de transportar el semen y la orina; se encuentra adherido al abdomen en la sección de "raíz" (Figura2) (Latarjet Ruiz, 2012). El pene es un órgano cilíndrico en cuyo interior se encuentran dos cuerpos llamados cavernosos y un cuerpo esponjoso, por cuyo interior transcurre la uretra.
b) Testículo: Se localizan en la parte inferior del torso, entre la base del pene y el ano, en la zona conocida como perineo. Este es un órgano ovoide, aplanado transversalmente, de color blanco azulado, brillante y liso. Se reconocen dos caras, medial y lateral. Tiene dos bordes, uno posterior y otro anterior y dos extremidades: superior e inferior (Figura2) (Latarjet Ruiz, 2012)
c) Epidídimo: Estructura localizada en el borde posterior del testículo (Figura2), presenta una cabeza redondeada separado del testículo por dos surcos, lateral y medial; una cola, inferior y lateral. Permite la maduración apropiada de los espermatozoides, permitiendo llevar a cabo el proceso de maduración espermática (Figura1) (Latarjet Ruiz, 2012).
d) Escroto: Es el saco que contiene a los testículos, epidídimo y parte inferior de los cordones espermáticos están contenidos en las bolsas escrotales (Figura2). Este saco cutáneo se encuentra conformado por dos Capas: la piel y la túnica (Latarjet Ruiz ,2012).
e) Capa albugínea: Membrana fibrosa que cubre testículo y epidídimo (Figura2), constituida por fibras de colágeno entrelazado, brindando protección y regulación térmica del exterior (Latarjet Ruiz ,2012).
f) Espermatocele: sección que conecta epidídimo con vasos deferentes (Figura2), incrementando la cantidad de líquidos, denominado líquido seminal. Y terminar el proceso de Capacitación espermática (Latarjet Ruiz, 2012).
g) Conductos deferentes: Los conductos deferentes son 2 tubos musculares de pared gruesa que comienzan en la cola del epidídimo de cada lado y terminan en el conducto

eyaculador. Transportan esperma desde el epidídimo al conducto eyaculador (Figura2) (Latarjet Ruiz ,2012).

h) Vesículas seminales: Secciones donde se Asientan a ambos lados de la parte caudal de la superficie dorsal de la vejiga (Figura 2). Tienen un fondo, un cuerpo y un cuello o conducto, estos producen un líquido rico en fructosa, el cual permite la movilidad y energía a los espermatozoides. Considerado como una parte fundamental de las vías espermáticas (Latarjet Ruiz, 2012).

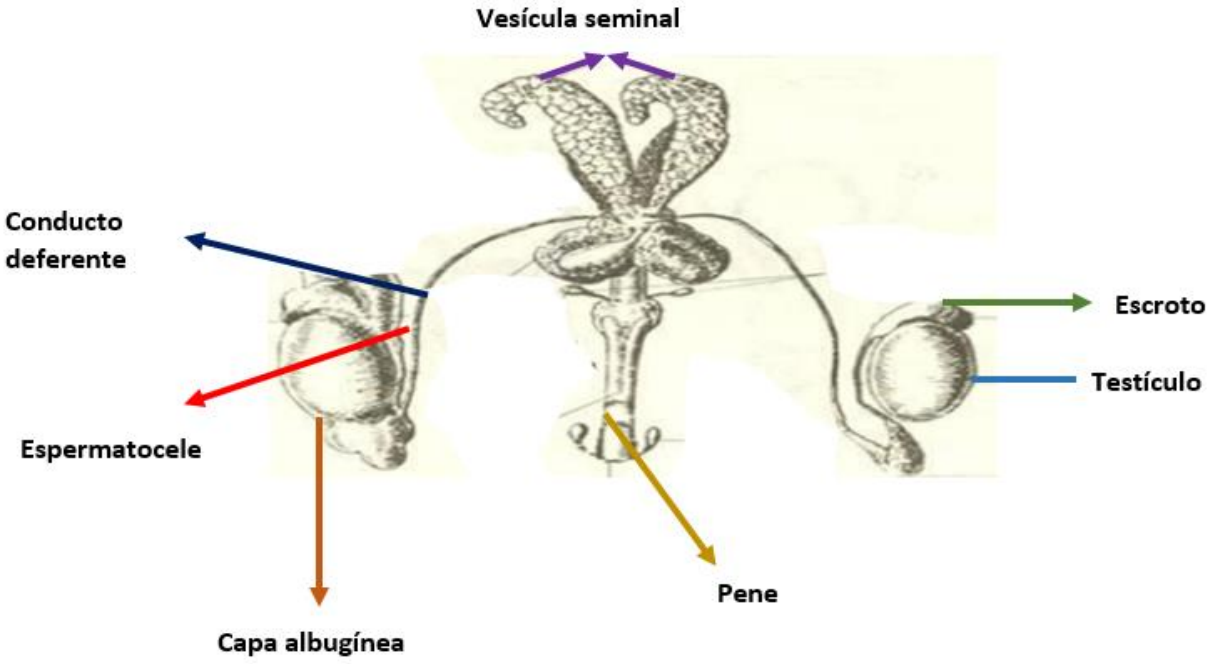


Figura 2.- Imagen representativa del aparato reproductor masculino de rata en el cual se señalan las secciones Pene, Testículo, Escroto, Capa albugínea, Espermatocele, Conductos deferentes y Vesículas Seminales (Fernández C. 2012)

1.3 Eje hipotálamo hipófisis gónadas

El Eje HHG es un sistema cuya función principal es mantener la regulación entre la producción de hormas, Las cuales afectan el crecimiento de tejido, desarrollo de caracteres sexuales. Por medio de la liberación de la hormona estimulante de las gonadotropinas a la circulación portal hipofisaria, donde se estimula la secreción pulsátil de gonadotropinas adenohipofisarias a la circulación periférica.

La actividad gonadal se ve dirigida por la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que permite la liberación de la hormona luteinizante y de la hormona foliculoestimulante proveniente de la región adenohipófisis. Estas gonadotropinas actúan sobre las gónadas masculina y femenina. Los niveles de la GnRH, de la hormona luteinizante y de la hormona foliculoestimulante están regulados por mecanismos de retroalimentación de los estrógenos y andrógenos, liberados por las gónadas que actúan en el hipotálamo e hipófisis.

La hipófisis responde sintetizando hormonas fundamentales para el control de las funciones metabólicas en todo el organismo (Figura 3) (Maeda et al., 2010). Estas a su vez se ven reguladas por la hormona inhibina la cual presenta función de feedback negativo en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, generando una regulación hormonal (Figura3).

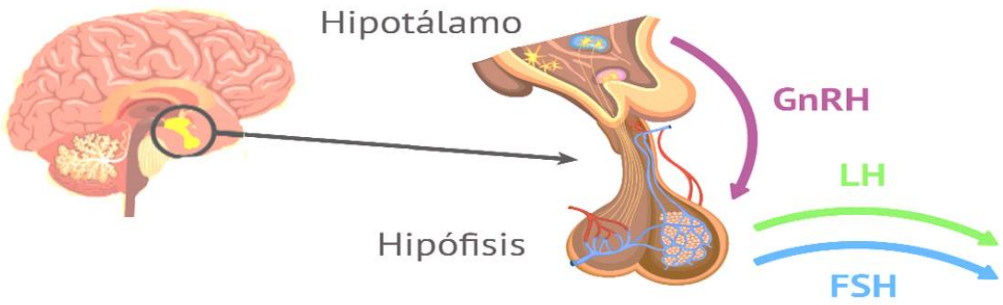


***Figura 3**: Acción de eje hipotálamo hipófisis gónadas por regulación hormonal, El efecto de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) sobre hipófisis e hipotálamo en la liberación de las hormonas luteinizante y de la hormona foliculoestimulante para llegar a testículo y la presencia de inhibina que permite la regulación de liberación excesiva de hormonas generando una estabilidad hormonal.*

1.4 Hormonas reguladoras

1.4.1 Hormonas Hipotalámicas

Hormona liberadora de gonadotropina

La GnRH es la hormona hipotalámica que controla la función gonadal a través del estímulo de la síntesis y la secreción de las gonadotrofinas hipofisarias, hormona foliculoestimulante y Hormona luteinizante (Figura 4).

1.4.2 Hormonas Hipofisiarias

Hormona foliculoestimulante

Hormona Foliculoestimulante es una glucoproteína sintetizada y secretada por células basófilas de la adenohipófisis esta se encuentra influenciando a las células de Sertoli, aromatizando la testosterona proveniente de las células de Leydig para formar estradiol generando una proteína ligadora secretada a la luz tubular, que permite interacción con inhibina en una reacción reguladora (Figura 4) (Dvorkin, Cardinali, Lermolli, 2011).

Hormona luteinizante

Hormona Luteinizante al igual que FSH es una glucoproteína sintetizada y secretada por células basófilas de la adenohipófisis, en conjunto a FSH en niveles plasmáticos forma pulsos estimulantes, esta a su vez dirige la estimulación de las células de Leydig Presenta una retroalimentación negativa generada por las hormonas testiculares denominadas Testosterona e inhibina (Figura 4) (Dvorkin, Cardinali, Lermolli, 2011).

1.4.3 Hormonas peptídicas

Inhibina

Es una hormona de origen exclusivamente gonadal, producida en las células de Sertoli y secretada en respuesta a la FSH a nivel hipofisiario del cual, a su vez, a través de un feedback negativo, suprime la secreción hipofisaria de la FSH, altamente relacionado a la producción espermática (Figura 4). (Plazas et Al 2010). Un aumento anormal de la FSH sérica es entonces interpretado como una caída de la producción testicular de inhibina. De esta manera los niveles circulantes de inhibina B pueden diferenciar una espermatogénesis normal de una anormal.

1.4.4 Hormonas testiculares

Testosterona

Hormona que proporciona los caracteres sexuales secundarios, adquiridos progresivamente a lo largo de la vida, tales como el timbre de voz, la distribución del vello, la morfogénesis genital, masa muscular, función sexual y reproducción. (Junquera, Carneiro 2015) la testosterona se encuentra regulado por un feedback negativo por la misma testosterona en una producción sobre los necesarios y por inhibina (Figura 4).

Los niveles de testosterona son un factor de alta prioridad para el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, los niveles de testosterona se incrementan durante la pubertad a sus niveles máximos y se encuentra un valor basal del cual se mantiene constante hasta la edad adulta (entre 40 y 70 años) Su alteración es multifactorial encontrando entre el área recurrente se ven disminuidas sus cantidades a niveles séricos (Morato el al. 2007).

Dihidrotestosterona

Andrógeno, metabolito biológico activo de la hormona testosterona, sintetizada principalmente en los testículos (Figura 4). La LH en las células intersticiales de Leydig del testículo incita la síntesis de la testosterona. En las células de Sertoli ubicadas en el conducto seminífero, la testosterona se transforma en dihidrotestosterona (un andrógeno muy activo) y también se convierte por la colaboración de la aromatasa en los estrógenos estrona y estradiol (Figura 4).

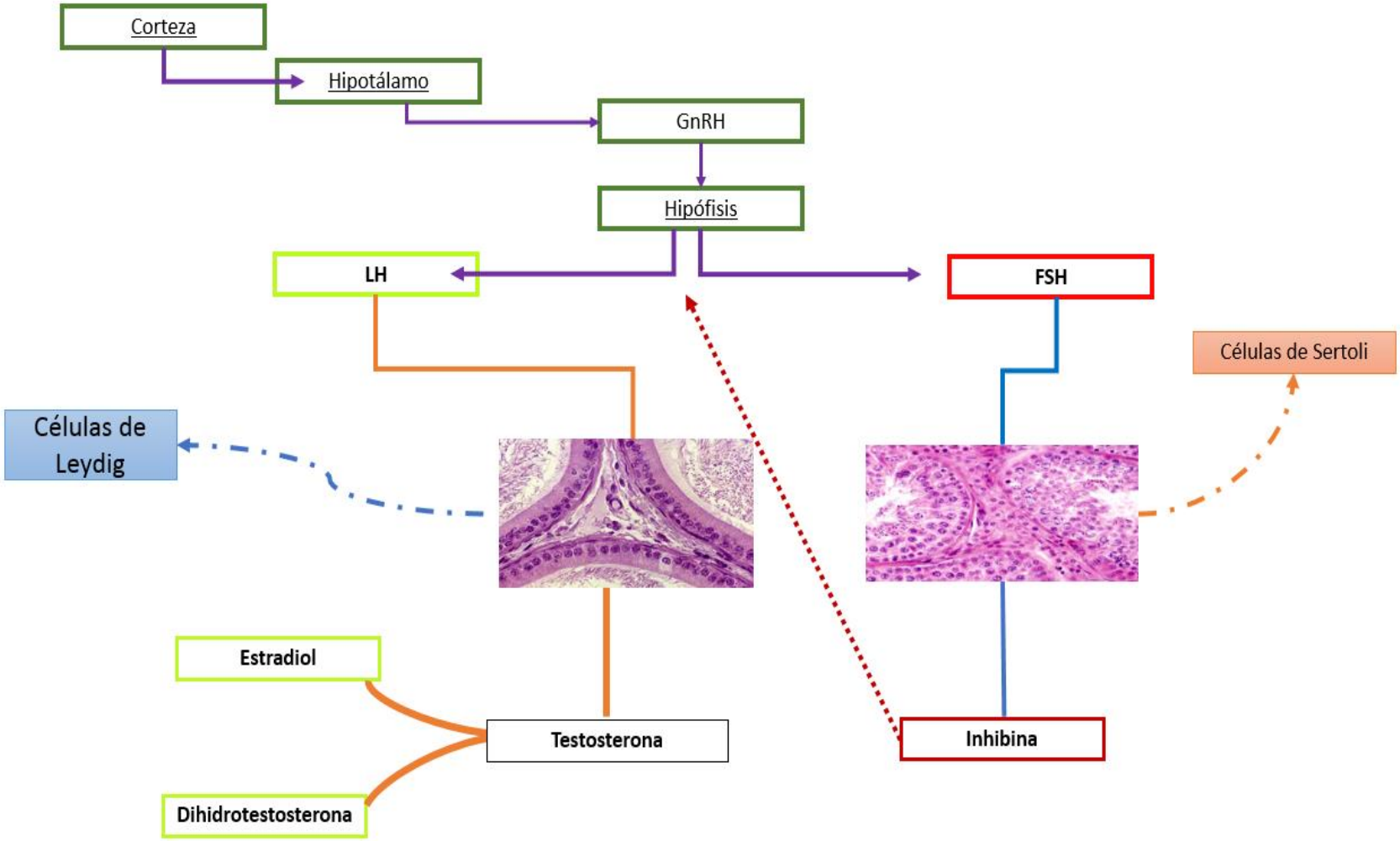


***Figura 4**: Regulación y control sexual regulado hormonalmente, relación que existe entre las diferentes hormonas hipotalámicas, hipofisiarias, peptídicas y testiculares en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada con el efecto en las células de Leydig y células de Sertoli. Tomado de: Calderón-Leyva, M.G. (2017).*

1.5 Catecolaminas

Las catecolaminas presentan un papel importante en la función de mecanismos neuronal endocrino ligado a sistema nervioso simpático -adrenal y el eje hipotálamo hipófisis -adrenal. Se inicia a partir de la dieta, con alimentos de contenido de tirosina el cual se biotrasforma a la producción de dopamina, noradrenalina y adrenalina. El término "catecolamina" (CA) designa a todos aquellos compuestos que contienen el grupo catecol (ortodihidroxibenzeno) y una cadena lateral con un grupo amino: el núcleo catecol. Las catecolaminas de importancia fisiológica son; Dopamina, noradrenalina y adrenalina

La adrenalina (o también epinefrina) es sintetizada y almacenada en la médula adrenal y liberada hacia la circulación sistémica. La noradrenalina (o norepinefrina) es sintetizada y almacenada no solamente en la médula adrenal, además también lo es en los nervios simpáticos periféricos. La dopamina se encuentra en la médula adrenal y en los nervios simpáticos periféricos, pero esta catecolamina actúa fundamentalmente como un neurotransmisor en el sistema nervioso central. Noradrenalina, adrenalina y dopamina: actúan como hormonas siendo adrenalina la de mayor porcentaje de producción involucrado en el movimiento involuntario.

Dopamina: Hormona encargada de la regulación de comportamientos modulada a nivel neuronal generando así sensaciones placenteras y comportamientos adictivos.

Noradrenalina: Anillo catecol con 6 carbonos y dos grupos hidroxilos, este cumple una función importante en el desarrollo de las actividades diarias, esta tiene función hormonal; en la glándula suprarrenal la cual dirige a sangre periférica.

Adrenalina: Actúa al igual que noradrenalina como hormona en torrente sanguíneo generado a partir de la modificación de aminoácidos esenciales descarboxilados; amina biológica que se encarga de diversos mecanismos de movimiento en respuesta a estímulos con una síntesis exclusivamente dirigida por sistema nervioso central (Tortora & Derrickson 2015).

1.6 Desarrollo del testículo desde el recién nacido

El proceso de diferenciación sexual es un proceso continuo que se inicia durante el desarrollo embriofetal, La diferenciación gonadal ocurre de forma temprana, marcado por la formación de cordones testiculares, siendo al día 13 post-fecundación en ratas. (Rojas M., Conei D., Bustos E., 2012).

La actividad enzimática esteroidogénica se activa tras esta diferenciación, ocasionando la producción de testosterona al día 15,5 post-fecundación en ratas. (Huhtanienmi & Pelliniemi, 2012)

La formación de las futuras gónadas son bipotenciales, es decir que podrán evolucionar hacia testículos o hacia ovarios según la constitución genética del individuo, dando origen a los componentes somáticos de las gónadas. Las células germinales se originan en tejidos extraembrionarios, en el saco vitelino (Figura 5). (Goodfellow & Lovell-Badge 2001).

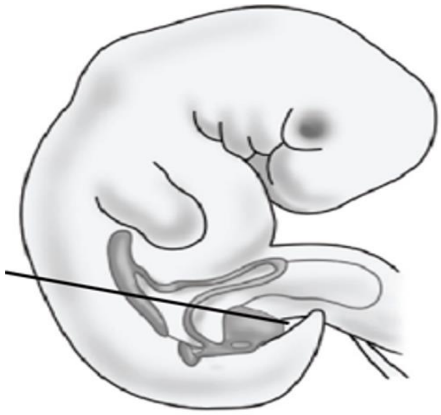


Figura 5: Representación de embrión de rata entre los días 13 a 15 posteriores a la fecundación de rata, donde se inicia la diferenciación sexual de los sujetos. (*Cunningham et.al. 2013)*

Previo a la diferenciación se encuentra que los sujetos tienen en su estructura Gónadas indiferenciadas (Figura 6). Mientras que en el individuo XY las crestas gonadales se diferencian formando los testículos fetales. Es posible observar la formación de cordones testiculares, futuros tubos seminíferos, formados por una población de células somáticas, las células de Sertoli, y una población de células germinales. (Rojas M., Conei D., Bustos E., 2012).

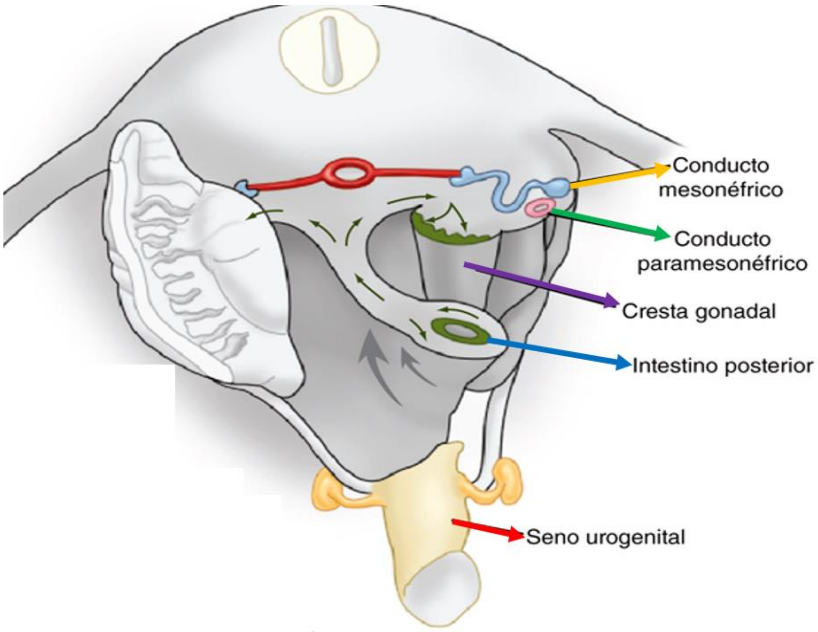


Figura 6: Representación de tejidos extraembrionarios donde se pueden encontrar los conductos paramesonefricos, crestas gonadales, los cuales permitirán la formación de tejidos definidos para una diferenciación sexual. (*Cunningham et.al. 2013)*

Posteriormente los gametos comienzan a diferenciarse en el intersticio entre los cordones seminíferos las células de Leydig (Figura 7). La población de células germinales está formada por los gonocitos, que se multiplican y se diferencian a espermatogonias; éstas también de dividen por mitosis, pero no entran en meiosis hasta la pubertad. (Goodfellow & Lovell-Badge 2001).

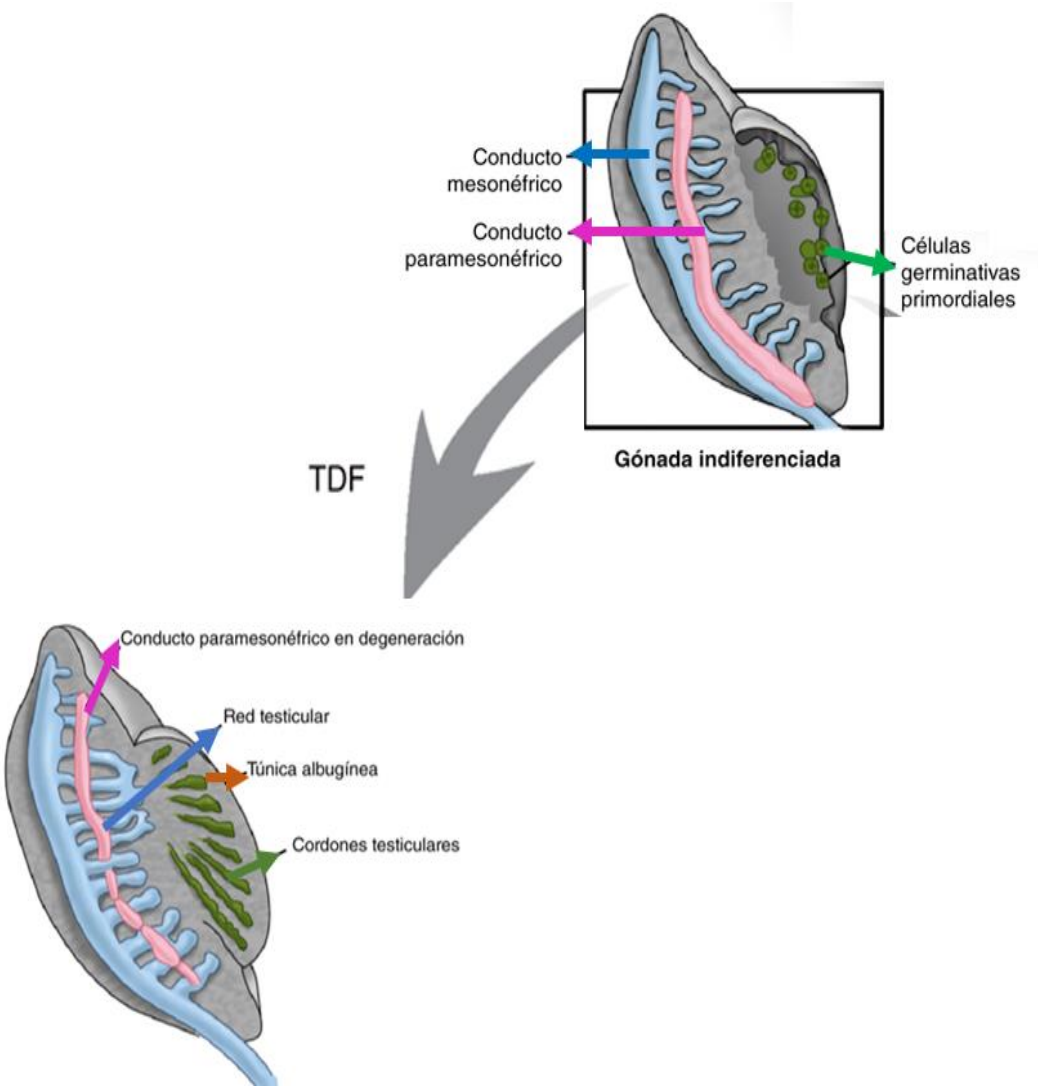


Figura 7: Proceso por el cual la gónada indiferenciada con efecto de la hormona denominada TDF permite la formación de la red testicular, túnica albugínea, cordones testiculares y conducto paramesonefrico, permitiendo formar los testículos de las ratas macho. (*Cunningham et.al. 2013)*

Bajo la acción de los andrógenos testiculares, los conductos mesonéfricos de Wolff dan origen en el feto masculino a los epidídimos, conductos deferentes y vesículas seminales (Figura 8). Permitiendo generar las células definidas que al inicio de la pubertad permitirán formar, almacenar y secretar espermatozoides maduros con la finalidad de preservar su especie. (Cunningham et.al. 2013)

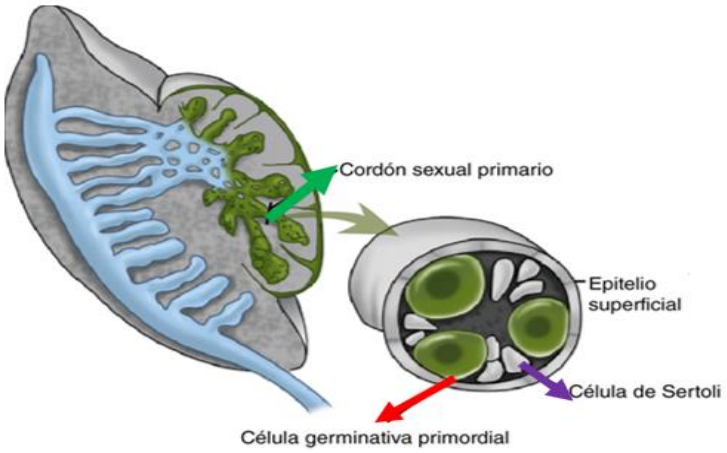


Figura 8: Representación de las células dentro del cordón sexual primario, indispensables para el término de la diferenciación sexual de los sujetos. (*Cunningham et.al. 2013)*

En el sexo femenino, ante la ausencia de hormona anti-Mülleriana (AMH), los conductos paramesonéfricos de Müller forman las tubas uterinas, el útero y el tercio superior de la vagina. Los conductos de Wolff degeneran en el feto XX por falta de andrógenos, en tanto que los conductos de Müller regresan en el feto XY por acción de la AMH. (Goodfellow & Lovell-Badge 2001).

La diferenciación de los órganos genitales internos y externos de neonatos en sentido masculino o femenino depende de la presencia o ausencia de las hormonas testiculares. Las cuales tendrán acción importante en la pubertad y el proceso de maduración sexual de las ratas (Goodfellow & Lovell-Badge 2001).

1.7 Histología celular de los testículos

Cada testículo se encuentra envuelto por una capsula gruesa de tejido conjuntivo denominado túnica albugínea (TA). La TA se engrosa en la superficie dorsal testicular formando el mediastino testicular. A partir del mediastino testicular parten los tabiques fibrosos, que se introducen en el testículo y se dividen en un aproximado de 250 lobulillos testiculares. Dentro de cada lobulillo testicular se encuentra los túbulos seminíferos.

a) Lobulillos: Son estructuras piramidales en el cual se almacenan espermátidas los cuales se preparan para su maduración dentro de los lobulillos, que presentan una forma cónica, dentro de este presenta de 1 a 4 túbulos seminíferos, dentro del cual se producen los espermatozoides y un estroma de tejido conjuntivo donde se encuentran células de Leydig (Figura 9) (Junquera & Carneiro, 2015).
b) Células de Leydig: Son las típicas células productoras de esteroides que manifiestan mitocondrias con crestas tubulares, las regiones entre los túbulos seminíferos plegados están ocupadas por elementos de la túnica vascular rica en vasos sanguíneos, tejido conectivo con fibroblastos, células cebadas y otras constituyentes normales del tejido conectivo. Dispersos entre la túnica vascular hay grupos de células endocrinas (Figura 9) (Ibarra et Al. 2006). Las células de Leydig son secretadoras de testosterona se ve regulada por la hormona luteinizante estas son las principales productoras y liberadoras de testosterona desde el inicio del desarrollo del feto hasta su edad adulta (Transpón et al. 2014).

c) Células de Sertoli: Son elementos esenciales para la producción de los espermatozoides, con una superficie basal la cual se adhiere a la lámina basal de los túbulos y sus extremos apicales se encuentran en la luz del túbulo (Figura 9). Son secretoras del líquido testicular que llena el túbulo seminífero y como células endocrinas liberadoras de hormonas teniendo principalmente la secreción de inhibina. Las células de Sertoli presentan las funciones de sostén, protección y aporte de los espermatozoides en desarrollo (Junquera, Carneiro 2015) La célula de Sertoli es el principal productor de inhibina B en el testículo; sin embargo, los

mecanismos involucrados en la regulación de su síntesis son complejos dependen del grado de maduración de la célula de Sertoli.

La producción de inhibina B por la célula de Sertoli no está regulada solo por la Hormona foliculoestimulante, sino también por otros factores producidos probablemente por las células peritubulares y productos no esteroideos de la célula de Leydig (Transpón et al. 2014).

Los túbulos seminíferos se encuentran conformados por células espermatogénicas y células de Sertoli, conjunto a las células de Leydig, las cuales se encuentran como tejido conjuntivo en los espacios de los túbulos seminíferos permiten una regulación en secreción de andrógenos, estrógenos reguladores del sistema (Figura 9) (Dvorkin, Cardinali, Lermolli, 2011).

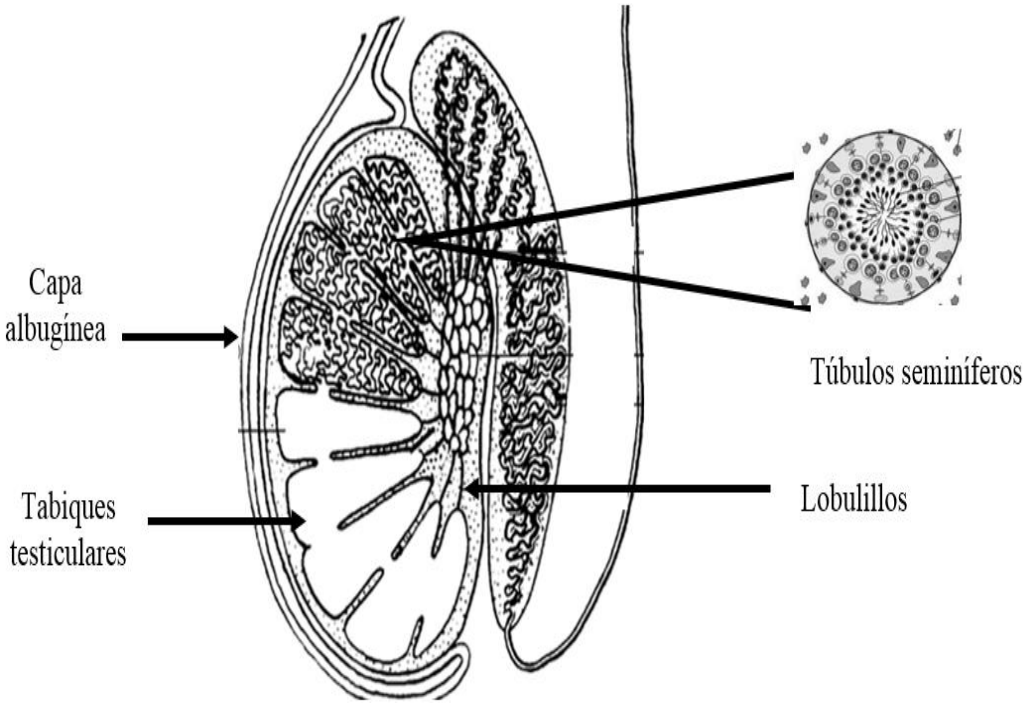


Figura 9.- *Representación de secciones internas de testículo de ratas, permitiendo, identificar los lobulillos, conductos seminíferos, células de Sertoli y células de Leydig en testículo sano (Sequeira l. dep.vet, 2015).*

1.8 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso por el cual dentro de los tubulos seminíferos se produce la población de espermatozoides, este proceso incluye la división celular mediante mitosis y meiosis, seguida de una diferenciación final de las células en espermatozoides. El proceso de espermatogénesis se ve formado a partir de la espermatogonia, las cuales están situadas cerca de la lámina basal del epitelio seminífero, durante la etapa de pubertad, las espermatogonias inician un proceso de división mitótica.

Las espermatogonias presentan la a Capacidad de mantener la división celular del proceso de formación de espermatozoides maduros o bien se puede mantener como célula madre de otras espermatogonias (Figura 10).

La división de las células se ve orientado por procesos mitótico y meiótico, con la finalidad de obtener células maduras que transporten el material genético adecuado.

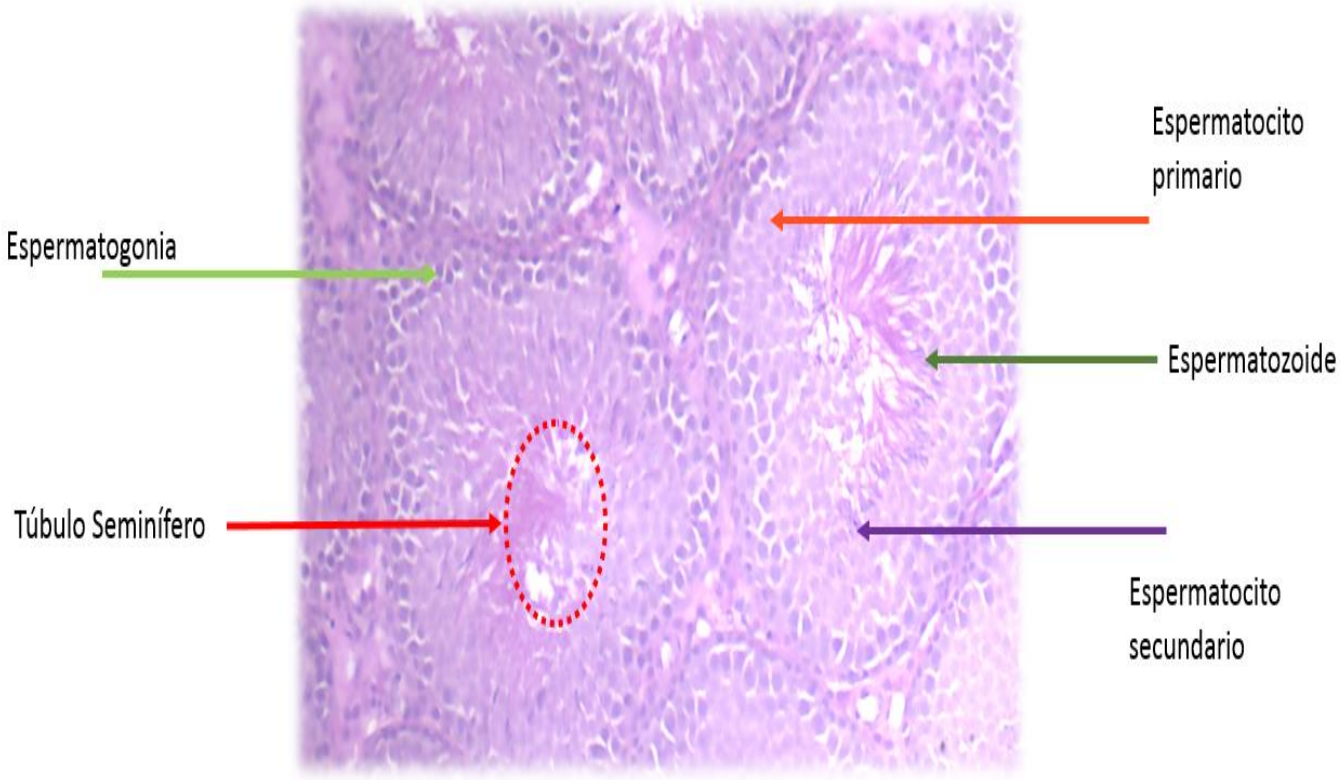


***Figura 10**: Identificación del proceso de espermatogénesis en Corte de testículo de rata macho Wistar Tinción Hematoxilina- Eosina, Laboratorio Neuroendocrinología.*

Se lleva a cabo la diferenciación de espermátidas a espermatozoides, por medio de una disminución del citoplasma en el espermatocito primario, posteriormente se ve alargando el núcleo del espermatocito secundaria, terminado este proceso este proceso se mantiene la información mitocondrial en el cuello del espermatozoide y se dirige a la luz del túbulo que servirá de transporte (Figura 10).

a) Espermatocito primario: Diferenciación de Espermatogonios durante el proceso mitótico para la trasformación a Espermatocitos secundarios (Figura 11).
b) Espermatocito secundario: Pasan por ciclos mitóticos generando espermatocitos primarios, los cuales duplican su DNA (equivalente a 46 cromosomas) durante el anafase del proceso los cromosomas homólogos se separan generando espermatocitos secundarios (con 23 cromosomas) Así por medio de meiosis se ve formada celularidad con la mitad de número de cromosomas (Figura 11).

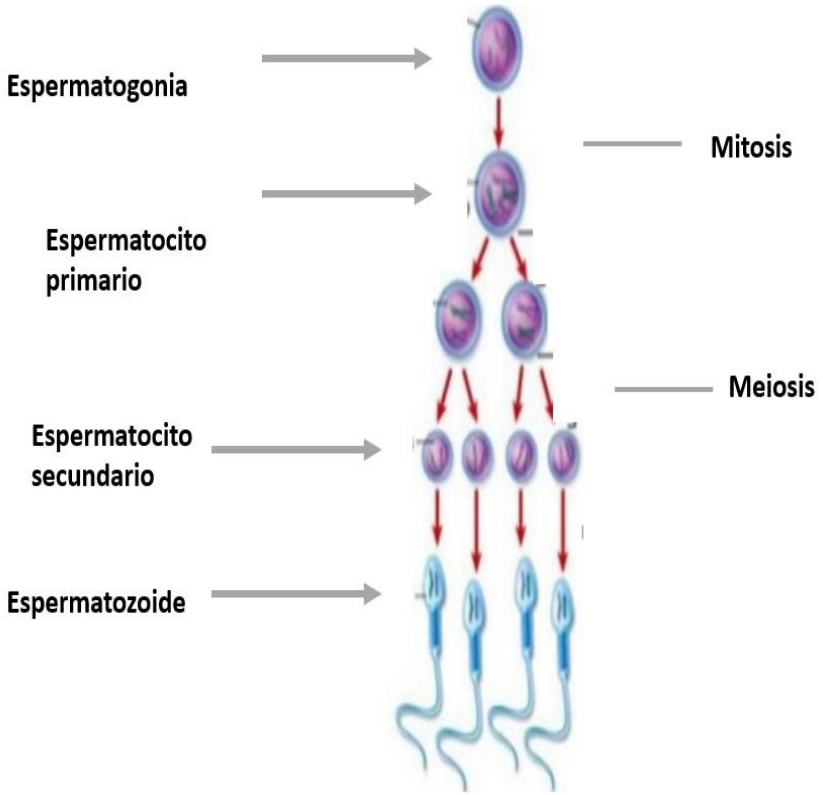


Figura 11*: Proceso de espermatogénesis, en el cual se identifican las espermatogonias, espermatocitos primarios, secundario generando espermatozoides, con una señalización de proceso mitótico y meióticos durante el proceso.*

1.9 Irrigación Testicular de rata

La vascularización se inicia en la capa albugínea la cual es una capa que cubre el testículo y al epidídimo, el cual se encuentra constituido por fibras de colágeno entrelazado el cual permite la formación del mediastino testicular cual desemboca numerosos vasos y red de conductillos eferentes denominada red de testis, estos acuden desde mediastino a la superficie, vinculados principalmente a la arteria testicular, arteria de conducto eferente y la arteria cresmatica.

El suministro de sangre que llega a los testículos se deriva principalmente de las arterias testiculares que son ramas de las arterias espermáticas internas. Después de atravesar una red capilar complicada, la sangre entra en múltiples venas testiculares que forman una red anatómica, el plexo planiforme. Los plexos janiformes se unen para formar las venas espermáticas internas. La vena espermática derecha drena directamente en la vena cava; la izquierda entra en la vena renal. (David G., Dolores S., 2013)

a) Arteria testicular: es la arteria principal, originada en un vaciamiento aórtico y que sigue al testículo en su migración. Se relaciona con el cruce de arteria lumbar, iliaca, peritoneal, inguinales, escrotales en el cordón espermático y ramas colaterales internas y ramas terminales (penetrando a los niveles variables del tejido)

b) Arteria de conducto eferente: procede de la arteria umbilical dando seguimiento al conducto deferente, permite la irrigación completa al epidídimo y extremidad inferior testicular.

c) Arteria cresmatica: rama de la arteria epigástrica inferir, permite la irrigación a las envolturas del cordón y bolsas escrotales, alcanzando la cola del epidídimo y permitiendo la vascularización uniendo a la arteria de conducto deferente.

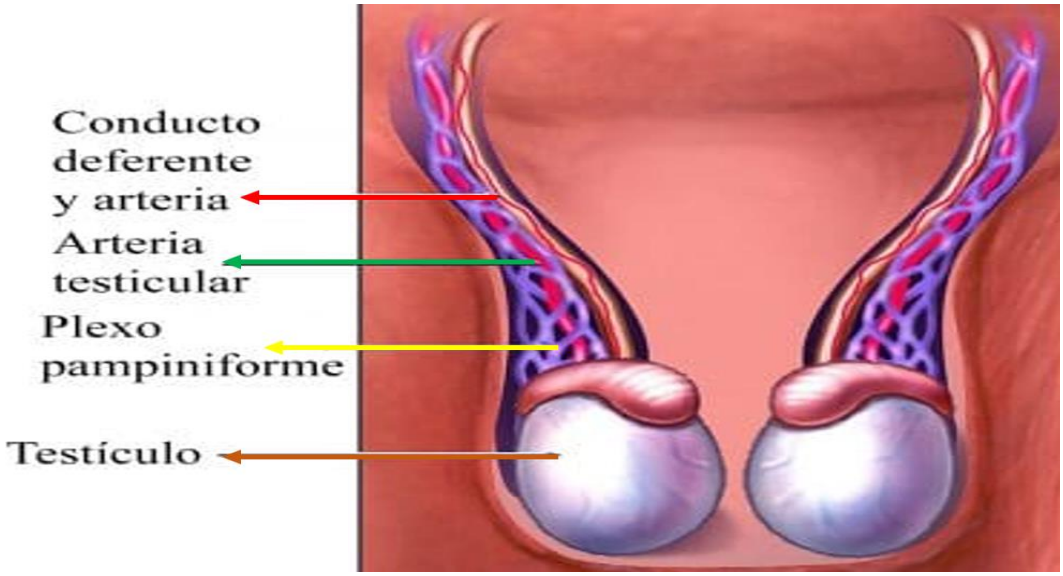


Figura 12.- *Representación del flujo sanguíneo de testículos sanos de rata, permitiendo realizar la localizando de plexo venoso, arteria testicular y conducto deferente. (Soder A. 2007)*

1.10 Inervación testicular de rata

El sistema nervioso autónomo es un conjunto de neuronas aferentes y eferentes que conectan al sistema nervioso central con efectores viscerales. La integración de las actividades del sistema nervioso autónomo ocurre a todos los niveles del eje cerebroespinal y la actividad eferente puede ser iniciada a partir de centros localizados en la médula espinal, tronco encefálico e hipotálamo (Höcht C. et al 2005)

Los nervios simpáticos tienen origen en la médula espinal entre los segmentos T-1 y L-2 y desde aquí se dirigen a la cadena simpática paravertebral y finalmente a los tejidos y órganos periféricos.

Las fibras simpáticas preganglionares abandonan el nervio espinal inmediatamente después de que éste salga por el agujero de conjunción y constituyen las ramas comunicantes blancas, mielinizadas, que se dirigen hacia la cadena simpática paravertebral.

Sistema nervioso parasimpático Las fibras nerviosas parasimpáticas tienen origen en el tronco encefálico, en los núcleos de los pares craneales III (oculomotor), VII (facial), IX (glosofaríngeo) y X (vago) y en la médula sacra: segundo y tercero nervios sacros, y a veces

también del primero y cuarto. (Guyton A. 2000). El suministro somático a los testículos y al escroto se origina en las raíces nerviosas Lumbares L1–L2 y S2–S4 a través de los nervios iliohipogástrico, ilioinguinal, genitofemoral y pudendo.

El nervio iliohipogástrico proporciona inervación sensorial a la piel por encima del pubis, a su vez actúa el nervio ilioinguinal inerva la piel del muslo interno, la base del pene y el escroto superior que permite al nervio genitofemoral dividirse en la rama genital y femoral después de pasar a través del músculo iliacus (Figura13).

La rama femoral proporciona inervación sensorial a un área pequeña de la piel en el interior del muslo y la rama genital viaja con el cordón espermático para proporcionar inervación al músculo enmascarado.

La inervación somática al escroto varía según la región escrotal específica. La superficie anterolateral es suministrada por la rama genital del nervio genitofemoral. La superficie anterior es suministrada por los nervios escrotales anteriores. La superficie posterior es suministrada por los nervios escrotales posteriores y la superficie inferior es suministrada por las ramas escrotales largas del nervio cutáneo femoral posterior (Patel Ap., 2017)

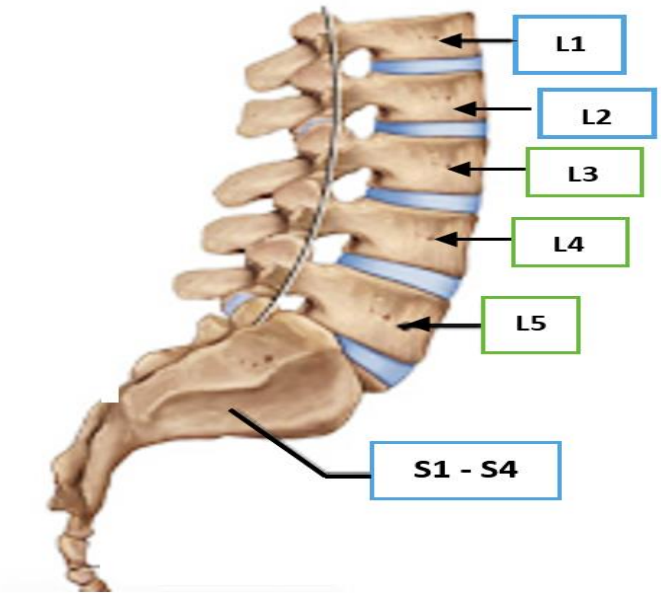


Figura 13.-*Rrepresentación de la inervación testicular, en las raíces nerviosas Lumbares L1–L2 y S2–S4 tomado de Sistema Nervioso Periférico: pelvis y miembros inferiores. (Tiznado G.,2018)*

Las neuronas sensoriales, que mandan información desde los tejidos del cuerpo y los órganos sensoriales hacia la médula espinal, de lo cual es responsable de procesar la información sensorial. Por medio de receptores sensibles a estímulos diferentes generan impulsos siguiendo patrones de analgesia o dolor.

La estimulación eléctrica de un nervio periférico es útil para generar los potenciales evocados somatosensoriales, mismos que se registran en la columna vertebral. La configuración y latencia de las respuestas dependen del nervio que se estimule.

Se ha documentado su existencia de fibras sensoriales en el corazón, pulmones, tracto respiratorio, testículos, sistema biliar, uréter y genitales. Teniendo un efecto sobre el ganglio de la raíz dorsal, células endocrinas. En el sistema nervioso periférico los receptores opioides se encuentran en las fibras sensoriales y simpáticas de la piel y articulaciones, en el plexo submucoso del intestino, la vejiga urinaria y en el deferente.

Los receptores TRPV1 que se expresan en las neuronas sensoriales y detectan el dolor y los estímulos térmicos. En la piel, los receptores TRPV1 están presentes en la fibra C sensoriales y en las fibras Ad.

La activación del canal nociceptivo TRP en las terminaciones de fibras nerviosas periféricas, al menos para TRPV1 y TRPA1, se ha relacionado directamente con la liberación de neuropéptidos, tales como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y neuroquinina o sustancia P (SP).

La elevación local de estos neuropéptidos conduce a vasodilatación y activación de una variedad de células inmunitarias, lo que resulta en la liberación de varios mediadores proinflamatorios, factores de crecimiento y péptidos bioactivos, así como condiciones de estrés oxidativo. La mayoría de estos mediadores activan receptores acoplados a proteínas G (GPCR) específicos y receptores de factores de crecimiento (GFRs) en los nervios sensoriales, dando lugar a la activación (o inhibición) de varias proteínquinasas y fosfatasas.

Estos efectores de transducción de señales celulares inducen modificaciones postraducción en múltiples canales nociceptivos, lo que conduce a un aumento en su activación resultando en un aumento en la excitación nociceptiva. Todos estos cambios culminan en la activación de los receptores TRPV1.

1.11 Receptores TRPV1 Receptor de Potencial Transitorio a Vanilloide Tipo 1

La familia TRP son canales catiónicos, no selectivos, permeables a calcio y poco sensibles al potencial de membrana. Son sensores celulares polimodales activados por estímulos físicos, mecánicos, químicos y ligandos endógenos y exógenos. Se encuentran diversos TRP, encontramos que el receptor TRPV1 anteriormente denomino receptor de potencial transitorio a vanilloide tipo 1.

Se encuentran diferentes resultados de que el receptor sensible a capsaicina se encuentra que el canal TRPV1 es un receptor polimodal que transduce estímulos físicos y químicos (Benarroch 2015).

Desde el punto de vista farmacológico, los más importantes son los receptores TRPV1 que se expresan en las neuronas sensoriales y detectan el dolor y los estímulos térmicos. En la piel, los receptores TRPV1 están presentes en la fibra C sensoriales y en las fibras Ad. y son ligandos para los Capsaicinoides, los resiniferanoides, los cannabinoides, los resiniferanoides y otros derivados de las plantas (Clapham et. al., 2002).

La sensibilización de TRPV1 puede deberse bien a activación directa de metabolitos que actúa potencializando los efectos de los canales iónicos. La activación directa ha sido documentada para los compuestos anandamida, N-araquidonoil-dopamina (NADA), N-oleoildopamina y el ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico (12-HPETE) que actúan como agonistas incrementando la entrada de calcio al citosol neuronal, aunado a él agonista capsaicina (Benarroch, 2015).

Estructuralmente, cada proteína de subunidad TRPV1 muestra un dominio de membrana compuesto por seis segmentos transmembrana (S1-S6), con una región anfipática entre el quinto y el sexto segmento que forma el poro conductor del canal. Esta región contiene ácidos glutámicos que intervienen en la activación del receptor dependiente del pH.

La proteína también tiene un N- citoplasmática y C-terminales (Figura 9). En el extremo N, los canales de TRPV1 exhiben tres dominios de anquirina que median interacciones proteína-proteína con proteínas citosólicas, y muestran secuencias de consenso para las proteínas quinasas.

La proteína muestra un dominio citosólico C-terminal que contiene fosfoinositido y dominios de unión a calmodulina (CAM), así como sitios de fosforilación. Además, el extremo C tiene un motivo similar a TRP que funciona como un dominio de asociación de subunidades receptoras. El pH ácido que se desarrolla en la zona inflamada también activa el receptor contribuyendo a incrementar más los niveles de Ca2+ intracelular y a despolarizar la membrana de los nociceptores. El Ca^{2+} a su vez ejerce de segundo mensajero activando rutas de señalización como la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa dependiente de calmodulina (CAMKII) que fosforilan al receptor alterando su funcionalidad.

La mayoría de estos agonistas reducen el umbral de activación térmica del receptor desde 42ºC a 35ºC, lo que se traduce en la activación del receptor a temperatura corporal produciendo hiperalgesia (Benarroch, 2015). En el caso de la capsaicina en la primera fase, hay excitación y activación del canal TRPV1, mientras que en la segunda fase produce analgesia por la depleción de transmisores pronociceptores, como la sustancia P.

Hay una sensación importante de dolor, prurito, quemazón y vasodilatación cutánea, después de la aplicación debido a la excitación y sensibilización de las fibras nociceptoras cutáneas C y A. Sin embargo, después de repetidas aplicaciones de capsaicina, hay una desensibilización persistente de los nociceptores (Galán et. al, 2015).

La activación de TRPV1 puede promover la supervivencia celular al modular varias vías de señalización celular (los receptores TRPV1 no solo afectan La biología celular a

través de la regulación de la señalización de calcio, que se ven implicados con los reguladores maestros del metabolismo celular , el desarrollo de las células madre , la sensibilidad al dolor y la supervivencia celular (Maiese, 2017).

Su patrón de distribución tisular es muy amplio, estando presentes en prácticamente todos los tejidos, especialmente en el sistema nervioso central y periférico. Son mediadores de una amplia variedad de funciones celulares como la iniciación del dolor, termorregulación, secreción salival, inflamación, tono de la musculatura lisa y homeostasis del calcio y magnesio. El hecho de que su función como canal iónico es potenciado por mediadores proinflamatorios liberados durante un daño tisular (Javdan et. al., 2018).

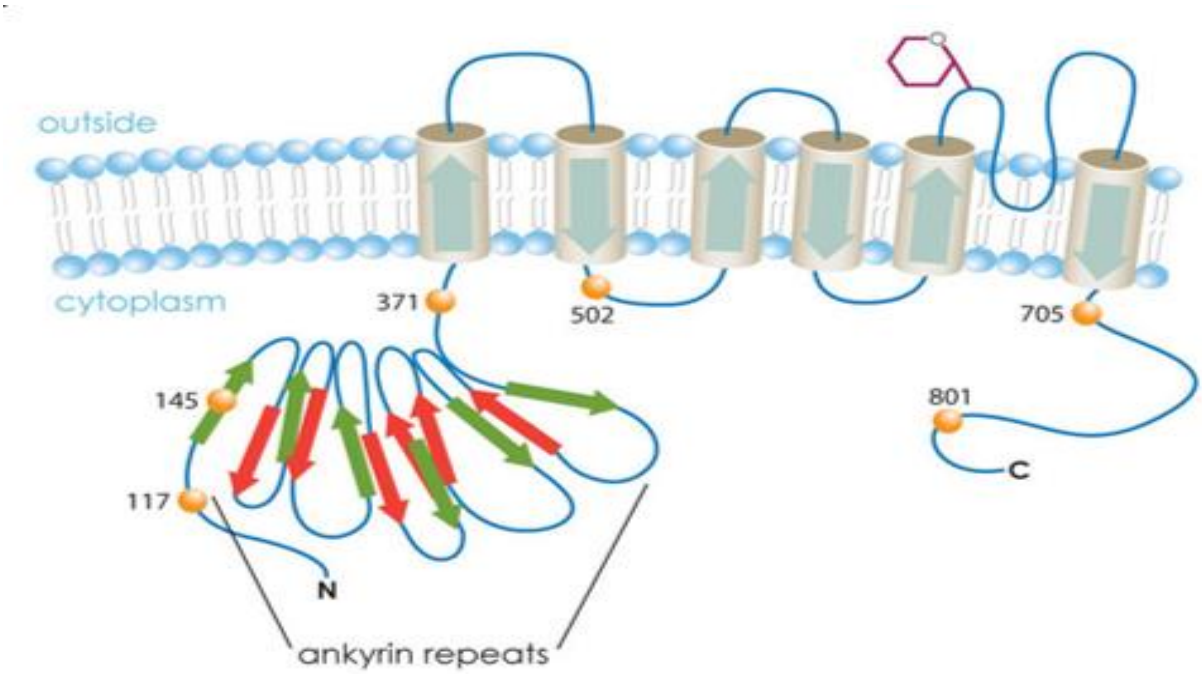


Figura 14: *Modelo representativo de la proteína TRPV1. Presenta 6 dominios transmembranales sensibles a la expresión de receptores única de canales de sodio voltaje dependientes (Renteria et al, 2018).*

1.12 Acción de TRPV1 en testículos

En los testículos la expresión de los receptores TRPV1 están presentes en las células germinales, en diferentes fases de la espermatogénesis encontrando que está ampliamente expresada dentro del túbulo seminífero esto se encuentra su participación en la regulación de la producción espermática (Renteria et al, 2018).

Debido a que el papel de los canales de TRPV1 durante la formación de los espermatozoides, lo cual se ve relacionado con la adquisición de la Capacidad de fertilización.

Bajo la estimulación de agentes agonistas como capsaicina se ve mejoría en el proceso de formación de espermatozoides y la expresión de TRPV1 en epidídimo el cual lleva a los espermatozoides de mamíferos a adquirir la Capacidad de fertilización. TRPV1 modulan la pubertad estimulados por la progesterona en testículos, permitiendo la modulación y regulación hormonal en el crecimiento gonadal y funcionalidad adecuada (Serra, 2007).

1.13 Capsaicina como herramienta farmacológica para estimular receptores TRPV1

La capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) es una oleorresina –inodora, incolora y parecida a la cera, componente químico de los pimientos picantes (Figura 15). (Fojo F. 2010) La capsaicina activa de forma selectiva TRPV1, presentando un canal de iones catiónicos permeable que se enriquece en los terminales de diversos nociceptores (La activación consecutiva es la disminución prolongada de la respuesta a estímulos nocivos.

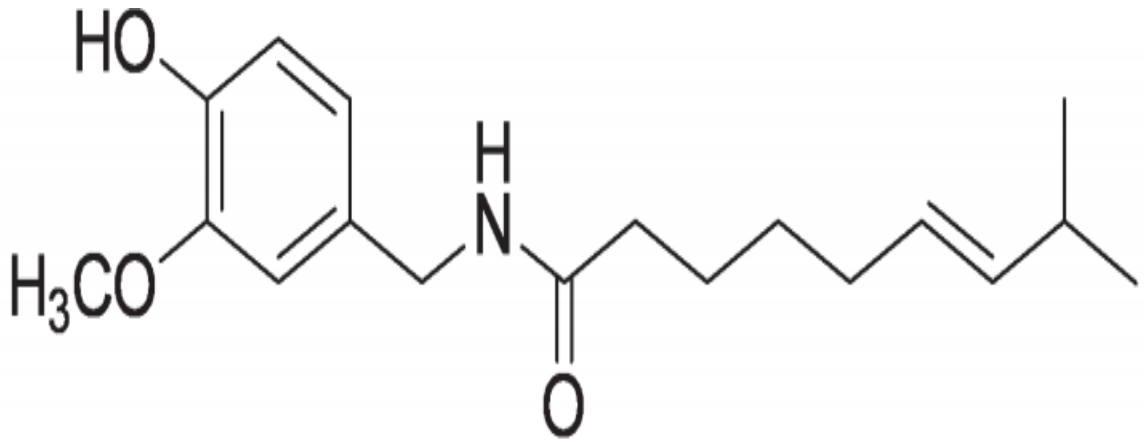
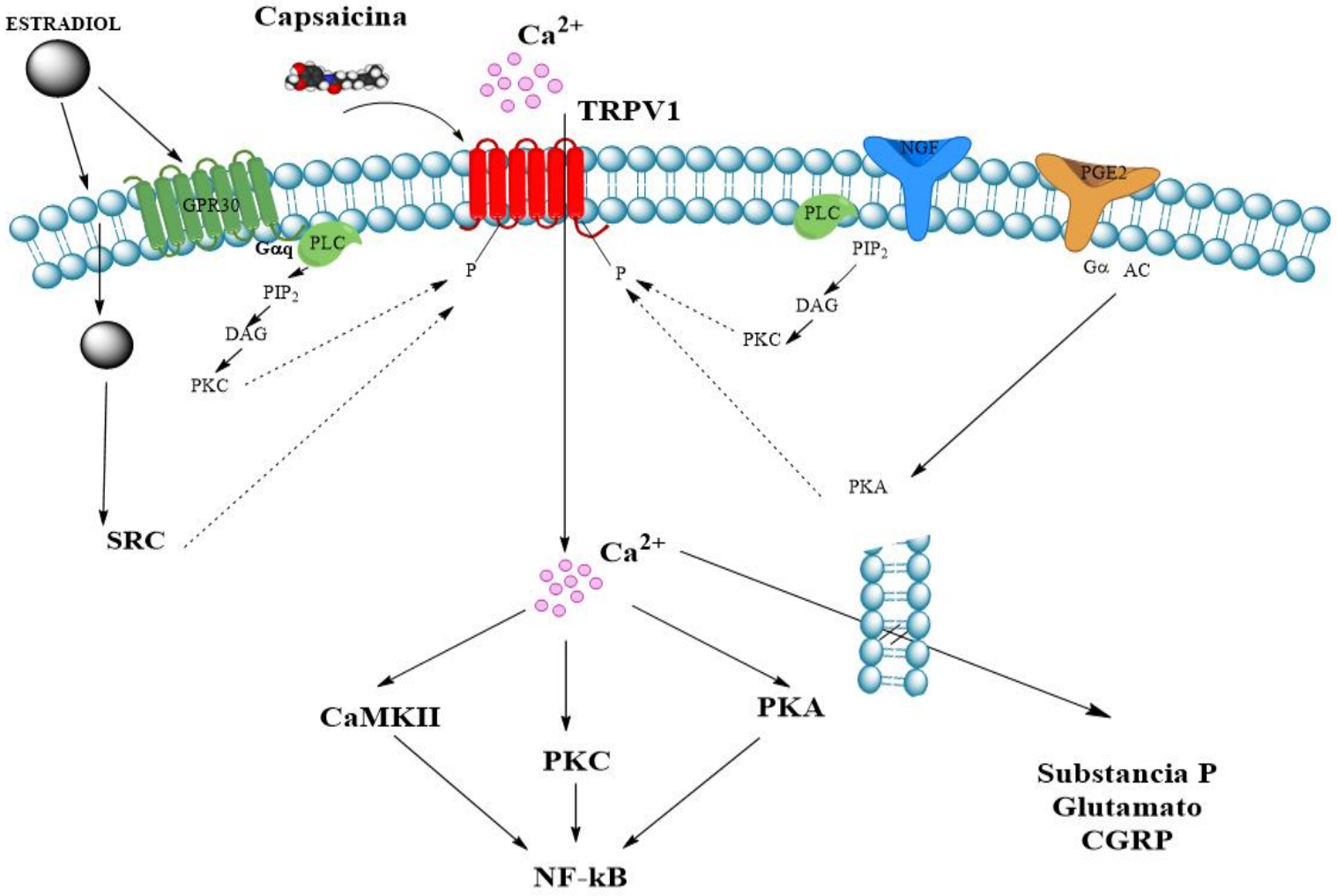


***Figura 15**: 8-metil-N-vanilil-6-nonenamida o Capsaicina presenta características neurotóxicas, al verse ligadas a TRPV1 se ve la capacidad de destrucción de fibras específicas de sistema nervioso periférico (Chung & Campbell 2016).*

Capsaicina presenta características neurotóxicas, al verse ligadas a TRPV1 se ve la Capacidad de destrucción de fibras específicas de sistema nervioso periférico (Chung & Campbell 2016). Al igual que sucede con otros receptores activados por ligando, la exposición prolongada de TRPV1 a su agonista capsaicina produce la desensibilización de este, siendo la magnitud de esta dependiente de la concentración del agonista, del tiempo de exposición y del Ca^{2+} extracelular (Cholewinski y col., 1993; Koplas y col., 1997).

Existen diferentes tipos de desensibilización. Cuando la aplicación del agonista se produce de manera prolongada se considera aguda y se caracteriza por una perdida rápida de la activación del receptor. En cambio, cuando se produce la administración repetida, se produce la denominada taquifilaxia, caracterizada por la disminución progresiva de la respuesta (Mohapatra y Nau, 2003).

La capsaicina tiene la Capacidad de activar y en altas dosis de bloquear fibras aferentes primarias C y A□, lo que implica un déficit sensorial de larga duración reducido a propiedades neurotóxicas en concentraciones elevadas, afectando el sistema nervioso periférico sensitivo (Figura 16) (Villoria M. 2007). Una estimulación constante de TRPV1 por medio del agonista capsaicina prevé una modificación de la Capacitación espermática, en la sección del epidídimo y testículo al encontrarse una expresión de TRPV1 en los conductos espermáticos (Renteria, et al, 2018).



Representación de mecanismo de interacción de TRPV1 con agonista especifico donde se incrementa Ca ++ afecta CaMKII, PKC y PKA que actúa sobre NF. kB generando un estímulo en la proliferación celular "Tomado de Luna F., Alatriste V., Martínez I., Limón D. departamento de farmacia FCQ BUAP en el libro

2. JUSTIFICACIÓN

El proceso de la maduración sexual es regulado por diferentes factores, como los hormonales y nerviosos. Entre los nerviosos destaca la participación de los receptores TRPV1, los cuales pueden modificar, en hembras, el inicio de la pubertad y el desarrollo ovárico. Alatriste, et al, 2013.

Sin embargo, la participación de los receptores TRPV1 en funciones del desarrollo sexual en machos es poco conocida. Por lo cual se ha decidido iniciar la investigación que presenta en este tejido y como afecta la proliferación celular.

En esta tesis, identificamos la localización de los receptores TRPV1 en estructuras y células de los testículos de ratas Wistar. Además de conocer el efecto de una administración crónica de capsaicina en la expresión de los receptores TRPV1 y desarrollo celular.

Los resultados obtenidos nos ayudarán a entender y conocer más acerca del desarrollo sexual masculino y el papel que podrían llegar a tener los receptores TRPV1 en este proceso.

3. HIPÓTESIS

La administración de Capsaicina a 1 nM y 10 nM a ratas machos Wistar promueve la proliferación celular en los testículos.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el papel de los receptores TRPV1 en el desarrollo testicular de ratas macho Wistar bajo la administración del agonista Capsaicina.

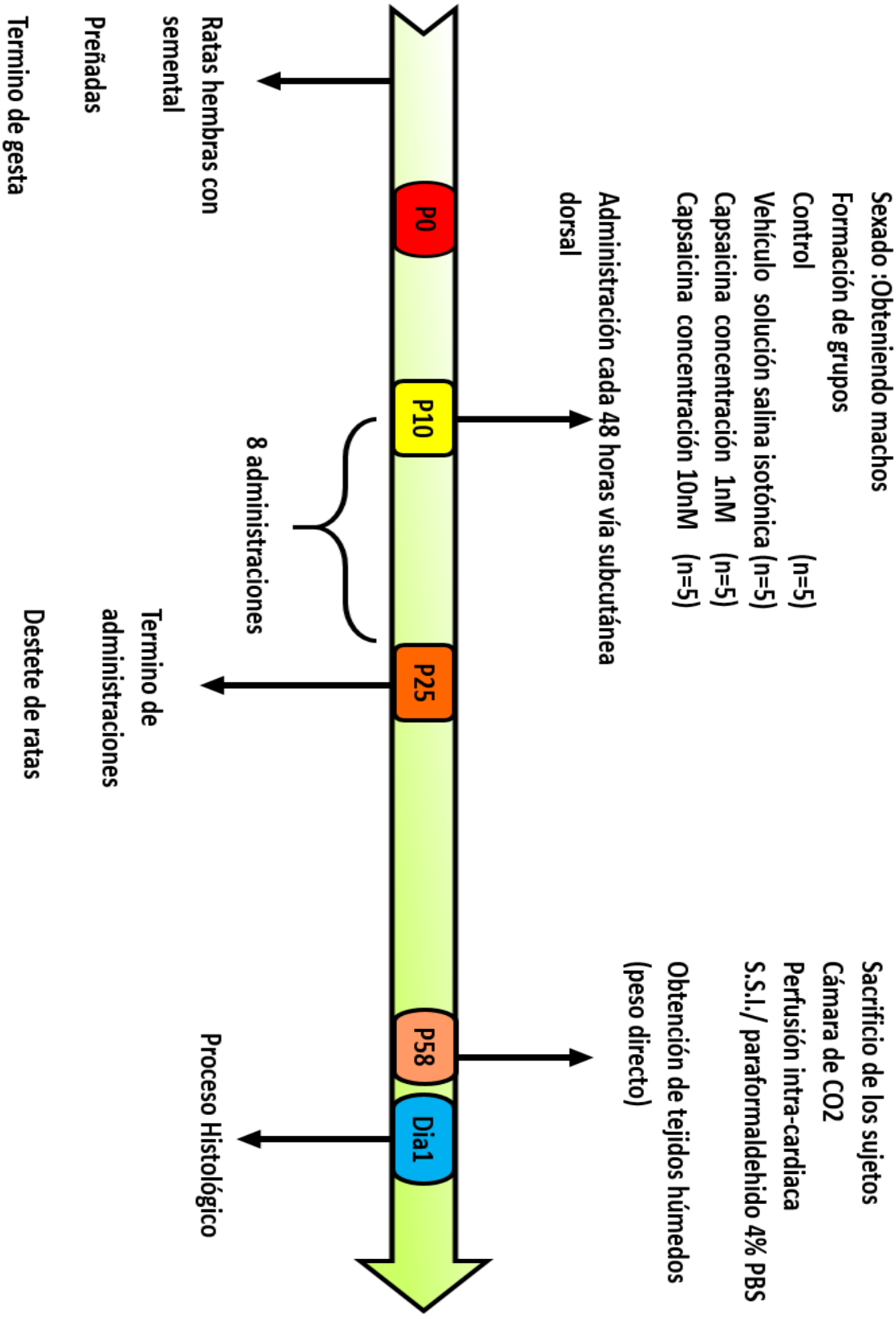
Objetivos particulares

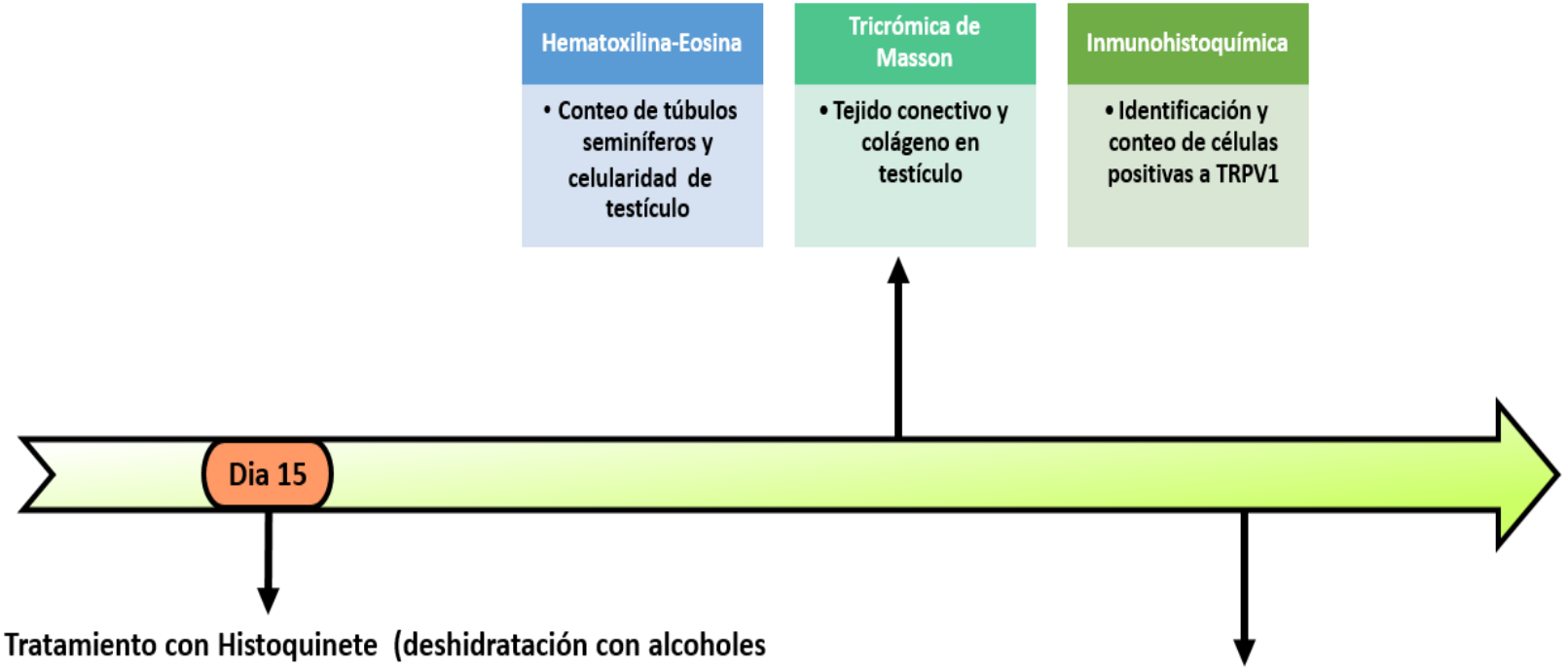
1. Identificar el efecto que provoca la administración de Capsaicina 1nM y/o 10 nM vía subcutánea al interactuar con TRPV1 en las células de testículos de rata Wistar.

2. Estudiar la morfometría de células de rata Wistar con la tinción de Hematoxilina – Eosina y Tricromica de Masson en ratas macho Wistar administradas con Capsaicina a 1nM y /o 10 nM.

3. Identificación de receptores TRPV1 por inmunohistoquímica en testículos de rata macho Wistar administradas con Capsaicina a 1nM y /o 10 nM.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO





Tratamiento con Histoquinete (deshidratación con alcoholes y aclaramiento con xilol e impregnación de parafina)

Inclusión en bloques de parafina (a menos de 60°C) en moldes para tejido.

Cortes histológicos a 5µm con uso de microtomo de traslación

Proceso estadístico de ANOVA seguida de la prueba U Mann-Whitney

6.-MATERIALES Y METODOS

Metodología

La relación teórico-practico de este proyecto se mantuvo bajo los procesos establecidos en NOM-062-ZOO-1999 y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), que establece que las especificaciones técnicas sobre producción , cuidado y uso de los animales de laboratorio además de la Capacitación por profesionales del bioterio "Claude Bernard" y certificado para el manejo y vías de administración en ratas de laboratorio.

Animales:

Rata Wistar

El manejo de animales de laboratorio se encuentra apegado a la norma (NOM-062-ZOO-1999), con la finalidad de asegurar que todo procedimiento realizado sobre los anímales de laboratorio con responsabilidades y cuidados durante su empleo.

Las ratas como sujeto de pruebas experimentales permiten. El uso de animales de laboratorio se encuentra como pieza indispensable para investigación dentro de un laboratorio, debido a las reacciones que este puede presentar frente a un estímulo, por lo cual esto puede ser utilizado en control y producción de fármacos.

Dentro de los procesos de investigación las ratas Wistar albinas pertenecientes a la especie norvergicus se ha demostrado gran accesibilidad al manejo, permite la demostración de efectos farmacológicos.

Rata macho

La rata macho Wistar es altamente estudiada en los cambios hormonales durante las diferentes etapas de vida; se realizan estudios de crecimiento celular en gametos sexuales, cerebrales y hormonales

Enfocado en la cepa de rata macho Wistar considerando los Requerimientos de:

- Temperatura 18-26 °C. Ideal 21°C.
- Cambios de aire: 15-20/he
- Ruido. No más de 85db

- Ciclos Luz obscuridad: 12/12
- Espacio.150cm2/200grs.
- Pubertad a las 6-8 semanas.
- Edad de madurez sexual: machos: 9-17 semanas.
- Promedio 7-11 crías por parto.
- Peso adulto: macho 300-500 grs.

(NOM-062-ZOO-1999)

Procedimiento

Se obtuvieron ratas hembras Wistar las cuales fueron colocadas con ratas macho semental, a las cuales se les dio un seguimiento a que se encuentren preñadas, una vez preñadas se retira la rata macho semental y se observa diariamente la evolución de crecimiento prenatal identificando así la fecha de nacimiento de los sujetos.

Al momento del nacimiento se hace un conteo probable de sujetos totales. Se realizan observaciones diarias del estado visible de las ratas. Se observo el crecimiento y sobrevivencia, aceptación o rechazo de las crías.

Llegado el P10 se realiza el sexado de las crías, posterior a la selección de los sujetos machos se forman grupos de trabajo donde cada grupo presenta una n=5. Estos grupos se conforman por Control; son sujetos a los cuales no son administrados nos permitirán evaluar las condiciones promedio sin ningún agente, Vehículo los cuales permitirán descartar que los efectos obtenidos sean producidos por el vehículo S.S.I., a sujetos administrados a concentración 1nM y10nM se realizara una administración.

Dentro de este proceso los sujetos fueron divididos en grupos de trabajo cada uno de los grupos con un n =5 permitiendo así su manejo especifico en numeración, administración y estadística.

Administración de Capsaicina

La administración de vehículo S.S.I. fue administrada mediante vía sub- cutánea dorsal. La administración de Capsaicina a concentraciones 1nM y 10 nM disuelta en el vehículo (solución salina isotónica), administradas respectivamente en sus grupos de trabajó mediante vía subcutánea dorsal. Estas administraciones fueron realizadas en alternando los días de administración cada 48 horas.

Eutanasia y obtención los tejidos

Las ratas fueron colocadas en cámara de CO_2 con una posterior perfusión cardiaca aplicando solución salina isotónica, con conservación de todos los tejidos mediante paraformaldehido posterior a esto se realizó la obtención de testículos con información de peso húmedo.

Tratamiento de los tejidos y análisis

Una vez procesados los tejidos se colocaron individualmente en parafina liquida orientados en la misma dirección, para obtener "bloques" con los cuales se obtuvieron cortes histológicos de 5 µm de espesor de los cuales se realizaron tinciones de Hematoxilina-Eosina, Tricromica de Masson y la técnica inmunohistoquímica. Estas tinciones y técnicas permitieron realizar el conteo de túbulos de la zona media por testículo, calcular el número de espermatogonias, células positivas a TRPV1.

Este proceso se realizando el contando el número total de tubulos de la zona media de testículo por sujeto, con laminillas de diferentes cortes teñidos bajo el proceso de H&E

De los tubulos en la zona media fueron tomados 10 tubulos de manera aleatoria de cada sujeto realizando las mediciones dentro de los tubulos se realización 15 medidas internas de los diferentes cortes teñidos con H&E con el software Motic Images plus 3.0.

Se realizaron conteo de tejido conectivo, de las cuales fueron seleccionadas 20 secciones de este tejido, con uso de tinción Tricromica de Masson con uso del software Motic Images plus 3.0.

De la zona media fueron seleccionados 20 tubulos aleatorios por sujeto se realizó el conteo de las espermatogonias haciendo uso de la herramienta “cell counter” en el software NIH ImageJ.

Tinción hematoxilina – eosina

1.- Fijar tejido en formol al 4%.
2.-Deshidratación, aclaramiento e infiltración (uso de histokinet).
3.-Inclusión de tejidos en parafina.
4.-Cortés de 5 micras de espesor.
5.-Desparafinado y rehidratación de los tejidos.

Xilol 1	10 min
Xilol 2	3 min
Alcohol-Xilol	1 min
Alcohol Absoluto	1 min
Alcohol Absoluto	1 min
Alcohol 96°	1 min
Alcohol 96°	1 min
Agua destilada	5 lavados

Observación morfológica de los tejidos:

Donde la hematoxilina, que por ser catiónica o de carga positiva tiñe estructuras ácidas en tonos azul eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa.

Tricromica de Masson

1.- Fijar tejido en formol al 4%.

2.-Deshidratación, aclaramiento e infiltración (uso de histokinet).

3.-Inclusión de tejidos en parafina.

4.-Cortés de 5 micras de espesor.

5.- Desparafinar e hidratar hasta llegar al agua destilada

- Xilol 1 10 min
- Xilol 2 3 min
- Alcohol-Xilol 1 min
- Alcohol Absoluto 1 min
- Alcohol Absoluto 1 min
- Alcohol 96° 1 min
- Alcohol 96° 1 min
- Agua destilada 5 lavados

Si las secciones fueron fijadas con formalina, tratar con la solución de Bouin por 1 h a 56ºC o durante toda la noche a temperatura ambiente.

6.- Dejar enfriar durante 10 min
7.- Agua corriente 5 lavados
8.- Agua destilada 5 lavados
9.- Hematoxilina de Hierro de Weigert 10 min
10.- Agua corriente 5 lavados
11.- Agua destilada 5 lavados
12.- Fucsina acida-escarlata de Biebrich 15 min 18min
13.- Agua destilada
14.- Acido fosfotúngtico-fosfomolíbdico 10-15 min 20-25min
Observar que el colágeno no se torne rojo de ser así repetir 10
15.- Verde brillante 1 min
16.- Agua destilada 5 lavados
17.- Acido fosfotúngstico 5% 15 min 18min
18.- Alcohol 96° 2 min
19.- Alcohol 96° 2 min
20.- Alcohol Absoluto 2 min
21.- Alcohol Absoluto 2 min Secar y montar
22.- Xilol 2 3 min
23.- Xilol 1 3 min
24.-Montar con medio resinoso.

RESULTADOS
Núcleos……negro
Musculo, citoplasma, queratina……rojo
Colágeno……...verde

Técnica Inmunohistoquímica.

1.- Fijar tejido en formol al 4%.

2.-Deshidratación, aclaramiento e infiltración (usando el histokinet).

3.-Inclusión de tejidos en parafina.

4.-Cortés de 5 micras de espesor.

5.-Desparafinado y rehidratación de los tejidos.

Xilol 1	10 min
Xilol 2	10 min
Alcohol-Xilol	10 min
Alcohol Absoluto	10min
Alcohol Absoluto	3 min
Alcohol 96°	10 min
Alcohol 70°	10 min
Agua destilada	3 minutos

6.-Enjuague con buffer de fosfatos, PH 7.4 (PBS) por 5 minutos.

7.-Recuperación antigénica:

*Colocar 50 ML de buffer de citratos (amortiguador de citratos 10 Mm, pH 6).

•A. Solución stock ácida (0.1 M de ácido cítrico).

•B. Solución stock básica (0.1 M de citrato de sodio).

Solución de trabajo.

9 milímetros de solución A, 41ml de solución B, llevar a 500 ML con agua desionizada se almacena en refrigeración a 2 - 8 °C.

Dejar enfriar a temperatura ambiente o sumergido en agua fría (tiempo aproximado de enfriamiento 5 minutos).

8.-Permeabilizar los cortes con PBS - Tritón - 100x (PBS-T) al 2% por 10 minutos

9.-Bloquear el marcaje inespecífico con albúmina bovina libre de IgG 0.5% en PBS - T:

-secar las laminillas; en especial alrededor del corte.

-marcar con plumón hidrofóbico alrededor de la muestra.

- colocar dentro de la cámara húmeda.

-colocar 150 microlitros de albúmina cada corte, cubriendo la muestra hasta los bordes internos del marcador.

-dejar 20 - 30 minutos en la cámara húmeda cerrada a temperatura ambiente.

10.-Lavar dos veces en PBS - t por 5 minutos.

11.-Incubar el tejido con el anticuerpo primario diluido en PBS – T (a la concentración requerida de acuerdo al tejido) toda la noche en cámara húmeda cerrada a 4 °C.

-cubrir correctamente el tejido.

-incubar en la cámara húmeda cerrada a 4 °C o dos horas a temperatura ambiente.

12.-Lavar tres veces en PBS-T por 5 minutos.

13.-Incubar con el anticuerpo secundario (marcado con el fluorocromo), diluido en PBS-T por una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y protegido de la luz.

14.-Lavar tres veces por 5 minutos con PBS-T.

15.-Lavar una vez por 3 minutos con PBS-T.

16.-Teñir núcleos con yoduro de propidió (IP) por 3 minutos.

-stock de IP 10 mg/ml de agua destilada.

-solución de trabajo: diluir 1:1000 stock de IP en PBS.

17.-Lavar dos veces por 5 minutos con PBS agitando suavemente.

18.-Lavar dos veces por 5 minutos con agua bidestilada.

19.-Lavar una vez por 5 minutos con PBS-T.

20.-Montar los portaobjetos con vectashield /sustituido en el proyecto por glicerol

21.- Observar al microscopio de fluorescencia.

Proceso estadístico

Proceso estadístico de resultados usando la prueba de ANOVA seguida de la prueba de U Mann-Whitney para los pesos de tejido húmedo, conteo de túbulos y celularidad positiva en la identificación de TRPV1. Serán considerados diferentes cuando la probabilidad entre ellos sea menos al 5%.

7. RESULTADOS

Peso corporal de los sujetos al P58 (fecha de sacrificio de los sujetos)

El peso corporal de los animales al P58 que fue la fecha en la que se realizó el sacrificio de los sujetos, fue para el grupo control de 141.6±4.60 g, para el grupo vehículo de 145.0± 3.53g, incrementado en Cap. 1nM y Cap. 10 nM en relación con el control y el vehículo (182.6±6.87*y 180.6. ± 3.71*, respectivamente). *< p 0.05, prueba ANOVA postU-Mann-Whitney (figura17)

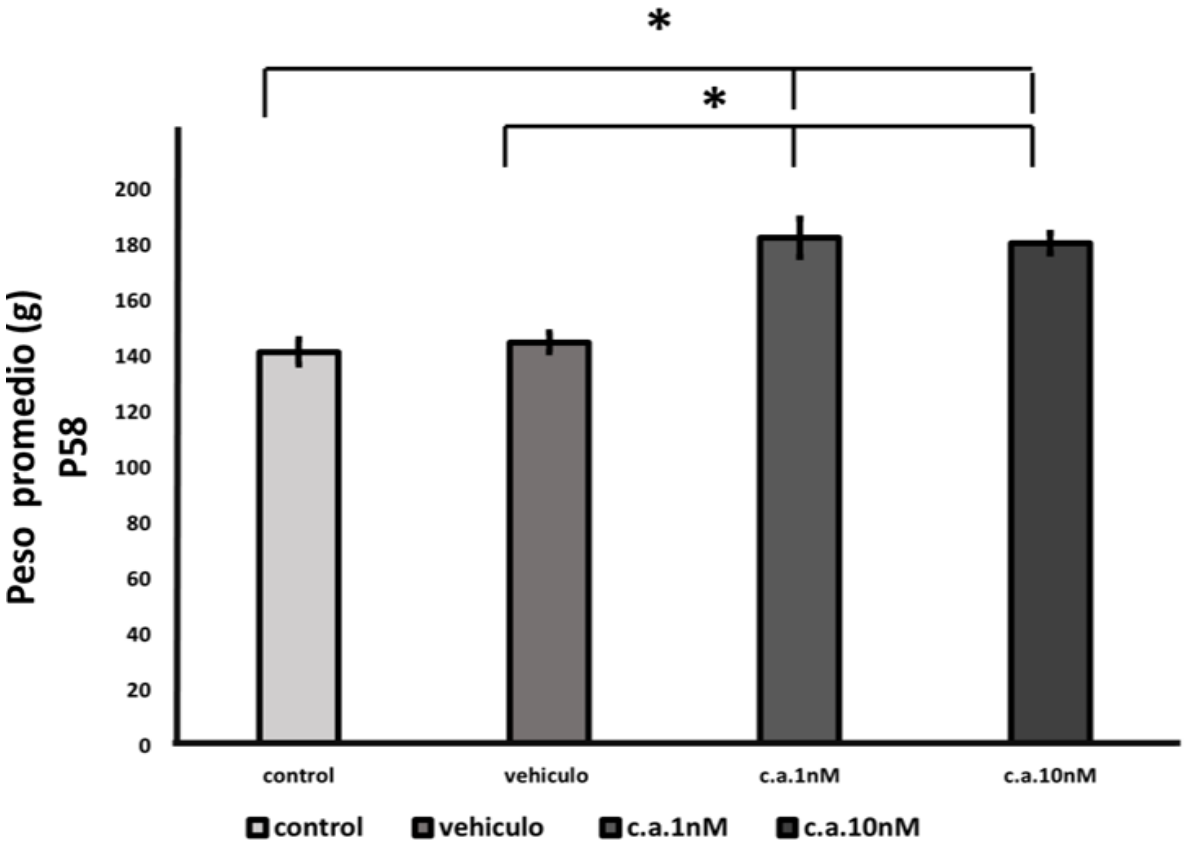


Figura 17: *Peso vivo de la rata macho Wistar en P58 de los grupos control, vehículo, c.a.1nM y c.a. 10nM Las barras representan el promedio ± EEM *< p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.*

Conteo de las espermatogonias dentro de los tubulos de ratas administrados con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM

Número de espermatogonias localizadas en el interior de tubulos seminíferos fue para el grupo control de 72.19 ±0.0595, para el grupo vehículo de 71.68 ±0.3904, incrementado en Cap. 1nM y Cap. 10 nM en relación con el control y el vehículo (84.73±0531* y 77.29±0.657*, respectivamente). *< p 0.05, prueba ANOVA postU-Mann-Whitney. (Figura 18)

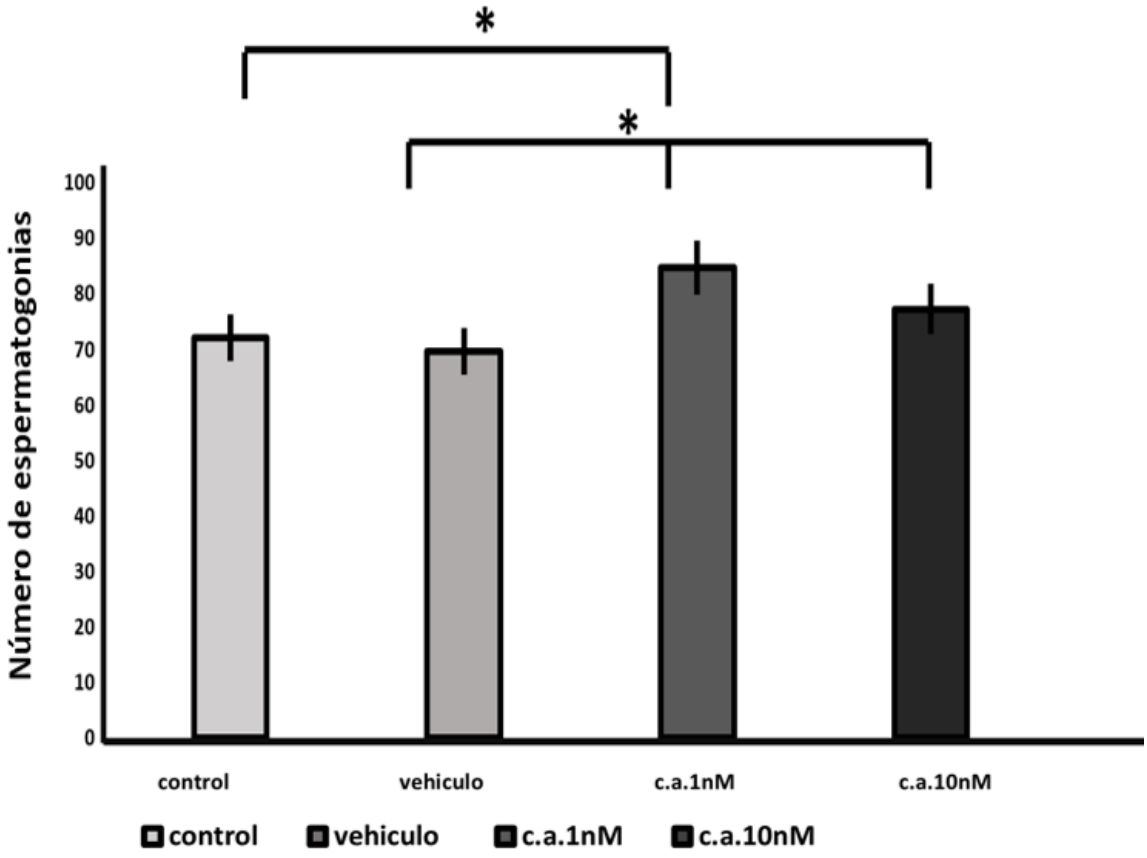


Figura 18: *Conteo de espermatogonias de los grupos control, vehículo, c.a.1nM y c.a. 10nM Las barras representan el promedio± EEM *< p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.*

Conteo de túbulos en los cortes de sección media testículos de ratas administrados con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM

El conteo de túbulos en los cortes de sección media testículos de ratas, fue para el grupo control de 733.8±0.477, para el grupo vehículo de 734.8±1.935, incrementado en Cap. 1nM y Cap. 10 nM en relación con el control y el vehículo (993.4±0.901y 916.4±0.807*, respectivamente). *< p 0.05, prueba ANOVA postU-Mann-Whitney (Figura 19)

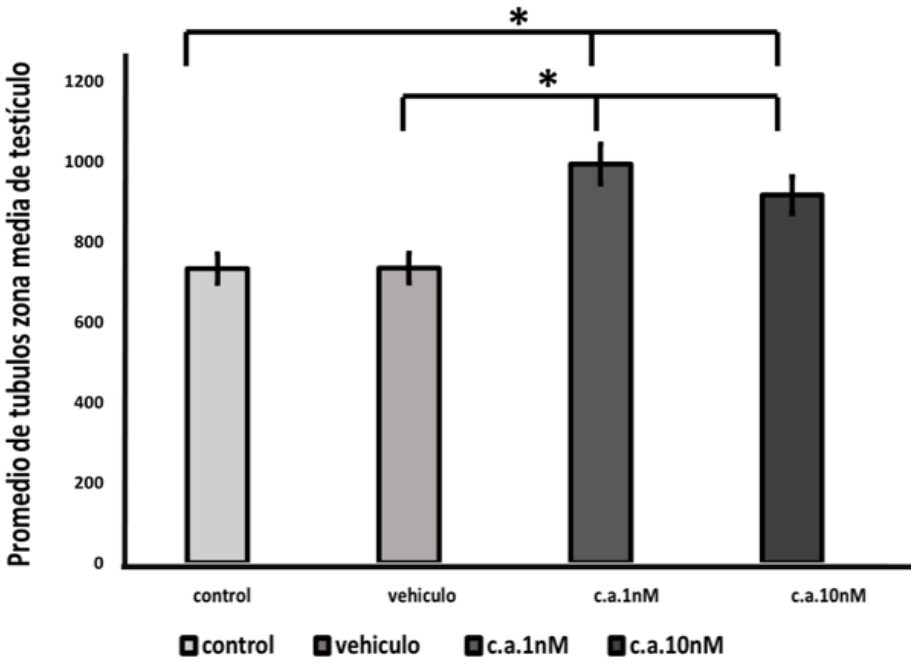


Figura 19. *Conteo de túbulos de la zona media por testículo bajo el objetivo 4 x de los grupos control, vehículo, c.a.1nM y c.a. 10nM Las barras representan el promedio± EEM *< p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.*

Análisis comparativo de medida interna de los túbulos de ratas administrados con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM

La medida interna de los tubulos considerada entre la lámina basal y la luz del túbulo seminífero, se obtuvo como resultado, para el grupo control de 111.658± 2.066µm, para el grupo vehículo de 117.241±3.934µm, para el grupo Cap10 nM 110.546 ± 2.806, incrementado en Cap. 1nM en relación con el control y el vehículo (89.663 ± 1.28. *< p 0.05, prueba ANOVA postU-Mann-Whitney (Figura 20)

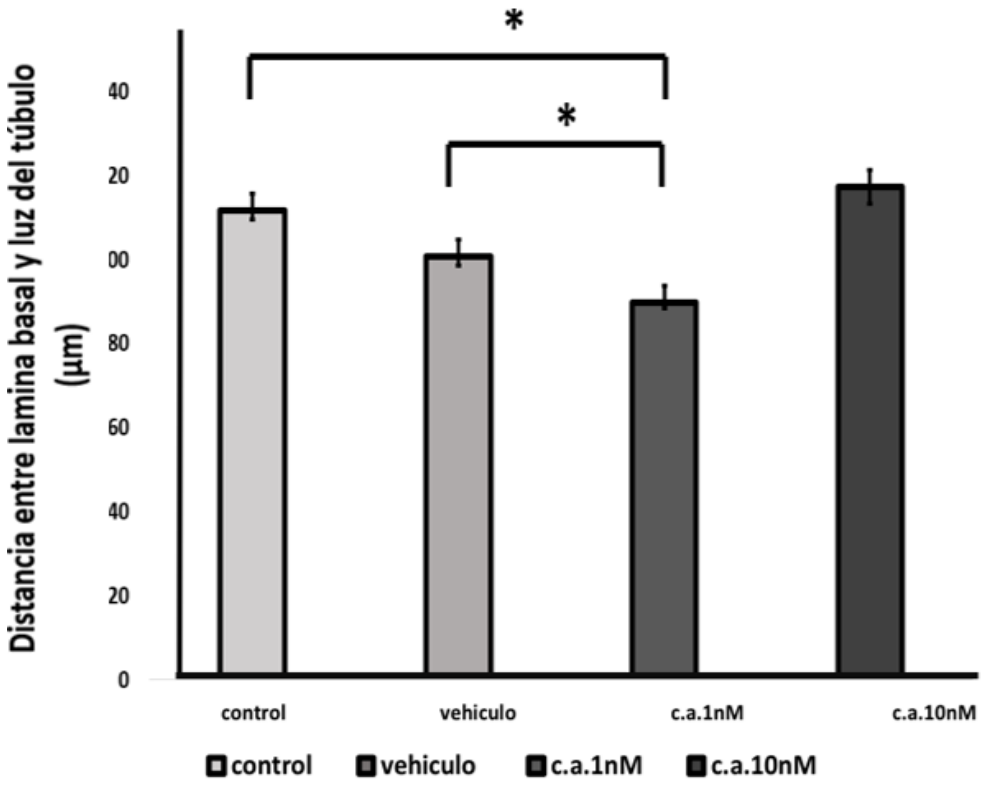


Figura 20. *Mediciones internas en los tubulos de los grupos control, vehículo, c.a.1nM y c.a. 10nM Las barras representan el promedio± EEM *< p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.*

Análisis morfométrico de testículos de ratas administrados con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM

El análisis morfométrico se tomaron fotografías a 4x y 10 x que permitieron realizar el conteo de túbulos seminíferos descritos en la metodología, mostrando a continuación el panel de fotografías en los diferentes grupos control, vehículo, 1nMy 10 nM.

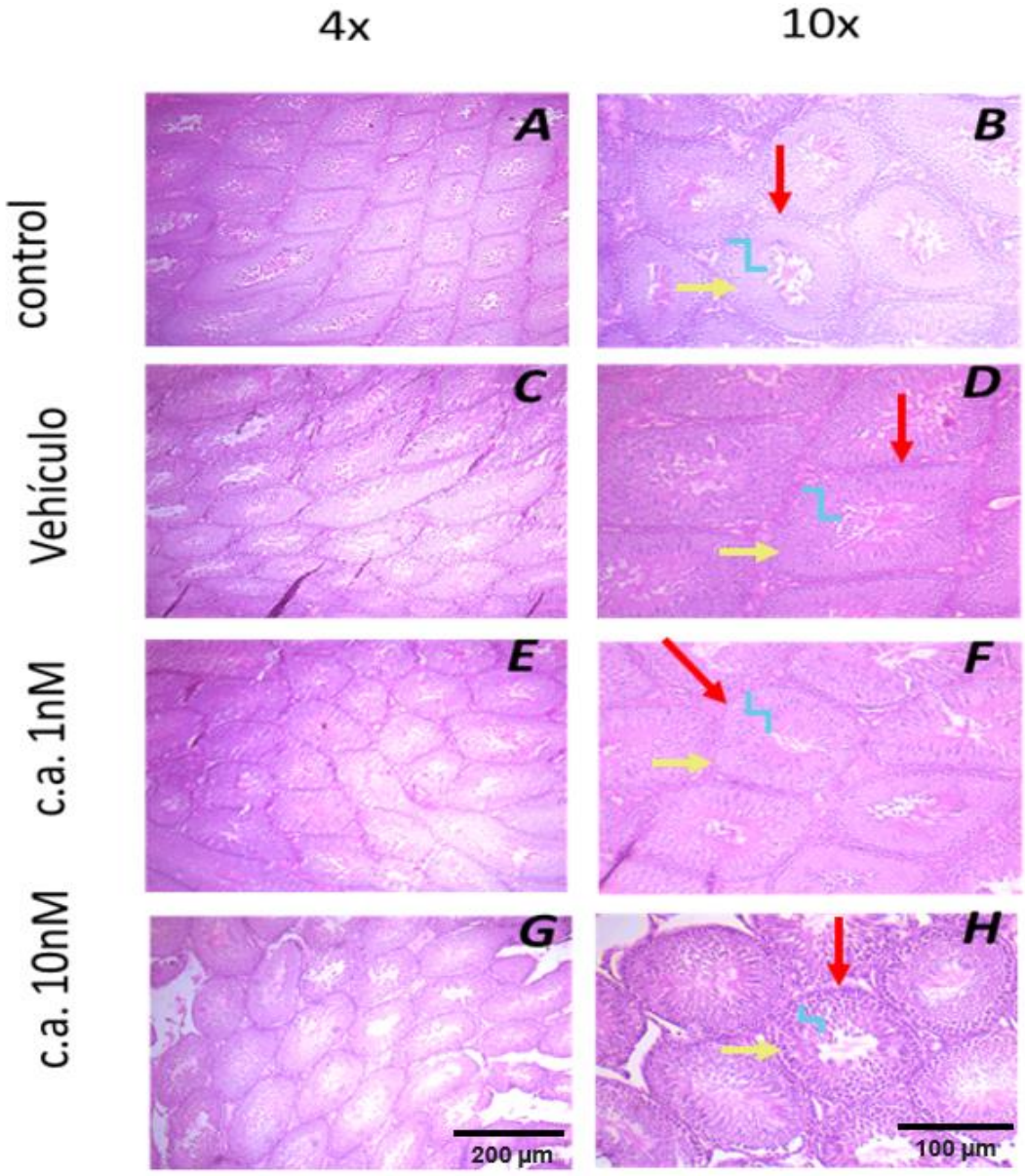


Figura 21: *Cortes histológicos de testículo de rata Wistar (Tinción Hematoxilina-Eosina). En A y B Grupo Control, C y D Grupo Vehículo, E y F Grupo administrado con capsaicina a concentración 1nM., G y H Grupo administrado con capsaicina a concentración 10nM. Mostrando en las imágenes obtenidas bajo el objetivo 10 x (B, D, F y H) flechas rojas: mostrando los tubulos seminíferos, flechas amarillas espermatogonia dentro del túbulo, señalamiento azul distancia existente ente la lámina basal y la luz dl túbulo seminífero. Laboratorio Neuroendocrinología***.**

Medidas de tejido conectivo en testículos de ratas macho Wistar administrados con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM

Entre los grupos control y vehículo de las medidas de del tejido conectivo que existe entre los tubulos seminíferos se realizaron mediciones de las cuales se obtuvieron que para el grupo control de 78.4333±0.1961 µm, para el grupo vehículo de 77.8743±0.2127 µm, incrementado en Cap. 1nM y Cap. 10 nM en relación con el control y el vehículo (81.6679±0.2436 µm*y 95.3182±0.5482 µm*, respectivamente). *< p 0.05, prueba ANOVA postU-Mann-Whitney (Figura 22)

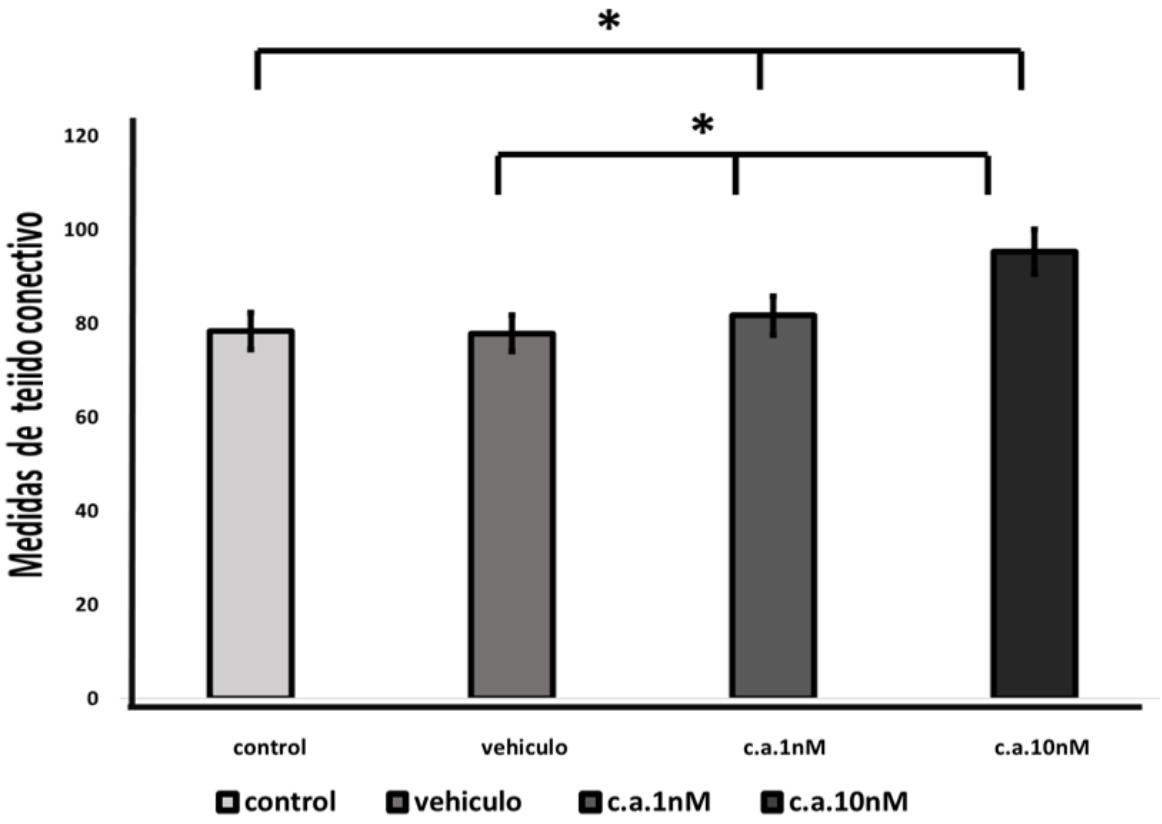


Figura 22. *Mediciones del tejido conectivo realizadas en objetivo 10x de los grupos control, vehículo, c.a.1nM y c.a. 10nM Las barras representan el promedio± EEM *< p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.*

Medidas de fibras musculares testículos de ratas administrados con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM

El análisis morfométrico se tomaron fotografías a 4x y 10 x que permitieron realizar las mediciones de tejido conectivo entre los tubulos en la zona media de testículo, descritos en la metodología, mostrando a continuación el panel de fotografías en los diferentes grupos control, vehículo, 1nMy 10 nM.

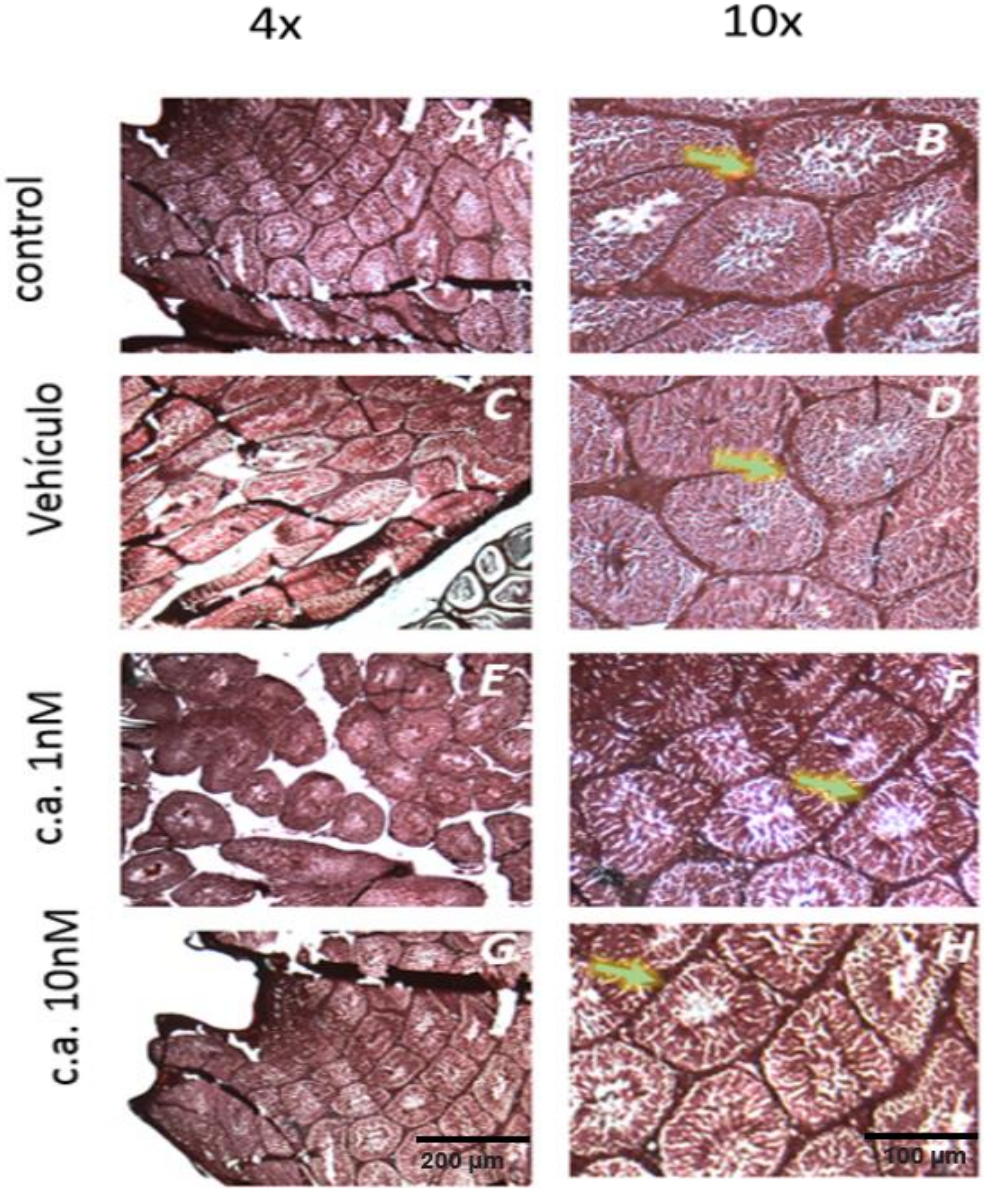


Figura 23: *Cortes histológicos de testículo de rata Wistar con la Tinción Tricromica de Masson. En A y B Grupo Control y D Grupo Vehículo, E y F Grupo administrado con capsaicina a concentración 1nM., G y H Grupo administrado con capsaicina a concentración 10nM. Mostrando con flechas en las imágenes tomadas bajo el objetivo 10 x (B, D, F, H) se muestra localizado tejido conectivo el cual fue medido con el software Motic Images plus 3.0. del Laboratorio Neuroendocrinología.*

Análisis de células positivas a TRPV1 de testículos de ratas administrados con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM

Fotografías en la sección media de testículo en cortes de 5µm de espesor con las cuales se realizó el conteo de células positivas a TRPV1 localizados principalmente en las células de Sertoli y en espermatozoides, mostrando a continuación el panel de fotografías en los diferentes grupos control, vehículo, 1nMy 10 nM.

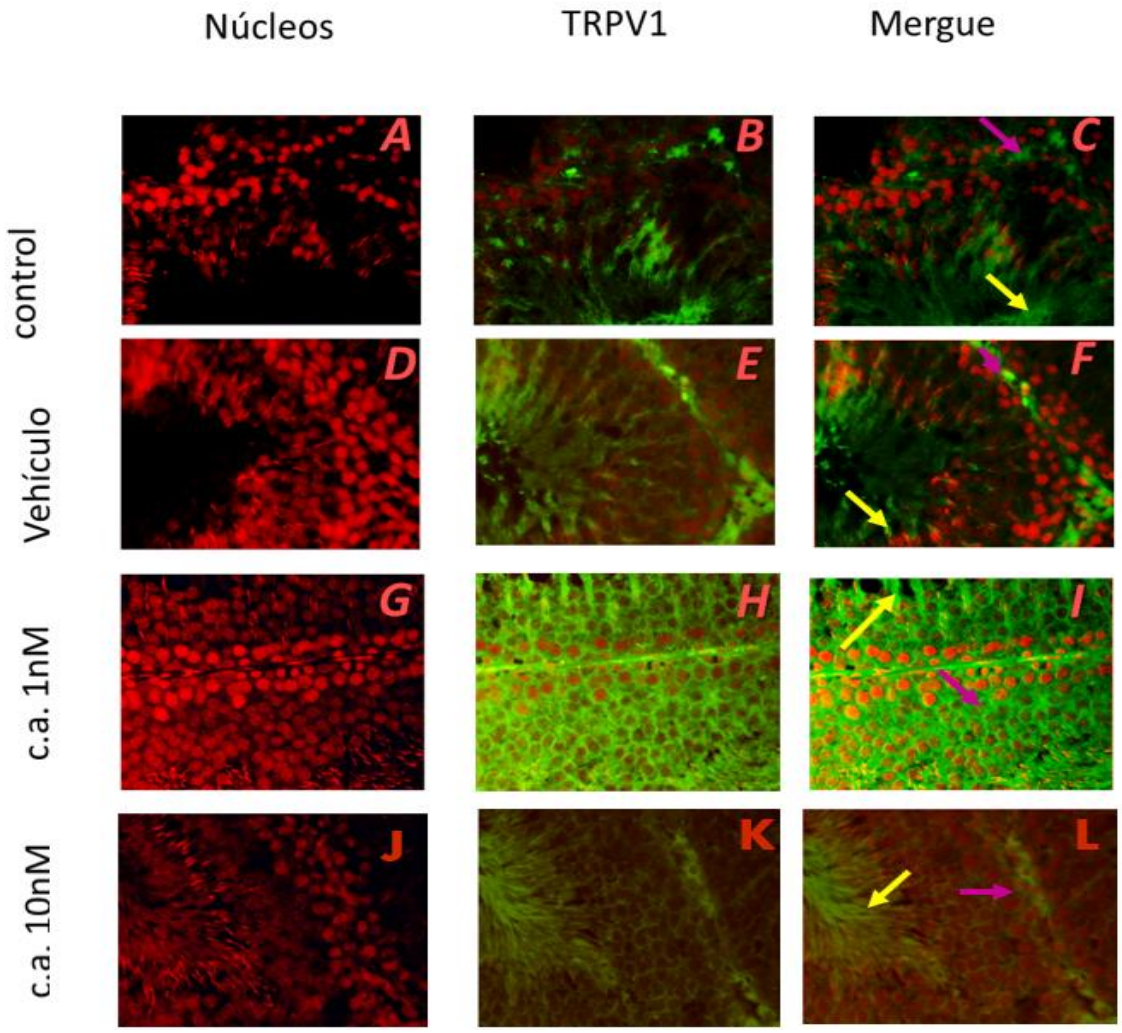


Figura 24*: Inmunohistoquímica de los receptores TRPV1 en células de testículo de rata macho Wistar de los grupos Control, Vehículo, administrados c.a.1nM, c.a.10nM.En la primera columna ((A, D, G y J) muestran los núcleos fueron marcados con ioduro de propidio (rojo). La segunda columna (B, E, H y K) los receptores TRPV1 marcados con FITC (verde) y en la tercera columna se presenta el merge (colocalización) (C, F, I y L)* Las flechas amarillas indican cuales son las células positivas a TRPV1.Obervando con las flechas moradas las espermatogonias primarias y con las flechas amarillas los espermatozoides.

Conteo de células positivas a TRPV1 en testículos de ratas macho Wistar administrados con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM.

En el conteo de células positivas a TRPV1, para el grupo control de 67.46±3.90, para el grupo vehículo de 74.67 ±1.87, incrementado en Cap. 1nM y Cap. 10 nM en relación con el control y el vehículo (135.28±6.567*, y 101.08±5.5534* respectivamente). *< p 0.05, prueba ANOVA postU-Mann-Whitney (Figura 25)

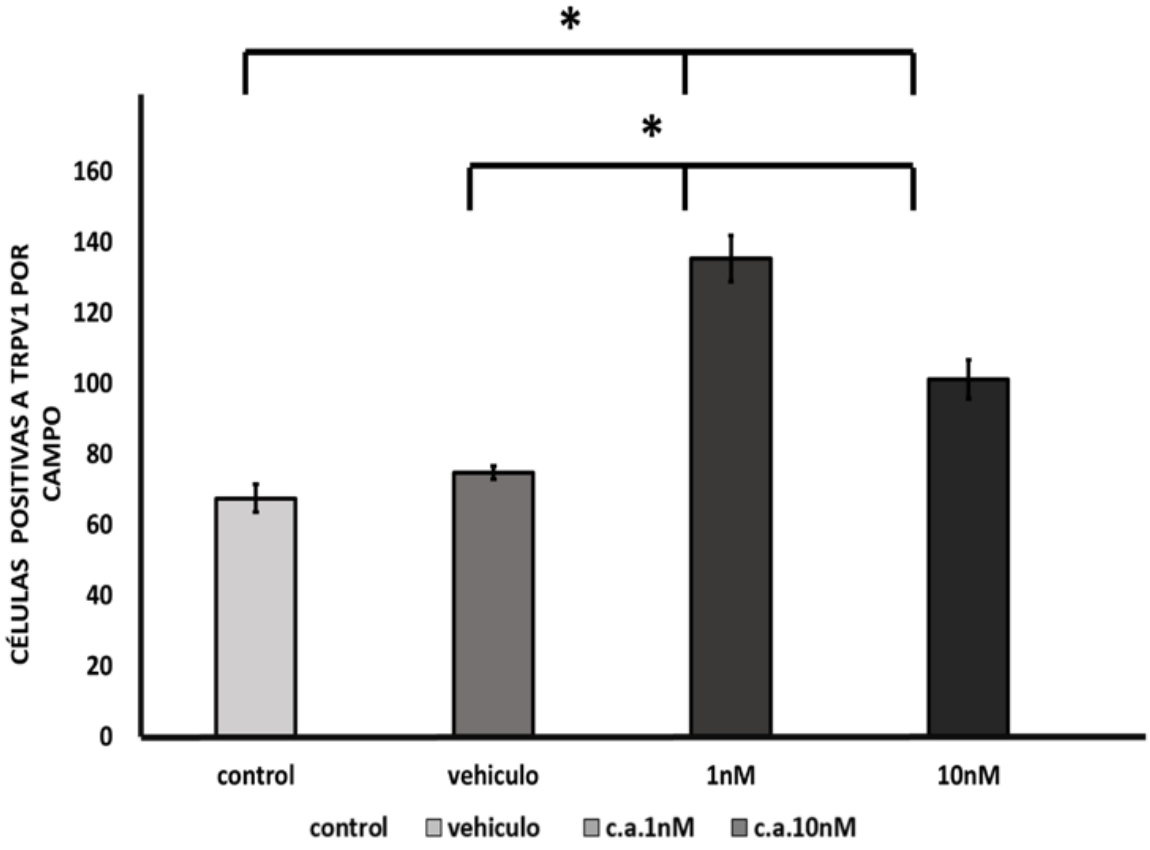


Figura 25. *Localización de células positivas a TRPV1 por campo de los grupos control, vehículo, c.a.1nM y c.a. 10nM Las barras representan el promedio± EEM *< p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.*

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se ha comprobado que los receptores TRPV1 promueven el desarrollo y diferenciación celular. En el presente trabajo observamos un incremento del peso corporal de los animales en la fecha de sacrificio que fue al P58. Esto nos sugiere que los receptores TRPV1 pueden modular el desarrollo de los adipocitos. A pesar de que no buscamos los receptores TRPV1 en adipocitos, nuestra propuesta está basada en los estudios hecho por Choowanthanapakorn, 2015, dónde observaron un aumento de peso posterior a la administración de capsaicina, y en los cuales se presentó un incremento en el tejido adiposo de los sujetos. Posteriormente en otro trabajo de Jiang Chen & col, 2015, donde se realizó una estimulación con electroacopuntura donde se promovió el desarrollo celular y de peso a través de los receptores TRPV1. Debido a los resultados obtenidos en el presente trabajo y basándonos en la bibliografía proponemos que el incremento del peso de los animales tratados con capsaicina con 1nM y 10nM, el cual estímulo los receptores TRPV1 en las células adipociticas.

Debido al incremento de peso corporal de los sujetos, originado por el aumento de tejido adiposo se infiere un incremento en la testosterona, relacionado con las investigaciones realizadas por Quintero F.& col.,2001, donde evaluaron el efecto de las hormonas de crecimiento sobre la maduración y pubertad de ratas, mostrando evidencia de un aumento de peso relacionado al incremento en niveles de testosterona. Las cuales se ven relacionadas con la investigación de MS Marty , JW Crissman & EW Carney,2001, en las cuales se muestra una relación entre la administración de agentes inhibidores de esteroides como propionato de testosterona (TP),los cuales afectaron el peso de los órganos de las glándulas sexuales reproductivas y accesorias y los niveles séricos de testosterona, encontrando una relación de incremento de peso-testosterona .Dentro del trabajo realizado se encontró un incremento de pesos corporales los sujetos administrados, relacionado por su incremento de células adiposas presentan la capacidad de incrementar la síntesis de testosterona por ende se plantea una mayor concentración de esta hormona en los sujetos administrados con capsaicina.

El incremento de testosterona es esencial para la producción y maduración normal de los espermatozoides, dentro del trabajo al mencionar un incremento de testosterona se vería

una modificación del proceso de espermatogénesis, como lo menciona Rodríguez & Col. 2001, el proceso de espermatogénesis depende, principalmente, de niveles intratesticulares de testosterona lo que permite conservar la morfología de los túbulos seminíferos. Afectando también la producción de espermatozoides depende del tamaño de los espermatozoides a partir de los espermatocitos primarios presentes dentro de los túbulos. Como se vio relacionado en la investigación realizada por Ilhan T. & Erdost H. ,2013, donde se realizaron investigaciones de grelina testicular, donde los niveles séricos de testosterona aumentaron en ambos grupos experimentales, especialmente en adultos.

Durante el experimento se identificaron modificaciones significativas en el conteo de espermatogonias, espermatocitos y visualmente de espermatozoides en los sujetos administrados con capsaicina principalmente en aquellos con la concentración de capsaicina 1nM. Donde podemos encontrar que en el grupo experimental puberal como en el adulto, el epitelio seminífero era grueso. Con la administración de capsaicina parece mejorar la proliferación de células testiculares y puede afectar la liberación de grelina y testosterona directa o indirectamente, al realizar el conteo de los túbulos de la zona media se ve incrementado el número de túbulos de los sujetos administrados con capsaicina comparado con los sujetos control y vehículo.

Una modificación de la espermatogénesis se ve relacionado con un número mayor de túbulos, dentro del análisis realizado sobre los tejidos se evaluaron el número de espermatocitos primarios, de las cuales se derivan los espermatocitos secundarios, los cuales permitirán la formación de espermátidas y posterior a la diferenciación, con el cual se podría realizar un aproximado del conteo espermático. Al existir una modificación en la cantidad de espermatocitos primarios se verá reflejada en el número total de espermatozoides como lo mencionan Takehiko & Yoshinobu en 2006, al realizar experimentos de proliferación de células madre (espermatogonia) y espermatogénesis de manera invitro.

Dentro de este trabajo se ocuparon laminillas procesadas bajo la tinción Hematoxilina- Eosina, con las cuales se identificaron el número de espermatocitos primarios dentro de los túbulos de la zona media de testículo. Así como se ocupó en el trabajo realizado por Téllez-López y col. 2013, donde se encontró la correlación entre el tamaño de los tubulos

con la motilidad espermática realizadas mediante cortes histológicos procesados bajo esta tinción. Dentro de nuestro trabajo fueron realizadas las mediciones de la distancia de la luz del túbulo a la lámina basal del túbulo, de los cuales se identificó un incremento de espermatocitos primarios, relacionado a un incremento del proceso de espermatogénesis el los sujetos administrados con capsaicina ,esto nos permite considerar que este proceso abarca un área mayor, lo que se refleja con un incremento de las mediciones de la luz del túbulo a la lámina basal del túbulo en los sujetos administrados con capsaicina.

Con apoyo de las laminillas procesadas bajo la tinción de Hematoxilina -Eosina dando así en los resultados que los sujetos administrados con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM presentaron un incremento de tubulos seminíferos comparado con los grupos control y grupo vehículo ,se puede considerar una relación de proliferación celular reflejada en el conteo de espermatogonias durante el experimento lo cual se ve ligado a un incremento del proceso de espermatogénesis en las cuales por medio de división celular darán lugar a un aumento en el conteo de espermatocitos primarios por medio de meiosis y espermatocitos secundarios generen espermátidas que por maduración incrementen el número de espermatozoides , los cuales podrían reflejar un incremento en la capacidad de fertilidad de los sujetos en edad reproductiva.

Con apoyo de la tinción Tricromica de Masson se realizó la medición de tejido conectivo permitiendo realizar las mediciones de tejido conectivo entre los tubulos en la zona media de testículo, en el interior se encuentran localizadas las células de Leydig, principalmente ligado a la producción de testosterona, Devoto E. & Aravena L.,2004, realizaron investigaciones sobre la medición de los testículos y la producción de testosterona , principalmente enfocado a un proceso hipogonadal , presentando que una menor secreción de testosterona por las células de Leydig y una menor cantidad de las células ,el cual se ve reflejado en con la disminución del tamaño tubulos y producción espermática, afectando factores secundarios de la pubertad como el tamaño de los testículos.

Mostrando una relación del área ocupada por las células de Leydig con la producción de testosterona y producción espermática muestra que en sujetos bajo estímulos se incrementan las mediciones de tejido. Durante el trabajo presente se identificó un incremento

en las mediciones de tejido en los sujetos administrados con capsaicina, principalmente en el grupo administrado con capsaicina a concentración 10 nM reflejando un incremento en la medición del tejido conectivo por un incremento de las células de Leydig , por lo anterior se propone que de los animales tratados con capsaicina el cual presenta un estímulo sobre los receptores TRPV1 en las células de Leydig reflejado por el incremento de tejido conectivo de los sujetos .

El uso de la tinción Tricromica de Masson también nos permitió identificar la presencia o ausencia de colágeno, evaluando así el tejido muscular, el cual permitirá considerar un daño tisular asociado a tumores, Gonzales y col. 2016, Realizaron investigaciones sobre múltiples daños presentes en testículo, en los cuales se presentaba un incremento de células tanto cancerosas, como benignas denominadas tumores, Carezzano F. Y Col., 2015, identificaron con uso de la tinción Tricromica de Masson mostrando diferentes tejidos testiculares con daños tumorales por medio de la identificación de un predominio de las fibras de colágeno.

La finalidad de este trabajo se relaciona a un incremento en la proliferación celular de manera "*positiva"* el cual permita mejorar las características del tejido, Al realizar dentro del trabajo la administración de capsaicina, el cual tiene alta afinidad sobre el receptor TRPV1se ha relacionado a la modificación presenta a NF-kB se ha encontrado en relación a trastornos inflamatorios , procesos autoinmunes y procesos cancerosos, por lo cual es viable realizar la identificación de algún daño tisular, canceroso o tumoral. Dentro de la tinción se evidenciaría en tonos azules-purpura, encontrando como resultado la ausencia en los diversos campos de la zona media de testículo. Demostrando así que la administración de capsaicina en estas dosis del tratamiento no presenta efectos daños tisulares o tumorales.

Con uso de la técnica Inmunohistoquímica de Fluorescencia la cual nos permitió realizar la identificación de células positivas a TRPV1, con los cuales se realizó el conteo por campo de la zona media de las células que presentaron una marca de TRPV1 con FITC presente en la *colocalización* ,observando un incremento de estas en los sujetos administrados, en la investigación realizada por Ilhan T. & Erdost H. ,2013 donde se

realizaron IHC de grelina testicular bajo una administración bajo la dieta alta de capsaicina en roedores durante la edad de pubertad , donde llegaron a la conclusión de que la administración de capsaicina estimula células de grelina , afectando a la testosterona .Dentro el trabajo realizado los sujetos administrados con capsaicina en concentración 1nM se identificó un incremento considerablemente mayor, mostrando que la administración de capsaicina en bajas concentraciones presenta un proceso *up-regulation* sobre los tubulos seminíferos .

Se deduce que TRPV1 actúa como un canal importante para mediar la entrada de Ca^{2+}. Este trabajo estudio la presencia del canal TRPV1 y su efecto sobre la proliferación celular. La participación de los receptores TRPV1se ha visto demostrada en trabajos realizados dentro del laboratorio de neuroendocrinología, en los cuales se identificó que pueden modificar la proliferación celular en hembras, modificando el inicio de la pubertad y el desarrollo ovárico Alatriste, el al, 2013.

Mediante NGF y la regulación que presenta en la plasticidad de sistema nervioso por medio de su receptor Trk permite la activación de **PI3K** el cual presenta función de proliferación celular, **PKC** en vinculación a la ruta de transducción de señales y **SRC** participando en la diferenciación y la proliferación celular, afectando el dominio N-terminal de los receptores TRPV1. La fosforilación de estos sitios permite que los receptores TRPV1 sean transportados a la membrana celular y capten estímulos extracelulares; o bien el estradiol, atraviesa la membrana celular y activa directamente a la proteína SRC, la cual fosforila a aminoácidos en el dominio N-terminal de los receptores TRPV1 en el retículo endoplásmico y así promover el tráfico de ellos a la membrana celular. La activación de los receptores TRPV1 contribuye al desarrollo de los órganos del sistema reproductor y del SNC participando en la diferenciación y la proliferación celular Alatriste, el al, 2013.

Relacionado al mecanismo ya existente de unión de Anandamida a los receptores TRPV1 incrementando el Ca^{2+} intracelular que a la vez activa a las proteínas calcio calmodulina quinasa II (CAMKII), a la PKC y a PKA dependientes de Ca^{2+}, activando el factor de transcripción NF-κB, el cual promueve la transcripción de genes involucrados en

los procesos de diferenciación y proliferación celular García, et.al.2018, González, et. al. 2015, Thippe gowda et al, 2010.

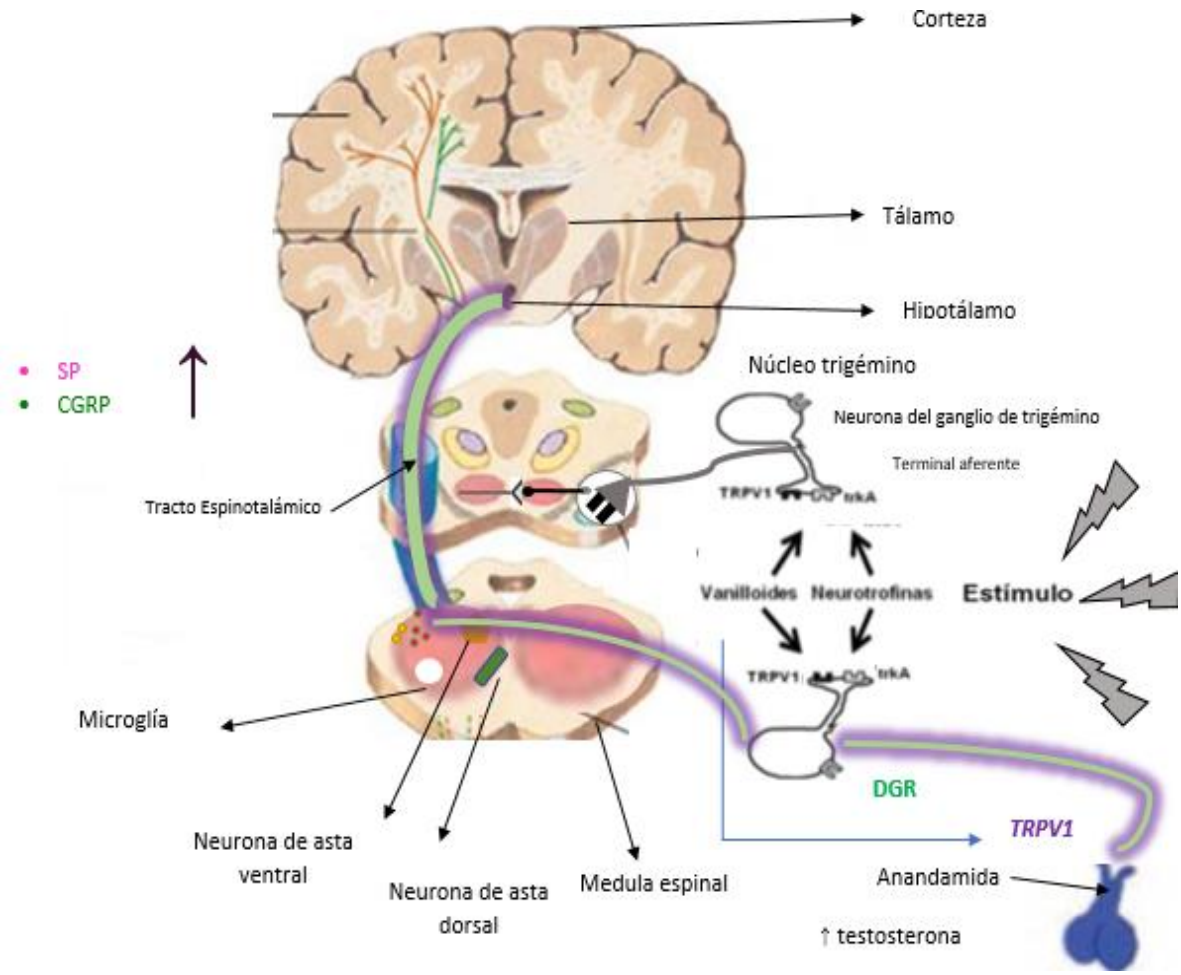


Figura 25. *Conexión nerviosa sensorial de testículo hacia el SNC. Los receptores TRPV1 se localizaron en los testículos y modulan el desarrollo en proliferación celular. además se expresan en las neuronas de los DRG y neuronas de la región raíces nerviosas Lumbares L1–L2 y S2–S4 También se ha reportado que NGF sensibiliza a los receptores TRPV1, favoreciendo el mecanismo antes descrito y permitiendo la proliferación y crecimiento del cono axonal, donde el NGF sensibiliza a los receptores TRPV1 (Meffert y Baltimore, 2005).Por lo cual la unión de Cap. a TRPV1 permite la señalización que activa la diferenciación y proliferación celular positiva en testículo de rata macho Wistar.*

CONCLUSIONES

1.- En las ratas macho tratadas con capsaicina a concentración 1nM y 10 nM se vio un incremento en el peso corporal, identificado al momento de sacrificio (P58).

2.- Se identifico que a concentración 1nM y 10 nM se promovió el desarrollo celular de los testículos de las ratas machos Wistar.

3.- Dentro de las inmunohistoquímicas realizadas se identificó dentro de los tubulos espermáticos un número mayor de células positivas a TRPV1 en las espermatogonias primarias

4.- El estímulo de los receptores TRPV1 presenta un papel relevante en el proceso de proliferación celular, demostrada por un incremento en el peso corporal, un incremento de las células de Leydig y espermatozoides vía receptores TRPV1.

Anexo 1: Perspectivas de trabajo

Para dar una continuidad a este trabajo se presentan las siguientes perspectivas con base a los resultados obtenidos durante la investigación y los cuales podrían favorecer sus aplicaciones.

Reproducir el trabajo realizado la cuantificación de testosterona en todos los sujetos proponiendo un incremento de esta en sujetos administrados, relacionado al incremento de tejido adiposo vía receptora TRPV1.

Realizar espermiograma/ seminograma amplio de todos los sujetos y evaluar la viabilidad de los espermatozoides.

Realizar la cruza con hembras bajo características específicas e identificar la capacidad de fertilidad de los sujetos.

Anexo 2: Aplicaciones del trabajo

Los resultados obtenidos podrían ser aplicados en problemas de fertilidad de diferentes especies, en sistemas de ganadería e inclusive en especies en peligro de extinción.

REFERENCIAS

Alatriste, V., Herrera-Camacho, I., I. Martínez, M., D. Limón, I., González-Flores, O. & Luna, F. (2013). Sensory denervation with Capsaicin reduces ovarian follicular development and delays the onset of puberty in guinea pigs. Advances in Reproductive Sciences, 1, 29-37

Antonio Ferrer Montiel , An. R. Acad. Nac. Farm Inflamación neurogénica: mecanismos y oportunidades dermocosmecéuticas , Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández. Elche 2009. 75 (2): 255-271

Appendino Gm Szallasi A: Euphorbium: modern research on its active principle, resiniferatoxin, revives an ancien medicine. Life Sciences 1997. 60(10):681-96

Asenjo A, Ting KS, Pino, J. Morfometría de testículos y células germinales de Allobates femoralis (Boulenger 1883) (Dendrobatidae: Anura: Amphibia). The Biologist. 2011;9(2):167-175.

Babbar S, Chanda S, Bley K. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes in vitro by Capsaicin. Xenobiotica 2010;40:807–816 50.

Bernstein L. The Male Reproductive System guide / el sistema reproductor masculino WebMD Medical Reference 2018. 341:4678

Buck Louis GM, Gray LE Jr, Marcus M, Ojeda SR, Pescovitz OH, Witchel SF, Sippell W, et al. Environmental factors and puberty timing: expert panel research needs. Pediatrics. 2008 14(9): 1044.

Caires R. Modulacion de la actividad del canal ionico TRPV1 por el Hialuronato sodico: (2015) tesis doctoral instituto de neurociencias; consejo superior de investigaciones científicas universidad miguel hernandez instituto de neurociencias.

Calvo M., Pozo J. Pubertad norma y sus variantes Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Profesores Asociados del Departamento de Pediatría de la UAM. Fisiopatología y Nutrición. Instituto de Salud Carlos III. Madrid (2011) 507-518

Carel JC, Eugster EA, Rogol A, Ghizzoni L, Palmert MR. Consensus statement on the use of gonadotropin-releasing hormone analogs in children. Pediatrics. 2009 123 (4), pp. e752-62. ff10.1542/peds.2008-1783

Carezzano FJ, Dorflinger K, Alonso M, Urquiza Bardone SP. Morfohistología testicular durante la estación reproductiva. Acta biol. Colomb. 2015;20(1):225-228. doi: http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n1.42978

Chaban V. (2012) Estrógeno y nocicepción visceral a nivel de neuronas sensoriales primarias. Tratamiento para el dolor. 2012; 2012

Chaban V. El estradiol inhibe el aumento de la concentración de calcio intracelular inducida por ATP en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal. Neurociencia 2003; 118(4): 941–948.

Chen, J., Li, L., Li, Y. et al. Activation of TRPV1 channel by dietary capsaicin improves visceral fat remodeling through connexin43-mediated Ca2+ Influx. Cardiovasc Diabetol 14, 22 (2015). https://doi.org/10.1186/s12933-015-0183-6

Cherrier MM, Asthana S, Plymate S, Baker L, Matsumoto AM et al. Testosterone supplementation improves spatial and verbal memory in healthy older men. Neurology 2001. 10;57(1):80-8

Choi JS, Boralevi F, Brissaud O, et al. Paroxysmal extreme pain disorder: a molecular lesion of peripheral neurons. Nat Rev Neurol 2011. 7(1):51-5. doi: 10.1038/nrneurol.2010.162.

Choowanthanapakorn, M., Lu, K., Yang, J. y col. Dirigido a TRPV1 para el control del peso corporal utilizando TRPV1 - / - Ratones y electroacupuntura. Sci Rep 5, 17366 (2015). https://doi.org/10.1038/srep17366

Chung MK, Campbell JN Use of Capsaicin to Treat Pain: Mechanistic and Therapeutic Considerations. US National Library of Medicine National Institutes of Health 2016. 1;9(4). pii: E66.

Clapham, C Montell, Gr Schultz, D. Julius. The TRP Ion Channel Family. IUPHAR Compendium, TRP Channels July 10, 2002 2(6):387-96.

Davidson S, Copits BA, Zhang J, Page G, Ghetti A, Ge - reau RW. Human sensory neurons: membrane proper - ties and sensitization by inammatory mediators. Pain 2014 55(9):1861-1870. doi: 10.1016/j.pain.2014.06.017.

Davis JB, y col. (2012) El receptor vanilloide-1 es esencial para la hiperalgesia térmica inflamatoria. Naturaleza. 2000; 405 (6783): 183–187.

Descoeur J, Pereira V, Pizzoccaro A, et al. Oxaliplatininduced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. EMBO Mol Med 2011 3(5):266-78. doi: 10.1002/emmm.201100134.

Devoto C, Enzo, & Aravena C, Lucía. (2004). HIPOGONADISMO ASOCIADO A LA SENILIDAD EN EL VARÓN (Climaterio Masculino - Andropausia - Adam). Revista chilena de obstetricia y ginecología, 69(5), 392-398.

E.L. Thompson, V. Amber, GWH Stamp, M Patterson, AE Curtis, JH Cooke, GF Appleby. Kisspeptin-54 at high doses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central mechanisms 2009 156(4): 609–625.

Eduardo E. Benarroch, Canales iónicos en nociceptores Desarrollo reciente , Implicancias Clínicas De La Investigación Neurocientífica Department of Neurology . 2015 ;139: 267–284

Edwards, J. G. TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. Prog. Drug Res.68,77–104 (2014).

Eisenach JC, Hood DD, Curry R. Preliminary efficacy assessment of intrathecal injection of an American formulation of adenosine in humans. Anesthesiology. 2002 96(1):29-34

Fan Yang , Linlin Ma , Xu Cao , KeWei Wang , Jie Zheng . Divalent cations activate TRPV1 through promoting conformational change of the extracellular región/Los cationes divalentes activan TRPV1 a través de la promoción del cambio conformacional de la región extracelular2013 143(1): 91–103.

Ferreira A, dos Santos Rosa A, Mehanna M. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). Acta Sci Biol Sci. 2009;31(4):447-452. Doi: http://dx.doi. org/10.4025/actascibiolsci.v31i4.3332

Fertleman CR, Ferrie CD, Aicardi J, et al. Paroxismal extreme pan desorden (previously familial rectal pain syndrome). Neurology 2007 7;69(6):586-95.

Flores, Quevedo, Resendiz Lopez ; Mecanismos neuroendocrinos al inicio de la pubertad. medigraphic revista / revista mexicana de pediatria vol 80 2013 pp 240-246

García, T. dos A. y Coimbra, Carolina del Norte (2018). Implicación de los receptores CB1 y TRPV1 en el hipotálamo en el efecto de la anandamida en el comportamiento defensivo

de los ratones amenazados por las serpientes . Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto.

Gowda S 1 , Desai PB , Kulkarni SS , Hull VV , Math AA , Vernekar SN . (2010) Marcadores de pruebas de función N Am J Med Sci. 2 (4): 170-3.

Guemes , ceñal, hidalgo Pubertad y adolescencia . 2017 V (1): 7-22

H. Xu, M. Delling, J.C. Jun, y D.E. Clapham. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. Nature neuroscience, 9 (5):628–635, 2006.

Han BG, Hao CM, Tchekneva EE, et al. Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-h- and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;295:E981–E986 29

He H, Yang D, Ma L, et al. Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-deltadependent pathways. Hypertension 2010;55:869–879 31.

Idkowiak J, Lavery GG, Dhir V, Barrett T, Stewart PM, Krone N, Arlt W. Premature adrenarche - novel lessons from early onset androgen excess. Eur J Endocrinol. 2011 165 189–207 ISSN 0804-4643

Ilacqua , aversa, francomano. The Physiology of the Testis 2017 10.1007/978-3-319-44675

Ilacqua, Alessandro & Francomano, Davide & Aversa, Antonio. (2017). The Physiology of the Testis. 10.1007/978-3-319-44675-2_17.

Ilhan T. & Erdost H. (2013) Effects of capsaicin on testis ghrelin expression in mice , n Biotechnic & Histochemistry ,DOI: 10.3109/10520295.2012.724083.

Immke D. & Narender R. El receptor TRPV1 y la nocicepción Seminarios en Biología Celular y del Desarrollo (2006) doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.09.004

Jacus MO, Uebele VN, Renger JJ, Todorovic SM. Pre - synaptic Cav3.2 channels regulate excitatory neurotrans - mission in nociceptive dorsal horn neurons. J Neurosci 2012 4;32(27):9374-82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0068-12.2012.

Jin X, Touhey J, Gaudet R. Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. J Biol Chem. 2006 1;281(35):25006-10.

Kenneth Maiese .Warming Up to New Possibilities with the Capsaicin Receptor TRPV1: mTOR, AMPK, and Erythropoietin, US National Library of Medicine .National Institutes of Health 2017 14(2): 184–189.

Lee G.R., Shin M.K., Yoon D.J., Kim A.R., Yu R., Park N.H., Han I.S. (2013)Topical application of Capsaicin reduces visceral adipose fat by affecting adipokine levels in high-fat diet-induced obese mice. Obesity. 2013;21:115–122. doi: 10.1002/oby.20246.

Lehman MN, Merkley CM, Coolen LM, Goodman RL. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. Brain Research [Internet]. 2010 [cited: 2013, Jan 3]; 1364: 90-102.

Lillo Espinosa, José Luis. . Crecimiento y comportamiento en la adolescencia. Revista de la Asociación Española de Neuropsiquiatría. 2004 0211-5735, pp. 57-71

llard, S.; Adin, P.; Gouedard, L.; Di Clemente, N.; Josso, N.; Orgebin-Crist, M.C.; Picard, J.Y. & Xavier, F. Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct

Loipa Galán Martínez,Damián Souto , Suria Valdés García,Enrique Minaberriet Conceiro Canales iónicos Receptores de Potencial Transitorio y su papel protagónico en la terapia

analgésica /Transient receptor potential ion channels and their leading role in analgesic therapy Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2015 42089–1011.

Lucioni, A., Bales, G. T., Lotan, T. L., McGehee, D. S., Cook, S. P. & Rapp, D. E. (2008)Botulinum toxin type A inhibits sensory neuropeptide release in rat bladder models of acute injury and chronic inflammation. BJU. 2008 4797–4816.

M. Güemes Madrid.(2017) Pubertad y adolescencia . ; V (1): 7-22

M. Numazaki, T. Tominaga, K. Takeuchi, N. Murayama, H. Toyooka, y M. Tominaga. 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100 (13):8002–8006,

Marty MS , Crissman JW , Carney EW . 2001 Evaluación del ensayo de inicio puberal masculino para detectar testosterona e inhibidores de la biosíntesis de esteroides en ratas CD. Toxicol Sci. ; 60 (2): 285-95.

Meena R, Misro MM, Ghosh D, Nandan D. Extended intervention time and evaluation of sperm suppression by dienogest plus testosterone undecanoate in male rat. Contraception. 2012; 85(1):113–121.

Meffert MK , Baltimore D .(2005) Funciones fisiológicas para el cerebro NF-kappaB .Tendencias Neurosci. PMID:15626495DOI:10.1016 / j.tins.2004.11.002

Michel Latarjet, Alfredo Ruiz Liard , 2004.. Anatomía Humana . Ed. Médica Panamericana EAN: 9789500695923

MICHEL, S.; CHOVER-GONZ£LEZ, A.J., JESSOP, D.S. (2003): Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis and Chronic Immune Activation. Ann. N. Y. Acad. Sci., 992: 99-106.

Miguel A. Téllez-López, Jaime Fco. Treviño-Neávez,Ma. Julia Verde-Star,Catalina Rivas-Morales, Azucena Oranday-Cárdenas,Javier Moran-Martínez,Luis Benjamín Serrano-Gallardo,Ma. Eufemia Morales-Rubio(2013) Evaluation of the e!ect of methanol extract of Tagetes lucida on testicular function and sperm quality in male Wistar rats.revista medicina de ciencias farmacéuticas 44:85-87.

Molitch, Mark E., and Bernard P. Schimmer.. "Introducción a la endocrinología: eje hipotálamo-hipófisis." Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas De La Terapéutic, 13e Eds. Laurence L. Brunton, et al. New York, NY: McGraw-Hill,

MS Marty, JW Crissman, EW Carney, Evaluación del ensayo de inicio puberal masculino para detectar inhibidores de la biosíntesis de testosterona y esteroides en ratas CD, Toxicological Sciences (2001) Volumen 60, Número 2, , páginas 285–295, https: // doi. org / 10.1093 / toxsci / 60.2.285

Muñoz Calvo MT. Pubertad normal y sus variantes. Pediatr Integral. 2007 VII(6):429-437

N. Javdan ,S. A. Ayatollahi ,M. Iqbal Choudhary ,S. Al-Hasani ,H. Pazoki-Toroudi (2010) FOXO1 targeting by Capsaicin reduces tissue damage after testicular torsion 2018 . Statpearls Treasure Island(FL): https://doi.org/10.1177/1535370219831615

Nieschlag E(2009). Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA. J Androl 2006 55 121–130

Ning-Ning Wei , Hai-Ning Lv , Yang Wu (2016). Activación selectiva del canal Nociceptor TRPV1 y reversión del dolor inflamatorio en ratones por un novedoso derivado de cumarina Muralatina L de Murraya alata /Selective Activation of Nociceptor TRPV1 Channel and Reversal of Inflammatory Pain in Mice by a Novel Coumarin Derivative

Muralatin L from Murraya alata. The Journal of Biological Chemistry 291, 640-651. doi: 10.1074/jbc.M115.654392

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. Endocrine Reviews . 2009 30(6): 713-43

Ortega-González ME, Hernández-Méndez E, Cortes-Raygoza P, CalvoVázquez I, Veliz-Cabrera G, López-Maguey R, y colaboradores.2017 Tumores testiculares bilaterales: experiencia de 25 años en un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México Artículo original Rev Mex Urol. sep-oct;77(5):353-360.

Ortíz-Rentería M, Juárez-Contreras R, González-Ramírez R, Islas LD, Sierra-Ramírez F, Llorente I, Simon SA, Hiriart M, Rosenbaum T, Morales-Lázaro (2018) SL TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. US National Library of Medicine National Institutes of Health Statpearls Treasure Island(FL): https://www.pnas.org/content/115/7/E1657

Panchal, S. K., Bliss, E., & Brown, L. (2018). Capsaicin in Metabolic Syndrome. Nutrients, 10(5), 630. doi:10.3390/nu10050630

Quinter F., Orden A., Fucuni M., Guimarey L., Oyhenart E.(2001) Efecto hormonal sobre el crecimiento y la maduración de ratas con retardo prenatal del crecimiento, Revista Argentina de Antropología Biológica; vol. 3, no. 2ISSN: 1853-6387

R. Planells-Cases, N. Garc`ıa-Sanz, C. Morenilla-Palao, y A. Ferrer-Montiel. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. Pflugers Arch, 451(1):151–159, 2005.

Reilly, R. M. et al. Pharmacology of modality-specific transient receptor potential vanilloid-1 antagonists that do not alter body temperature. J. Pharmacol. Exp. Ther. 342, 416–428 (2012)

Rodenburg W, Keijer J, Kramer E, Vink C, van der Meer R, Bovee-Oudenhoven IM. Impaired barrier function by dietary fructo-oligosaccharides (FOS) in rats is accompanied by increased colonic mitochondrial gene expression. BMC Genomics 2008;9:144

Rodríguez, Héctor, Salazar, Paulina, Schmidt, Nadia, Torres, Patricia, & Ossandón, Enrique. (1999). Histologia Testicular Humana Comparada, Adulto Joven Y Senil. Revista chilena de anatomía, 17(2), 183-188.

S.C. Pingle, J.A. Matta, y G.P. Ahern. Capsaicin receptor: Trpv1 a promiscuous trp channel. In Transient Receptor Potential (TRP) Channels, pages 155–171. Springer, 2007.

Schmelz M, Schmidt R. Microneurographic single-unit recordings to assess receptive properties of aerent hu - man C-bers. Neurosci Lett 2010 470(3):158-61. doi: 10.1016/j.neulet.2009.05.064

Seung Hee Han and , Sung-Ho Lee . Differential Growth of the Reproductive Organs during the Peripubertal Period in Male Rats 2013 (4): 469–475.doi: 10.12717/DR.2013.17.4.469

Taehoon Cho & Victor V. Chaban (2017) Expression of P2X3 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons from estrogen receptors-α and estrogen receptor-β knock-out mice / Expresión de los receptores P2X3 y TRPV1 en las neuronas sensoriales primarias de los ratones knock-out receptores de estrógeno-α y receptor de estrógeno-β NCBI; 23(9): 530–534. doi: 10.1097/WNR.0b013e328353fabc

Targeting of Transient Receptor Potential Channels in Digestive Disease 2015 Daniel P.Poole,,TinaMarieLieu1Nicholas A.Veldhuis,,PradeepRajasekhar1Nigel W.Bunnett, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420024-1.00021-7

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Volume 90, Issue 10, 1 October 2005, Pages 5588–5595, https://doi.org/10.1210/jc.2005-0438

Thibodeau GA, Patton KT. Anatomía y Fisiología. 6ª ed. Madrid: Elsevier España, S.A; 2007.

Thippegowda, PB, Singh, V., Sundivakkam, PC, Xue, J., Malik, AB y Tiruppathi, C. (2010). La entrada de Ca2+ a través de los canales TRPC induce la expresión de A20 dependiente de NF-kappaB para prevenir la apoptosis inducida por trombina en las células endoteliales. A.m. J. Physiol. Cell Physiol. 298, C656 – C664.

ThompsonEL, Amber V, Stamp GWH, Patterson M, Curtis AE, Cooke JH, Appleby GF, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR, Murphy KG (2009). Kisspeptin-54 at high do- ses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central me- chanisms. British Journal of Pharmacology, 156: 609-625.

Tortora GJ, Derricskon B. Principios de Anatomía y Fisiología. 11ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006.

Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Activation Enhances Gut Glucagon-Like Peptide-1 Secretion and Improves Glucose Homeostasis. (2012)DOI link: https://doi.org/10.2337/DB11-1503

Tugnoli, V., Capone, J. G., Eleopra, R.,Quatrale, R., Sensi, M., Gastaldo, E., Tola, M. R. & Geppetti, P. Botulinum toxin type A reduces Capsaicinevoked pain and neurogenic vasodilatation in human skin. Pain. 2007 130(1-2):76-83

Vriens, B Nilius, R. Venneken: Herbal Compounds and Toxins Modulating TRP Channels. Current Neuropharmacology, 2008 79-96. doi: 10.2174/157015908783769644.

W.H. Xiao, H. Zheng, y G.J. Bennett. (2012) Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. Neuroscience, 203:194–206.

Wagner MS, Wajner SM, Maia AL (2008). The role of thyroid hormone in testicular de- velopment and function. J Endocrinol, 199: 351-365.

X. Zhang, L. Li, y P.A. McNaughton. Proinflammatory mediators modulate the heatactivated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. Neuron, 59 (3):450–461, 2008.

Yang D, Luo Z, Ma S, et al. Activation of TRPV1 by dietary Capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. Cell Metab 2010;12:130–141 30.

Yokonishi, T. y Ogawa, T. (2016). Criopreservación de tejidos testiculares y espermatogénesis in vitro. Medicina y biología reproductiva , 15 (1), 21–28. doi: 10.1007 / s12522-015-0218-4

Yuan L.J., Qin Y., Wang L., Zeng Y., Chang H., Wang J., Wang B., Wan J., Chen S.H., Zhang Q.Y., et al. (2015)Capsaicin-containing chili improved postprandial hyperglycemia, hyperinsulinemia, and fasting lipid disorders in women with gestational diabetes mellitus and lowered the incidence of large-for-gestational-age newborns. Clin. Nutr. 2016;35:388–393. doi: 10.1016/j.clnu.2015.02.011.

Zhang QH, Hu JP, Wang BL, Li Y. Effects of Capsaicin and dihydro Capsaicin on human and rat liver microsomal CYP450 enzyme activities in vitro and in vivo. J Asian Nat Prod Res 2012;14:382–395