



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**Efectos de la Administración de la  
p-Cloroanfetamina (pCA) Sobre la función  
Gonadal en la Rata Macho.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

P R E S E N T A

**Abel**

**Avilés**

**Sánchez**

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES  
DE NUESTRA PROFESIÓN

DIRECTORA DE TESIS: Dra. María Elena Ayala Escobar.

MÉXICO, D.F.

2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE

<b>Resumen.</b> . . . . .	I
<b>Introducción.</b> . . . . .	1
Aparato reproductor masculino. . . . .	3
Espermatogénesis. . . . .	7
Esteroidogénesis. . . . .	14
Eje hipotálamo-hipófisis. . . . .	19
Serotonina. . . . .	20
Serotonina y testículo. . . . .	22
<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.</b> . . . . .	25
<b>HIPÓTESIS.</b> . . . . .	26
<b>OBJETIVO GENERAL.</b> . . . . .	26
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.</b> . . . . .	26
<b>MATERIAL Y MÉTODO.</b> . . . . .	27
Efecto de la administración de p-cloroanfetamina (pCA) . . . . .	27
Procedimiento de la autopsia. . . . .	27
Evaluación espermática. . . . .	28
Cuantificación de hormonas esteroides. . . . .	29
Cuantificación de gonadotropinas. . . . .	29
Estudio histológico. . . . .	30
Cuantificación de serotonina. . . . .	30
Análisis estadístico. . . . .	31
Resultados. . . . .	33
Discusión. . . . .	53
Conclusiones. . . . .	60
Bibliografía. . . . .	61

## RESUMEN

En la rata macho el sistema serotoninérgico participa en la regulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, aunque, los resultados que apoyan la participación de este sistema son contradictorios. Así mismo, se sugiere que la serotonina actúa directamente en el testículo en donde regula sus funciones. Hasta el momento no se ha mostrado la participación de este sistema de neurotransmisión durante el desarrollo prepuberal de la rata. Por ello, a ratas de 30 días de edad se les realizó el bloqueo del sistema serotoninérgico, mediante la administración de la p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y a los 65 días de edad se analizaron los efectos sobre la esteroidogénesis y espermatogénesis.

En comparación con el grupo testigo absoluto, en los animales que recibieron pCA la masa testicular y del epidídimo disminuyeron de manera significativa. En estos animales el número de espermatozoides, así como el porcentaje de espermatozoides móviles y viables disminuyen significativamente. La concentración de testosterona en suero disminuyó ligeramente pero esta diferencia no fue significativa. Este mismo comportamiento se observó en la concentración de gonadotropinas. En el hipotálamo anterior, medio y posterior de los animales que recibieron pCA la concentración de 5-HT disminuyó de manera significativa.

Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que el sistema serotoninérgico participa de manera estimulante en la regulación de la espermatogénesis y esteroidogénesis por parte del testículo, posiblemente debido a la modificación en la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides sexuales.

## **INTRODUCCIÓN**

La complejidad funcional que experimentan los mamíferos durante su evolución, hace necesaria la existencia de sistemas de regulación que coordinen las diferentes funciones y las respuestas a las variaciones del medio externo. Los responsables de dicha coordinación son los sistemas nervioso y endocrino, los cuales actúan de manera integrada (Constanzo, 1998; Prieto y Velázquez, 2002).

El organismo posee una variedad de receptores sensoriales que captan la información del medio externo e interno, la cual es enviada al sistema nervioso central donde se elaboran las respuestas motoras, autónomas y neuroendocrinas. El sistema efector para la respuesta endocrina está constituido fundamentalmente por el eje hipotálamo-hipófisis. En este eje se producen una serie de mecanismos neuroendocrinos que regulan el funcionamiento de las gónadas y la reproducción, que es el proceso por el cual se asegura la continuidad de las especies (Constanzo, 1998; Prieto y Velázquez, 2002).

En los mamíferos, la pubertad se define como la etapa de transición entre la inmadurez y la madurez sexual, la cual inicia con la aparición de los caracteres sexuales secundarios, así como de una serie de cambios en el comportamiento y la adquisición de la capacidad para reproducirse (Setchell, 1978; Ramaley, 1979). Este proceso es el resultado de la estimulación de las gónadas por las gonadotropinas [hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH)], así como del incremento en la producción de los esteroides sexuales por la gónada (Setchell, 1978).

Con base en parámetros fisiológicos el desarrollo prepuberal de la rata macho se ha dividido en cuatro fases, entre estos parámetros se encuentran: los cambios en las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas; alteraciones en

los mecanismos de retroalimentación estimulante o inhibitoria que ejercen los esteroides sobre el eje hipotálamo-hipófisis (Ojeda y Urbanski, 1994). Estas fases son:

***Fase neonatal.*** Abarca desde el nacimiento hasta el día siete de vida. Esta etapa se caracteriza por la falta de madurez del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Durante esta fase del desarrollo, la producción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) tiende a aumentar, y las concentraciones de las gonadotropinas [hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH)] son altas. En cambio, la concentración de testosterona es baja y en esta fase las células de Sertoli dejan de dividirse (Odell, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

***Fase infantil.*** Comprende del día 8 al 21 de edad. Se caracteriza porque las concentraciones de FSH y LH en el plasma continúan aumentando. Además, la FSH induce la expresión y el aumento del número de receptores a LH en las células de Leydig, y como consecuencia se incrementa la producción de testosterona. En las células de Sertoli hay un aumento en la producción de la proteína fijadora de andrógenos (ABP), la que alcanza un máximo a la tercera semana del desarrollo (Odell, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

***Fase juvenil.*** Se inicia en el día 22 de vida y finaliza alrededor del día 35. Los receptores a la GnRH en la hipófisis aumentan durante las primeras 4 semanas de vida y su número máximo se alcanza a los 30 días. Entre los 30 y 40 días también aumenta el número de receptores a GnRH en el testículo, y después disminuye. La máxima concentración de FSH se detecta entre los 25 y 35 días de edad. También la FSH actúa en el túbulo seminífero, en particular en las células de Sertoli, donde estimula espermatogénesis. Los principales andrógenos producidos por el testículo de la rata inmadura son: androstenediona,  $5\alpha$ -androstenediol y esteroides  $5\alpha$  reducidos como la dihidrotestosterona (Odell, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

***Fase peripuberal.*** Inicia el día 36 y finaliza entre el día 55 y 60 de edad. En esta fase aparecen los espermatozoides maduros en el conducto deferente. La mayor concentración de LH en forma se observa, entre los 35 y 45 días de edad. En el día 60 el número de receptores a la GnRH en la hipófisis es estable (Odell, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

## **Aparato Reproductor Masculino**

El aparato reproductor del macho está constituido por dos testículos, dos epidídimos, dos conductos deferentes y las glándulas sexuales anexas, que son las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales, mientras que los genitales externos comprenden el pene y el escroto (Geneser, 2000) (Figura 1).

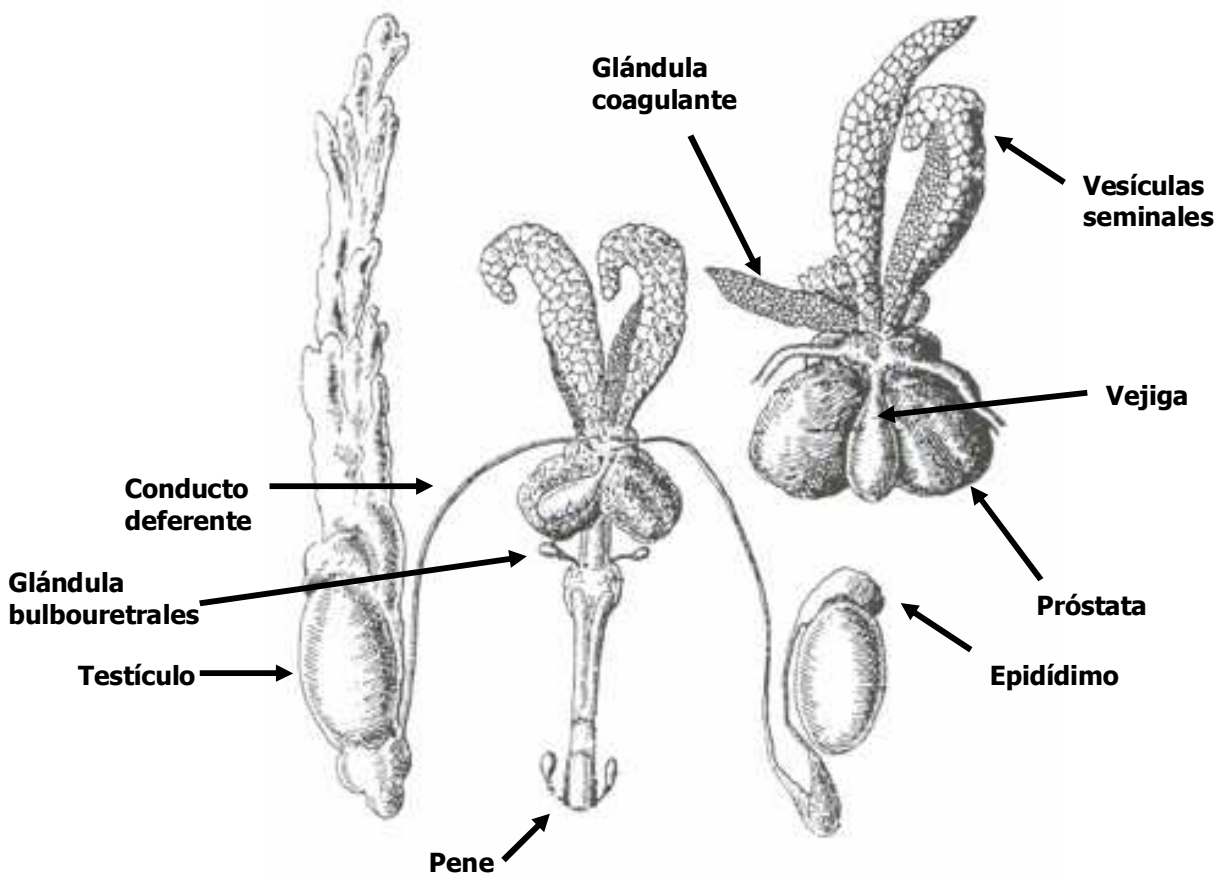
Los testículos tienen múltiples cambios durante la pubertad, como son el inicio de la producción de espermatozoides y el incremento en la producción de las hormonas sexuales masculinas, principalmente la testosterona (Gondos y Kogan, 1990). En el inicio de la pubertad, esta hormona es un factor que regula la producción de la primera oleada de los espermatozoides, así como la secreción por parte de las glándulas sexuales anexas y el desarrollo de las características sexuales secundarias. En la etapa adulta, la testosterona mantiene la producción de los espermatozoides y las características sexuales secundarias (Geneser, 2000; Ross y col., 1992; McLachlan y col., 1996).

Los testículos se consideran los órganos primarios del aparato reproductor del macho debido a que por medio de la producción de las hormonas sexuales modulan el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del resto de los órganos del aparato reproductor. Cada testículo está recubierto por una gruesa

## *Introducción*

---

cápsula de tejido conectivo, la túnica albugínea. La parte interna de la cápsula es la túnica vascular, una capa de tejido conectivo laxo que contiene los vasos sanguíneos. En la superficie posterior del testículo la túnica albugínea se hace más gruesa y se proyecta hacia el interior, en donde se forma el mediastino testicular. Cada testículo está dividido en lobulillos mediante tabiques incompletos de tejido conectivo que se proyectan desde la cápsula. Estos lobulillos contienen varios túbulos seminíferos contorneados. Los túbulos seminíferos constituyen el compartimiento donde se producen los espermatozoides (Figura 1) (Geneser, 2000; Ross y col., 1992).





**Figura 1. Esquema en el que se muestra el aparato reproductor de la rata macho (Modificado de Setchell y col., 1994).**

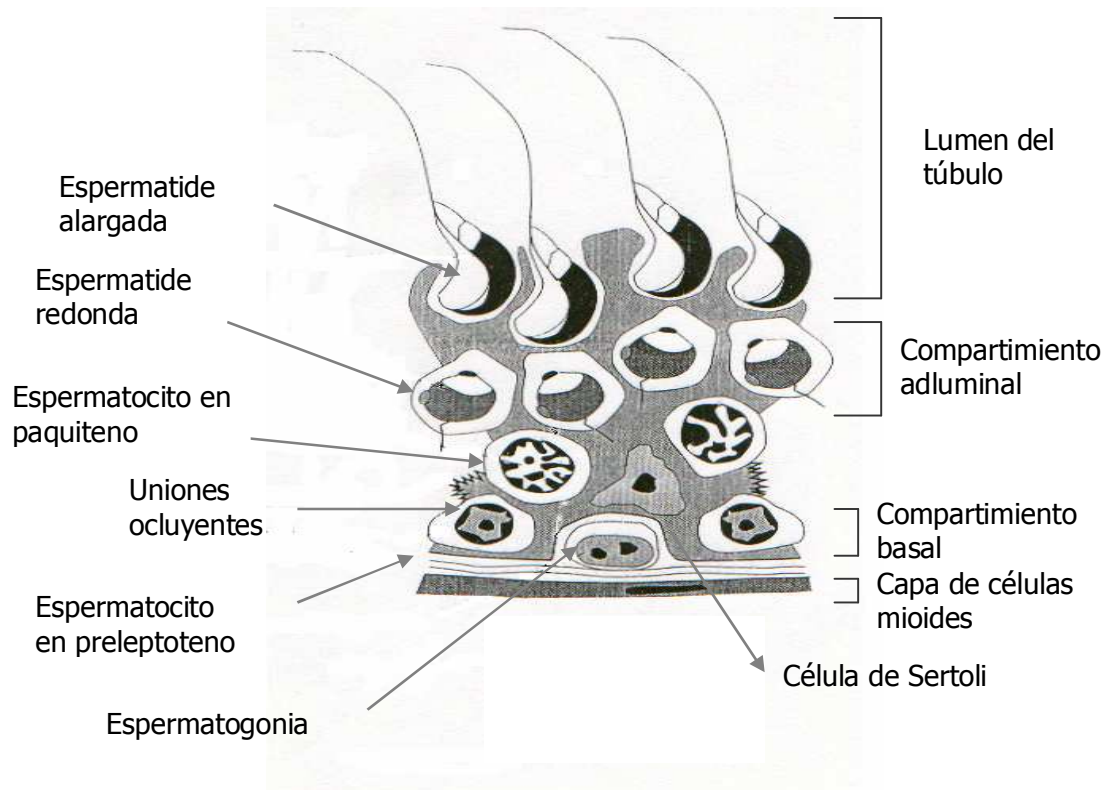
El tejido intersticial constituido por las células de Leydig que rodea a los túbulos seminíferos tiene una función endocrina, ya que sintetiza y secreta principalmente testosterona. Las células de Leydig son grandes, poligonales y acidófilas, y contienen inclusiones lipídicas. También contienen cristales citoplasmáticos en forma de bastón bien diferenciados, los cristales de Reinke. El 95% de la testosterona es producida por las células de Leydig del testículo y 5% proviene de las glándulas suprarrenales (Ross y col., 1992).

Los túbulos seminíferos están rodeados por una membrana basal, y por 3 ó 4 capas de células aplanadas, denominadas células mioides. Inmediatamente después de la membrana basal, los túbulos seminíferos están revestidos por un epitelio estratificado especializado, el epitelio seminífero o productor de espermatozoides, compuesto por dos poblaciones básicas de células: células espermatogénicas, que se dividen con regularidad y se diferencian a espermatozoides maduros; y células de Sertoli o células de sostén, que una vez alcanzada la pubertad no se dividen (Geneser, 2000; Ross y col., 1992).

Las funciones de las células de Sertoli comprenden: soporte físico para las células espermatogénicas, que están unidas unas a otras mediante puentes citoplasmáticos, la nutrición de los espermatocitos, espermatídes y espermatozoides, que están aislados del riego sanguíneo por las uniones de oclusión entre las células de sostén; protección contra el ataque autoinmunitario por las inmunoglobulinas en la sangre; fagocitosis de cuerpos residuales que resultan de la transformación de la espermatide en espermatozoides; secreción de la proteína fijadora de los andrógenos, que se une a la testosterona y producción

de inhibina, que actúa sobre la hipófisis donde inhibe la producción de la FSH (Paulson, 1991).

Las células de Sertoli adyacentes se encuentran comunicadas entre sí por las uniones ocluyentes. El epitelio tubular está dividido por estas uniones en un compartimiento basal, en el que sólo se encuentran espermatogonias y espermatoцитos primarios en los estadios más tempranos de la meiosis, y un compartimiento adluminal que contiene el resto de los estadios de la espermatogénesis. La importancia de las uniones ocluyentes entre las células de Sertoli radica en que permiten una permeabilidad selectiva que mantiene un microambiente especial en el compartimiento adluminal, con una composición bastante diferente de la plasmática. El compartimiento basal es permeable a las hormonas esteroideas, y el compartimiento adluminal contiene gran cantidad de andrógenos y estrógenos, además de determinados aminoácidos así como de iones (Geneser, 2000; Pilliniemi y col., 1993) (Figura 2).



**Figura 2. Esquema en el que se muestra la célula de sertoli y sus asociaciones con las células germinales en diferentes estadios de desarrollo en el túbulo seminífero de la rata (Sharpe, 1994).**

## Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual las espermatogonias se convierten en espermatozoides (Jones, 1997; McLachlan, 2002). Este proceso se divide en tres fases: espermatogénica o de espermatogonias; espermatocítica o de espermatocitos y de espermiogénesis o de espermátides (Ross y col., 1992; Setchell, 1978; Weinbauer y Nieschlag, 1993).

**Fase espermatogénica o de espermatogonias.** Las células precursoras o espermatogonias, se dividen y forman una célula precursora de reemplazo y proporcionan una población de espermatogonias, las cuales según sus características nucleares se dividen en tres tipos: espermatogonias tipo A oscuras,

que tienen núcleo ovoide con cromatina y finas granulaciones; espermatogonias tipo A claras, que tienen núcleo ovoide con cromatina que se tiñe ligeramente y finas granulaciones; y espermatogonias tipo B, que por lo general tienen núcleo esférico con cromatina condensada (Ross y col., 1992; Setchell, 1978; Weinbauer y Nieschlag, 1993).

Las espermatogonias oscuras son células diploides que se dividen por mitosis y generan dos grupo de células, uno que tienen la capacidad de continuar multiplicándose y otro (espermatogonias claras) que inician la meiosis y su diferenciación a espermatozoide. Una característica de la división de las espermatogonias es que las células hijas permanecen unidas a través de un puente citoplasmático. Las conexiones son esenciales para el desarrollo sincrónico. Estas conexiones citoplasmáticas se mantienen intactas hasta los últimos estadios de maduración de las espermátides (Ross y col., 1992; Setchell, 1978; Weinbauer y Nieschlag, 1993).

***Fase espermatocítica o de espermatocitos.*** Los espermatocitos primarios son producidos por la división mitótica de las espermatogonias tipo B. Los espermatocitos primarios entran en la primera profase de la división meiótica, en la que se produce el entrecruzamiento de la información genética entre los cromosomas homólogos y después continúan con la meiosis. Las células derivadas de la primera división meiótica son los espermatocitos secundarios. Estas células son más pequeños que sus progenitores y pasan inmediatamente a la segunda división meiótica y como resultado se producen las espermátides haploides (Geneser, 2000; Ross y col., 1992; Setchell, 1978; Weinbauer y Nieschlag, 1993).

***En la fase de espermátides o espermiogénesis.*** Las espermátides que se caracterizan por ser redondeadas y con una gran cantidad de citoplasma, se

diferencian a espermatozoides. Las espermatídes maduran y dan origen al espermatozoide. La última etapa de la espermatogénesis se denomina espermiogénesis, la cuál se divide en cuatro fases: de Golgi; de casquete; de acrosoma, y de maduración, las cuales se llevan a cabo mientras las espermatídes están unidas físicamente a la membrana plasmática de la célula de Sertoli (Stevens y Steven, 1993).

Durante la fase de Golgi se inicia la acumulación de gránulos proacrosómicos ricos en glucoproteínas, que se unen y forman la vesícula acrosómica, limitada por una membrana adyacente a la envoltura nuclear. La posición de la vesícula acrosómica determina el polo anterior del espermatozoide en desarrollo (Setchell, 1978; Stevens y Steven, 1993).

Durante la fase del casquete, la vesícula acrosómica se extiende hasta cubrir la mitad anterior del núcleo y se condensa aún más. Esta estructura transformada se denomina casquete acrosómico. Durante esta etapa aumenta la condensación del contenido nuclear (Setchell, 1978; Stevens y Steven, 1993) (Figura 3).

Durante la fase acrosómica las espermatídes se reorientan de manera que la cabeza queda incluida en las invaginaciones de la célula de Sertoli, en dirección hacia la lámina basal. El flagelo en desarrollo se extiende hacia la luz del túbulo seminífero. El núcleo condensado de la espermatíde se aplana y alarga, los microtúbulos citoplasmáticos se organizan y forman una vaina cilíndrica, el manguito, que se extiende desde el borde posterior del acrosoma hasta el polo posterior de la espermatíde. A partir de los centriolos se forma el flagelo y este se dirige hacia la superficie posterior del núcleo, en donde el centriolo proximal se fija a una cavidad poco profunda del núcleo y forma la pieza de conexión o región del cuello del espermatozoide en desarrollo. A partir de los centriolos se producen nueve fibras gruesas que se extienden hacia el interior de la cola. A medida que la

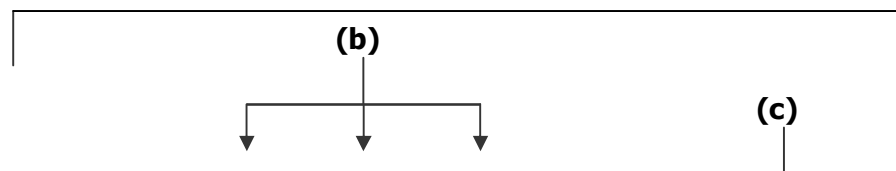
## *Introducción*

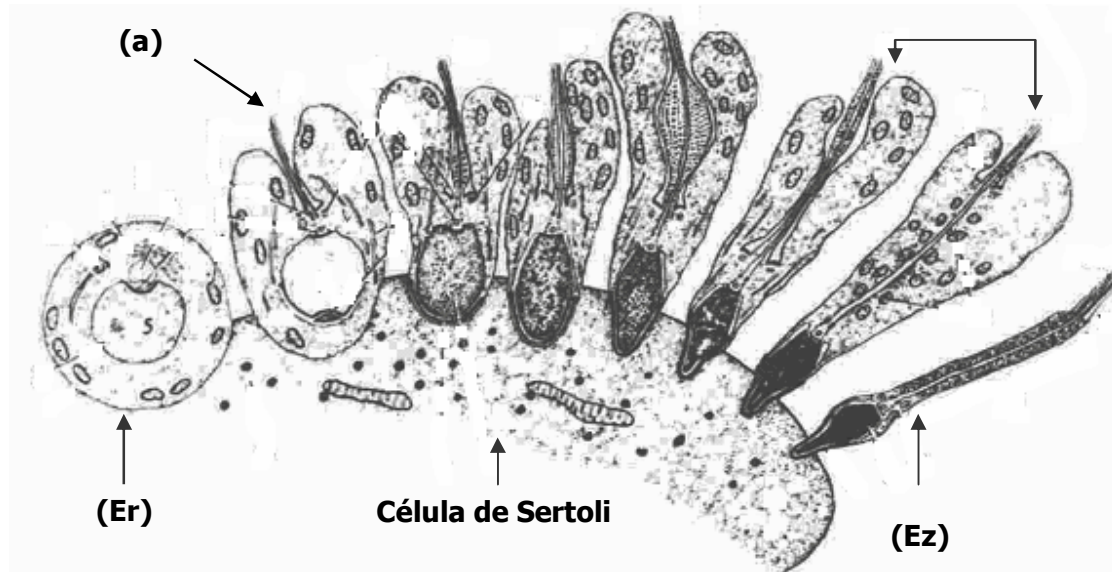
---

membrana plasmática se dirige hacia la parte posterior para cubrir el flagelo en crecimiento, desaparece el manguito y las mitocondrias migran del resto del citoplasma y forman una vaina helicoidal que se enrolla alrededor de las gruesas fibras de la región del cuello y su extensión posterior inmediata (Setchell, 1978; Stevens y Steven, 1993).

Las espermatides están en contacto estrecho con las células de Sertoli y durante la espermiogénesis pierden la mayor parte de su citoplasma lo que da origen a los cuerpos residuales, los que son fagocitados por las células de Sertoli y reutilizados; este es un paso fundamental en la regulación local de la espermatogénesis (Meistrich, 1993; Ross y col., 1992; Setchell, 1978) (Figura 3).

### **Transformación de la espermatide a espermatozoide**





**Figura 3. Esquema que ilustra la espermiogénesis en la rata. Espermátide redonda (Er); espermátide con formación del granulo acrosomal (a); espermátides con condensación del material genético, elongación del núcleo y desarrollo del flagelo (b); espermátides alargadas con pérdida de citoplasma y organización de mitocondrias en la región media (c); espermatozoide (Ez) (Tomado de Russell, 1990).**

El ciclo del epitelio seminífero es un proceso secuencial del desarrollo de los diferentes tipos celulares presentes en el túbulo seminífero y para su estudio este desarrollo se le ha dividido en etapas. En la rata, el ciclo del epitelio seminífero se divide en 14 etapas, cada una de las cuales se caracteriza y clasifica con base en los diferentes tipos celulares presentes, que incluye la morfología de la cabeza de las espermátides en etapas tempranas de su desarrollo hasta la etapa final, el espermatozoide, así como la posición del acrosoma en desarrollo. En las primeras etapas se observan espermatogonias, espermatocitos, espermátides (en sus diferentes etapas), mientras que en las etapas finales se encuentran espermatocitos, espermátides alargadas y espermatozoides (Figura 3) (Russell y col., 1990).

Los túbulos seminíferos se comunican con los túbulos rectos, que a su vez desembocan en la rete testis. Desde allí los conductillos eferentes, que salen del testículo y desembocan en una vía común, el conducto del epidídimo que luego se continúa en el conducto deferente, que se extiende hasta la próstata. Allí se une con el conducto excretor de la vesícula seminal y forman el conducto eyaculador, que cruza la próstata y desemboca en la parte prostática de la uretra. Durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo, los espermatozoides maduran, adquieren movilidad y la capacidad para fertilizar al óvulo (Geneser, 2000; Ross y col., 1992; Parker y Thibodeau, 1983).

Cuando se habla de espermatogénesis, es necesario distinguir entre las tres etapas de desarrollo, las cuales son: iniciación, mantenimiento y reiniciación. La iniciación consta del primer ciclo de espermatogénesis, que es la formación de espermatozoides en la pubertad. El mantenimiento se refiere al conjunto de eventos necesarios para asegurar la producción de espermatozoides en el organismo sexualmente maduro. La reiniciación se refiere a la producción de gametos una vez que este proceso fue interrumpido (Meistrich, 1993; Sharpe, 1994).

En los mamíferos la espermatogénesis es regulada por las gonadotropinas [hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH)], la prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), los propios esteroides y por factores de crecimiento (Weinbauer y Nieschlag, 1993). La FSH y LH son las principales hormonas reguladoras de este proceso. La FSH actúa en el túbulo seminífero en particular en la célula de Sertoli y la LH ejerce sus efectos reguladores de la espermatogénesis vía la modulación de la producción de testosterona por las células de Leydig (Weinbauer y Nieschlag, 1993).

La FSH al unirse a sus receptores de membrana en la célula de Sertoli induce la producción de la proteína transportadora de los andrógenos (ABP), que tiene una



alta afinidad para la testosterona y dihidrotestosterona. Esta célula también sintetiza y secreta una gran cantidad de sustancias que forman parte del fluido tubular o que pasan a la circulación general en donde actúan como mediadores endocrinos. Entre estas sustancias se encuentra la activina y la inhibina que estimulan o inhiben la producción de la FSH respectivamente (Griswold, 1998; Jones, 1997; Ross y col., 1992; Setchel, 1978).

Durante el desarrollo prepuberal de la rata, la presencia de la GnRH es fundamental para la iniciación de la espermatogénesis. La administración de un antagonista de la GnRH a ratas prepúberes causa disfunción testicular permanente (Sharpe, 1994; Weinbauer y Nieschlag, 1993). Además, cuando se hipofisectomiza a la rata, la espermatogénesis se suspende, debido a que las divisiones meióticas no se producen de manera normal; cuando a ratas hipofisectomizadas se les administra LH se previene parcialmente la pérdida de células germinales. En conjunto, estas evidencias apoyan la idea de que la producción de espermatozoides es regulada entre otros factores por las gonadotropinas (Boccabella, 1963, citado en Sharpe, 1994; Setchell, 1978).

En la rata inmadura la iniciación de la espermatogénesis es un fenómeno hormono-dependiente y se ha mostrado que las gonadotropinas y la testosterona, están involucradas en su regulación (Dym y col., 1978; Heckert y Griswold, 1992; Weinbauer y Nieschlag, 1993). Al parecer, la FSH es un factor que modula la transformación de las espermatogonias a espermaticitos preleptótenicos y la transformación de la espermatide en sus últimas etapas durante la primera onda espermática (Weinbauer y Nieschlag, 1993). En la etapa fetal de la rata y durante los primeros 20 días de vida, la FSH induce la proliferación de las células de Sertoli. Este efecto mitogénico de la hormona no se observa en la etapa adulta (Orth y col. 1984; Sharpe, 1994).

La testosterona participa en la regulación de la espermatogénesis principalmente durante las divisiones meióticas y en particular de la espermiogénesis. En la rata, la testosterona es capaz de estimular el inicio de la espermatogénesis. Se ha mostrado que cuando se bloquea la acción de la testosterona por la administración de un antiandrógeno como el casodex, disminuye el número de células germinales (Chandolia y col., 1991, citado en Weinbauer y Nieschlag, 1993). Mientras que cuando se administra testosterona a ratas hipofisectomizadas, se previene la involución testicular, se mantiene la espermatogénesis y se restablece la fertilidad (Awoniyi y col., 1992; Sun y col., 1990). Con base en estas evidencias es posible pensar que en la rata la testosterona sola es capaz de mantener la espermatogénesis (Weinbauer y Nieschlag, 1993).

También existen evidencias de que otros andrógenos como la dihidrotestosterona (DHT), el  $5\alpha$ -androstenediol y los precursores de los andrógenos (pregnenolona, progesterona y 17-hidroxiprogesterona), mantienen parcialmente el proceso de espermatogénesis (Weinbauer y Nieschlag, 1993).

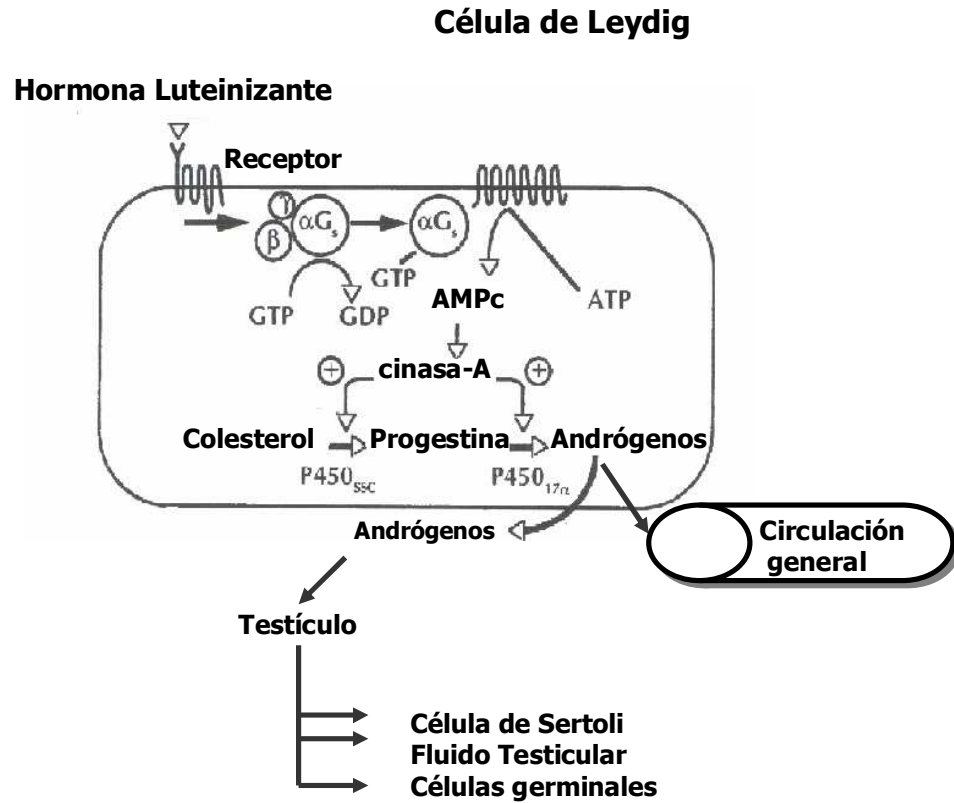
En la rata la testosterona y FSH de manera separada son capaces de estimular el proceso completo de espermatogénesis. Sin embargo, el mecanismo preciso de la acción de la testosterona y FSH sobre la espermatogénesis no se conoce con exactitud. La FSH modula la espermatogénesis directamente al actuar en las células germinales e indirectamente debido a que en la célula de Sertoli, modula su metabolismo y la secreción de proteínas necesarias para el desarrollo de las células germinales. La testosterona y la LH son requeridas para que se complete la meiosis (diferenciación del espermatocito primario a espermatocito secundario) (Weinbauer y Nieschlag, 1993).

La LH modula la espermatogénesis vía la producción de los andrógenos por las células de Leydig (Figura 5). La neutralización selectiva de la LH provoca disminución de la espermatogénesis con disminución de los espermatoцитos en paqueiteno y degeneración celular, ausencia de espermátidas y falta de luz en la mayoría de los túbulos seminíferos. Estos hechos confirman los requerimientos de LH y testosterona para completar la meiosis. Así mismo se ha mostrado que la maduración de las espermátidas requiere del estímulo de la LH, testosterona y FSH, mientras que la liberación de los espermatozoides hacia la luz tubular (espermiación), sólo necesita de los efectos de la LH (Setchell y col., 2002; Steinberger y Steinberger, 1975).

### **Esteroidogénesis**

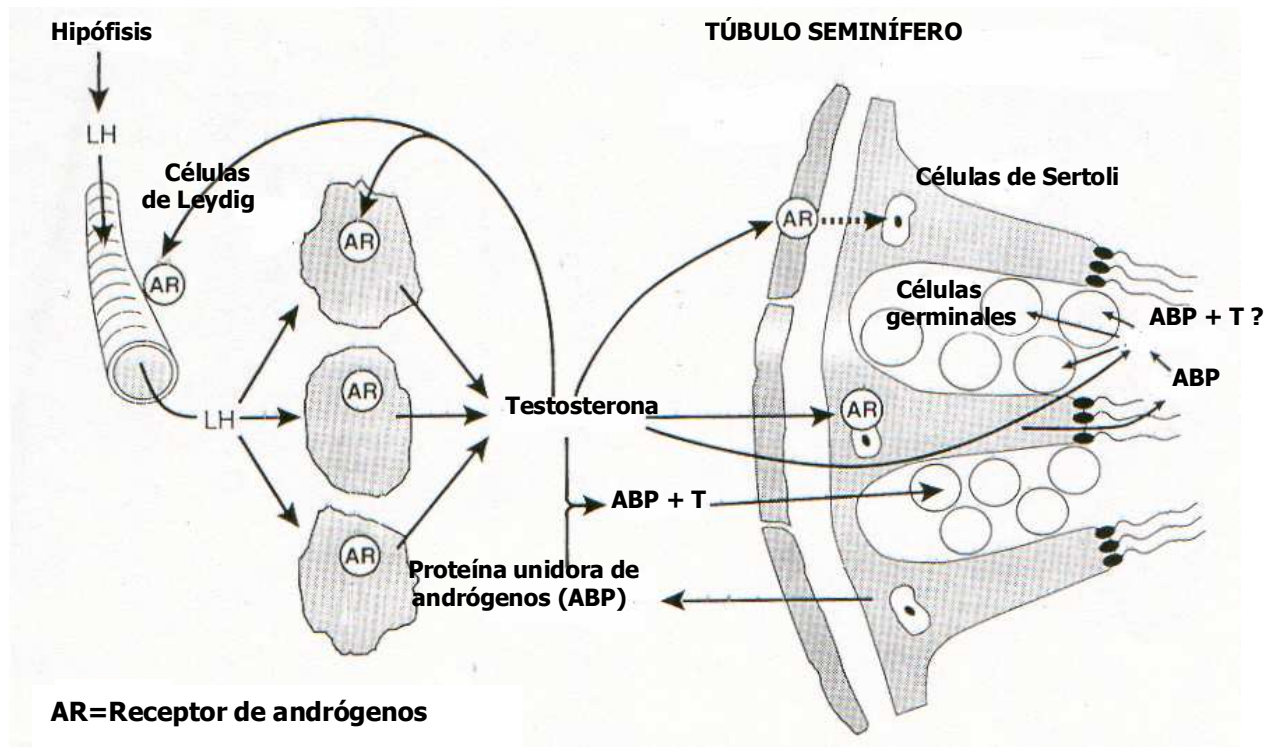
La LH al unirse a sus receptores de la membrana en las células de Leydig activa el sistema adenilatociclasa e incrementa la concentración de la molécula mensajera, adenosin monofosfato cíclico (AMPcíclico). Esto desencadena la activación de la proteína cinasa que cataliza la fosforilación de proteínas intracelulares y la movilización de los precursores de los esteroides, principalmente por la conversión del colesterol a pregnenolona necesaria en la producción de testosterona (Setchell y col., 2002; Tresguerres, 1999) (Figuras 4 y 5).

El colesterol es la molécula precursora para la síntesis de las hormonas esteroides en la célula de Leydig. Existen dos fuentes de colesterol para la célula de Leydig: 1) el plasma, a partir de los ésteres de colesterol que forman parte de las lipoproteínas de baja densidad, las cuales se introducen a la célula por endocitosis mediada por receptor. Los ésteres de colesterol pueden almacenarse en gotas de lípidos o convertirse en colesterol libre y ser utilizados en la síntesis de andrógenos (Hinshelwood, 1999; Tresguerres, 1999); 2) su formación en la propia célula de Leydig a partir de acetato (Setchell, 1978).



**Figura 4. Esquema los pasos de la síntesis de los andrógenos en la Célula de Leydig (Modificado de Ericsson y Shimasaki, 2001).**

La transformación del colesterol en pregnenolona se realiza en la mitocondria, por lo que el colesterol es transportado e internalizado unido a una proteína transportadora. En el transporte desde la cara externa de la membrana de la mitocondria hasta la interna, donde se realiza el paso de colesterol a pregnenolona, intervienen los fosfolípidos de la membrana y un péptido activador de la esteroidogénesis (Setchell, 1978; Tresguerres, 1999).



**Figura 5. Esquema que ilustra los posibles sitios de acción de la testosterona (T), receptor de andrógenos (AR), hormona luteinizante (LH), proteína unidora de androgenos (ABP) en el testículo en la rata (Nazian, 1986, citado en Sharpe, 1994).**

La pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa al retículo endoplásmico liso, donde se completa la esteroidogénesis. Dos rutas metabólicas conducen a la síntesis de la testosterona, una a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona, conocida como la ruta  $\Delta 5$ , y otra a partir de 17-hidroxi-progesterona o  $\Delta 4$ ; los esteroides intermedios de la ruta  $\Delta 5$  pueden convertirse en el  $\Delta 4$  correspondiente. La importancia relativa de estas dos rutas varía según la especie; en el hombre la más importante es la  $\Delta 5$ , mientras que en roedores es la  $\Delta 4$  (Figura 6) (Hinshelwood, 1999; Setchell, 1978; Tresguerres, 1999).

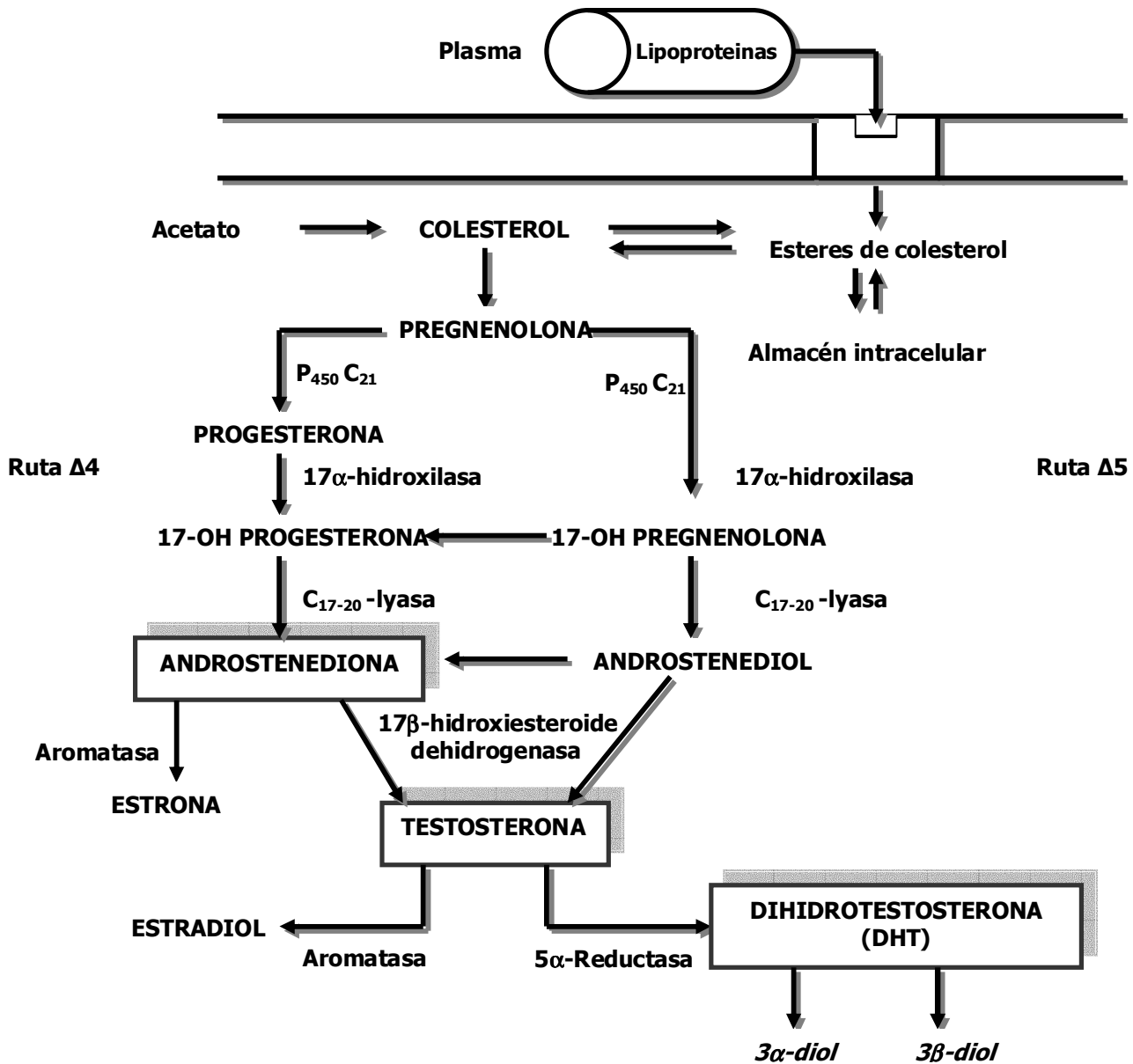


Figura 6. Síntesis de esteroides en la célula de Leydig. Se presenta la ruta de la  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$ , para la síntesis de testosterona y estradiol (Tomado de Tresguerres, 1999).

## **Eje hipotálamo-hipófisis**

El hipotálamo es la parte del diencefalo que regula la actividad de la hipófisis y como consecuencia las funciones del testículo. El hipotálamo está compuesto por células nerviosas dispuestas en grupos o núcleos. Estas células comparten características tanto de neuronas como de células endocrinas y responden a señales del torrente circulatorio como a los neurotransmisores (Constanzo, 1998). En el hipotálamo se ubican los núcleos que secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que estimula la producción y la liberación de las gonadotropinas (Snell, 1990).

La GnRH es un decapeptido sintetizado por neuronas que se denominan GnRHérgicas. La síntesis y liberación de la GnRH en el macho es regulada por las hormonas testiculares y por los diferentes sistemas de neurotransmisión, entre los que se encuentran las catecolaminas, aminoácidos excitadores, el ácido gama aminobutírico (GABA), los péptidos opioides y la serotonina (Crowley y Zemlan, 1981).

En el lóbulo anterior de la hipófisis se encuentran las células gonadotropas cuya actividad es regulada por la GnRH y secretan la LH y FSH. La célula gonadotropa hipofisiaria tiene receptores para la GnRH, estos receptores son glucoproteínas localizadas en la membrana celular. La respuesta hipofisiaria a la GnRH depende del número de receptores presentes, el que aumenta después del nacimiento. Esta respuesta está modulada por las hormonas esteroides, neurotransmisores, péptidos opioides, insulina, entre otras hormonas (Silverman y col., 1994). La GnRH llega a la adenohipófisis en la sangre circulante de los capilares del sistema portal-hipofisiario y se une a los receptores membranales específicos de los gonadotropos (Fink, 2000).

## **Serotonina**

La serotonina ó 5-Hidroxitriptamina (5-HT) es un neurotransmisor distribuido en diferentes regiones del encéfalo. También está presente en tejidos periféricos incluyendo las células cromafines de la mucosa gastrointestinal, glándula pineal, las plaquetas, los mastocitos, el páncreas, pulmón, timo, la tiroides y el tracto urogenital (Frazer y Hensler, 1999; Takeuchi, 1988; Tinajero, 1993). En el encéfalo la serotonina es secretada por un grupo de neuronas que en conjunto conforma el núcleo del rafe, que se localiza en el cerebro medio. Este núcleo se divide en rafe dorsal, medial y del puente. El rafe dorsal y medial proyectan sus fibras hacia varias áreas del encéfalo, entre ellas el hipotálamo (Crowley y Zemlan, 1981; Takeuchi, 1988).

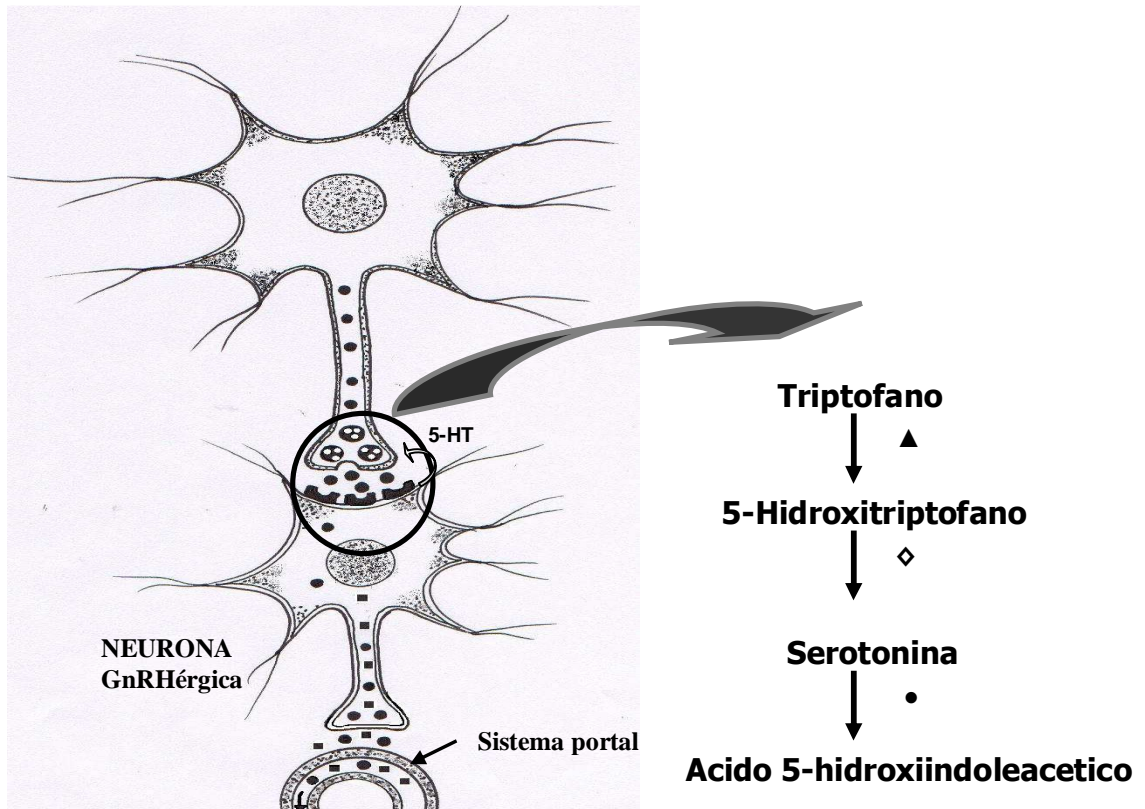
La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido esencial L-triptofano, que después de su incorporación en la dieta penetra en la circulación y del 80 al 90% se une a la albúmina, mientras que el resto circula en forma libre. Posteriormente el triptofano se convierte en 5-hidroxitriptofano por medio de la enzima triptofano hidroxilasa. Este es el paso limitante en la síntesis de la serotonina. En condiciones normales la enzima triptofano hidroxilasa no está saturada, por lo que la administración de triptofano se acompaña de un incremento en la formación de 5-hidroxotriptofano, el cual es descarboxilado y se forma la serotonina (Crowley y Zemlan, 1981).

Después de la liberación de la serotonina a la hendidura sináptica, es recapturada por la neurona serotoninérgica, e inactivada por la monoaminoxidasa (MAO) y forma el metabolito 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Esta sustancia es utilizada como índice del metabolismo de la serotonina en el organismo (Frazer y Hensler, 1999; Ganong, 1996) (Figura 7).



Se han descrito siete tipos de receptores de serotonina: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub> y 5-HT<sub>1G</sub>, algunos de los cuales son presinápticos; 5-HT<sub>2</sub>. Los receptores a serotonina se identifican en diferentes regiones del sistema nervioso central y en los tejidos periféricos (Li, 1995).

### Neurona serotoninérgica



- ▲ Triptofano hidroxilasa
- ◇ Decarboxilasa
- Monoamino oxidasa

**Figura 7. Diagrama que ilustra la síntesis de serotonina y la comunicación con la neurona GnRHérgica, serotonina (5-HT) (Modificado de Sharpe, 1994).**

### **Serotonina y Testículo**

Existen diversas evidencias que apoyan la idea de que la serotonina participa en la modulación de las funciones del testículo. Posiblemente en la regulación de la secreción de la GnRH y como consecuencia en la producción de las gonadotropinas o directamente en la gónada donde modula la producción de testosterona. Sin embargo hasta el momento los resultados obtenidos al respecto son poco claros (Crowley y Zemlan, 1981; Shishkina y Dygalo, 2000).

Por medio de técnicas de inmunocitoquímica se ha mostrado que los diferentes núcleos hipotalámicos reciben inervación serotoninérgica. Además se ha mostrado que en el área preóptica existe una comunicación entre el soma de las neuronas que producen la GnRH y las terminales serotoninérgicas que tienen su origen en el núcleo dorsal del rafe. En la eminencia media existe comunicación entre las terminales que liberan GnRH al sistema portal y las que producen serotonina (Jennes y col., 1985). Estas evidencias anatómicas apoyan la idea de que la serotonina está asociada en la modulación tanto de la síntesis como de la liberación de la GnRH y como consecuencia de las gonadotropinas (Jennes y col., 1985).

La serotonina y la MAO están presentes en el testículo y se ha mostrado que la 5-HT regula la esteroidogénesis en las células de Leydig (Tinajero, 1993).

Cuando se tratan ratas macho de 16 ó 20 días de edad con 5-hidroxitriptofano, se estimula la secreción de la FSH y no se modifica la de LH. Así mismo, cuando este tratamiento se realiza a ratas hembras de las mismas

edades se incrementa la producción de LH y no se modifica la de FSH (Bécu-Villalobos y col., 1989; Justo y col., 1989; Moguilevsky y col., 1987). Cuando se inhibe la síntesis de serotonina en ratas macho de 23 días por la administración de p-clorofenilalanina, disminuye la concentración de FSH en suero y la de LH no se modifica (Pinilla y col., 2003). Con base en estos resultados los autores sugieren que el sistema serotoninérgico participa en la modulación de la regulación de la secreción de las gonadotropinas durante el desarrollo del animal prepúber y que su participación es diferente entre los sexos.

El bloqueo del sistema serotoninérgico inducido por la administración de la pCA (antagonista de la síntesis de serotonina) en ratas macho de 40 y 44 días, resulta en la disminución del peso de los testículos y las vesículas seminales. Estos cambios se acompañan de la disminución en la concentración de testosterona en plasma y del número de espermatozoides en el conducto deferente. Cuando el mismo tratamiento se realiza en animales de 30 y 34 días no se modifica la producción de testosterona. Por otro lado, cuando los animales de 30 y 34 son tratados con 5-hidroxitriptofano, a los 60 días de edad se incrementa la concentración de testosterona en plasma, el peso de los testículos y de las vesículas seminales. Con base en estos resultados los autores sugieren que la serotonina modela la secreción de los andrógenos necesarios en la maduración sexual de las ratas macho (Shishkina y Dygalo, 2000).

Steger y col., (1990) mostraron que en cricetos adultos o prepúberes mantenidos en periodos de iluminación cortos, disminuye de manera significativa la concentración de LH, el tamaño y peso de los testículos. Estos cambios se acompañan del aumento en la concentración de serotonina en el hipotálamo medio basal. Estos resultados permitieron a los autores sugerir que el incremento en la síntesis de serotonina induce la disminución en la secreción de la LH por la hipófisis.

Collu y col., (1974) mostraron que cuando a ratas macho de 21 y 23 días de edad, se les administra 5,6 Dihidroxitriptamina (un fármaco que provoca la degeneración selectiva de las terminales nerviosas serotoninérgicas) en el tercer ventrículo, la concentración de serotonina disminuye desde la primera semana de realizado el tratamiento. Esto se acompañó de disminución del peso testicular y de la concentración de FSH en suero. Estos resultados apoyan la idea de que la serotonina estimula la secreción de las gonadotropinas y particularmente la FSH.

Además de la participación de la serotonina en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, este sistema de neurotransmisión participa en la modulación de la producción de PRL. Cuando ratas macho de 4, 8, 12 y 16 días de edad son tratadas con 5-hidroxitriptofano se incrementa la concentración de PRL en suero, mientras que cuando el precursor se administra a los 4, 8 ó 12 días no se presentan cambios. Estos resultados permitieron a los autores sugerir que la serotonina estimula los mecanismos que regulan la secreción de la PRL y que su participación varía a lo largo del desarrollo del animal prepúber (Aguilar y col., 1994).

Al parecer, el efecto estimulante que ejerce la serotonina en la regulación de la secreción de PRL es mediado por los receptores del tipo 5-HT<sub>1A</sub>, debido a que la administración del agonista de este tipo de receptores, la 8-hidroxi-2-(di-n-propilamina) tetralina, incrementa la producción de PRL en los animales de 16 días de edad (Aguilar y col., 1994).

Cuando cricetos macho de 36 días de edad son expuestos a períodos de iluminación largos o cortos durante 14 ó 22 semanas, se incrementa la concentración de 5-HT en el parénquima y cápsula del testículo lo cual se acompaña del aumento en la concentración de LH, 3 $\alpha$ -androstano y 17 $\beta$ -estradiol

en suero. Este mismo comportamiento se observa cuando animales adultos (60 y 90) son expuestos a periodos de iluminación largos o cortos. Estos resultados permiten a los autores sugerir que la serotonina puede actuar como un importante modulador en la secreción de LH o en el propio testículo sobre la esteroidogénesis gonadal durante el desarrollo sexual (Frungeri y col., 1999).

Se ha mostrado que cuando se administra un agonista de los receptores a 5-HT en ratas macho de 75 ó 90 días de edad se observa un aumento significativo en el peso testicular 24 y 48 horas después de la administración. También se observó una distensión de los túbulos seminíferos como consecuencia de un incremento del lumen, cambios que fueron observados en todas las etapas del ciclo espermatogénico. Los autores concluyen que estos cambios se deben a la inadecuada reabsorción de fluidos por la red de testis y el conducto eferente, cambios que desaparecen a las 96 horas postadministración (Piner y col., 2002).

Además de la participación de la serotonina en la modulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, se sugiere que esta amina actúa directamente en el testículo donde regula la producción de testosterona (Tinajero y col., 1993). Se sugiere que la serotonina testicular es transportada por el nervio espermático superior (aproximadamente 34%) (Campos y col., 1990). Sin embargo es posible que la serotonina se sintetice directamente en el testículo, ya que cuando se mantiene en cultivos a células de Leydig, se observa que se produce serotonina en el medio (Tinajero y col., 1993), por lo que es posible que las células de Leydig posean el mecanismo enzimático para la síntesis de serotonina. Al parecer en el testículo esta amina modula la producción de testosterona por intermedio de la activación de la producción del factor inhibidor de la corticotropina (Tinajero y col., 1993)

## **JUSTIFICACIÓN**

Se ha mostrado que el sistema serotoninérgico regula la secreción de las gonadotropinas, las cuales intervienen en conjunto con la testosterona en la modulación de la espermatogénesis y esteroidogénesis. Sin embargo, hasta el momento existe poca información sobre las modificaciones en la actividad de este sistema y su vinculación con la maduración sexual en la rata macho. Por lo que en el presente trabajo se decidió analizar los efectos del bloqueo del sistema serotoninérgico inducido por la administración de p-Cloroanfetamina (pCA) en ratas macho de 30 días de edad sobre la espermatogénesis y la esteroidogénesis.

## **Hipótesis**

Dado que el sistema serotoninérgico regula la secreción de la FSH y LH, si se bloquea la síntesis de serotonina en ratas macho, se alterará la estructura de la gónada así como su funcionamiento, disminuyendo la síntesis de testosterona y la producción de espermatozoides.

## **Objetivo General**

Analizar los efectos del bloqueo del sistema serotoninérgico en las funciones del testículo (espermatogénesis y esteroidogénesis).

## **Objetivos Particulares**

- Analizar los efectos de la administración de pCA en la producción de espermatozoides (cantidad, viabilidad y movilidad).
- Analizar los efectos de la administración de pCA en la concentración sérica de hormonas esteroides testiculares (progesterona, testosterona y  $17\beta$ -estradiol) y gonadotropinas (FSH y LH).
- Analizar los efectos de la administración de pCA en el ciclo del epitelio seminífero.
- Analizar la estructura histológica del testículo de ratas macho tratada con pCA.
- Evaluar los efectos de la administración de pCA en la concentración de 5-HT, 5-HIAA y la relación  $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$  en el hipotálamo anterior, medio, posterior y los núcleos dorsal y medial del rafe.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron ratas macho de 30 días de edad de la cepa CIIZ-V mantenidas en condiciones controladas de iluminación (14 h luz y 10 h de oscuridad) con libre acceso al agua y al alimento hasta el sacrificio.

Los animales se trataron entre las 10:30 a 11:30 h, con 10 mg/Kg de p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) por vía intraperitoneal (i.p), cada 8 días hasta cumplir 65 días de edad. Otro grupo de animales recibieron solución salina al 0.9% (grupo vehículo). Como grupo de comparación se utilizaron animales sin tratamiento (testigo absoluto) de las mismas edades.

### **Procedimiento de la autopsia**

Los animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron por decapitación al día 65 de edad entre las 12:30 y 13:30 h. Al momento de la autopsia se extrajeron y disecaron los testículos, el epidídimo, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas coagulantes, los que se pesaron en una balanza de precisión. El peso de los órganos se expresó en mg (pesos absolutos) y el de los testículos también en mg/100 g de peso corporal (pesos relativos). Los órganos extraídos se fijaron en paraformaldehído al 4 %, se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se colectó la sangre del tronco y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y posteriormente se separó el suero, que se almacenó a -20°C para la posterior cuantificación de hormonas esteroides y gonadotropinas por radioinmunoanálisis.



## **EVALUACIÓN ESPERMÁTICA**

### **Número de espermatozoides**

Al momento de la autopsia se extrajeron los conductos deferentes, los cuales fueron colocados en tubos Eppendorf que contenían 1000 µl de solución tirodes a una temperatura de 36° C durante 5 minutos en baño maría, posteriormente se maceraron y colocaron en el baño maría durante 2 minutos, (para su posterior filtración), del filtrado se tomó una alícuota de 10 µl y se colocó en la cámara de Neubauer y en 5 cuadrantes se contó el número de espermatozoides, con el uso de un microscopio óptico a 40X. El número de espermatozoides de los 5 cuadrantes se promediaron y los resultados se expresaron como  $1 \times 10^6$  células en 1 ml de líquido espermático.

### **Movilidad**

Para la evaluación de la movilidad se tomó una alícuota de 20 µl del filtrado y se colocó en un portaobjetos. Las muestras fueron evaluadas con la ayuda de un microscopio óptico a 40X. Se consideró espermatozoide móvil aquel que presentó movimientos ondulantes de cola y cabeza e inmóvil aquel que permaneció inerte. Se contaron en total 100 células, se promediaron los resultados de cada grupo experimental para obtener un porcentaje final. Los resultados se expresan como porcentaje de células móviles e inmóviles.

### **Viabilidad**

Se mezclaron 10 µl de la solución espermática con 10 µl de solución azul tripano (0.4 %) (Sigma chemical st. Louis Mo. USA). De esta solución se tomó una alícuota que se colocó en un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos. Las evaluaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio óptico. Se consideró

un espermatozoide vivo aquel en el que no se tiñó la cabeza y espermatozoide muerto aquel que presentó una coloración azulada en la cabeza. Se contaron 100 espermatozoides en total, se promediaron los resultados de cada grupo experimental para obtener un porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

### **Morfología**

Se tomo una alícuota de 10  $\mu$ l de la solución espermática y se colocó en una portaobjetos a la cual se le realizó un barrido con la finalidad de distribuir los espermatozoides en toda la laminilla. La preparaciones se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina. De cada preparación se examinaron 100 espermatozoides con la ayuda de un microscopio óptico y se clasificaron como normales y anormales de acuerdo al criterio de Odeigah 1997. Los resultados se presentaron como porcentaje de formas anormales y normales y porcentaje de cada forma anormal.

### **Cuantificación de esteroides**

La cuantificación de progesterona, testosterona y 17 $\beta$ - estradiol se realizó por medio de la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, para lo cuál se utilizó un kit (Coat-A-Count, USA). La concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/mL y mientras que la concentración de 17 $\beta$ - estradiol en pg/ml. Los coeficientes interensayo e intraensayo utilizados fueron: para progesterona 9.87 y 5.3; para 17 $\beta$ - estradiol 10.8 y 6.9 y para testosterona de 8.1 y 4.1, respectivamente.

### **Cuantificación de gonadotropinas**

La cuantificación de la concentración de FSH y LH en suero se realizó por medio de la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo (Salve y col.,

1994). Los anticuerpos empleados fueron rFSH-<sup>125</sup>I-RP2 y RIh-<sup>125</sup>I-RP2 respectivamente, proporcionados por el National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). La concentración de ambas hormonas se expresó en ng/ml. Los coeficientes interensayo e intraensayo utilizados fueron: para FSH 9.3 y 5.74 y para LH 6.82 y 7.9, respectivamente.

### **Estudio histológico**

Los testículos se deshidrataron y se incluyeron en parafina, y se realizaron cortes seriados de 7 µm de grosor. Los cortes histológicos de los testículos fueron teñidos con la técnica de PAS-hematoxilina, para el posterior análisis de las etapas del ciclo del epitelio seminífero siguiendo el criterio descrito por Russell y col. (1990).

### **Cuantificación de serotonina.**

Al momento de la autopsia se extrajo el cerebro, se colocó en solución salina fría (0°C) y se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente se realizaron cortes coronales del cerebro para la disección del hipotálamo anterior, medio y posterior; y de los núcleos dorsal y medio del rafe siguiendo como referencia las coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson (1982) (Figura 8). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta la cuantificación de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA).

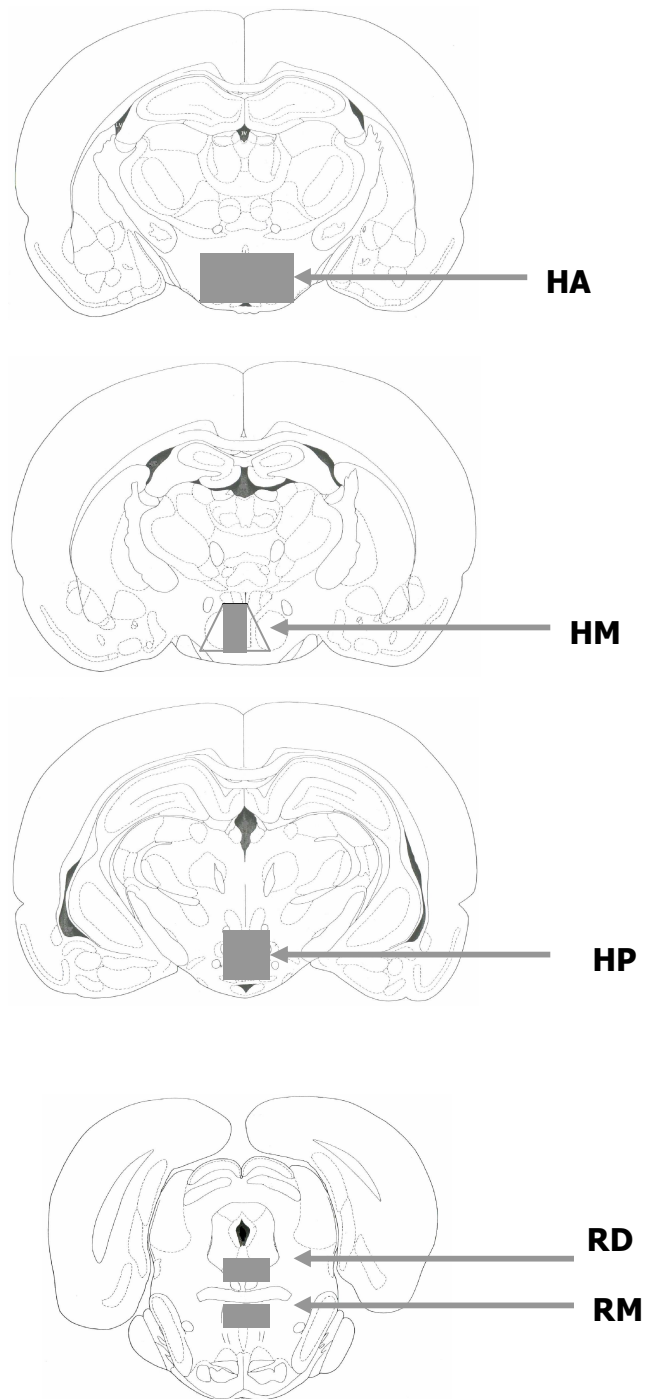
La cuantificación de serotonina se realizó por la técnica de cromatografía de líquidos de alta precisión. En el día de la cuantificación las muestras de hipotálamo se pesaron y homogenizaron en 300 µl de ácido perclórico al 0.1 N, se centrifugaron a 12,500 rpm, a -4 °C durante 30 minutos, el sobrenadante se filtró usando filtros de celulosa regenerada de tamaño de poro de 0.2 µm, y se inyectaron 20 µl del filtrado al sistema de cromatografía.

La sensibilidad del ensayo para la detección de cada uno de los neurotransmisores y sus metabolitos fue de 0.01 ng. Las monoaminas y sus metabolitos fueron identificados y cuantificados por un integrador Nelson 1020 (Perkin Elmer, México). El equipo identificó a los neurotransmisores por sus tiempos de retención y se realizó el cálculo al comparar el área bajo la curva de los picos de la muestra problema con el área bajo la curva de sus respectivos estándares. La concentración de los neurotransmisores se expresó en ng/mg de tejido y la actividad de la neurona serotoninérgica se calculó siguiendo la relación de Kerdelhué y col. (1989) y Shannon y col. (1986).

$$\text{Actividad neuronal} = [\text{Metabolito}] / [\text{Neurotransmisor}]$$

### **Análisis estadístico**

Los resultados de pesos de órganos, concentraciones de gonadotropinas (FSH y LH), hormonas esteroides sexuales, serotonina, metabolito y actividad neuronal de la neurona serotoninérgica, fueron analizados por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. El número de etapas del ciclo del epitelio seminífero y la producción de espermatozoides (movilidad y viabilidad) se analizó por la prueba de ji cuadrada y el número de espermatozoides se analizó por la prueba de "U" de Mann-Whitney. En todos los casos sólo se consideró como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor a 0.05.

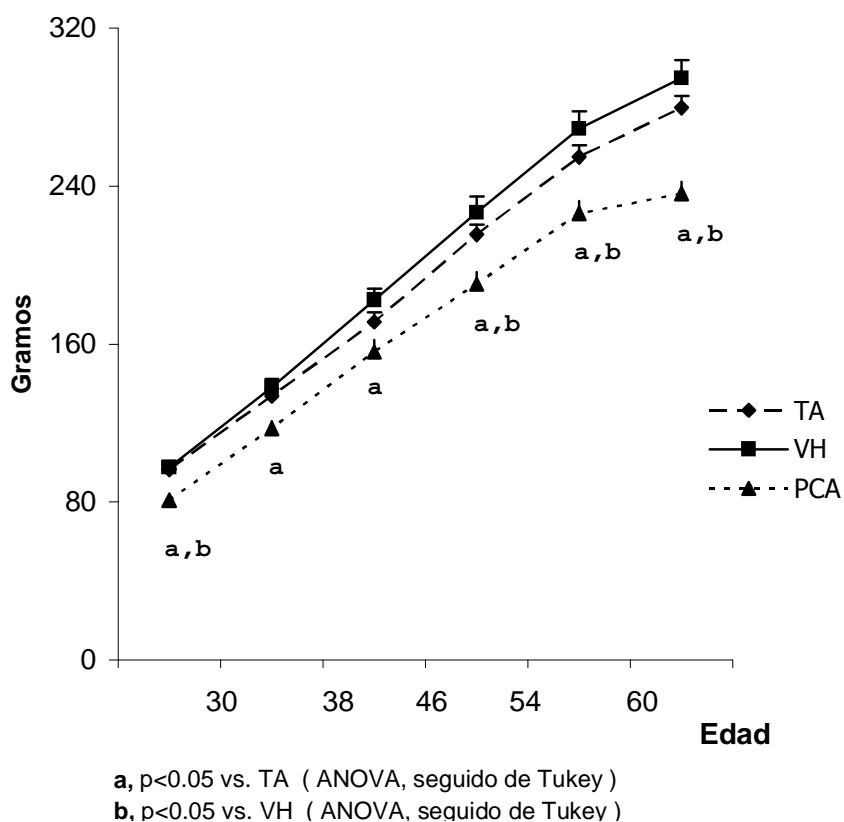


**Figura 8. Esquema de cortes coronales de cerebro de la rata macho, donde se muestra la localización del hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM), hipotálamo posterior (HP), rafé dorsal (RD) y medial (RM) (Modificado de Paxinos y Watson, 1982)**

## RESULTADOS

## Peso corporal y de órganos

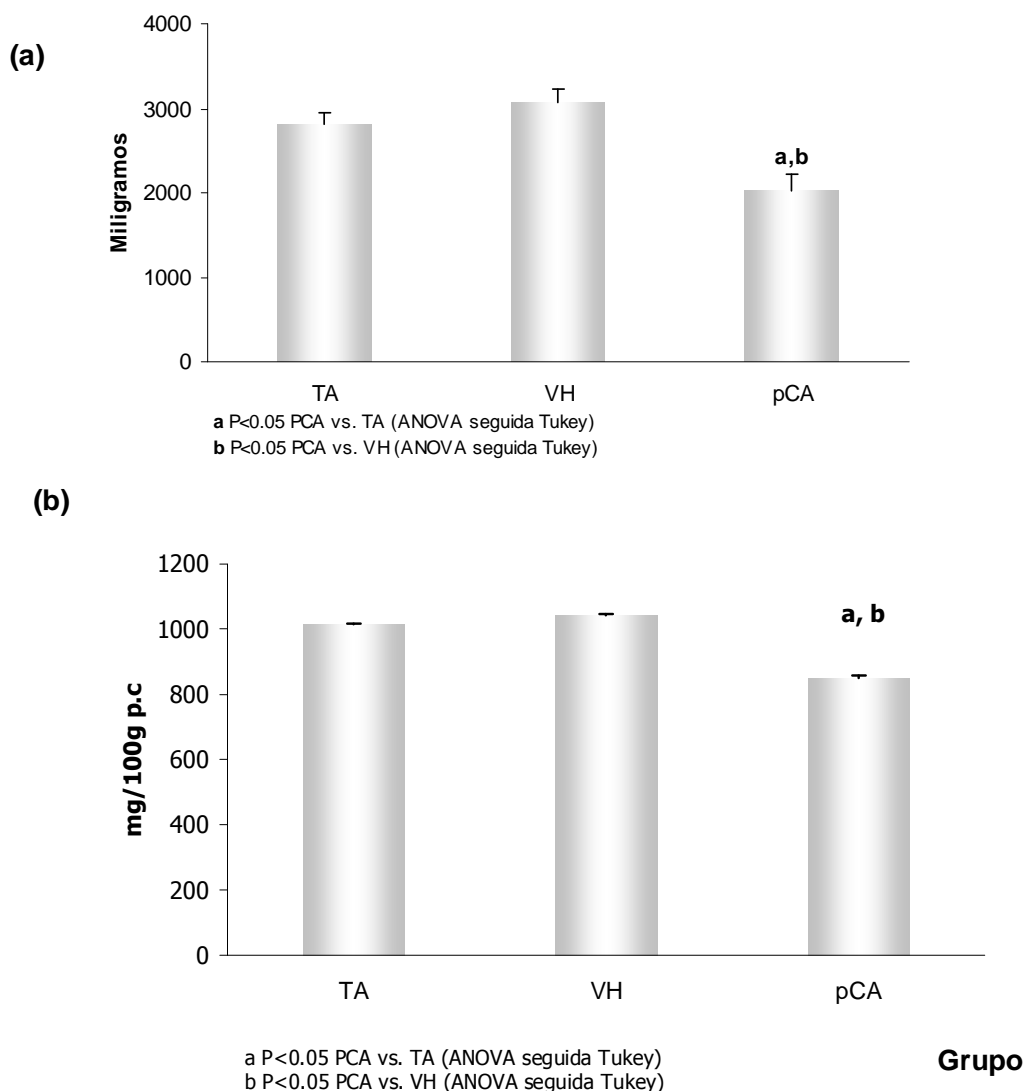
En la figura 9 se muestra el peso corporal de ratas macho, testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH), o con p-cloroanfetamina (pCA). La administración de VH no modificó el peso corporal de los animales durante el tiempo de tratamiento. En los animales que recibieron pCA el peso corporal fue menor que el TA y del grupo tratado con vehiculo durante todo el tiempo que duró el tratamiento.



**Figura 9. Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**

## Resultados

En la figura 10 se muestran los resultados del análisis del peso testicular de los animales de los diferentes grupos experimentales. Se observa que la administración de VH no modificó el peso absoluto, ni el relativo de estos órganos. En el grupo que recibió pCA el peso absoluto y relativo de los testículos fue significativamente menor que en el grupo de animales TA o que recibieron VH.



**Figura 10. Media  $\pm$  e.e.m. del peso absoluto (a) y relativo (b) de los testículos en de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg de p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**

---

---

## Resultados

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en los animales que recibieron VH no se modificó el peso del epidídimo, próstata, vesícula seminal y glándulas coagulantes, mientras que, en los animales que recibieron pCA se observó la disminución del peso de todos estos órganos (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los epidídimos, la próstata, la vesícula seminal y las glándulas coagulantes (mg) de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**

GRUPO	n	Masa del epidídimo	Próstata	Vesícula Seminal	Glándulas coagulantes
TA	10	588 $\pm$ 25	446 $\pm$ 62	292 $\pm$ 24	134 $\pm$ 11
VH	9	610 $\pm$ 50	547 $\pm$ 38	339 $\pm$ 31	126 $\pm$ 10
pCA	11	433 $\pm$ 30 a,b	348 $\pm$ 40 a,b	252 $\pm$ 15 a,b	118 $\pm$ 10 a,b

a, p<0.05 vs. TA (ANOVA, seguida de Tukey)

b, p<0.05 vs. VH (ANOVA, seguida de Tukey)

## Espermatogénesis

En la figura 11 se presentan los resultados de número de espermatozoides cuantificados en los conducto deferente en los diferentes grupos experimentales. En

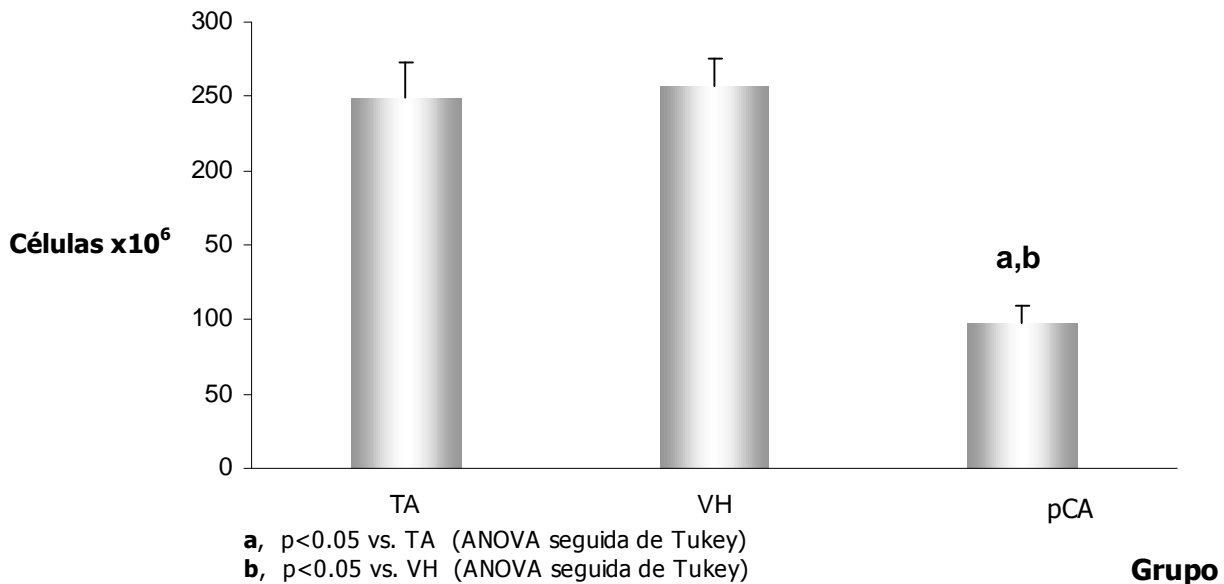


---

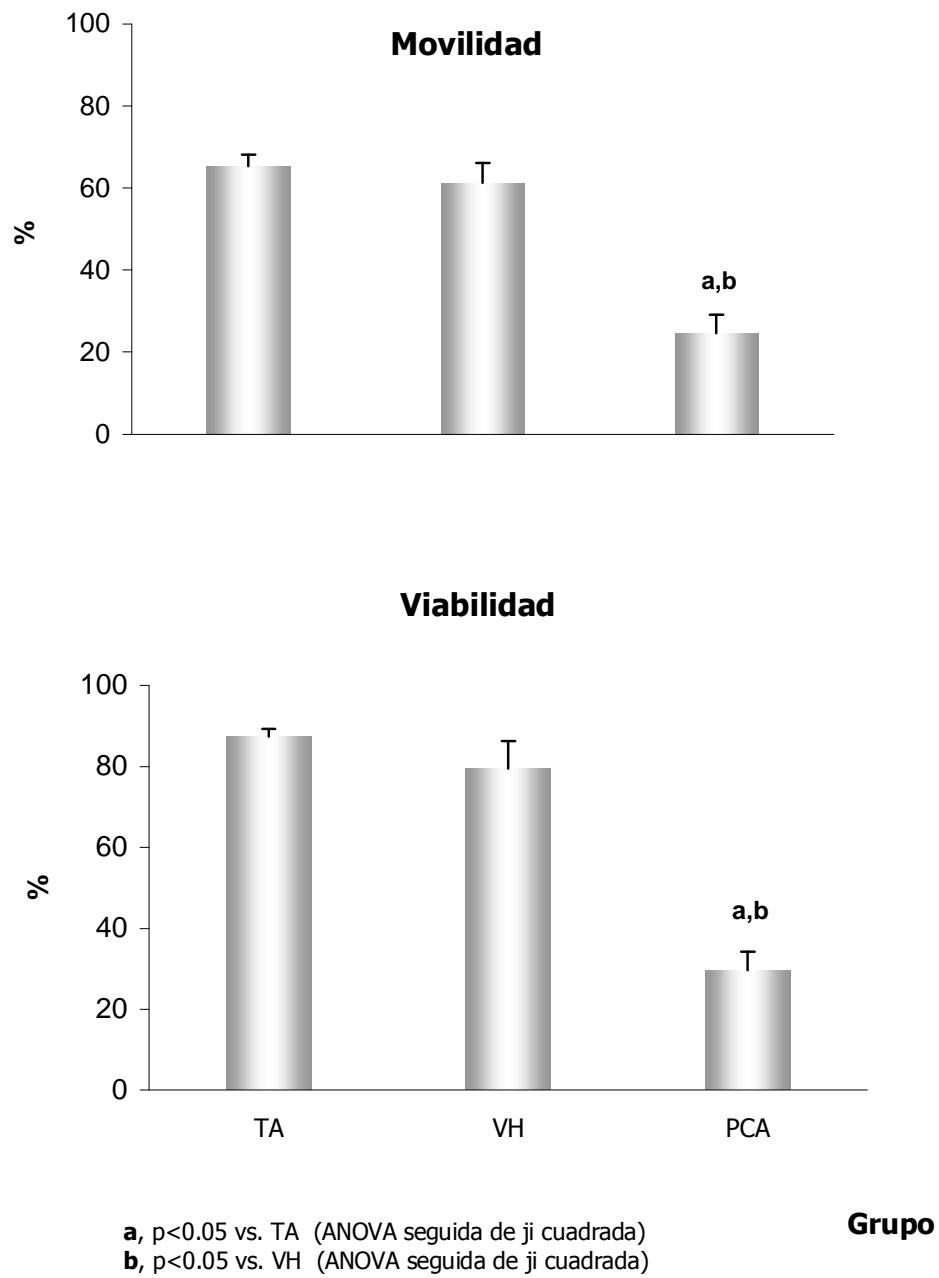
---

### Resultados

los animales que fueron tratados con VH, el número de espermatozoides (figura 11), así como el porcentaje de espermatozoides móviles y viables (Figura 12) fue similar al grupo de animales testigo absoluto, mientras que en los que recibieron pCA estos parámetros fueron significativamente menores.



**Figura 11. Media ± e.e.m. del número de espermatozoides (1X10<sup>6</sup>) de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/Kg de p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**

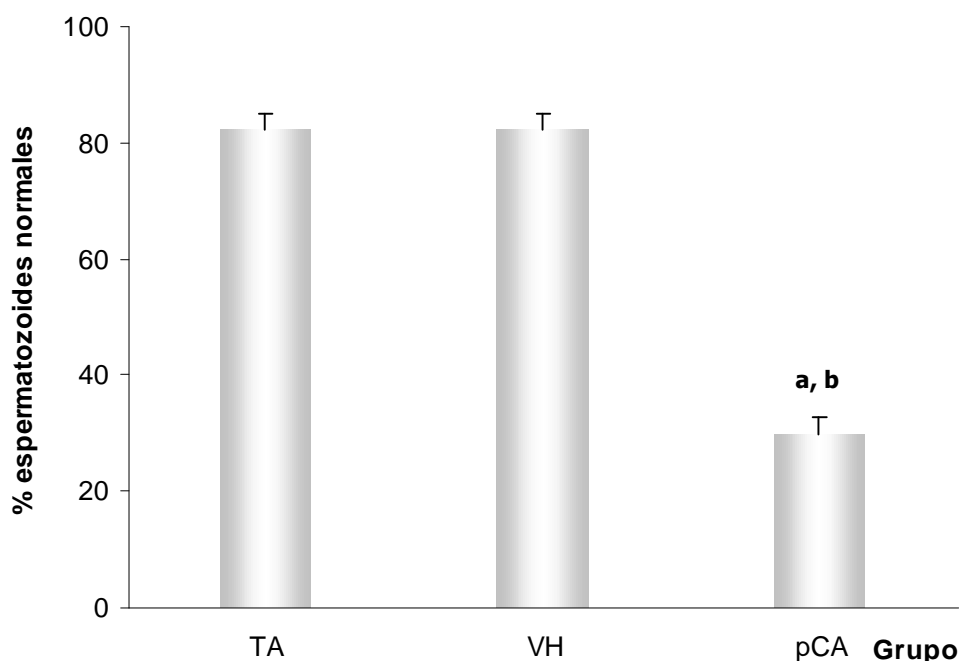


**Figura 12. Media  $\pm$  e.e.m. del porcentaje de espermatozoides móviles y viables en ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/Kg de p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**

---

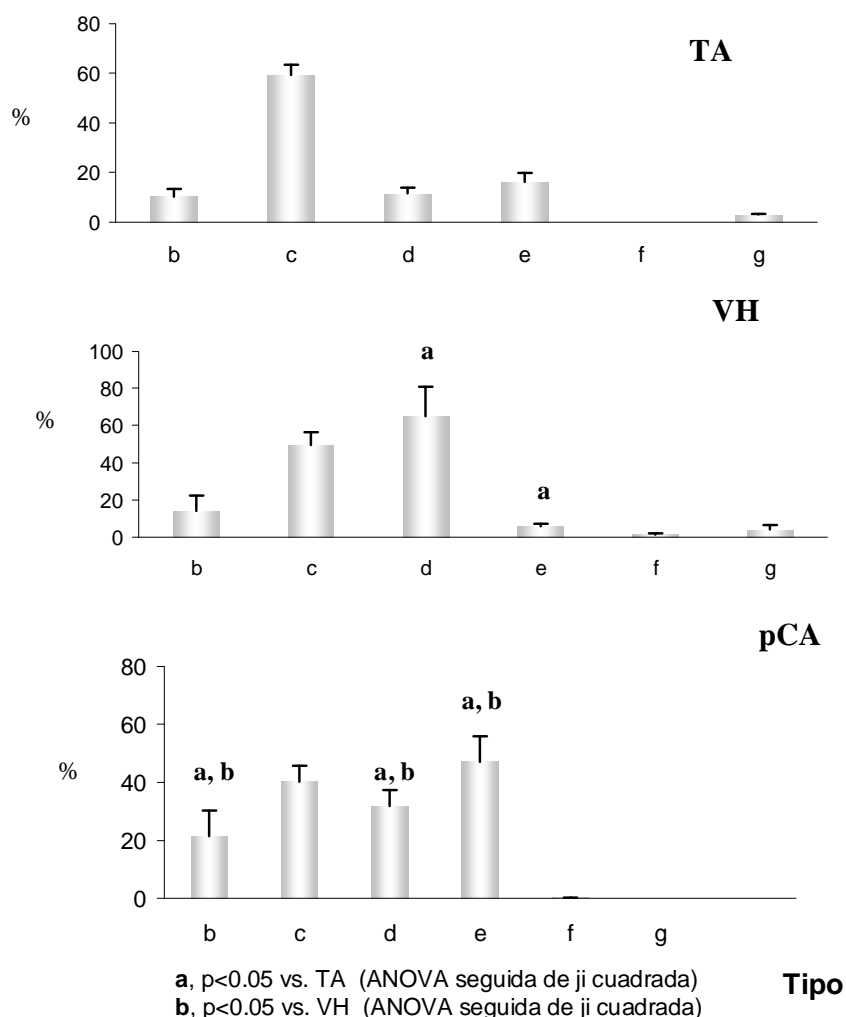
## Resultados

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto (TA) en los que recibieron solución salina no se modificó el porcentaje de espermatozoides normales (según la clasificación de Odeigah, 1977). El tratamiento con PCA resultó en la disminución del porcentaje de espermatozoides con morfología normal (Figura 13 y 14). Las anomalías en el espermatozoide más evidente fueron: cabeza en forma de alfiler, cabeza corta, cabeza larga (Figura 14).



a,  $p < 0.05$  vs. TA (ANOVA seguida de ji cuadrada)  
b,  $p < 0.05$  vs. VH (ANOVA seguida de ji cuadrada)

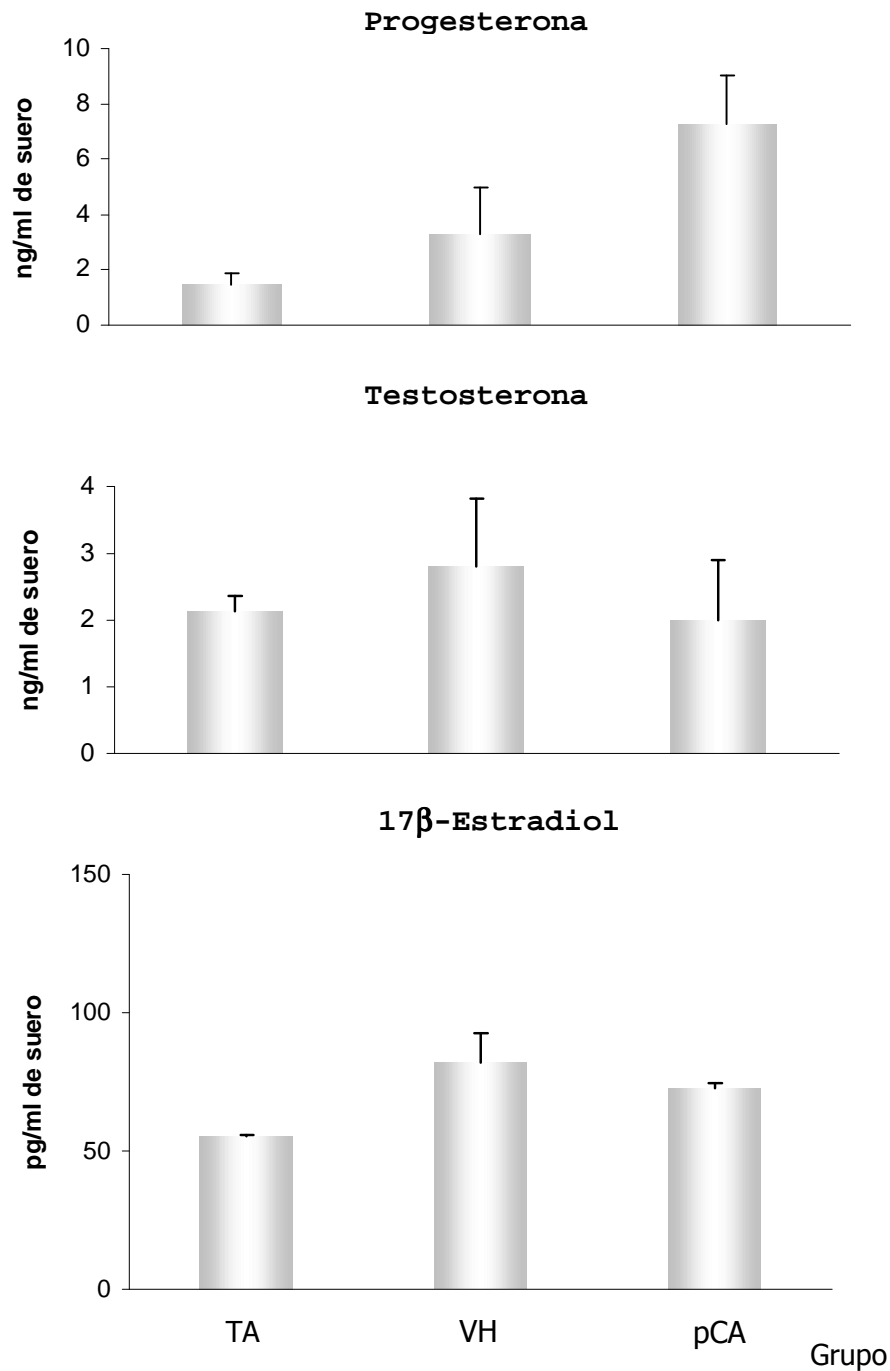
**Figura 13. Porcentaje de espermatozoides normales en ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con vehículo (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**



**Figura 14. Porcentaje de espermatozoides anormales en ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con vehículo (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad. b) cabeza en forma de alfiler; c) cabeza corta; d) cabeza larga; e) cabeza con ángulo agudo; f) cabeza de forma irregular; g) acrosoma ancho.**

### Concentración de hormonas esteroides y gonadotropinas

En comparación con los grupos de animales TA o que recibieron VH, en los animales inyectados con pCA se observó el incremento en la concentración sérica de progesterona la que no llegó a ser significativa. Las concentraciones del 17β-estradiol y de la testosterona no presentaron cambios en los diferentes grupos experimentales (Figura 15).

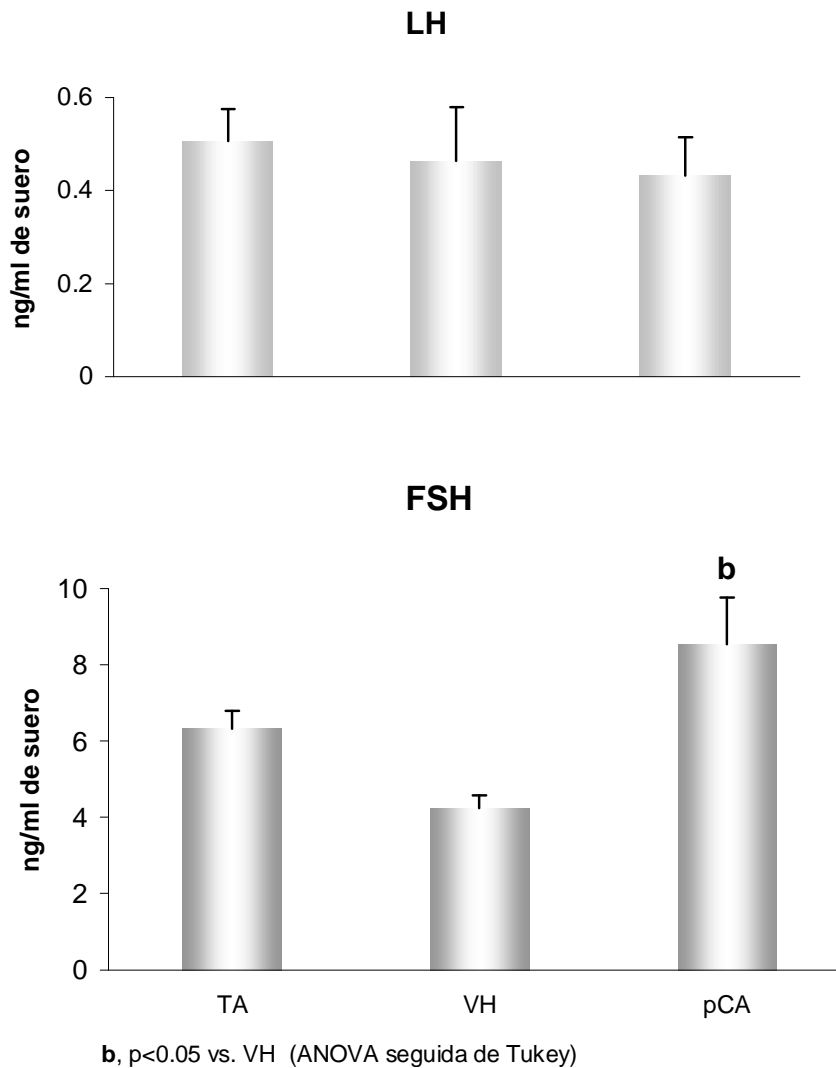


**Figura 15. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de progesterona, testosterona y 17 $\beta$ -estradiol en suero de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**

---

## Resultados

En comparación con el grupo de animales TA o que recibieron VH en los animales tratados con pCA no se modificó la concentración sérica de LH. En cambio la concentración de FSH se incrementó de manera significativa (Figura 16).

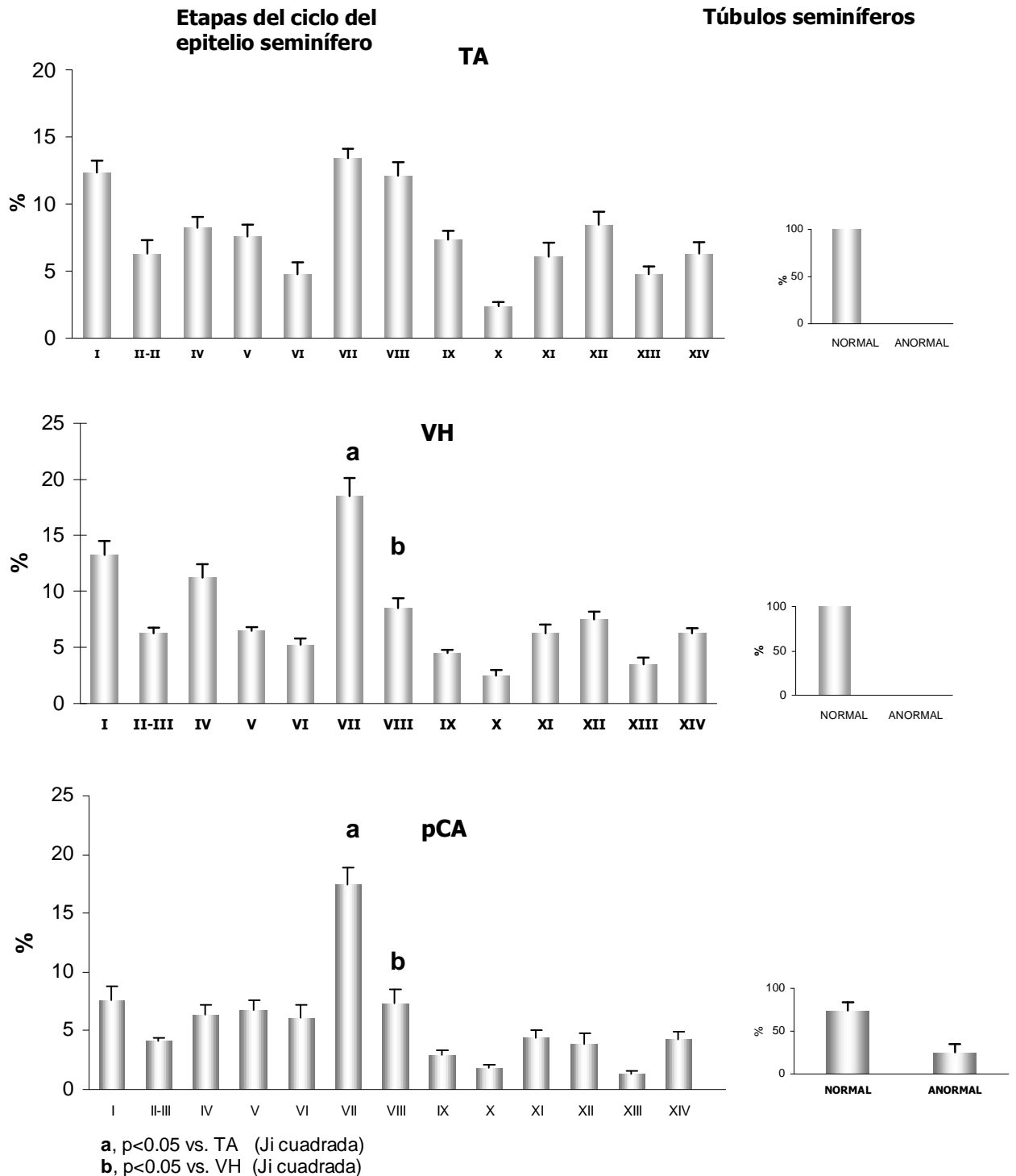


**Figura 16. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) en suero de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**

### **Análisis histológico de las etapas del ciclo del epitelio seminífero**

En los testículos de los grupos testigos absoluto y tratados con solución salina se identificaron las XIV etapas del ciclo del epitelio seminífero con un arreglo celular normal según la clasificación descrita por Russel y col. (1990) (Figura 17).

Los animales que recibieron pCA se observó una disminución en el porcentaje de túbulos seminíferos normales y por lo tanto en el porcentaje de las etapas del ciclo del epitelio seminífero. Esta disminución se observó en las primeras etapas (I,II-III), que son las etapas iniciales en las cuales se llevan a cabo diferentes divisiones que dan como resultado espermátides en etapas tempranas de su desarrollo, aunque existen alteraciones en todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero. También, se observó un incremento en la etapa VII que es la etapa en la cual se observan espermatozoides en la luz del túbulo seminífero. El análisis cuantitativo mostró un incremento en el porcentaje de túbulos anormales, en los cuales se observaron alteraciones en el diámetro del túbulo seminífero, alteraciones en el lumen y ausencia de algunos tipos celulares (espermátides y espermatozoides principalmente) (Figura 17).

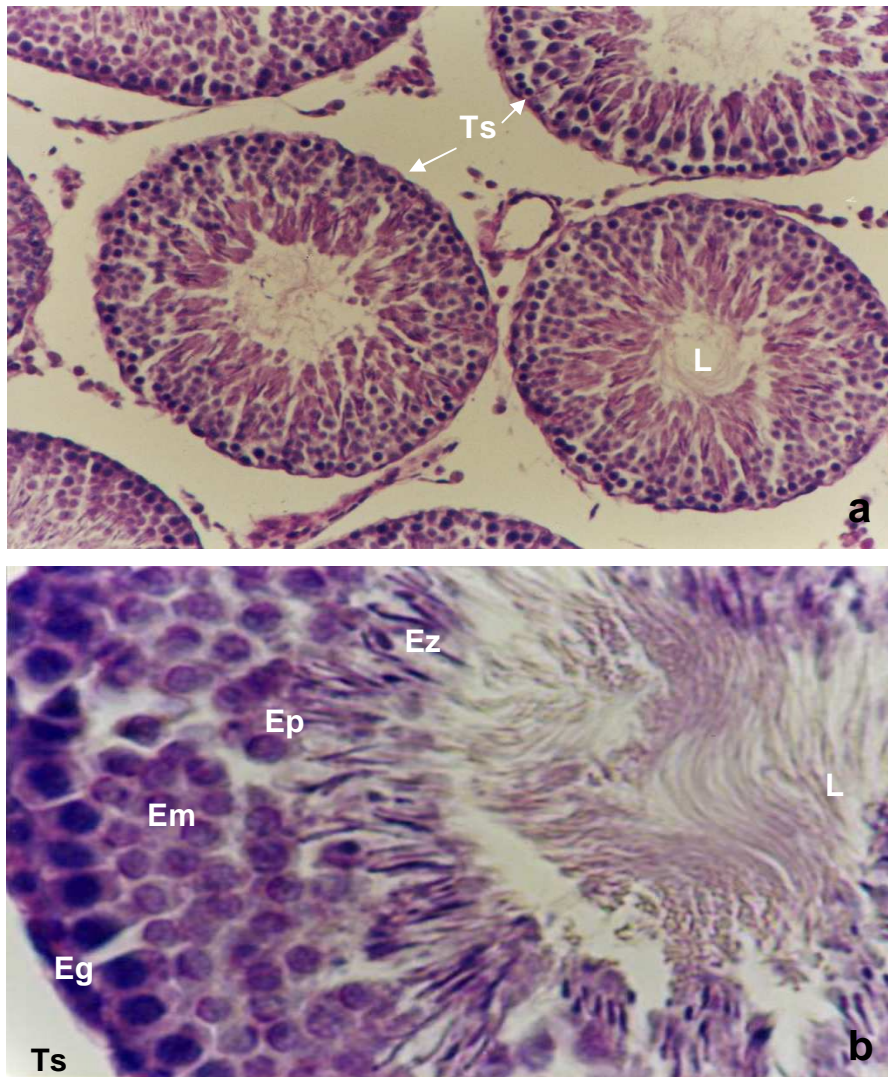


**Figura 17. Media ± e.e.m. del porcentaje de etapas del ciclo del epitelio seminífero y de los túbulos normales y anormales de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina o con 10 mg/Kg de p.c de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**



### **Análisis histológico**

En la figura 18 se observan fotomicrografías de túbulos seminíferos (Ts) normales en animales TA, en las que se observan los diferentes tipos celulares del ciclo del epitelio seminífero como son espermatogonias, espermatocitos, espermatídes, espermátides, espermatozoides y la luz del túbulo seminífero en diferentes etapas de desarrollo.

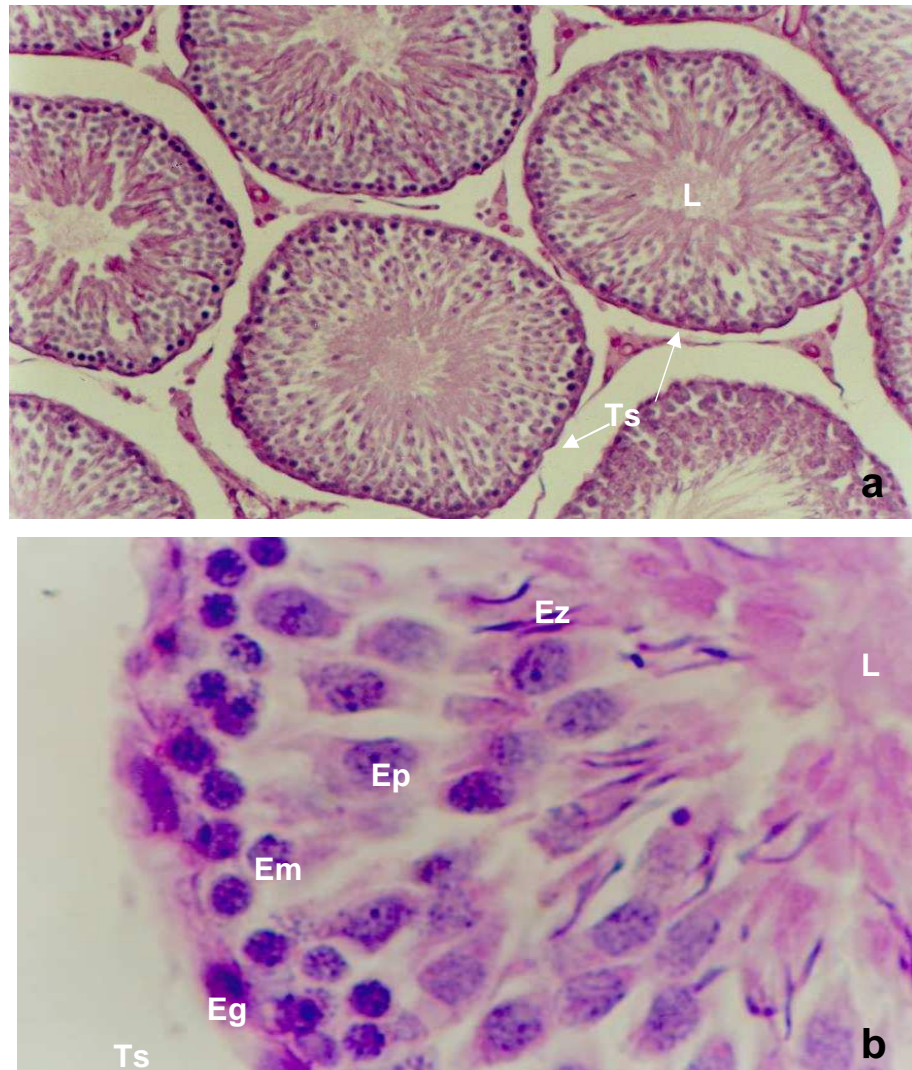


**Figura 18. Fotomicrografías de túbulos seminíferos de ratas macho testigo absoluto (TA) sacrificadas a los 65 días de edad. Aumento a 10X (a); aumento a 40X (b). Espermatogonias (Eg), Espermatides (Em), Espermatocitos (Ep) y Espermatozoides (Ez), Túbulos seminíferos (Ts), Lumen del túbulo (L).**

---

*Resultados*

En la figura 19 se observan fotomicrografías de túbulos seminíferos normales en animales que recibieron VH, en las que se observan los diferentes tipos celulares del ciclo del epitelio seminífero como son espermatogonias, espermatocitos, espermatides, espermatozoides y la luz del túbulo seminífero en diferentes etapas de desarrollo.



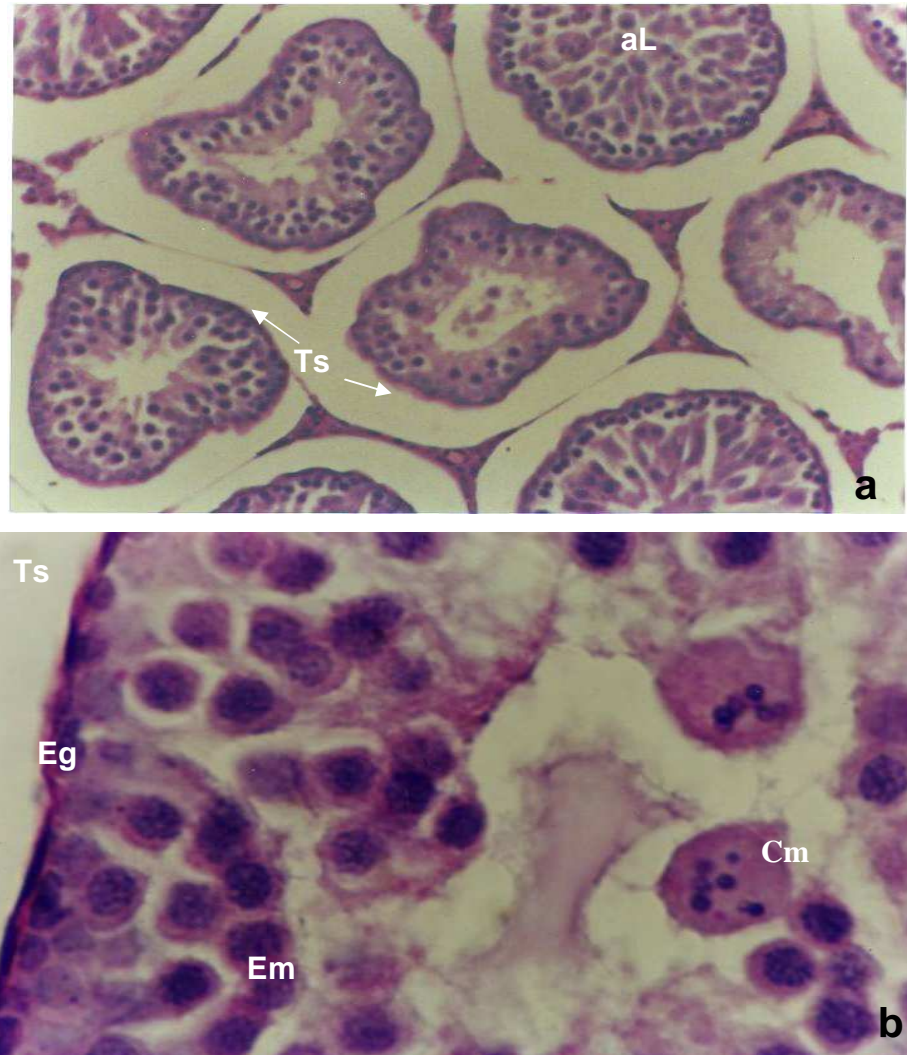
**Figura 19. Fotomicrografías de túbulos seminíferos de ratas macho tratada con solución salina (VH) sacrificadas a los 65 días de edad en el que se muestran diferentes tipos celulares. Aumento a 10X (a); aumento a 40X (b). Espermatogonias (Eg), Espermatides (Em), Espermatocitos (Ep) y Espermatozoides (Ez), Túbulos seminíferos (Ts), Lumen del túbulo (L).**



---

*Resultados*

En la figura 20 se observan fotomicrografías de túbulos seminíferos anormales de animales que recibieron pCA. La administración de la anfetamina resultó en la ausencia de tipos celulares como son espermátides, espermatozoides y en algunos casos se identificaron células multinucleadas. Así mismo se observó la falta de luz tubular en algunos túbulos.



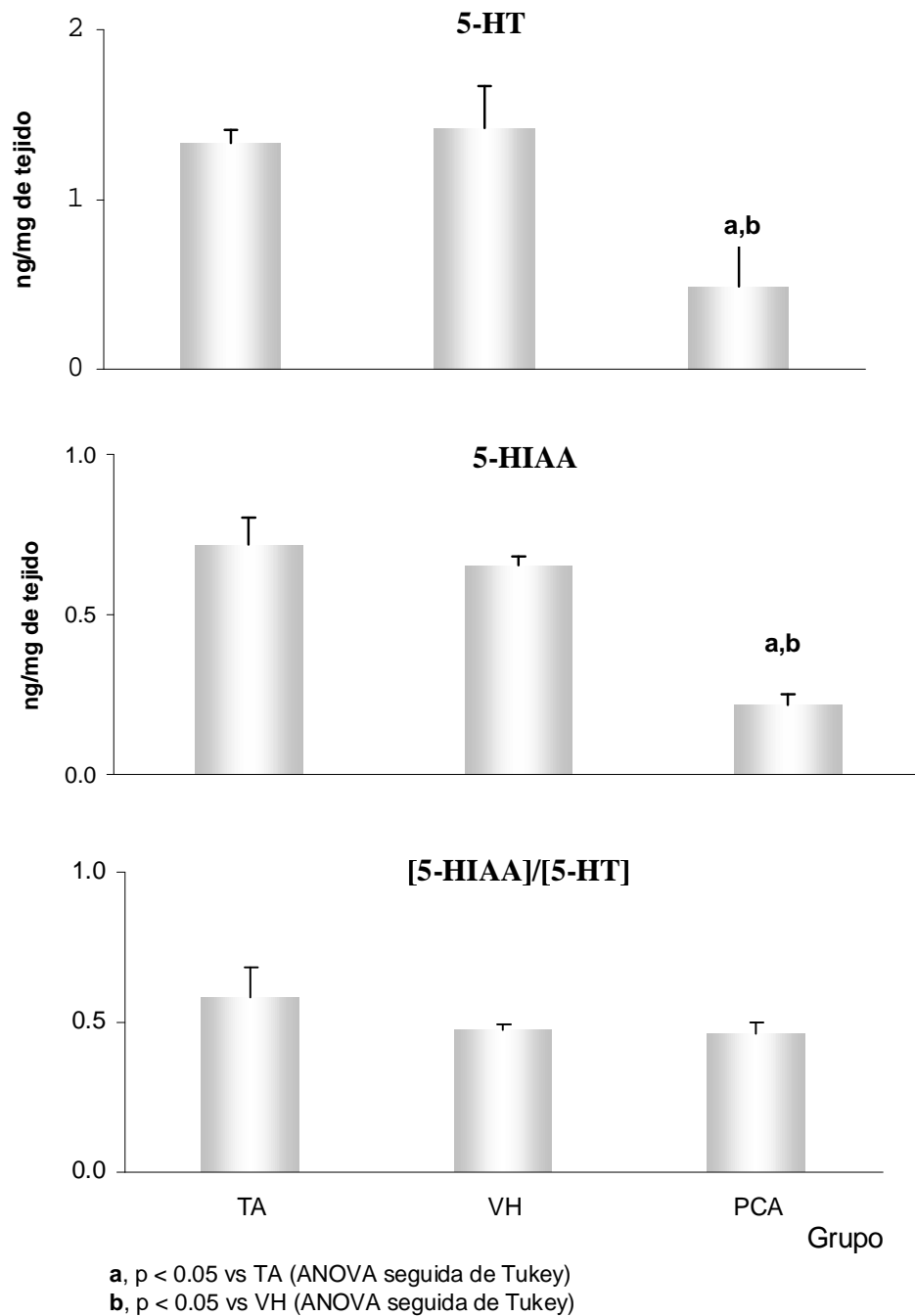
**Figura 20. Fotomicrografías de túbulos seminíferos de ratas macho tratadas con 10 mg/kg de p.c. de p-Clorofetamina (pCA) sacrificadas a los 65 días de edad. Aumento a 10X (a); aumento a 40X (b). Espermatogonias (Eg), Espermatides (Em), Túbulos seminíferos (Ts), Ausencia del lumen (a), Células multinucleadas (Cm).**

**Concentración de serotonina y ácido 5- hidroxindolacético**

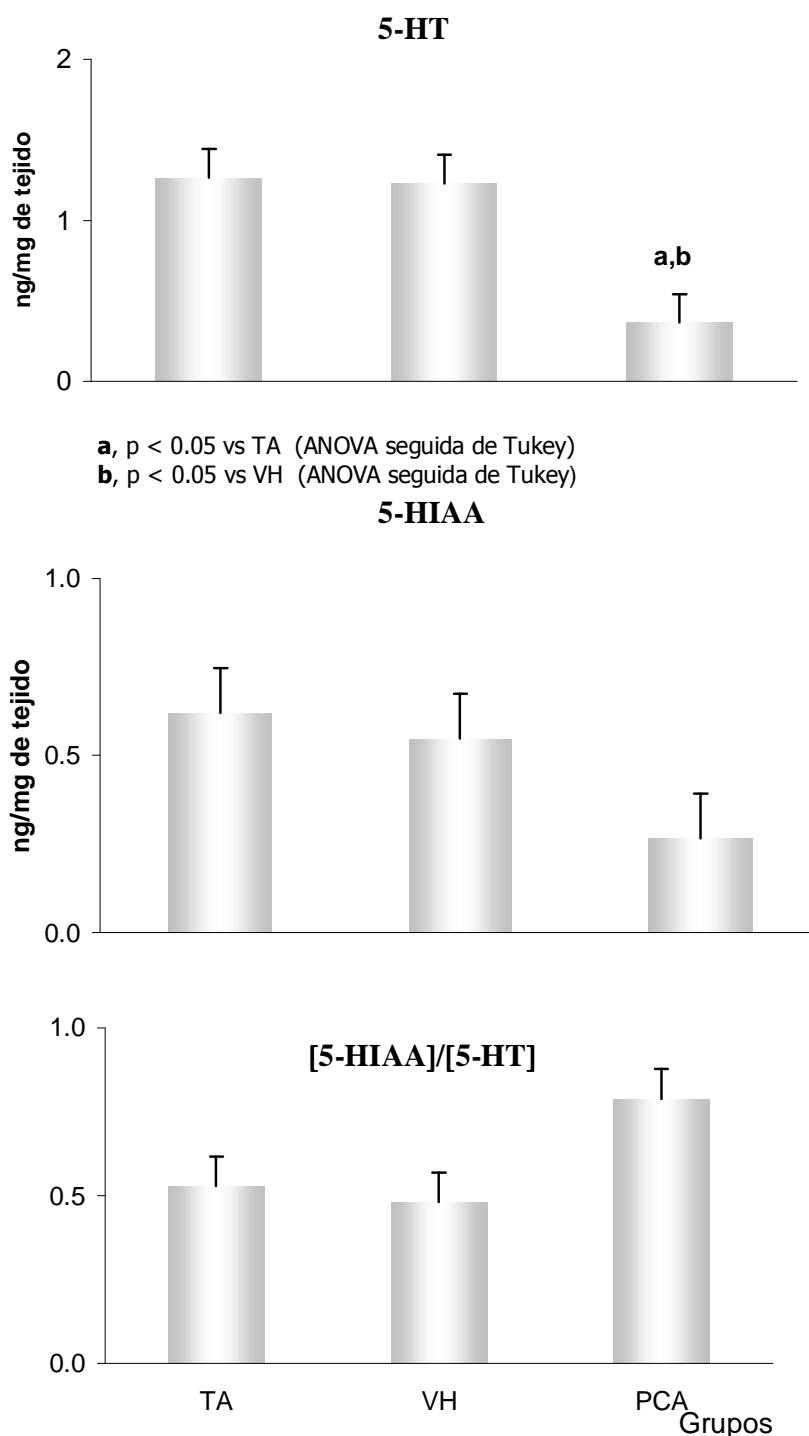
En comparación con el grupo testigo absoluto, en los animales que fueron tratados con solución salina las concentraciones de serotonina, del 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] no se modificaron en el hipotálamo anterior, medio y posterior. En los animales que recibieron PCA la concentración de serotonina y su metabolito disminuyó en estas regiones del hipotálamo. La relación [5-HIAA]/[5-HT] no se modificó de manera significativa (Figuras 21, 22 y 23).

En el núcleo dorsal del rafe de los animales que recibieron solución salina (VH), las concentraciones de serotonina y del 5-HIAA fueron menores que en el grupo TA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] no se modificó. La administración de PCA resultó en el incremento en la concentración de serotonina y del 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] fue menor que en el grupo que recibió solución salina (Figura 24).

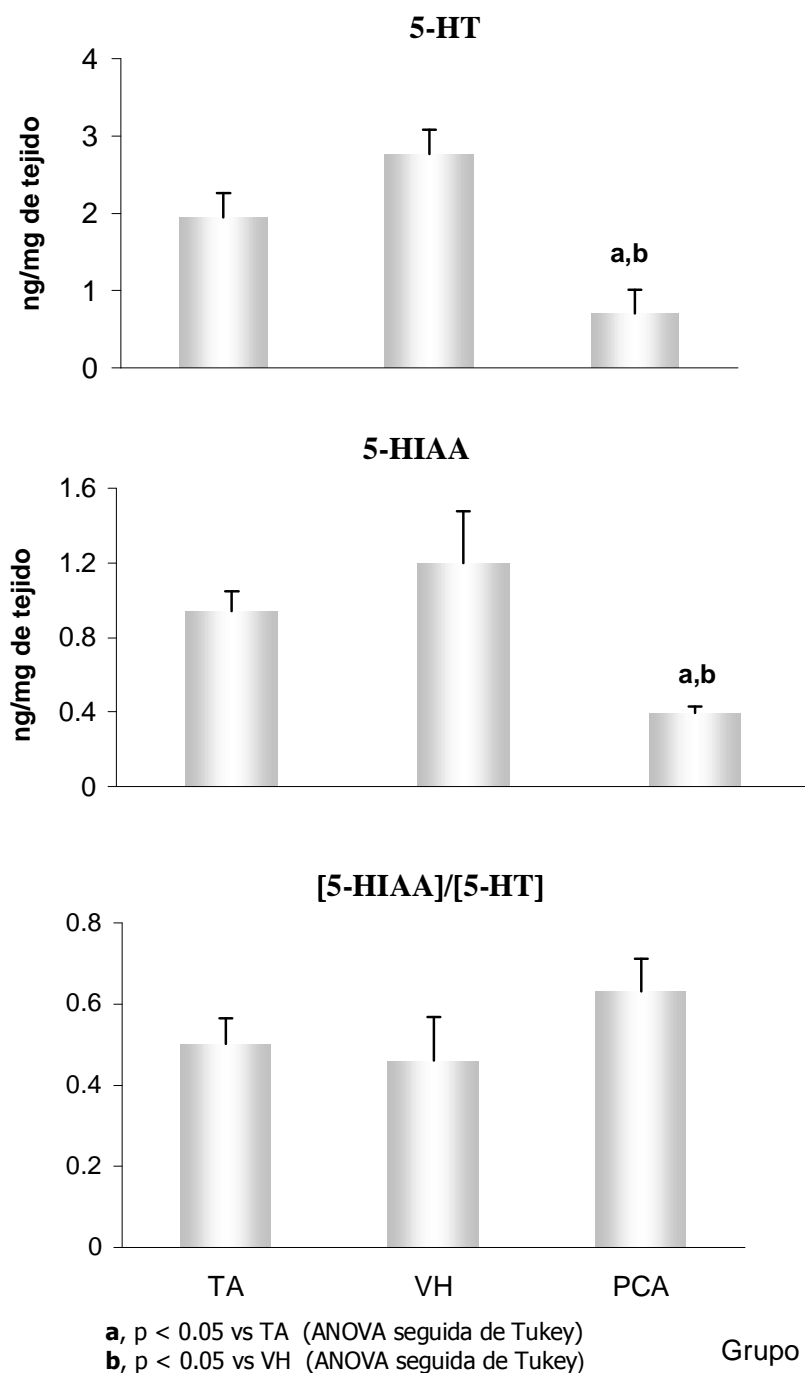
En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en el rafe medial de los animales que recibieron VH no se modificó la concentración del 5-HT, 5-HIAA ni la relación [5-HIAA]/[5-HT], mientras que en los animales que se inyectaron con PCA la concentración de serotonina fue mayor que en el grupo testigo absoluto y la relación [5-HIAA]/[5-HT] presentó un comportamiento inverso (Figura 25).



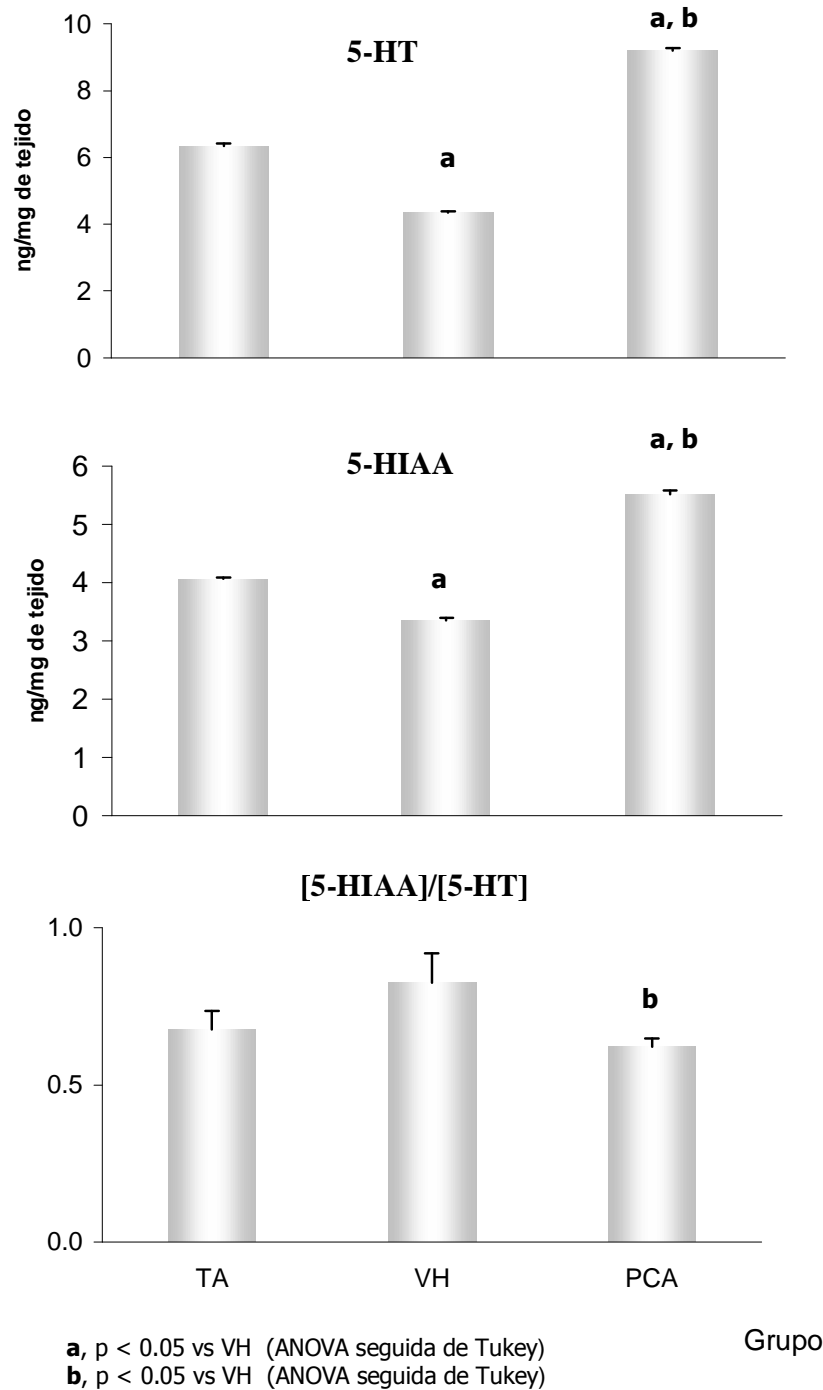
**Figura 21. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido hidroxindolacético (5-HIAA) y la relación [5-HIAA]/(5-HT) en el hipotálamo anterior de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**



**Figura 22. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido hidroxindolacético (5-HIAA) y la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo medio de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**

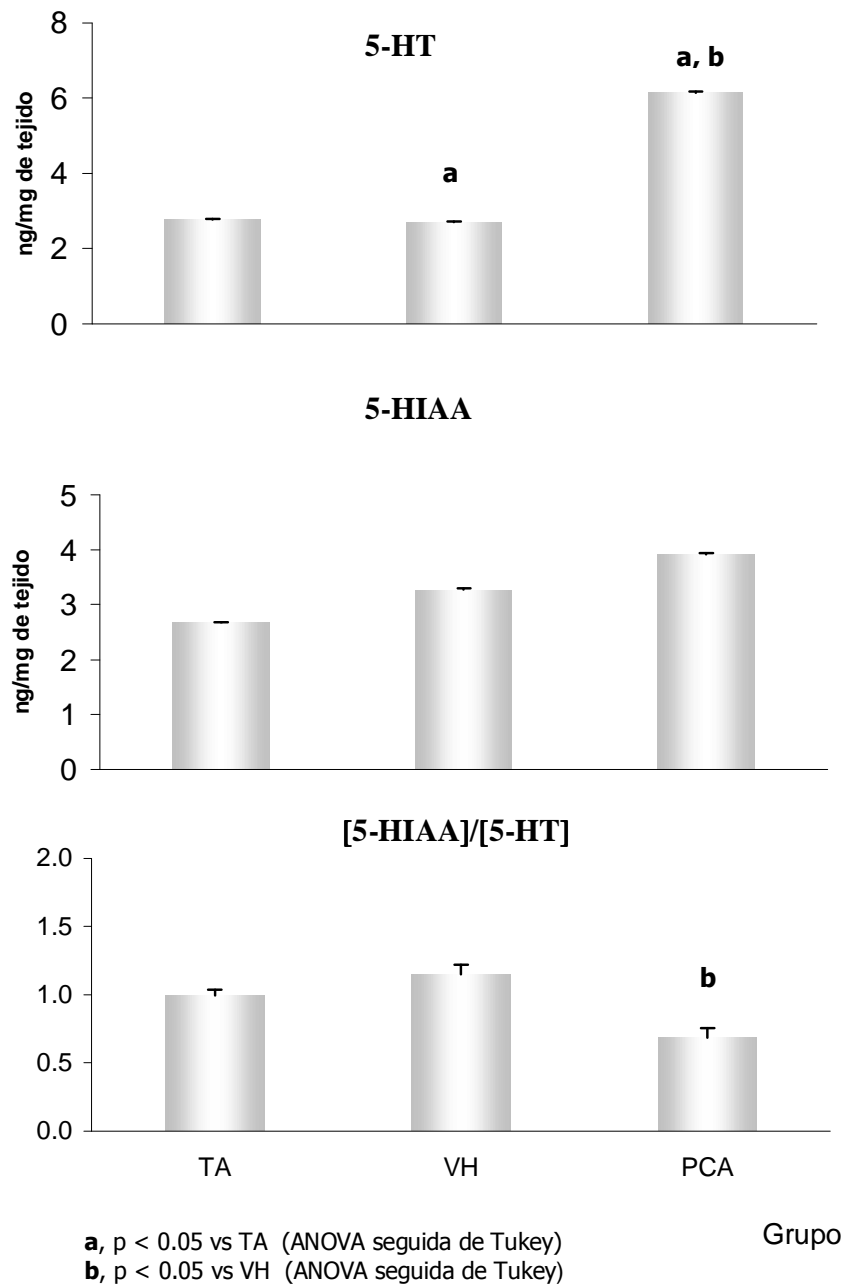


**Figura 23. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido hidroxindolacético (5-HIAA) y la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo posterior de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**



**Figura 24. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido hidroxindolacético (5-HIIA) y la relación [5-HIIA]/(5-HT) en el núcleo dorsal del rafé de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.**





**Figura 25. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido hidroxindolacético (5-HIAA) y la relación [5-HIAA]/(5-HT) en el núcleo medial del rafé de ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/kg p.c. de p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificadas a los 60 días de edad.**

## **DISCUSIÓN**

Los resultados de este estudio nos permiten sugerir que el sistema serotoninérgico participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la espermatogénesis. La disminución en el peso del testículo, del número de espermatozoides, y del porcentaje de movilidad, así como las alteraciones en la estructura del ciclo del epitelio seminífero, apoyan esta interpretación.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con pCA a partir de los 30 días de edad, provocó la disminución del peso de los testículos. Estos resultados nos permiten pensar que en esta etapa y hasta el inicio de la pubertad de la rata macho, el sistema serotoninérgico participa de manera estimulante en los mecanismos que regulan el desarrollo de este órgano y sus funciones; ya que observamos que el bloqueo en la síntesis de serotonina disminuye el peso de la gónada y de otros componentes del aparato reproductor del macho (próstata, vesícula seminal, epidídimo). Algunos autores han mostrado que cuando se administra serotonina o un agonista de los receptores a serotonina 5-HT<sub>2</sub> se induce el incremento del peso de los testículos (Piner y col., 2002; Shiskina y Dygalo, 2000). Con base en los resultados de nuestro estudio y los reportados por otros autores es posible pensar que la serotonina es uno de los factores que regulan el desarrollo del testículo y mantienen su estructura y funcionamiento.

La disminución del peso del testículo observada en los animales que recibieron pCA posiblemente está asociada a la atrofia del túbulo seminífero y a la disminución de algunos elementos celulares que se observaron en este compartimiento de la gónada. Collu y col., (1974) previamente mostraron que existe una relación entre el peso de la gónada y alteraciones en los tipos celulares presentes en el epitelio del túbulo seminífero.

La administración de pCA resultó en la disminución en el proceso de espermatogénesis, evaluado por disminución del número de espermatozoides, por el porcentaje de espermatozoides móviles y viables. Se ha mostrado que en el epidídimo existen grupos de células que sintetizan la serotonina y que en este órgano la amina interviene en la regulación de los procesos de maduración espermática (Rodríguez, 2003) y que en este órgano se induce la fosforilación de proteínas que modulan la movilidad del espermatozoide (Eddy y O'Brien 1994). Con base en las evidencias antes mencionadas, es posible que la anfetamina afectó el proceso de síntesis de la serotonina y como consecuencia la función del epidídimo, lo que se reflejó en la disminución del número de espermatozoides móviles.

Se sugiere que la producción de fluido en el túbulo seminífero es alta entre las etapas VI y VIII del ciclo del epitelio, lo que se asocia con el incremento del diámetro del lumen del túbulo (Sharpe, 1989). Al parecer el incremento en el diámetro del lumen depende de la presencia en el epitelio seminífero de espermátides elongadas (Wing y Christensen, 1982). Estas células estimulan la producción del fluido, así como de diferentes proteínas por las células de Sertoli (Sharpe, 1989). Las evidencias antes mencionadas nos permiten pensar que la disminución de las espermátides alargadas en los túbulos se reflejó en la menor producción de espermatozoides y la ausencia del lumen en algunos túbulos en los animales que recibieron la anfetamina.

La idea de que existe una estrecha relación entre la presencia de los diferentes tipos celulares en el epitelio seminífero y la producción de espermatozoides es apoyada por los resultados de Kainz y col., (1988). Estos autores han mostrado que las variaciones del ciclo del epitelio seminífero, en particular al inicio del desarrollo de la espermatogénesis, se ve reflejada en una baja producción de espermatozoides.

Se ha mostrado que el peso, la estructura y el funcionamiento del testículo, así como el de los otros órganos del aparato reproductor del macho, son regulados por diferentes hormonas, entre las que se encuentran las gonadotropinas y los andrógenos (Spilman y col., 1976; Sharpe, 1994). En nuestro estudio los cambios observados en los testículos, la espermatogénesis y en el ciclo del epitelio seminífero en los animales que recibieron la anfetamina, se acompañaron del incremento en la concentración de FSH y sin cambios en la producción de LH y de testosterona. Estos resultados llevan a sugerir que posiblemente la serotonina ejerce un efecto modulador en la secreción de la GnRH y de la FSH. Esta idea ha sido propuesta previamente por Becú-Villalobos y col. (1989), Justo y col. (1989).

La posibilidad de que la PCA actuó en el sistema nervioso central y en particular en el hipotálamo, donde se encuentran los somas de las neuronas que producen la GnRH, es apoyada por la disminución en las concentraciones de serotonina y del ácido 5-HIAA observada en las tres regiones del hipotálamo de los animales que recibieron la anfetamina. Estas modificaciones en el sistema serotoninérgico posiblemente son el reflejo de la disminución en el proceso de síntesis de este neurotransmisor. Estudios experimentales han mostrado que la p-Cloroanfetamina inhibe la actividad de la enzima triptofano-hidroxilasa, que es la primera enzima que interviene en el proceso de síntesis de esta amina (Sanders-Bush y col., 1972).

El incremento en la concentración de serotonina y del 5-HIAA observado en los núcleos dorsal y medial del rafé en los animales que recibieron la anfetamina, posiblemente sea el reflejo de la intercomunicación que existe entre los diferentes núcleos del rafé (dorsal, medial y del puente), como se ha mostrado en diversos estudios anatómicos (Vertes y col., 1999). Además, existen evidencias que señalan que las neuronas serotoninérgicas de estos núcleos son afectadas de manera diferencial por algunos agonistas de la serotonina y al parecer las que se ubican en el núcleo medial son más resistentes (Hillegaart y col., 1990; Kreiss y Lucki. 1997).

Por lo antes mencionado, es posible pensar que la disminución en la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio modificó la secreción de GnRH y como consecuencia de la FSH. La idea de que el sistema serotoninérgico participa en la modulación de la secreción de las gonadotropinas ha sido planteada previamente (Justo y col. 1989; Pinilla y col., 2003). Así mismo, esta idea es apoyada por las evidencias anatómicas que muestran que la inervación que se origina en el núcleo dorsal y medial del rafe se encuentran en contacto con los somas de las neuronas que producen la GnRH en el área preóptica, y entre las terminales nerviosas de ambas neuronas en la eminencia media (Jennes y col. 1982; Smith y Jennes 2001).

El incremento en la concentración de FSH observado en los animales que fueron inyectados con la anfetamina, posiblemente también puede ser el resultado de la modificación en el proceso de retroalimentación que ejerce la inhibina en la hipófisis. Se ha mostrado que esta hormona inhibe la síntesis de la FSH y que es producida por las células de Sertoli en respuesta a la fagocitosis de residuos de citoplasma que se generan después de la diferenciación de la espermatide a espermatozoide (Ross y col.,1992). Así mismo, existen evidencias que señalan que cuando disminuye el número de espermátides alargadas la producción de inhibina también disminuye y la de FSH se incrementa (Allenby y col. 1991, citado en Sharpe, 1994). Con base en estas evidencias es posible pensar que el incremento en la concentración de FSH observada en los animales que recibieron la PCA puede ser el resultado de que la diferenciación de la célula germinal no progresó hasta la etapa de espermatozoide y espermatozoide en la mayoría de los túbulos, de la disminución de los residuos de citoplasma

El hecho de que la disminución en la espermatogénesis observada en los animales inyectados con la PCA se acompañara del incremento en la producción de FSH y no se haya modificado la concentración de la testosterona, no coincide con los resultados reportados en la literatura, en los que se señala que cuando en la

rata se neutraliza de manera selectiva estas dos hormonas disminuye la espermatogénesis (Jégou y col., 1983; McLachlan y col., 2002; Sanborn y col., 1977; Skinner y col., 1993). Por ello, una posible explicación a la disminución en la producción de espermatozoides observada en estos animales, sería el resultado de la modificación en la producción de algún factor u hormona por parte del testículo. En relación a esto, se ha mostrado que la célula de Sertoli sintetiza y secreta diferentes sustancias que tienen efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos (Sharpe, 1994; Tresguerres y col. 1999)

En el testículo de la rata se produce el factor de crecimiento de los fibroblastos  $\alpha$  y  $\beta$ , el factor de crecimiento parecido al de la insulina entre otros y se sugiere que estos también intervienen en la regulación de las funciones del testículo (esteroidogénesis y espermatogénesis) (Robertson y col., 1993). Por ello es posible que los cambios en el proceso de espermatogénesis observados en los animales que fueron tratadas con la pCA, también están vinculados a la modificación de alguno de estos factores de crecimiento.

Se sugiere que la participación de la serotonina en la modulación de la FSH y LH es diferente entre la hembra y el macho. Al parecer en el macho prepúber la serotonina estimula la secreción de la FSH y en la hembra modula la producción de la LH (Justo y col. 1989). Estas evidencias confirman lo observado en este estudio, debido a que no se modificó la producción de la LH en los animales que recibieron la anfetamina.

El hecho de que no se modificará la producción de testosterona y de LH, apoya los resultados de otros autores (Sharpe, 1994; McLachlan y col., 1996), sobre el paralelismo entre estas dos hormonas. Al parecer en los animales que se trataron con la pCA, al no modificarse la secreción de la LH por la falta de serotonina, no se afectó la esteroidogénesis en el testículo. Se ha mostrado que en el testículo la serotonina es producida en la propia célula de Leydig y actúa como un modulador

autocrino en tales células. La serotonina inhibe la producción del AMPc y favorece la producción del factor liberador de la corticotropina, que inhibe la esteroidogénesis en el testículo en estos animales (Tinajero y col. 1993), lo que explica que no se modificará la concentración de testosterona.

La disminución del peso corporal observada en los animales que recibieron pCA es semejante a lo observado en la rata hembra durante el desarrollo prepuberal (Ayala y col., 1993). Posiblemente las alteraciones en el peso de los animales están asociadas a modificaciones en la producción de la hormona de crecimiento, ya que se ha mostrado que la serotonina en el hipotálamo estimula la liberación de la somatostatina y como consecuencia la producción de la GH por la hipófisis (Lindstrom y Ohlsoon, 1987). Cuando se administra pCA por vía sistémica, la concentración de serotonina disminuye en el sistema nervioso central a las 24 horas de iniciado el tratamiento (Sander-Bush, 1971). Además se ha mostrado que la administración del agonista de serotonina quipazina incrementa la concentración en suero de la GH. Con base en nuestros resultados y la evidencias antes mencionadas es posible pensar que el sistema serotoninérgico estimula la liberación de la GH (Muntarge y Calos, 1988).

En suma, los resultados obtenidos en este estudio apoyan la idea de que en el animal prepúber el sistema serotoninérgico es esencial en la modulación de los mecanismos que regulan la espermatogénesis. Es posible que la disminución de la síntesis de la serotonina en el hipotálamo se reflejara en modificaciones en la secreción de la GnRH y de la FSH. Otra posible explicación, es que la anfetamina modificó directamente el funcionamiento del testículo y en particular la actividad secretora de la célula de Sertoli, lo que se reflejó en la disminución en la producción de espermatozoides.

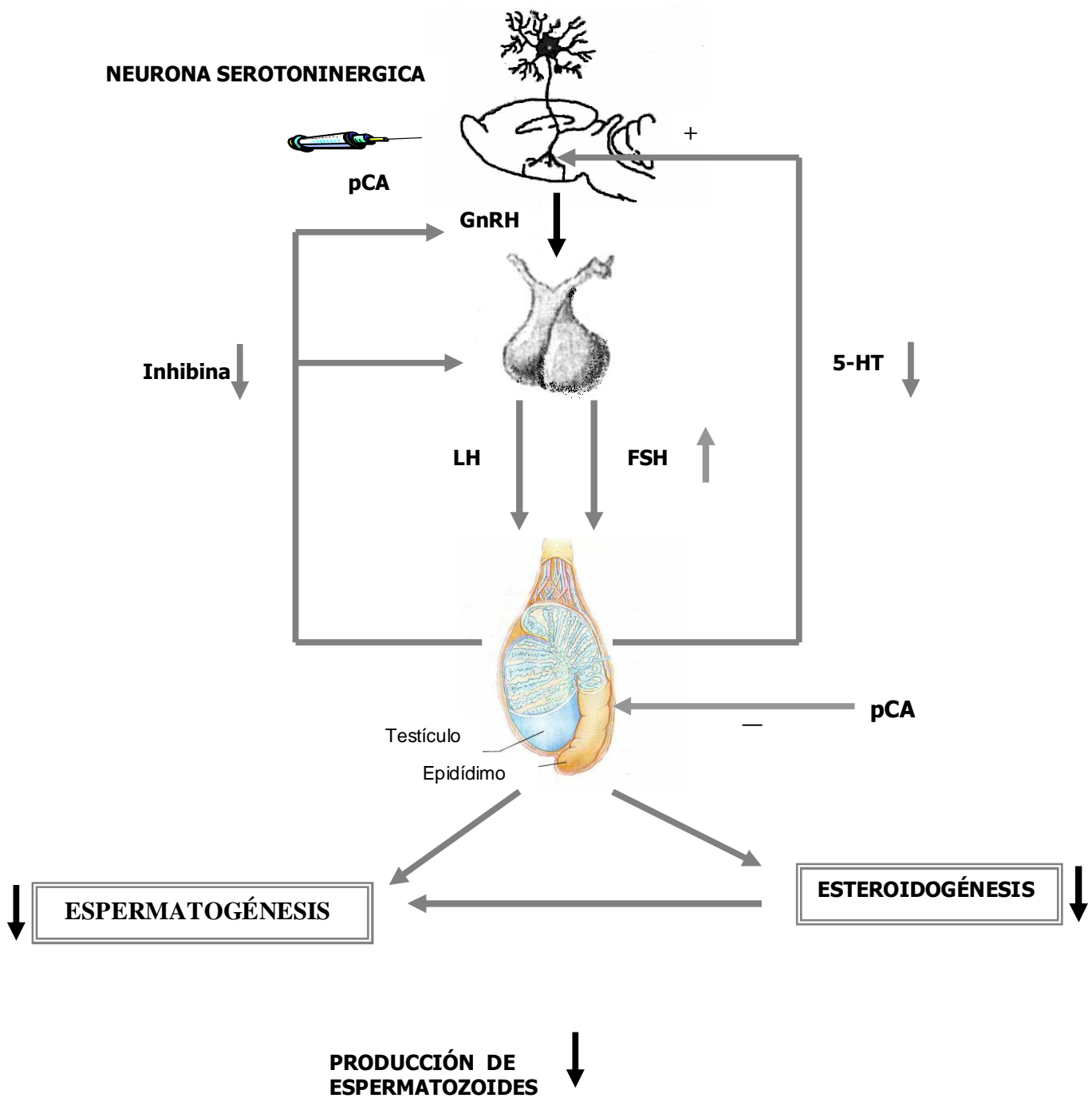


Figura 26. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo y los posibles sitios de acción de la p-cloroanfetamina (pCA) sobre las funciones del testículo. Serotonina (5-HT); Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH); Hormona folículo estimulante (FSH); Hormona luteinizante (LH); Efecto estimulante (+); efecto inhibitorio (-).



### **CONCLUSIONES**

- El sistema serotoninérgico participa de manera estimulante en la modulación de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la espermatogénesis.
- En la rata macho la serotonina participa en la modulación de la secreción de la FSH y no afecta la de LH.
- El bloqueo del sistema serotoninérgico no modifica el proceso de esteroidogénesis en la rata macho de 65 días de edad.
- La serotonina es un factor esencial para el mantenimiento del epitelio seminífero en la rata macho de 65 días de edad.
- En el testículo la serotonina es esencial en la modulación de la diferenciación de la espermatogonia a espermatozoide.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Aguilar E., Ranchal A., Tena-Sempere M., Pinilla L. (1994). Serotonergic control of prolactin secretion in prepubertal male rats. *European Journal of Endocrinology*, **131**: 547-554.

Awoniyi CA., Zirkin BR., Chandrashekar V., Schlaff WD. (1992). Exogenously administered testosterone maintains spermatogenesis quantitatively in adult rats actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. **130**; 3283-3288.

Becú-Villalobos D., Lacau-Mengido IM. y Libertun C. (1989). Developmental changes in FSH secretion induced by 5-hydroxytryptophan, naloxone and haloperidol in male and female rats. *Developmental Brain Research*, **47**:181-186.

Chandolia RK., Weinbauer GF., Behre HM., Nieschlag E. (1991). Evaluation of peripherally selective antiandrogen (Casodex) as a tool for studying the relationship between testosterone and spermatogenesis in the rat. *J. steroid Biochem. Mol. Biol.* **38**; 367-375.

Collu R., Jequier JC., Letarte J., Leboeuf G. Ducharme JR. (1974). Endocrinology effects of Brain Serotonin Depletion by 5,6-Dihydroxytryptamina in prepuberal Male Rats. *Neuroendocrinology*, **14**: 139-150.

Costanzo SL. (1998) **Fisiología**. McGraw-Hill. Interamericana. México. PP.468.

Crowley WR., Zemlan FP. (1981). Neurotransmitter Systems. Anatomy and Pharmacology. En: **N. Adler (ed.). Neuroendocrinology of Reproduction.** Physiology and Behavior. Edit. Plenum Press, New York, USA. pp. 65-85.

Csaba Z., Csernus V., Gerendai I. (1998). Intratesticular serotonin affect steroidogenesis in the rat testis. *J. neuroendocrinol.* **5**;371-376.

Dym M., Raj HG., Lin YC., Chemes HE., Kotite NJ., Nayfeh SN., French FS. (1978). Is FSH required for maintenance of spermatogenesis in adult rats?. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **26**; 175-181.

Fink G. (2000). Neuroendocrinology regulation of pituitary function: General principles. En: **Neuroendocrinology in Physiology Medicine**. Eds. PM Conn, ME Freeman. Humana press, New Jersey. Pp. 107-137.

Eddy EM., O'Brien DA. (1994). The Spermatozoon. En: *The Physiology of Reproduction Second Edition*. (Edi. E. Knobil, JD Neil ). Raven Press, New York, 1994. pp.29-77.

Frazer A., Hensler JG. (1993). Serotonin. En:Eds. Basic Neurochemistry GJ. Siegel, BW. Agranoff, RW. Albers y PB. Molinoff. Basic neurochemistry. Raven Press, New York, pp: 283-308.

Frungieri BM., Gonzales CS., Rubio M., Ozu M., Lustig L., Calandra SR. (1999). Serotonin in Golden Hamster Testes: Testicular Levels, Immunolocalization and Role during Sexual Development and Photoperiodic Regresión-Recrudescence Transition. *Neuroendocrinology*, **69**: 299-308.

Ganong W.F., (1996). **Fisiología Médica**. 5ª edición. Manual Moderno, México, PP. 962.

Geneser F. (2000). **Histología**. 3ª edición. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. pp. 813.

Ghosh S., Bartke A., Grasso P., Reichert LE., Russel LD. (1992). Structural manifestations of the rat Sertoli Cell to hypophysectomy: A correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology* 131; 485-497.

Gómez BP., Pinagua MV. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. **45**; 252-257.

Gondos B., Kogan SJ. (1990) Testicular Development during Puberty. En: **Control of the Onset of Puberty**. (Eds.) M. M. Grumbach, P. C. Sizonenko , M. L. Albert Williams & Wilkins, USA. pp. 183-210.

Griswold DM. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell & Developmental Biology*, **9**: 411-416.

Heckert L. Griswold MD. (1992). The changing functions of follicle-stimulating hormone in the testes of prenatal, newborn, immature and adult rats. In "Follicle Stimulation Hormone- Regulation of Secretion and Molecular Mechanism of Action"(M. Hunzicker-Dunn and N. B. Schwartz, eds). pp.237-245. Springer Verlag, New York.

Hinshelwood M. Margaret, (1999). Steroidogenesis, Overview. En: **Encyclopedia of Reproduction**. (Eds) E. Knobil, J. Neill. Vol 4. Academic Press, New York, pp: 644-653.

Hutton JC., Siddle. (1985). Peptide hormone serotonin. A practical approach.

Jégou B., Le Gac F., Irby DC., De Kretser DM. Studies on seminiferous tubule fluid production in the adult rat: effect of hypophysectomy and treatment with FSH, LH and testosterone. *Int J. Androl*. 1983. 6; 249-260.

Jennes L., Stumpt WE., Sheedy ME. (1982). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *J. Comp. Neurol.* **232**; 534-547.

Jones ER., (1997). **Human Reproductive Biology**. 2ª edición. Academic Press, Inc. USA, 90-101.

Juorio AV., Li XM., Gonzales A., Chedrese PJ., Murphy BD. (1991). Effect of active immunization against gonadotrophin-releasing hormone on the concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-hydroxy-tryptamine and some of their metabolites in the brain and sexual organs of male rats. *Neuroendocrinology.* **1**; 49-54.

Justo NS., Rassano LG., Szwarcfarb B., Rubio CM., Moguilevsky AJ. (1989). Effects of Serotonergic System of FSH secretion in Male and Female Rats: Evidence for stimulatory and inhibitory Actions. *Neuroendocrinology.* **50**: 382-386.

Kainz V., Frick J., Kainz NR., Kalla RD., Rovor E., Adam H. (1988). The effects of gossypol Acetic on the different stages of the spermatogenic cycle in the rat. *Int J Androl*, **11**(6): 533-546.

Kerdelhué B., Bojna F., Lesieur P., Pasqualini C., El Abad A., Lenoir B., Doviller P., Chiueh MC., Palkovits M., (1989). Median eminence dopamine and serotonin neural activity. *Neuroendocrinology.*, **49**: 176-180.

Lang U., Lenko H. L., Bradtke., Delavy B., Aubert ML., Sizonenko PC. (1990). Testicular Development during Puberty. En: **Control of the Onset of Puberty**. (Eds.) M. M. Grumbach, P. C. Sizonenko, M. L. Albert Williams & Wilkins, USA. pp. 710.

Li S., Pelletier G. (1995). Involvement of serotonin in the regulation of GnRh gene expression in the male rat brain. *Neuropeptides*. **29**: 21-25.

Lindstrom P., Ohlson L. (1987). Effects of 5-hydroxytryptamine, dopamine and aromatic L. aromatic acids on growth hormone (GH) releasing – factor stimulated GH release in rat anterior pituitaries. *Endocrinology* **120**; 74-78.

Meistrich LM. (1993) Nuclear Morphogenesis during spermiogenesis. En: **Molecular Biology of the Male Reproductive System**. Eds. D. De Kretser. Academic Press, USA. **3** . pp. 67-88.

McLachlan R. I., O´Donnell L., Meachem S. J., Stanton P. G., De kretser D. M.,m Pratis K. and Robertson D. M. (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *The endocrine society*. 149-178.

McLachlan RI., Wreford NG., Meachem SJ., De kretser DM., Robertson DM. (1996). The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal of endocrinology*. **148**; 1-9.

McLachlan RI., Wreford NG., Meachem SJ., De kretser DM., Robertson DM. (1994). Effects of testosterone on spermatogenic cell population in the adult rat. *Biol. Reprod*. **5**. 945-55.

Mogulesvsky JA., Faigón MR., Seacchi P., Szwarcfarb B. (1987). Role of sexual differentiation of the hypothalamus in the differential effect of the serotonergic system on LH in pubertal male and female rats. *Neuroendocrinology*, **45**: 274-277.

Montargé M., Calas A. (1988). Serotonina and Endocrinology-The pituitary Neural Serotonin. **10**; 2711-303.

Odeigah CG. (1997). Sperm head abnormalities and dominant lethal effects of formaldehyde in albino rats. Mutation Research. **389**. 141-148.

O'Donnell L., McLachlan RI., Wreford NG., Robertson DM. (1994). Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII Y VIII of the rat spermatogenic cycle. Endocrinology.135; 2608-2614.

Odell DW. (1990). Sexual Maturation in the Rat. En: **Control of the Onset of Puberty**. (Eds.) M. M. Grumbach, P. C. Sizonenko. ML. Albert Williams & Wilkins. USA. pp. 183-210.

Ojeda RS., Urbansky FH. (1994). Puberty in the Rat. En: **The physiology of Reproduction**. (eds) E. Knobil, J. Neill. Raven Press, New York pp: 363-404.

Odeigsh PGC. (1997). Sperm head abnormalities and lethal effects of formaldehyde in albino rats. Mutat. Res. 389; 141-148.

Orth JM., Higginbotham CA., Salisbury RL (1984). Hemicastration causes and testosterone prevents enhanced uptake of thymidine by Sertoli cell in testes of immature rats. Biol. Reprod. **30**; 263-270.

Parker CA., Thibodeau GA. (1983). **Anatomía y Fisiología**. 10ª edición. Interamericana Mc Graw Hill. México. D.F. pp. 724.

Paulson DF. (1991). **Histología Básica**. Manual Moderno. México. D.F. pp. 602.

Paxinos G., Watson C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press Australia.

Pelliniemi LJ; Fröjdman K; Paranko J. (1993). Cell Biology of Testicular Development.

Piner J., Sutherland M., Millar M., Turner K., Newall D., Sharpe MR. (2002). Change in vascular dynamics of the adult rat testis leading to transient accumulation of seminiferous tubule fluid after administration of a novel 5-hydroxytryptamine (5-HT) agonist. *Reproductive toxicology*. **16**: 141-150.

Pinilla L., Gonzales CL., Sempere TM., Aguilar E. (2003). 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor activation reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA) stimulated LH secretion in prepubertal male and female rats. *European Journal of Endocrinology*. **148**: 121-127.

Propina t., Ugrumov M., Adanskaya E., Kuznetsova T., Shishkina I., Babichev V., Calos A., Traw G., Maiñny P., Makaremco I. (2003). Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurons in rat fetuses. *J. Neuroendocrinol.* **6**; 549-558.

Ramaley JA., Farr L. (1990). Control of the Onset of Puberty. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland. pp. 710.

Ross H. Michael, Romrell L.J., Kaye G.I., (1992). **Histología Texto y Atlas Color**. 3ª edición. Médica Panamericana. México, D.F. pp. 817.

Russell L.D., Malone JP., Karpas SL. (1981). Morphological pattern elicited by agents affecting spermatogenesis by disruption of its hormonal stimulation. *Tissue Cell* (1981). 13; 369-380.



Russell L.D., Sinha-Hikim A.P., Ettlín R.A., Clegg E.D., (1990). **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. Ed. Cache River Press. U.S.A., pp. 286.

Sadler T. W., (2001). **Embriología Medica**. 8<sup>a</sup> edición Ed. Panamericana. Buenos Aires Argentina., pp.481.

Salve ML., Amich S., Prietos., Casas A. (1994). Laboratorio clínico, bioquímica. 1<sup>a</sup> ed. Ed. McGraw-Hill pp.496.

Sanborn BM., Steinberger A., Teholekian RK., Steinberger E. (1977). Direct measurement of androgen receptors in cultured Sertoli Cell. *Steroids*.; 240: 327-330.

Sanders-Bush E., Buhing J. A and Sulfer F. (1971). P-Chloroamphetamine-Inhibition of cerebral tryptophan hydroxylase. *Biochemical Pharmacology*. 21: 1501-1510.

Sanders-Bush E., Bushing J., Sulser F. (1975). Long-Term effects of p-cloroamphetamine and related drugs on central serotonergic mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **192**: 33-4.

Sar M., Hall SH, Wilson EM., Frech FS. (1993). Androgen regulation of steroid cells. In. Russell LD. Griswold MD., eds. *The Sertoli Cells*. Clearwater Florida; Cache River Press; 509-516.

Sharpe RM. (1989). Possible role of elongated spermatides in control of stage-dependent changes in the diameter of the lumen of the rat.

Setchell PB; Pakarinen P; Huntaniem I. (2002). How much LH do the Leydig cells see?. *J. Endocrinology* . **2**. 375-82.

Setchell PB. (1978). *The Mammalian Testis. Reproductive Biology Handbooks.* Cornell University Press, New York. pp. 181-218.

Schmidts R.F; Thews G., (1993). **Fisiología Humana.** 24<sup>a</sup> edición. Interamericana Mc Graw Hill. Madrid, España. pp. 906.

Shannon NJ., Gunnet JW., Moore KE., (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *Journal Neurochemical*, **47**: 958-965.

Shishkina TG., Dygalo NN. (2000). Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **125**: 45-51.

Skinner MK. (1993) Sertoli cell- peritubular myoid cell interaction IN: Russell LD., Griswold MD, eds. *The Sertoli Cell.* Clearwater Florida; Cache River Press; 493-508.

Silverman AS., Liune I., Witki JW. (1994). The gonadotrophin-releasing-hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry. En: **E. Knobil y J. Neill (eds).** **The physiology of Reproduction.** Raven Press, New York pp: 1683-1710.

Sinha-Hikim AP., Swerdloff RS. (1993) Temporal and stage-specific changes in spermatogenesis of rat after gonadotropin deprivation by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*. **5**;2161-2170.

Snell RS. (1990). **Neuroanatomía Clínica**. 2<sup>da</sup> edición. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 552.

Spilman CH., Lobl JJ., Kirton KT. (1976). Regulatory mechanisms of male reproductive physiology. *Excerpta medica*. Amsterdam. pp. 23-45

Steger WR., Dennis C., VanAbbema A., Gay-Primel E. (1990). Alterations in hypothalamic serotonin metabolism in male hamsters with photoperiod-induced testicular regression. *Brain Research*, **514**: 11-14.

Steinberger E., Steinberger A. (1975). Hormonal control of testicular function in mammals. En: *Handbook of Physiology*. Section 7: RO. Greep, EB. Astwood eds. American Physiological Society. Washington D.C. pp325-345.

Stevens A., Steven, L.J., (1993). **Texto y Atlas de Histología**. Doyma, S. A., Madrid, España. pp. 378.

Sun YT., Wreford NG., Robertson DM., and de kretser DM. (1990) Quantitative cytological studies of spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats: indentification of androgen-dependent stages. *Endocrinology*. **127**; 1215-1223.

Takeuchi Y. (1988). Serotonina and Endocronology. **Distribution of serotonin in the mammalian brain**. En: *Neuronal Serotonin*. (Eds.) MN Osborne, M. Hamon. John Wiley & Jons, New York, USA. pp. 25-56.

Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca DR., Dufau ML. (1993). Serotonin Secretion from Rat Leydig Cells. *Endocryology*, **133**(6): 3026-3029.

Tresguerres JF. (1999). **Fisiología Humana**. McGraw-Hill. Madrid, España. pp. 1181.

Weinbauer FG., Nieschlag E. (1993) Hormonal Control of Spermatogenesis. En: **Molecular Boilogy of the Male Reproductive System**. Eds. D. De Kretser. Academic Press, USA. **4**. pp. 99-130.

Wing TY, Christensen AK. (1982). Morphometric studies en rat seminiferous tubules. Am J. Anat. 165: 13-25.