



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE
P-CLOROANFETAMINA Y SU EFECTO EN LA
SECRECIÓN DE TESTOSTERONA Y ESTRUCTURA
DEL TESTÍCULO DE LA RATA MACHO PREPÚBER.

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:

JONATHAN IVÁN VILLAR ARELLANO

DIRECTORA: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR



MÉXICO, D.F.

2011



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE
P-CLOROANFETAMINA Y SU EFECTO EN LA
SECRECIÓN DE TESTOSTERONA Y ESTRUCTURA
DEL TESTÍCULO DE LA RATA MACHO PREPÚBER.**

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta:

Jonathan Iván Villar Arellano

Directora de Tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

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

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

**ÍNDICE**

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
Aparato reproductor del macho	1
Funciones del testículo	5
Espermatogénesis	5
Esteroidogénesis	9
Regulación endocrina de las funciones del testículo	12
Ciclo de epitelio seminífero	15
Apoptosis	18
Sistema serotoninérgico	19
Serotonina y aparato reproductor del macho	21
p-Cloroanfetamina	22
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Efecto de la administración sistémica de p-Cloroanfetamina	28
Efecto de la administración intratesticular de p-Cloroanfetamina	28
Procedimiento de la inyección intratesticular en bilateral	29
Procedimiento de sacrificio	29
Cuantificación de 5-HT y su metabolito	32
Hematoxilina-PAS	32
Evaluación apoptosis	33
Concentración de testosterona en el suero	33
Análisis estadístico de resultados	33



RESULTADOS	34
Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina vía sistémica	34
Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina vía sistémica en el ciclo del epitelio seminífero	41
Apoptosis en el compartimiento basal o adluminal del epitelio seminífero	45
Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina intratesticular	48
Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina bilateral en el ciclo del epitelio seminífero	50
Apoptosis en el compartimiento basal o adluminal del epitelio seminífero por efecto de la administración de p-Cloroanfetamina bilateral	56
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69



RESUMEN

La serotonina (5-HT) se le encuentra en diferentes regiones del sistema nervioso central, el hipotálamo y en órganos periféricos, como la hipófisis, la adrenal y el testículo. Esta amina participa con en la modulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y en las funciones del testículo. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias claras que muestren que la amina actúa directamente en el testículo modulando sus funciones, secreción de testosterona, o manteniendo su estructura. Por ello en el presente trabajo fue de nuestro interés analizar los efectos de la administración de p-Cloroanfetamina, inhibidor del sistema serotoninérgico, vía sistémica o directamente en ambos testículos, en el sistema serotoninérgico del hipotálamo, la hipófisis, las adrenales, el testículo y en la secreción de testosterona, en el ciclo del epitelio seminífero y apoptosis en la gónada de la rata macho prepúber.

Para ello, se utilizaron ratas macho de la cepa CII-ZV de 30 días de edad, a las cuales se les administró la pCA en una dosis de 10mg/kg de p.c. por vía sistémica (pCA) o directamente en ambos testículos (inyección intratesticular bilateral) (pCAb). Como grupos de comparación se utilizaron animales testigo absoluto (TA), o con inyección sistémica de solución salina al 0.9% (Vh) o en ambos testículos (Vh-b). Los animales tratados por vía sistémica se sacrificaron a los 65 días de edad, mientras que los animales en los que se realizó la inyección intratesticular se sacrificaron a los 45 ó 65 días de edad. Al momento del sacrificio se realizó la disección del hipotálamo anterior (HA) y medio (HM), hipófisis, adrenales y una biopsia de ambos testículos, en donde se realizó la cuantificación de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por cromatografía de líquidos de alta resolución. El par de testículos de cada animal fueron fijados en líquido de Bouin o Paraformaldehído al 4% para el posterior análisis del ciclo del epitelio seminífero o apoptosis. En el suero se realizó la cuantificación de testosterona por la técnica de radioinmunoanálisis.



Debido a que la administración de solución salina modificó algunos de los parámetros evaluados en el HA e HM, hipófisis, adrenales y testículos, se utilizó como grupo de comparación al grupo Vh. En los animales que se les administró la pCA por vía sistémica se observó la disminución significativa de la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el HA, sin embargo en el HM, la concentración del 5-HIAA no se modificó, mientras que la del neurotransmisor disminuyó significativamente. En la hipófisis no se presentaron cambios en estos parámetros. Mientras que en la glándula adrenal y testículo se observó la disminución significativa en la concentración de la amina y su metabolito. En los animales que se administró pCA en ambos testículos y sacrificados a los 45 días se observó la disminución significativa del 5-HIAA, en los animales sacrificados a los 65 días, la concentración de 5-HT y su metabolito disminuyó significativamente en ambos testículos.

La concentración de testosterona en el suero de los animales tratados con pCA vía sistémica no se modificó significativamente, mientras que en los animales con inyección intratesticular bilateral de pCA sacrificados a los 45 ó 65 días disminuyó significativamente. En los testículos de los animales que recibieron pCA vía sistémica, la organización del epitelio seminífero reflejó un alto porcentaje en el número de túbulos anormales, y de la disminución de túbulos en las etapas de la I a la III. Esto se acompañó del incremento de la muerte por apoptosis en el compartimento basal y adluminal del tubo seminífero. Este mismo efecto se observó en los testículos de los animales con inyección intratesticular de pCAB y sacrificados a los 45 ó 65 días.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten mostrar que la pCA inhibe al sistema serotoninérgico del hipotálamo y del testículo, lo que se traduce en la disminución en la secreción de testosterona, lo que se traduce en el incremento en la muerte celular por apoptosis y como consecuencia modifica la estructura del testículo.



INTRODUCCIÓN

Aparato reproductor de la rata macho

Está constituido por dos testículos, dos epidídimos, dos conductos deferentes, glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándula coagulante y bulbouretral) y por el órgano copulador (Figura 1) (Curtis y Barnes, 1996). De estos componentes, los testículos son considerados los órganos primarios del aparato reproductor del macho debido a que mediante sus secreciones hormonales, principalmente testosterona, mantiene la estructura y el funcionamiento del resto de los órganos del aparato reproductor (Audesirk, 2003; Bellido, 1999).

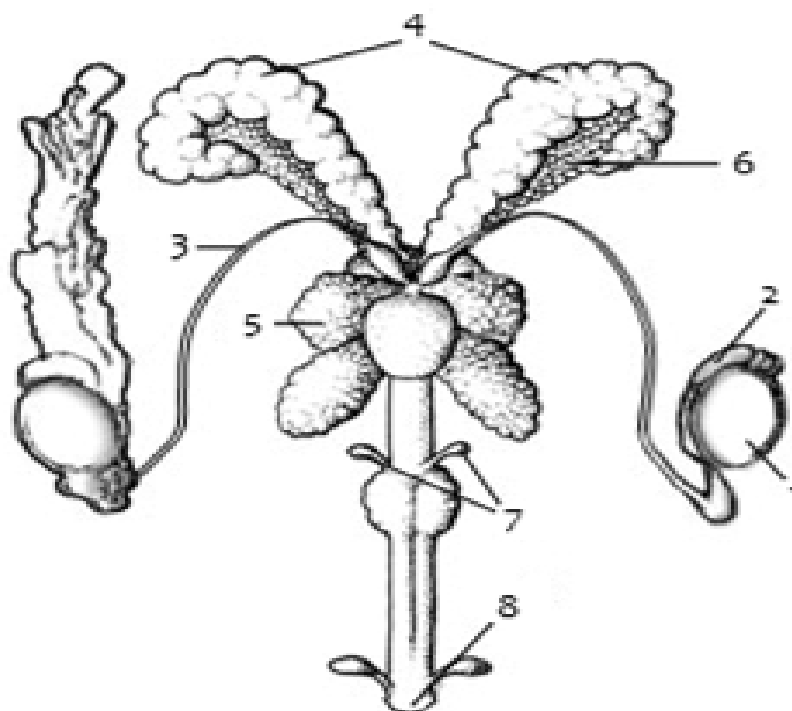


Figura 1. Esquema del aparato reproductor de la rata macho. Vista ventral, (1) testículo (2) epidídimo, (3) conducto deferente, (4) vesícula seminal, (5) próstata, (6) glándula coagulante, (7) glándula bulbouretral, (8) pene (Modificado de Setchel y col., 1994).



Los testículos se localizan en el exterior de la cavidad abdominal, alojados en las bolsas escrotales. El escroto tiene la función de mantener los testículos a una temperatura ligeramente inferior a la del cuerpo, 5°C debajo de la temperatura corporal, debido a que las células germinales son muy sensibles a los cambios de temperatura y cuando se incrementa ligeramente se produce esterilidad (Córdova, 2003).

Los testículos están compuestos por una gruesa capa de tejido conjuntivo, la túnica albugínea; de ella salen septos que se extienden y dividen al testículo en compartimentos piramidales, los lobulillos como en el hombre y en los roedores no se encuentra dicha tabicación. Cada lobulillo está constituido por varios túbulos seminíferos. Estructuralmente en este órgano se distinguen tres compartimentos: el tubular, ocupado esencialmente por el epitelio seminífero; el peritubular, donde se presentan las células mioepiteliales; y el intersticial, representa aproximadamente el 15% del volumen total del órgano, donde se encuentran los vasos sanguíneos, linfáticos, células del tejido conjuntivo y de Leydig (Figura 2) (Gartner y Hiatt, 2007; Krester y Kerr, 1994; Ross y col., 2004).

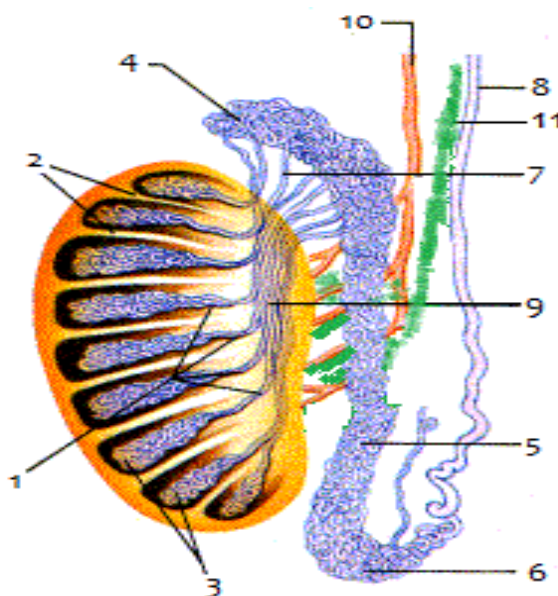


Figura 2. Esquema del Testículo. Vista sagital, (1) túbulos seminíferos, (2) septos, (3) lóbulos espermáticos, (4) cabeza epidídimo, (5) cuerpo epidídimo, (6) cola epidídimo, (7) conducto eferente, (8) conducto deferente, (9) rete testis, (10) arteria espermática, (11) nervio espermático (Modificado de Curtis y col., 2008).



El testículo se comunica con el epidídimo, el que forma parte de la vía espermática, es un órgano tubular extratesticular que forma parte del sistema reproductivo masculino de los mamíferos. Es dividido en tres grandes compartimentos llamados pieza inicial o cabeza, cuerpo y cola (Curtis y col., 2008). La parte inicial del epidídimo emerge del polo superior del testículo, y el cuerpo y la cola descienden adosados a su cara posterior de la gónada. En la rata, la cabeza abarca las zonas I, II y III, el cuerpo a la zona IV, y las zonas V y VI forman la cola (Jiménez Trejo y col., 2007).

El sistema de conductos que comunica al testículo con la vía espermática inicia en la rete testis, aún dentro del órgano, y continúa con los conductos eferentes que hacen contacto con el epidídimo. Este último se continúa con el conducto deferente. El papel del epidídimo es importante en la fisiología del macho, ya que en él los espermatozoides se concentran y a medida que son transportados en su interior maduran. Finalmente, una vez que los espermatozoides alcanzan la región distal del epidídimo se almacenan por un tiempo variable hasta el momento de ser eyaculados (Bellido, 1999; Córdova, 2003).

Entre los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig entremezcladas con los capilares del testículo y el tejido conectivo. Son células poliédricas que producen la testosterona, hormona sexual masculina, la cual vierten a los capilares. Las células de Leydig, por lo tanto constituyen la parte endocrina del testículo (Bellido, 1999; Sharpe, 1994).

Los túbulos se encuentran rodeados por células alargadas, las células mioides, las cuales son las responsables de la contractilidad del túbulo seminífero (Figura 3) (Geneser, 2000). Inmediatamente después se encuentra la membrana basal, sobre la que se apoyan las células de Sertoli y de la línea germinal, las que llegan hasta el lumen del túbulo que constituye el epitelio seminífero. Las células germinales se convierten constantemente en espermatozoides que son liberados al lumen de los túbulos seminíferos (Ham y Cormack, 1985).

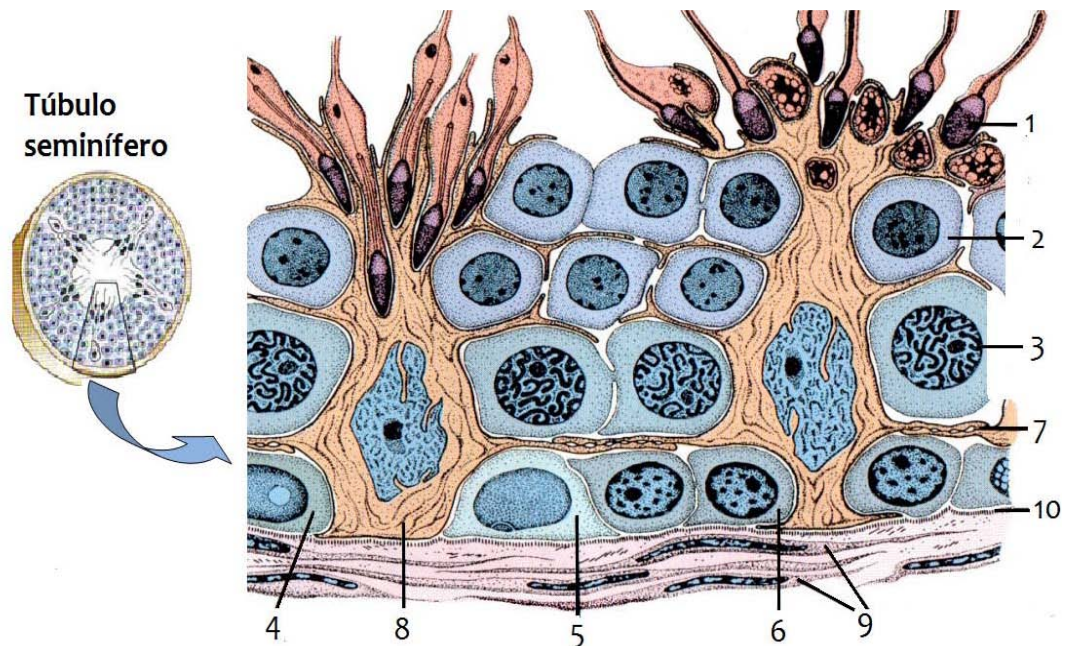


Figura 3. Esquema del Túbulo Seminífero, aquí se muestran los distintos tipos celulares, (1) espermátide tardía, (2) espermátide temprana, (3) espermatocito primario (4) espermatogonia tipo A oscura, (5) espermatogonia tipo A clara, (6) espermatogonia tipo B, (7) complejo unión, (8) célula de Sertoli, (9) células miodes peritibulares (10) lamina basal (Modificado de Raven y col., 2005).

Las células de la línea germinal comprenden las espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, así como las espermátides en sus diferentes etapas de diferenciación hacia espermatozoide. Las células mas inmaduras o espermatogonias, son diploides, se apoyan en la membrana basal, y en ellas se lleva a cabo la mitosis y como resultado de este proceso se forman los espermatocitos primarios (Figura 3) (Gartner y Hiatt, 2007; Geneser, 2000).

Las células de Sertoli son grandes, alargadas, de forma piramidal e irregular. En su citoplasma hay mitocondrias, abundante retículo endoplásmico liso, escaso retículo endoplásmico rugoso, lisosomas y aparato de Golgi. La forma del núcleo de la célula de Sertoli varía según el estado funcional. Puede ser alargada, redonda o triangular. Las células de Sertoli proporcionan lo necesario para el mantenimiento de las células germinales y su diferenciación a espermatozoide; fagocitan las células germinales dañadas y los cuerpos residuales de citoplasma que resultan de la transformación de la espermátide a espermatozoide (Fawcett 1990; Krester y Kerr, 1994; Bellido, 1999).



Otra función de las células de Sertoli es la formación de la barrera hematotesticular que divide al epitelio germinal en dos compartimientos, basal y adluminal. El compartimiento basal, contiene espermatogonias y espermatoцитos en los estadios tempranos de la meiosis. El compartimiento adluminal, contiene el resto del diferente tipo celular que se forma durante la espermatogénesis. Este compartimiento tiene un microambiente adecuado para el desarrollo de las células germinales y establecer un gradiente osmótico que facilita el transporte del líquido hacia la luz tubular (Bellido, 1999). Dicha barrera está formada por uniones estrechas entre las células de Sertoli, que crean una barrera permeable, que permite el paso de iones, aminoácido y proteínas. Por lo tanto, el líquido que se encuentra en los túbulos seminíferos difiere considerablemente de la composición del plasma (Bellido, 1999; Sharpe, 1994; Wagner y col., 2008).

Funciones del testículo

El funcionamiento del aparato reproductor del macho y del testículo son regulados por la interacción de señales hormonales y neurales entre el sistema nervioso central, el hipotálamo, la hipófisis y el propio testículo (Drucker, 2005; Roos y col., 2004). Los testículos cumplen dos funciones, la producción de espermatozoides (espermatogénesis) y una endocrina; sintetizan hormonas esteroides, como progesterona, andrógenos y estrógenos (esteroidogénesis). Los andrógenos como la testosterona, son esenciales en la producción de células germinales y en la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Curtis y Barnes, 1996; Ross y col., 2004; O'Shaughnessy y col., 2008).

Espermatogénesis

El espermatozoide o gameto masculino es una célula diferenciada producto del proceso de espermatogénesis que ocurre en los túbulos seminíferos (Curtis y Barnes, 1996). Proceso que es dinámico y sincronizado y tiene lugar en el epitelio seminífero, donde las espermatogonias diploides proliferan y se diferencian en espermatozoides haploides (Figura 4) (Audesirk, 2003; Ross y col., 2004; Geneser, 2000).



Para que la espermatogénesis se lleve a cabo depende de la testosterona producida por las células de Leydig y de la hormona estimulante del folículo (FSH), que secreta la hipófisis. La FSH actúa en los túbulos seminíferos, particularmente al unirse a sus receptores en las células de Sertoli y estimula la síntesis de la proteína unidora de andrógenos (ABP), la cual es necesaria para mantener una concentración elevada de testosterona en el epitelio seminífero, esta es transportada hasta las células germinales, en donde estimula su diferenciación y proliferación (Fawcett, 1990; Bellido, 1999).

La espermatogénesis inicia en la pubertad, comprende todos los fenómenos mediante los cuales las espermatogonias se transforman en espermatozoides, en respuesta a las gonadotropinas producidas por la hipófisis (Curtis y col., 2008).

En las espermatogonias tipo A se producen 4 divisiones mitóticas consecutivas A1, A2, A3, A4; esta última al dividirse mitóticamente da origen a la espermatogonia tipo B (Figuras 3 y 4) (Curtis y Barnes, 1996; Krester y Kerr, 1994; Ross y col., 2004; Geneser, 2000). Las espermatogonias tipo B se diferencian por medio de una división mitótica para formar los espermatoцитos primarios, que son células con núcleo esférico. Los espermatoцитos primarios duplican su ADN después de formarse y antes de que inicie la meiosis; en ellos inicia la primera división meiótica. El resultado de esta primera división son dos espermatoцитos secundarios. En los espermatoцитos secundarios se inicia la segunda división meiótica y se generan dos espermátides redondas por cada espermatoцитo secundario, por lo tanto se obtienen cuatro espermátides redondas por cada espermatoцитo primario (Figura 4) (Curtis y Barnes, 1996; Krester y Kerr, 1994; Ross y col., 2004; Geneser, 2000).

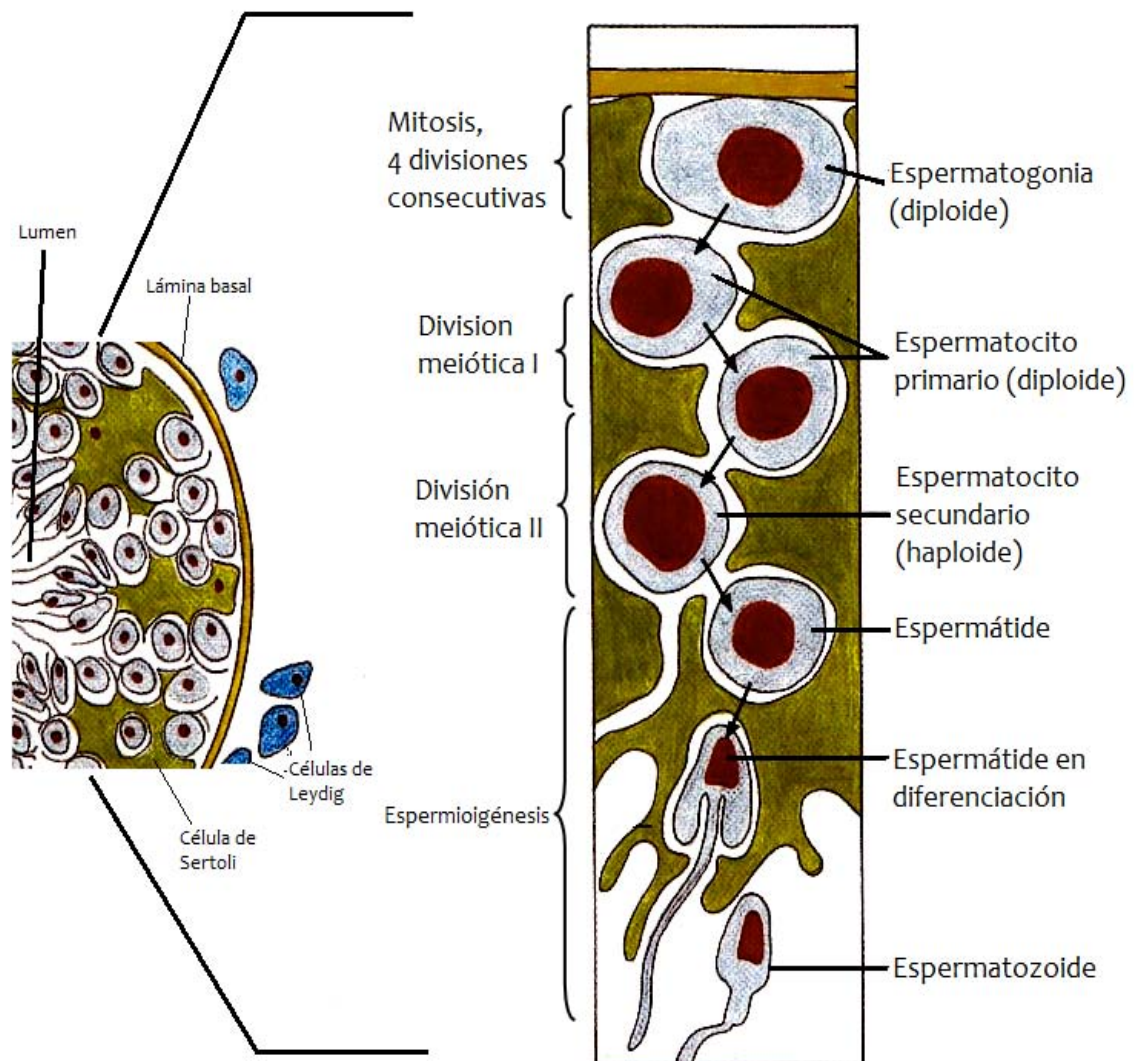


Figura 4. Esquema del proceso de la espermatogénesis (Modificado de Alberts y col., 1996).

Cada una de los cuerpos celulares en desarrollo se sitúa más próximo a la luz del tubo seminífero, siempre entre las células de Sertoli, las cuales nutren a los espermatozoides en desarrollo (Córdova, 2003).

Las espermatides redondas presentan cambios en su estructura, los cuales las llevan a adquirir la forma característica del espermatozoide, disponiendo de un flagelo que les da movilidad; éstos están situados ya en la luz del tubo seminífero, con la cabeza en contacto aún con las células de Sertoli; un núcleo y un acrosoma, por lo que a esta transformación se le denomina espermiogénesis (Figura 5) (Kretser y Kerr, 1994).



Durante la transformación de la espermatíde en espermatozoide, el material nuclear se compacta y forma la cabeza del espermatozoide. Alrededor de la envoltura nuclear se forma el granulo acrosómico, a partir del aparato de Golgi, este granulo posteriormente se transforma en el acrosoma, que rodea la parte anterior de la cabeza del espermatozoide; los centriolos se reorganizan e inician el armado de nueve dobletes microtubulares periféricos y los dos túbulos centrales que dan origen al axonema de la cola del espermatozoide, que en conjunto constituyen el flagelo; en la pieza media se reorganizan las mitocondrias, los centriolos regresan a la cercanía del núcleo para contribuir a la formación del cuello del espermatozoide en desarrollo (Figura 5) (Ross y col., 2004; Geneser, 2000; Krester y Kerr, 1994).

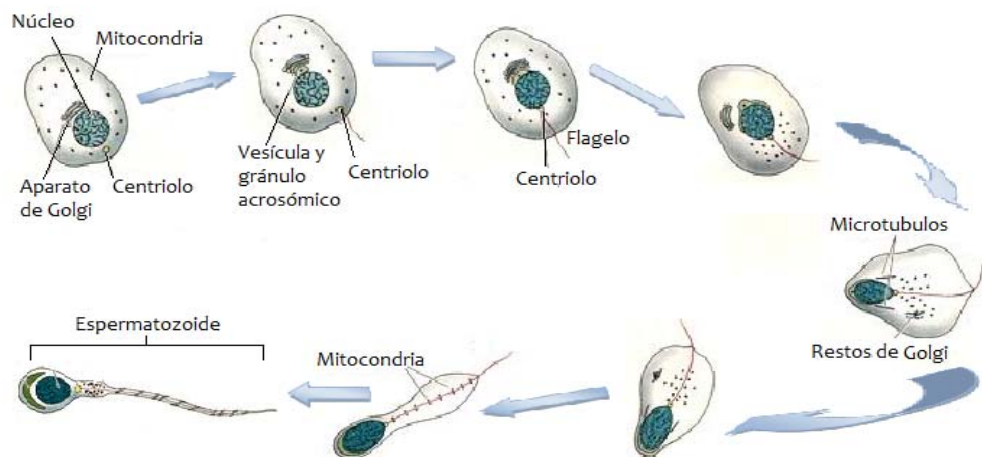


Figura 5. Proceso de espermiogénesis (Modificado de Gilbert, 2005).

Finalmente las espermatídes alargadas son liberadas en el proceso de espermiación, donde se elimina la mayor parte del citoplasma que es fagocitado por las células de Sertoli, se retiene la mayor parte del citoplasma que envuelve la cabeza del espermatozoide y se liberan los mismos hacia la luz del túbulo seminífero para ser transportados al epidídimo, de aquí a los conductos deferentes donde se almacenan la mayoría de ellos. Estos conductos desembocan en los conductos excretores de la vesícula seminal. El conducto deferente de cada testículo entra en la próstata y se unen en la uretra que se prolonga internamente por el pene (Curtis y Barnes, 1996; Ross y col., 2004; Geneser, 2000; Krester y Kerr, 1994).



Los espermatozoides que llegan al epidídimo son inmaduros e inmóviles, por lo que durante su trayecto a través de dicha estructura se produce la maduración del espermatozoide. Durante la maduración los espermatozoides adquieren un movimiento progresivo; cambios en la composición, organización y función de esta célula; en la superficie de la membrana plasmática se producen cambios en la composición de lípidos, glucoproteínas, proteínas y de carbohidratos; se forman puentes disulfuro entre las fibras externa y las fibras de la vaina; aumenta la producción del adenosin monofosfato cíclico (AMPC), que estimula la fosforilación de las proteínas lo que hace posible el movimiento del flagelo (Raven y col., 2005).

Además de las proteínas que están involucradas en la maduración del espermatozoide, se sugiere la presencia de un sistema serotoninérgico en la cabeza del epidídimo, en células epiteliales del epidídimo, en los mastocitos, que posiblemente participan en la maduración de los espermatozoides (Jiménez-Trejo y col., 2007). La vesícula seminal secreta un líquido alcalino que contiene; fructosa, principal nutriente de los espermatozoides; prostaglandinas, que estimulan la contracción del músculo liso; potasio; fosforilcolina; proteínas; lactoferina y proteínas inhibidoras de bajo peso molecular que mantienen al espermatozoide (Curtis y Barnes, 1996).

Esteroidogénesis

La síntesis de hormonas esteroides se lleva a cabo en las células de Leydig, estas sintetizan los andrógenos (testosterona, dihidrotestosterona y androstenediona), los cuales son esenciales para que se lleve a cabo la espermiogénesis y todos ellos se sintetizan a partir del colesterol, proceso importante en las funciones del testículo. En las células de Leydig pueden sintetizar el colesterol a partir de acetil-CoA, sin embargo, la fuente principal de este precursor es el que obtienen del plasma y lo puede almacenar en forma de ésteres de colesterol como gotas de lípidos o convertirse inmediatamente en colesterol libre y es utilizado en la síntesis. El paso limitante en la esteroidogénesis es la separación de la cadena lateral del colesterol que posteriormente es transformada a pregnenolona. Estas reacciones son estimuladas por la hormona luteinizante (LH) producida por la hipófisis (Bellido, 1999; Granner y Murray, 1988; Tresguerres, 1999).

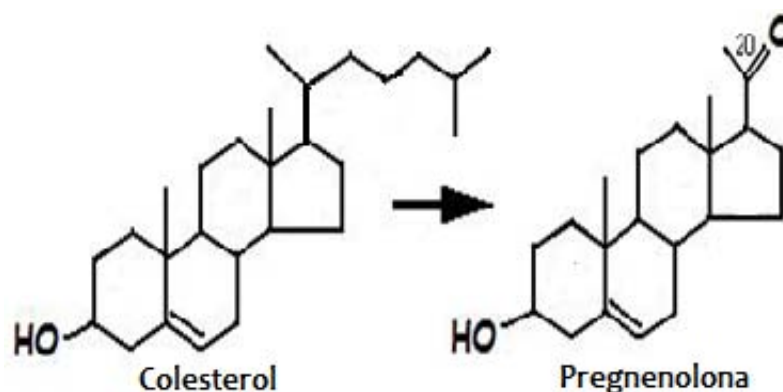


Figura 6. Separación de la cadena lateral del Colesterol (Modificado de Granner y Murray, 1988).

La transformación de colesterol a pregnenolona (Figura 6), se realiza en la mitocondria. El colesterol es transportado de la cara externa de la membrana de la mitocondria hasta la interna por la proteína reguladora de la esteroidogénesis e intervienen los fosfolípidos de la membrana y un péptido activador de la esteroidogénesis. La enzima de escisión de la cadena lateral citocromo P-450 convierte al colesterol en pregnenolona en la mitocondria, la pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa al retículo endoplasmático, donde se completa la esteroidogénesis (Tresguerres, 1999).

En el testículo existen dos rutas para la síntesis de testosterona, una a partir de 17-hidroxipregnenolona, conocida como ruta $\Delta 5$ y otra a partir de 17-hidroxiprogesterona ó $\Delta 4$ (Figura 7). La importancia de estas rutas varía según sea la especie en estudio, y en los roedores la ruta que predomina es $\Delta 4$ (Tresguerres, 1999). La síntesis de hormonas esteroides requiere de una serie de acciones para convertir el colesterol en varios tipos de esteroides. El citocromo P450_{SCC} es una enzima mitocondrial la cual cataliza la primera cadena de colesterol para producir pregnenolona (Tsai y col., 1997).

Para que se lleve a cabo la transformación de pregnenolona a testosterona es determinante la acción de 5 enzimas: 3 -hidroxiesteroide deshidrogenasa, $\Delta 4,5$ isomerasa, 17 α -hidroxilasa, C17-20 liasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Figura 7). Además el testículo sintetiza 17 β -estradiol, que deriva de la aromatización periférica en las células de Sertoli, de la testosterona o la androstenediona (Bellido, 1999).

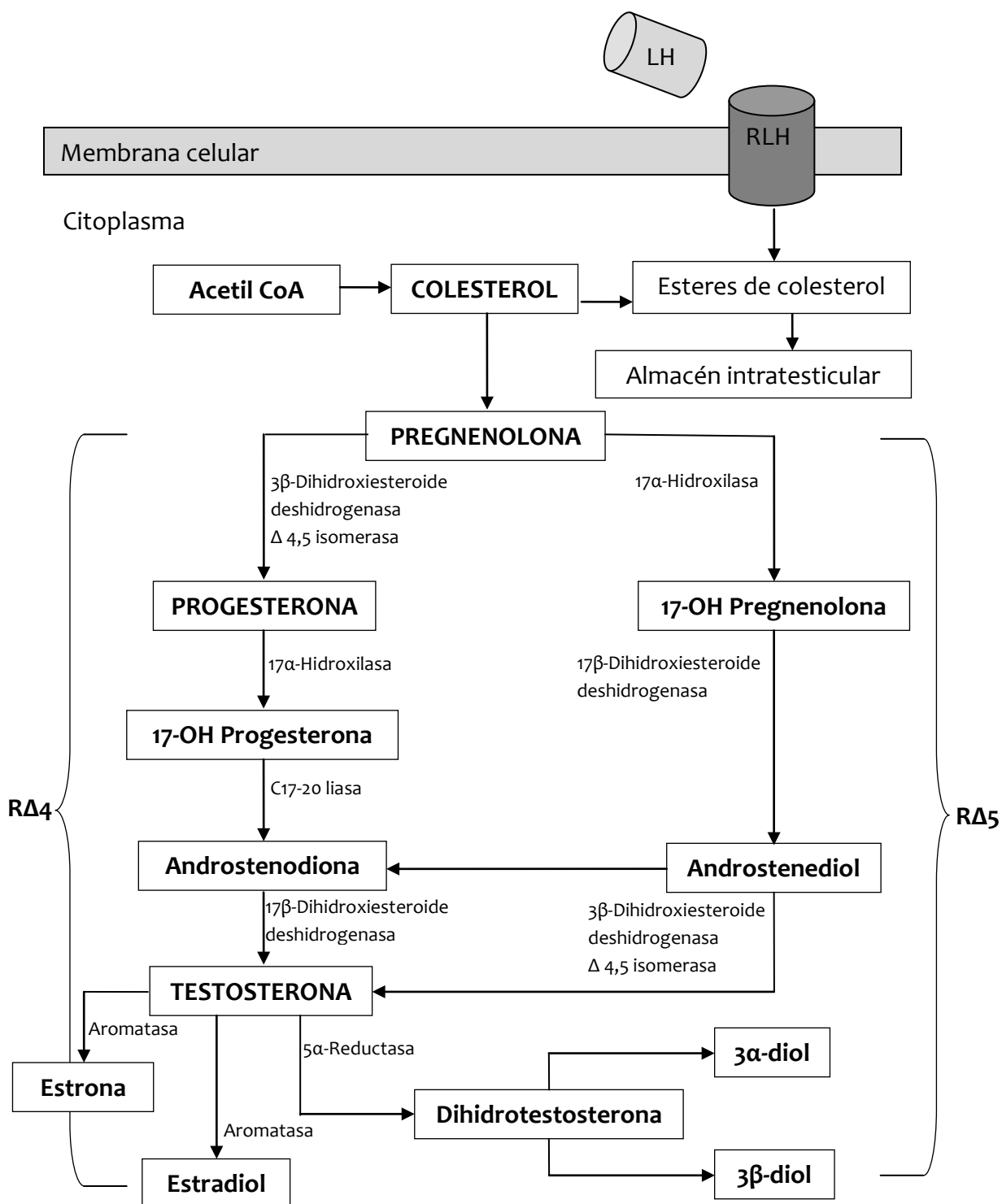


Figura 7. Representación esquemática de la esteroidogénesis. Hormona luteinizante (LH), receptor de LH (RLH), rutas (R Δ 4 y R Δ 5) (Modificado de Bellido, 1999).



Las enzimas que participan en la transformación de la pregnenolona en la esteroidogénesis son afectadas por algunas sustancias como las anfetaminas, las que pueden actuar directamente en el testículo, o de forma indirecta al modificar la secreción de alguna hormona esencial para mantener la esteroidogénesis. Se ha mostrado que disminuyen de forma significativa la síntesis de testosterona en células de Leydig (Tsai y col., 1997).

Regulación endocrina de las funciones del testículo

Las funciones del testículo son reguladas por mecanismos neuroendocrinos, en los que está involucrado el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Figura 8) (Sharpe, 1994). El hipotálamo está formado por neuronas que se agrupan y forman los diferentes núcleos, como el área preóptica, los núcleos preóptico medial, anterior, ventromedial y arcuato, así como la eminencia media. En el área preóptica media se encuentran los somas de las neuronas que sintetizan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y en la eminencia media se identifican las terminales de estas neuronas (Silverman y col., 1994), las que liberan la GnRH al sistema de vasos que conforman al sistema portal-hipotalámico hipofisario y transportan la hormona a la adenohipófisis en donde al unirse a sus receptores de membrana en los gonadotropos, estimula la secreción de las gonadotropinas (Smith y Jennes, 2001).

Las gonadotropinas (FSH y LH), son glucoproteínas que regulan las funciones de las gónadas, así mismo, algunas de las hormonas producidas por los testículos al actuar en el hipotálamo o en la hipófisis regulan la secreción de las gonadotropinas. La inhibina y activina actúan en la hipófisis y por mecanismos de retroalimentación negativa o positiva, inhiben o estimulan respectivamente la secreción de FSH por la hipófisis. La testosterona secretada por las células de Leydig por un mecanismo de retroalimentación negativa inhibe la secreción de la GnRH por el hipotálamo y de LH por la hipófisis (Figura 8). En los machos la secreción de la GnRH es de tipo pulsátil (Horrobin, 1976; Schmidt y Thew, 1993).



La FSH es esencial para que se desarrolle la espermatogénesis y la LH regula la esteroidogénesis en las células de Leydig, mientras que los andrógenos, principalmente la testosterona, estimula la transformación de la espermátide a espermatozoide (Smith y Jennes, 2001; Holdcraft y Brawn, 2004).

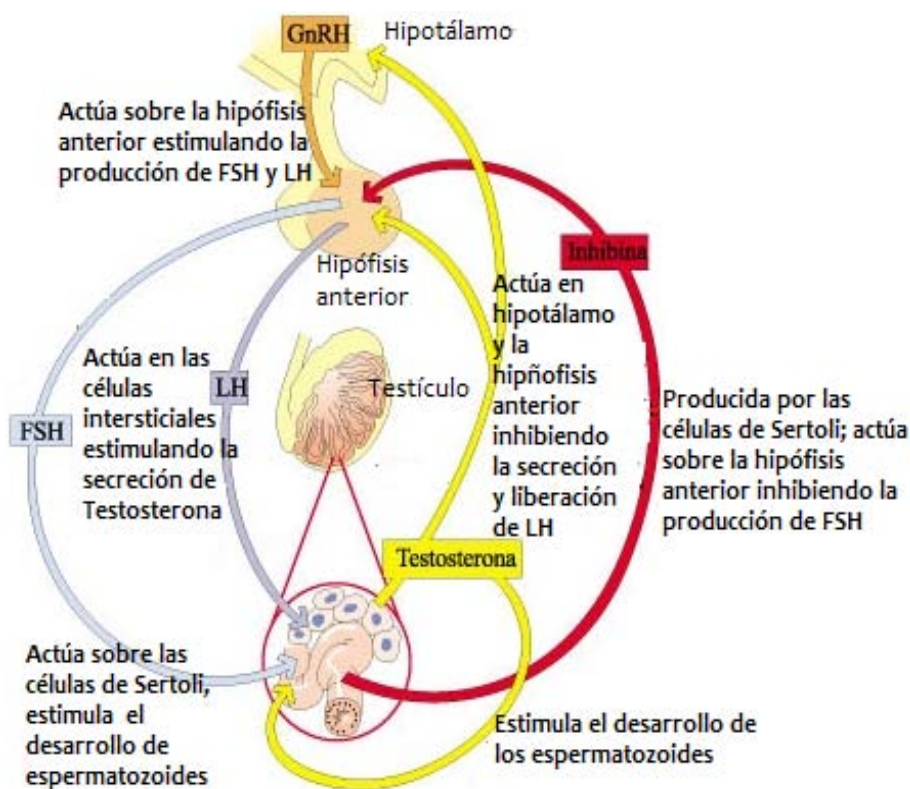


Figura 8. Control endocrino de la función testicular, eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH) (Modificado de 1).

Debido a que las células germinales no poseen receptores a la FSH, los efectos de esta hormona son mediados por las células de Sertoli. La FSH en las células de Sertoli favorece la producción de los elementos necesarios para que las espermatogonias se multipliquen, se inicie la primera división meiótica y como consecuencia participa en la regulación del desarrollo de los espermatozoides (Curtis y Barnes, 1996). También estimula la esteroidogénesis por un doble mecanismo, al aumentar el número de receptores a la LH en las células de Leydig y estimulando la síntesis del factor estimulante de la esteroidogénesis en las células de Sertoli, el cual estimula la producción de la testosterona por la célula de Leydig (Bellido, 1999).



La FSH es necesaria para el inicio de la espermatogénesis durante la pubertad, pero una vez que este proceso se ha establecido puede mantenerse por la acción de la testosterona (Tsai y col., 1997; Wang y col., 2006). La LH estimula a las células de Leydig para producir los andrógenos; intratesticularmente estos andrógenos son necesarios para una espermatogénesis normal. Los principales efectos de esta hormona sobre la esteroidogénesis consisten en aumentar la disponibilidad de colesterol y acelerar su transformación a pregnenolona (Tresguerres, 1999). Madhwa Raj y Martín en 1976, mostraron que cuando se administra diariamente un antisuero contra la LH a ratas macho a partir de los 20 días de edad y se sacrifican 14 días después, se altera la morfología de las células de Leydig, disminuye el peso del testículo y la concentración de testosterona. Con base en estos resultados los autores sugieren que la LH es un factor importante en el mantenimiento y funcionamiento de las células de Leydig y en la producción de testosterona.

Cuando se realiza la hipofisectomía a ratas macho se ha mostrado que disminuye el tamaño de los testículos, los que retornan a la cavidad abdominal, así mismo se genera la desorganización del epitelio seminífero y no se producen espermatozoides (Audesirk, 2003). Los principales efectos que se producen en el epitelio que reviste al túbulo son, disminución del número de espermatoцитos y espermátides redondas y no se observa la elongación de las espermátides. Cuando se administra a estos animales FSH o testosterona, estos parámetros son restablecidos (Bartlett y col., 1989). Estas evidencias llevaron a los autores a demostrar la importancia de las gonadotropinas y de la testosterona en el mantenimiento de la espermatogénesis. En estudios de inmunohistoquímica se ha detectado la presencia del virus de la pseudorabia (PRV), en la médula espinal, el NDR y el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) después de que se administra intratesticularmente, por lo tanto posiblemente al testículo llega inervación que transcurre por el nervio espermático y que comunica a la gónada con estructuras del encéfalo (Figura 2) (Gerendai y col., 2000). Esta evidencia anatómica demuestra una posible comunicación neural entre el cerebro y el testículo, la cual posiblemente está vinculada con la regulación de la secreción de testosterona (Selvage y River, 2003).



Ciclo del epitelio seminífero

En el epitelio germinal que reviste a los túbulos seminíferos se producen diariamente millones de espermatozoides y la población de espermatogonias es reemplazada continuamente. El epitelio seminífero, además de las células de Sertoli, incluye las germinales (las espermatogonias, espermatoцитos, espermátides y espermatozoides) (Geneser, 2000). Estas células germinales se organizan en capas concéntricas que se extienden desde la zona basal hasta el lumen del túbulo (Tiba y col., 1993).

El análisis de un corte transversal de un solo túbulo seminífero revela que en el mismo túbulo se encuentra, a distancias regulares, el mismo estadio del tejido germinal. Una generación se define como un grupo de células en aproximadamente el mismo estado de desarrollo. A lo largo del túbulo seminífero se encuentran las asociaciones celulares en una sucesión fija, denominada onda espermática. Por lo tanto es un concepto de espacio y no de tiempo, para observarla hay que recorrer el túbulo seminífero sagitalmente, en la rata existen alrededor de 4 etapas espermáticas en cada túbulo (Ross, 2004).

Como las células germinales que provienen de una sola espermatogonia tipo A están unidas por puentes citoplasmáticos y constituyen un sincitio, pueden comunicarse entre ellas y sincronizar su desarrollo. Existen varias posibilidades de asociación entre las células en desarrollo, lo que se conoce como los estadios del ciclo de la espermatogénesis; en la rata se han estudiado de I a XIV estadios presentes en el desarrollo de la célula espermática (Russel y col., 1987).

La clasificación se basa en los diferentes cambios morfológicos que se presentan en las espermátides durante el proceso de espermiogénesis, dichos cambios están basados en la forma y la posición angular del acrosoma, la cabeza de la espermátide y la condensación de la cromatina (Ross, 2004). La duración del ciclo del epitelio seminífero en el hombre es de 70 días aproximadamente, y de 7 a 21 días de maduración en el epidídimo (Working, 1995).



A los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero se les designa con números romanos de acuerdo a los cambios morfológicos que presenten, en cambio las fases del desarrollo de las espermatídes en la espermiogénesis se les asigna un número arábigo de acuerdo con su desarrollo (Figura 9).

- Estadio I: espermatogonias, espermatocitos, sin distinción del acrosoma.
- Estadio II-III: espermatogonias, espermatocitos y se inicia la formación de los gránulos acrosómicos.
- Estadio IV: espermatogonias, espermatocitos, espermatídes con citoplasma, se forma el acrosoma y se extiende sobre el núcleo.
- Estadio V: espermatogonias, espermatocitos, espermatídes con citoplasma, el ángulo de orientación del acrosoma se observa de 40° hasta 90°.
- Estadio VI: espermatogonias, espermatocitos, espermatídes con citoplasma, el ángulo de orientación del acrosoma es de 120°.
- Estadio VII: espermatogonias, espermatocitos, espermatídes con gota citoplasmática, el ángulo del acrosoma es superior a los 120°.
- Estadios VIII: espermatogonias, espermatocitos, espermatídes con desprendimiento de gota citoplasmática y espermatozoides.
- Estadio IX: espermatogonias, los núcleos de los espermatocitos sufren un cambio morfológico de redondo a ovoide con más presencia de citoplasma.
- Estadio X: espermatogonias, espermatocitos, la espermatíde sufre una transformación en la cabeza y se aprecia más elongada.
- Estadio XI: espermatogonias, espermatocitos, la cabeza de la espermatíde muestra un ángulo dorsal.
- Estadio XII: espermatogonias, espermatocitos, la cabeza de la espermatíde aun no alcanza una forma caudal.
- Estadio XIII: espermatogonias, espermatocitos, la condensación de la cromatina se completa.
- Estadio XIV: espermatogonias, espermatocitos, maduración de los espermatocitos primarios y las espermatídes con núcleos alargados, meiosis I y II.

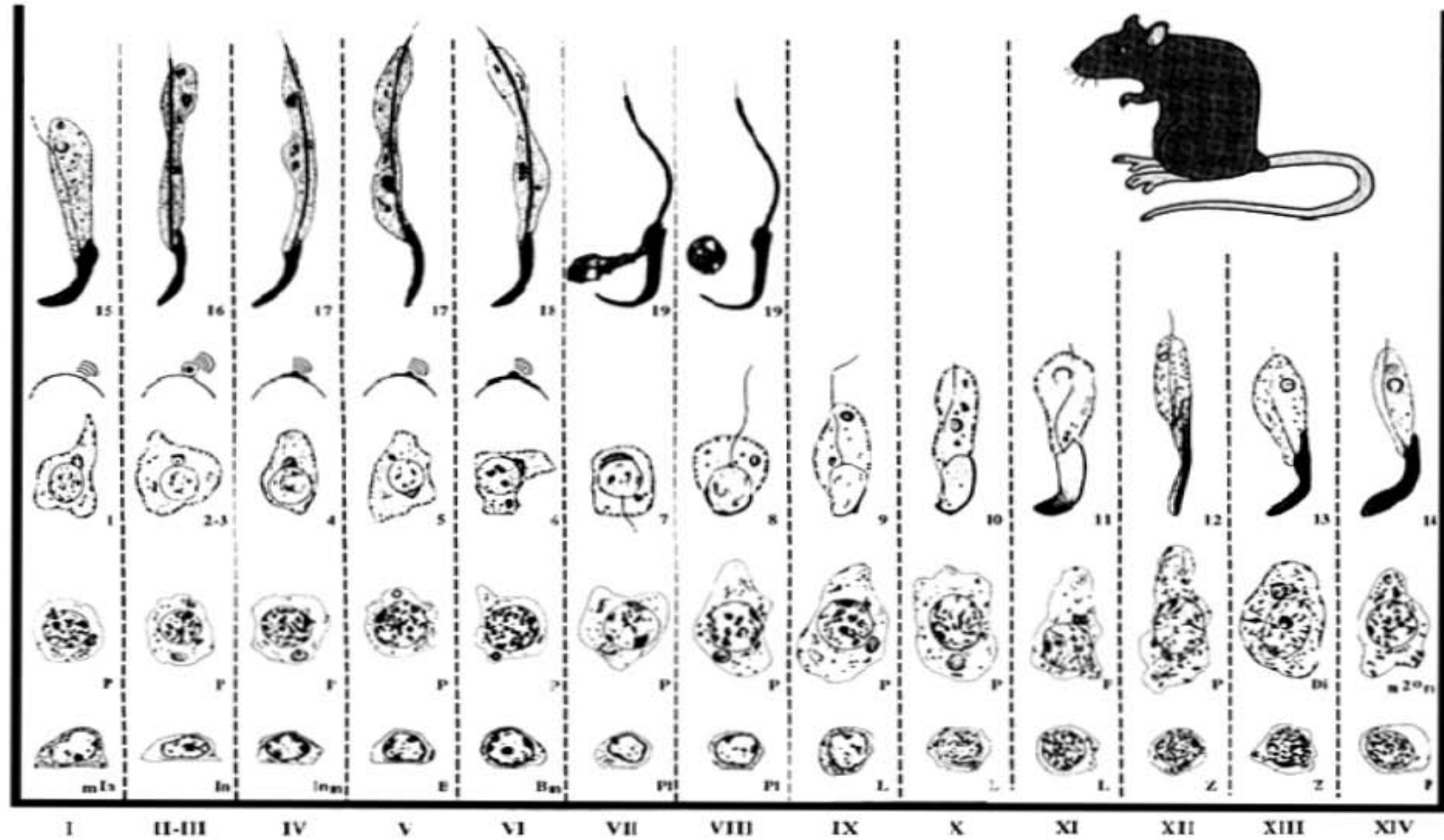


Figura 9. Esquema del ciclo del epitelio seminífero en la rata, por fases con las asociaciones celulares (Tomado de 2).



Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es un mecanismo desarrollado por los organismos pluricelulares, que se ha conservado evolutivamente y se presenta, prácticamente en todos los tejidos de un organismo (Kerr y col., 1972; Terranova y Taylor, 1999). Es un mecanismo de suicidio celular genéticamente regulado, que participa en el desarrollo y conservación de la homeostasis funcional del organismo. Cuando se presenta este proceso se observan algunas características morfológicas que fueron las que inicialmente permitieron identificarlo y caracterizarlo (Comella y col., 1999).

Los eventos que se producen durante la apoptosis, incluyen condensación tanto del citoplasma como del núcleo, con aparición de protuberancias citoplasmáticas envueltas por membrana. Estos cambios iniciales se continúan con una fragmentación nuclear y citoplasmática, en forma de cuerpos apoptóticos rodeados por membrana celular que son rápidamente fagocitados por las células de Sertoli (Comella y col., 1999).

Como consecuencia final, y al cabo de unas pocas horas, la célula apoptótica desaparece sin dejar rastro alguno. Desde un punto de vista bioquímico, las células apoptóticas se caracterizan por presentar una reducción en su potencial mitocondrial, acidificación intracelular, producción de radicales oxidantes, externalización de residuos de fosfatidilserina de la bicapa lipídica membranaria, proteólisis selectiva de determinadas proteínas celulares y degradación de la cromatina en fragmentos oligonucleosomales (Cryns y Yuan, 1998; Kerr y col., 1972).

La apoptosis durante la espermatogénesis es esencial en la regulación del número de células germinales, debido a que contribuye a mantener una población apropiada de células que puedan ser soportadas y maduras por las células de Sertoli, la remoción de células con alguna alteración, como falla en la reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA) o presencia de anomalías cromosómicas (Comella y col., 1999).



Existen tres factores importantes en la presencia de células en apoptosis en el testículo: I) la edad del animal; II) la concentración de FSH, LH y testosterona; III) el desarrollo de los estadios del epitelio seminífero. Por lo tanto la secreción de FSH, LH y testosterona es esencial para que se sustente el buen desarrollo del epitelio seminífero, debido a que estas hormonas actúan como factores de sobrevivencia de las células germinales principalmente en la etapa VII del ciclo del epitelio seminífero e inhiben la apoptosis. Si se presentan una baja concentración estas hormonas, se traduce en muerte celular manifestando un desbalance en la espermatogénesis y una menor fertilidad (McLachlan y col., 1996; Levy y col., 2006; Terranova y Taylor, 1999).

Sistema serotoninérgico

La serotonina (5-HT) se identificó en 1948 y se sintetizó en 1951 (Green, 2006). Junto con las catecolaminas forman el grupo de las monoaminas y es considerada como un neurotransmisor que se distribuye en diferentes regiones del encéfalo (Brown, 1994; Frazer y Hensler, 1999). La serotonina se encuentra en el sistema nervioso central donde es producida principalmente por un grupo de 9 paquetes celulares, que se localizan en el cerebro medio y que en conjunto constituyen los núcleos del rafé (Frazer y Hensler, 1999). También se le localiza en la hipófisis, en células y tejidos de órganos periféricos como las células cromafines de la mucosa gastrointestinal, las plaquetas y los mastocitos; así como en los órganos del sistema cardiovascular, el páncreas, el pulmón, el timo, la tiroides, el epidídimo y las gónadas (Tinajero y col., 1993; Rang y col., 2004; Linder y col., 2007).

La 5-HT es una sustancia neurohormonal y vasoconstrictora, participa en la modulación del funcionamiento del sistema cardiovascular, en la coagulación sanguínea; ejerce un papel importante en los estados de ánimo, ansiedad y sueño; también modula al sistema digestivo y la temperatura corporal (Lehninger, 2003; Vega Matuszyk y col., 1998; Rang y col., 2004; Frassetto y col., 2008). Las diferentes funciones que modula la serotonina es mediada por su unión a receptores específicos localizados en la membrana de las células diana; asimismo, en los mamíferos se ha mostrado que existen siete clases de receptores,



los cuales se identifican como 5-HT₁ al 5-HT₇; a su vez se dividen en subgrupos A, B, C ó D (Linder y col., 2007).

La serotonina se forma a partir del aminoácido triptófano, el cual se consume continuamente en la dieta. El paso inicial en la síntesis es el transporte del triptófano por el torrente sanguíneo hacia todo el cuerpo, pero principalmente al encéfalo. Las neuronas serotoninérgicas contienen la enzima triptófanohidroxilasa, esta misma regula la transformación del triptófano en 5-hidroxitriptofano (5-HTP), posteriormente este por acción de una enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilasa, se transforma en serotonina (Figura 10) (Frazer y Hensler, 1999; Jorgensen, 2007).

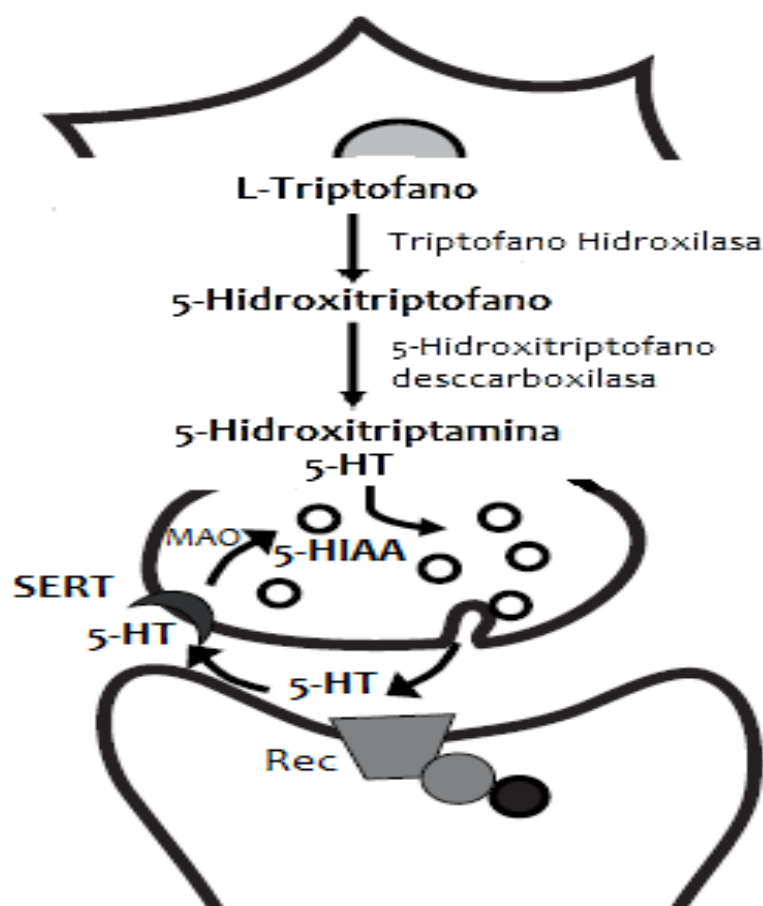


Figura 10. Síntesis de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), monoamino oxidasa (MAO), proteína transportadora (SERT), recuperación (Rec) (Modificado de Jorgensen, 2007).



Esta amina una vez sintetizada se almacena en vesículas de secreción y liberada a la hendidura sináptica y parte de esta serotonina que no se une a su receptor en la hendidura presináptica, se une a una proteína transportadora llamada SERT, que se expresa tanto en las neuronas del sistema nervioso central (SNC), como en sistemas celulares periféricos. La función de SERT es transportar a la serotonina desde compartimiento extracelular al interior; de esta manera la serotonina entra a la mitocondria en por acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO) y se transforma al ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), principal metabolito de la serotonina (Figura 10) (Linder y col., 2007; Frazer y Hensler, 1999; Rang y col., 2004; Jorgensen, 2007).

Serotonina y aparato reproductor del macho

La serotonina participa en la modulación de las funciones del testículo al modular la secreción de las gonadotropinas, o al actuar directamente en el testículo. Con base en las evidencias reportadas en la bibliografía se indica que algunas sustancias biológicamente activas se sintetizan en los testículos y que podrían participar en el control local de las funciones testiculares, entre estas sustancias se encuentran la serotonina (Csaba y col., 1998).

Con relación al papel de la serotonina en el aparato reproductor del macho, se ha mostrado que esta amina está presente en el testículo entre otros componentes (Aguilar y col., 1995; Tinajero y col., 1993). La fuente de serotonina para la gónada macho son las plaquetas y los mastocitos, así como la que se sintetiza en las células de Leydig (Tinajero y col., 1993). Otra fuente de serotonina para el testículo es el nervio espermático, sin embargo el mayor porcentaje de la amina es producida por las células de Leydig (Campos y col., 1990; Tinajero, 1993).

En el área preóptica del hipotálamo existe una comunicación directa entre las terminales de las neuronas serotoninérgicas y el soma de las neuronas que secretan la GnRH. En la eminencia media se forman sinapsis entre la terminales de ambas neuronas (Tinajero y col., 1993). En el testículo la serotonina que se sintetiza en las células de Leydig actúa de manera autócrina al unirse a los receptores 5-HT₂ y estimula la liberación del factor



liberador de la corticotropina (CRF) por la propia célula de Leydig, el cual inhibe a su vez la secreción de testosterona (Tinajero y col., 1993). También tiene la capacidad de modular el flujo sanguíneo de la gónada (Collin y col., 1996).

La administración intraperitoneal del 5-hidroxitriptofano en ratas macho de 26, 30 ó 60 días de edad induce el incremento en la concentración de FSH, cuando este mismo tratamiento se realiza en machos de 20 días de edad no se presentan cambios; los resultados indican que la participación de la serotonina en la regulación de la secreción de la FSH varía a lo largo del desarrollo del animal (Justo y col., 1989).

Por lo tanto se ha demostrado que la serotonina además de regular las funciones del testículo al participar en la modulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, actúa directamente en el testículo (Aragón y col., 2005; Shishkina y Dygalo, 2000).

p-Cloroanfetamina

El mecanismo de acción de las anfetaminas es complejo, principalmente por la capacidad de actuar en diversas regiones del cerebro. En la actualidad la humanidad consume indiscriminadamente productos nocivos para la salud, como drogas, alcohol, medicamento para la reducción de peso, anabólicos, y anfetaminas, entre otros. (Shulgin, 1990; Solowij y col., 1992; Henry y col., 1992).

Las anfetaminas incluyen a un diverso grupo de drogas, por lo regular estos agentes comparten su raíz estructural, fenetilamina y comprenden una clase de drogas con propiedades farmacológicas y toxicológicas similares, son estimulantes del sistema nervioso central, anorexígenos y agentes simpatomiméticos que actúan liberando norepinefrina, dopamina y serotonina de las terminales nerviosas, inhibiendo su síntesis, bloqueando la recaptura de estos o su metabolismo (Smith y Reynard, 1992).



Las anfetaminas también tienen el potencial de dañar a las neuronas productoras de estos sistemas de neurotransmisión. La p-Cloroanfetamina (pCA) (Figura 11) es una potente y selectiva neurotoxina del sistema serotoninérgico (Fuller, 1985; Utrilla, 2000).

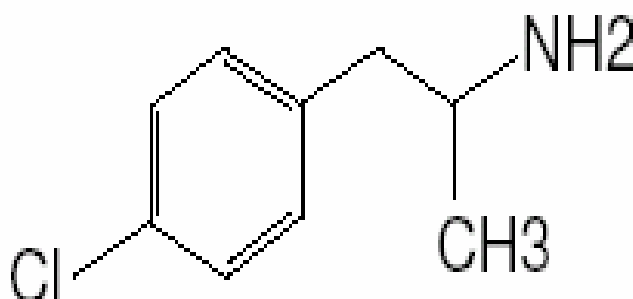


Figura 11. Estructura química de la p-cloroanfetamina (pCA) (Sprague y col., 1996).

Se ha demostrado que la pCA inhibe a la enzima limitante en la síntesis de serotonina, la triptófano hidroxilasa y a la MAO que metaboliza a la serotonina, lo que se manifiesta en la disminución en las concentraciones de serotonina y del 5-hidroxiindolacético. También daña las terminales serotoninérgicas y ocasiona su degeneración, en diferentes regiones del cerebro (Frazer y Hensler, 1999; Tsai y col., 1997).

Otro estudio demostró que la administración vía sistémica de pCA provoca la degeneración de las terminales de los axones de las neuronas serotoninérgicas que forman parte del núcleo dorsal del rafe (NDR), en contraste las células del núcleo medial del rafe (NMR) no presentan daño significativo. La diferencia en la susceptibilidad de las neuronas del NDR y el NMR a los agentes farmacológicos, posiblemente se relacione con diferencias en su aspecto morfológico y funcional. Por lo tanto los axones del NDR son más vulnerables a ciertos derivados de las anfetaminas como la pCA en comparación de los que se originan en el NMR (Mamounas y Molliver, 1988; Mamounas y col., 1991).

Al igual que la 3,4-metilenedioximetanfetamina (MDMA), la pCA, a corto (24 horas posteriores a su administración), es un potente y selectivo liberador de serotonina (Lassen, 1974; Ogren y Johansson, 1985). En la rata y en los primates se ha mostrado que la MDMA y la pCA ejercen sus efectos neurotóxicos en las terminales serotoninérgicas



(Manzana y col. 2001). También se ha demostrado que la administración 5-hidroxitriptófano a ratas tratadas con pCA incrementa la liberación de serotonina y disminuye su neurotoxicidad (Iyer y col., 1994). En resultados previos del laboratorio se ha mostrado que la inyección p-cloroanfetamina (inhibidor de la síntesis de serotonina) a ratas macho de 30 días de edad por vía sistémica, disminuye la concentración de testosterona en el suero, no se modifica la secreción de LH e incrementa la muerte por apoptosis de las células germinales a los 45 días de edad e induce el aumento del lumen de los túbulos (Aragón y col., 2005).

La menor producción de testosterona observada en los animales que recibieron pCA vía sistémica, sin que se observarán cambios en la secreción de LH puede ser el resultado de que la serotonina actuó directamente en el testículo, ya que se ha mostrado que las células de Leydig secretan serotonina, la cual actúa como modulador autocrino en estas células (Campos y col., 1990; Tinajero y col., 1993) y modula la esteroidogénesis.



JUSTIFICACIÓN

Actualmente la humanidad consume indiscriminadamente productos nocivos para la salud, como drogas, medicamento para la reducción de peso, anabólicos, y anfetaminas, entre otros; lo que ha causado un consumo de estupefacientes como las anfetaminas. Muchas de estas sustancias afectan la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión, como al serotoninérgico. Sin embargo, no se ha considerado el daño que estos generan en el cuerpo y sobre todo en su fertilidad.

Se ha mostrado que la p-Cloroanfetamina, es estructural y funcionalmente es similar a una droga recreacional, el éxtasis, inhibe la secreción de serotonina, que participa en la modulación de la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y como consecuencia en el mantenimiento de la estructura y funciones del testículo, espermatogénesis y esteroidogénesis. También es posible que esta anfetamina actúe directamente en gónada y module los eventos antes mencionados.

Por ello, en el presente trabajo se analizaron los efectos de la administración sistémica o directamente en el testículo de p-Cloroanfetamina sobre la concentración de serotonina en el testículo, secreción de testosterona y estructura de la gónada en la rata macho prepúber.

Los resultados de este estudio nos permitirán avanzar en el conocimiento del daño que causa la administración de la p-Cloroanfetamina, la alteración en la regulación endocrina del testículo, así como la relación del sistema serotoninérgico con el funcionamiento de las gónadas.



HIPÓTESIS

La serotonina ejerce un papel estimulante en la regulación de la secreción de testosterona, al actuar directamente en el testículo. Por ello, la inhibición de la síntesis de esta amina en este órgano inducido por la administración de p-Cloroanfetamina, se traducirá en la disminución de la secreción de testosterona y en alteraciones en la estructura del testículo.



OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la inhibición del sistema serotoninérgico del testículo inducida por la administración de p-cloroanfetamina en la secreción de testosterona y en la estructura de la gónada de la rata macho prepúber.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el efecto de la administración de p-cloroanfetamina por vía sistémica en la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético en hipotálamo, hipófisis, adrenal y testículo de la rata prepúber.
- Estudiar el efecto de la administración de p-cloroanfetamina directamente en el testículo en la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético de la rata macho prepúber.
- Analizar el efecto de la administración de la p-cloroanfetamina por vía sistémica o en el testículo, en la concentración de testosterona en el suero de la rata macho prepúber.
- Analizar el efecto de la administración de la p-cloroanfetamina por vía sistémica o en el testículo, en la estructura de la gónada de la rata macho prepúber.
- Analizar el efecto de la administración de p-Cloroanfetamina por vía sistémica o en testículo, en la apoptosis en la gónada de la rata macho prepúber.



MATERIALES Y MÉTODO

1. Efecto de la administración sistémica de p-Cloroanfetamina

Se utilizaron ratas macho de la cepa CII-ZV con 30 días de edad. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de iluminación (14hr de luz y 10hr de oscuridad), con libre acceso a la madre hasta el destete (21días), posteriormente al agua y alimento durante todo el tiempo. Los animales se dividieron al azar de la siguiente manera:

- Ratas macho sin tratamiento alguno, testigo absoluto (TA), sacrificados a los 65 días.
- Ratas macho a los que se les administró vía sistémica solución salina al 0.9%, grupo vehículo (Vh), sacrificados a los 65 días.
- Ratas macho tratados con p-Cloroanfetamina (pCA) vía sistémica.

La dosis de p-Cloroanfetamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) que se administró fue de 10mg/kg de peso corporal (p.c.), disuelta en solución salina al 0.9 %. La administración de solución salina o pCA se realizó por vía sistémica cada 8 días a partir del día 30 de vida hasta los 65 días de edad, momento en el cual se procedió a su sacrificio de los animales de los diferentes grupos experimentales.

2. Efecto de la administración intratesticular de p-Cloroanfetamina

Un grupo de ratas macho de 30 días de edad se les inyectó en cada uno de los testículos 20µL de solución salina al 0.9% (inyección bilateral) (Vh-b). A otro grupo de animales se les realizó la inyección intratesticular de p-Cloroanfetamina (inyección bilateral) (pCAb).



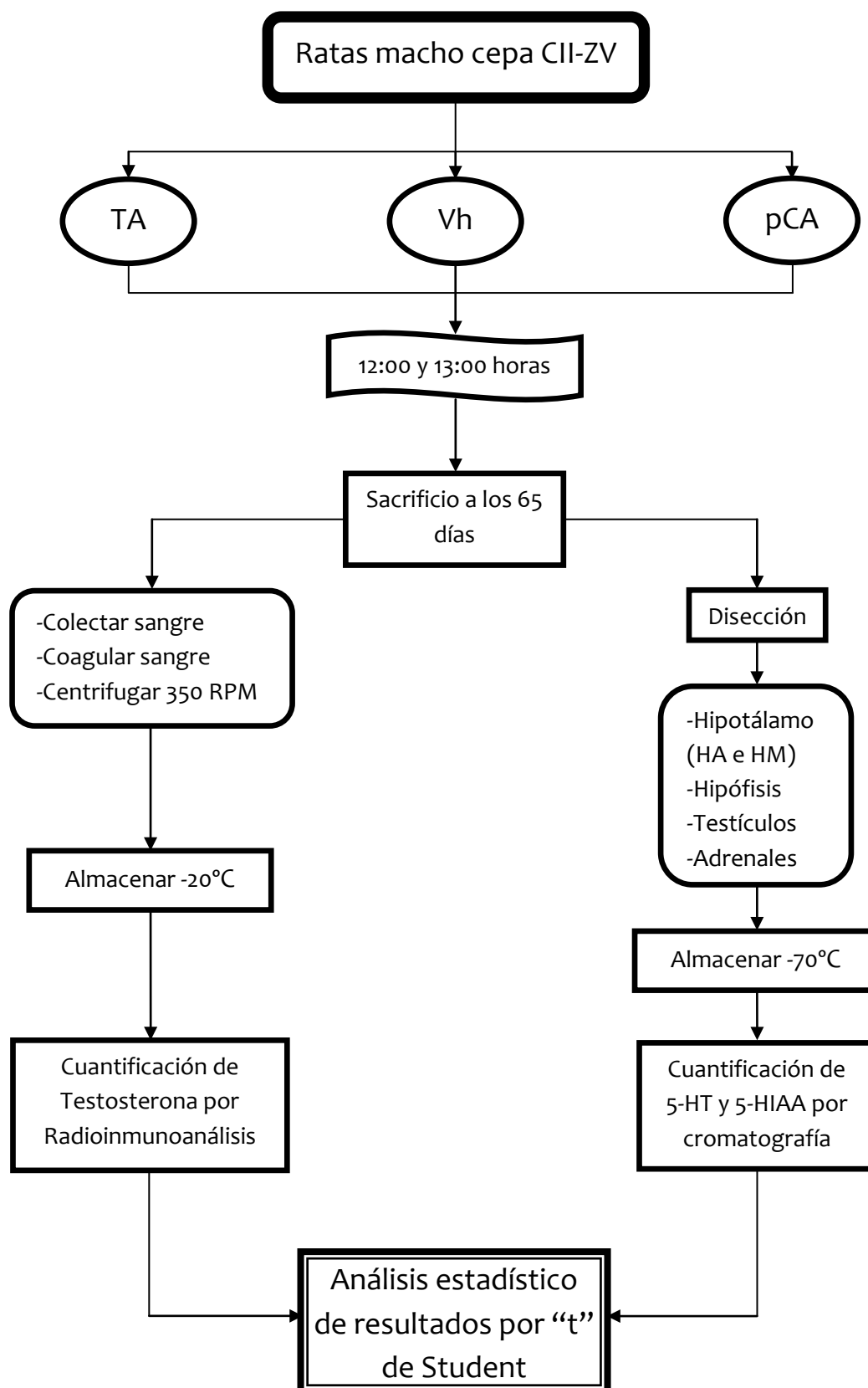
Procedimiento de la inyección intratesticular bilateral

Los animales se anestesiaron previamente con pentobarbital sódico (40mg por 1kg de p.c.) (Anestesal, Smith Kline Norden de México), se realizó una pequeña incisión en la piel que cubre al testículo, se procedió a introducir una aguja (30G22mm), por último se realizó la inyección de 20µL del vehículo (0.9%) ó del fármaco (10mg/kg de p.c. en relación al peso del testículo de aproximadamente 300mg) por cada testículo. La aguja se encontraba conectada a una jeringa Hamilton acoplada a una bomba de microinyección (MCA/100 Bionalitycal Systems, USA). Después de realizar la microinyección se retiró la aguja y se suturó la piel. Este procedimiento se siguió para cada testículo.

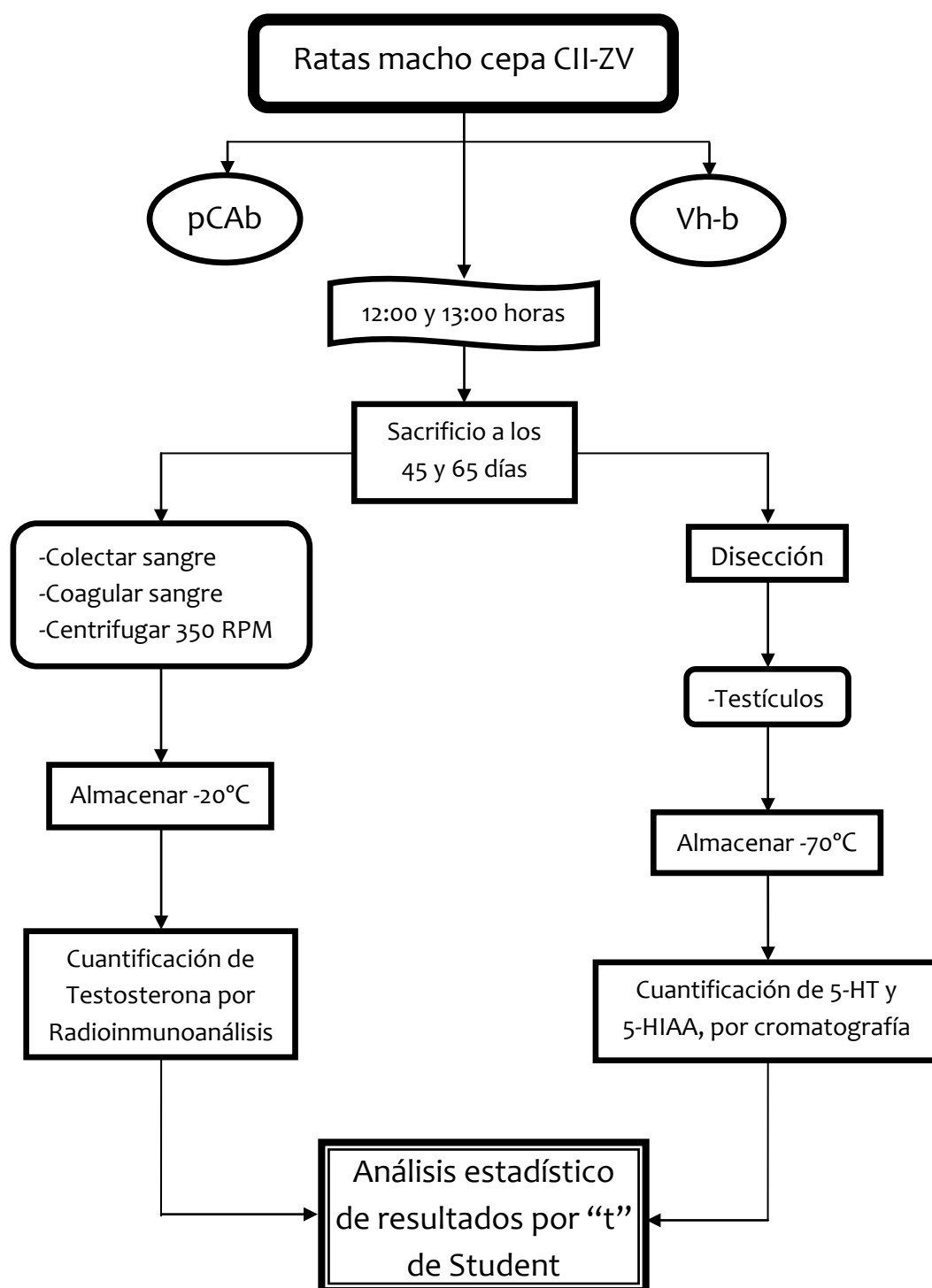
Procedimiento de sacrificio

Animales de los diferentes grupos experimentales tratados por vía sistémica se sacrificaron a los 65 días de edad, mientras que los animales en los que se realizó la inyección intratesticular bilateral de solución salina y fármaco fueron sacrificados a los 45 ó 65 días de edad. En todos los casos el sacrificio se realizó por decapitación, entre las 12:00 y 13:00 horas, momento en el que se colectó la sangre del tronco y se le dejó coagular por 20 minutos para ser posteriormente centrifugada, el suero se recolectó y se almacenó a -20°C hasta el día de la cuantificación de testosterona (Esquema 1).

En los animales tratados vía sistémica se realizó la extracción del cerebro, la hipófisis, biopsia de testículo izquierdo y testículo derecho, y las dos adrenales; en el caso de los animales que fueron tratados con inyección intratesticular bilateral vehículo y fármaco se realizó la disección de los testículos, se tomó una biopsia de cada uno de los mismo; cada muestra se almacenó a -70°C, para la posterior cuantificación de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético por cromatografía de líquidos (Esquema 2). Con la concentración del neurotransmisor y su metabolito se procedió a realizar el cálculo de 5-HIAA/5-HT indicador de la actividad de la neurona serotoninérgica. En el momento del sacrificio el par de testículos de cada animal se fijaron en líquido de Bouin o Paraformaldehído al 4% para el posterior análisis de la estructura del testículo.



Esquema 1. Diagrama de flujo, donde se representa la metodología que se siguió en ratas macho sin tratamiento (TA), tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir de los 30 días de edad y sacrificados a los 65 días. hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM).



Esquema 2. Diagrama de flujo, donde se representa la metodología que se siguió en ratas macho con inyección en ambos testículos (bilateral) de solución salina (Vh-b) o con p-Cloroanfetamina (pCAB) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días.



Cuantificación de 5-HT y de su metabolito

Se realizó la disección del hipotálamo anterior (HA) y medio (HM) siguiendo las coordenadas propuestas en el Atlas de Paxinos y Watson (1982). Las biopsias de HA, HM, Hipófisis, testículos y adrenales, se pesaron, se colocaron en un tubo ependorf y se agregó ácido perclórico 0.1N (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para ser homogenizadas en frío, posteriormente fueron centrifugadas las muestras a 12000rev/min, durante 30 minutos, y a una temperatura controlada de 4°C. El sobrenadante fue filtrado con membranas de celulosa de una luz en poros de 0.45µm (Millipore Bedford, MA, USA). Solamente 20µL del filtrado requiere el equipo para la cuantificación de la concentración de serotonina y del ácido 5-HIAA, en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución. La concentración del neurotransmisor y el metabolito se expresó en ng/mg de tejido (Esquemas 1 y 2).

El sistema de cromatografía fue calibrado con el método de estándar externo; se prepararon soluciones estándar de 5-HT y 5-HIAA en una concentración de 0.1ng, 0.5ng y 1.0ng, se realizó una curva de calibración. La serotonina y su metabolito se identificaron por los tiempos de retención y el sistema de cromatografía emplea el área bajo los picos de los diferentes estándares para el cálculo de la concentración del neurotransmisor.

Hematoxilina-PAS

Los testículos fijados de los animales de los diferentes grupos experimentales, se deshidrataron e incluyeron en parafina, se realizaron cortes histológicos de la región central de los testículos de 5 micras de grosor. Los cortes se montaron en portaobjetos recubiertos con albumina (para el análisis del ciclo del epitelio seminífero) o poli-L-lisina (para el estudio de apoptosis). Se colectaron dos portaobjetos por testículo para la evaluación del ciclo del epitelio seminífero y de la apoptosis. Una laminilla por cada testículo se desparafinó, hidrató y se tiñó con la técnica de Hematoxilina-Eosina-PAS y finalmente se montó con Permount para su posterior análisis. En cada testículo se analizaron 100 túbulos para establecer la etapa del ciclo del epitelio seminífero, siguiendo los criterios propuestos por Russel (1987).



Evaluación de apoptosis

En una laminilla de cada testículo, obtenida como se menciona en la sección anterior se realizó la técnica de TUNEL (Aragón y col., 2005) y se procedió a contar el número de células que presentaban una coloración café en el compartimento basal y adluminal de 50 túbulos seminíferos. La técnica de TUNEL se caracteriza porque las células muertas por apoptosis se tiñen de color café.

Concentración de testosterona en el suero

La sangre colectada en el momento del sacrificio se centrifugó a 3000rev/min durante 15 minutos. Se separó el suero y en este se realizó la cuantificación de testosterona por radioinmunoanálisis de fase sólida, se utilizó un kit comercializado por Coat-A-Count (USA). La concentración de testosterona se expresó en ng/mL.

Análisis estadístico de resultados

Los resultados de las concentraciones de serotonina y del ácido 5-HIAA en testículo, HA, HM, hipófisis y adrenales; de testosterona en suero y del número de células en apoptosis se analizaron por la prueba “t” de Student. Solo se consideraron significativas las diferencias en las que la “p” sea igual o menor a 0.05.



RESULTADOS

Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina vía sistémica

En el hipotálamo anterior de los animales que recibieron solución salina vía sistémica (Vh) la concentración de 5-HT y la relación 5HIAA/5HT aumentó significativamente mientras que la concentración del 5-HIAA disminuyó, en comparación con el grupo de animales TA. En el hipotálamo medio no se presentan cambios en estos parámetros (cuadro 1).

Cuadro 1. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo anterior y medio de ratas macho sin tratamiento (TA) o tratados con solución salina (Vh) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

Hipotálamo Anterior			
Grupo	5-HT	5-HIAA	5HIAA/5-HT
TA	0.75 ± 0.29	2.78 ± 0.08	0.28 ± 0.02
Vh	1.48 ± 0.03 *	1.38 ± 0.18 *	0.41 ± 0.05 *
Hipotálamo Medio			
TA	0.80 ± 0.33	2.74 ± 0.11	0.32 ± 0.05
Vh	1.00 ± 0.17	2.13 ± 0.34	0.58 ± 0.10

* $p < 0.05$ vs TA (prueba “t” de Student)

En la hipófisis de los animales a los que se les administró el Vh, la concentración de serotonina y su metabolito disminuyó significativamente en comparación con el grupo de animales TA. Un comportamiento inverso se observó en la concentración del 5-HIAA en el testículo y en la glándula adrenal (Cuadro 2). En relación a la concentración de testosterona en el suero de los animales tratados con Vh, no se observaron diferencias significativas en comparación con el grupo de animales TA (3.06 ± 0.46 vs. 3.34 ± 0.55 NS).



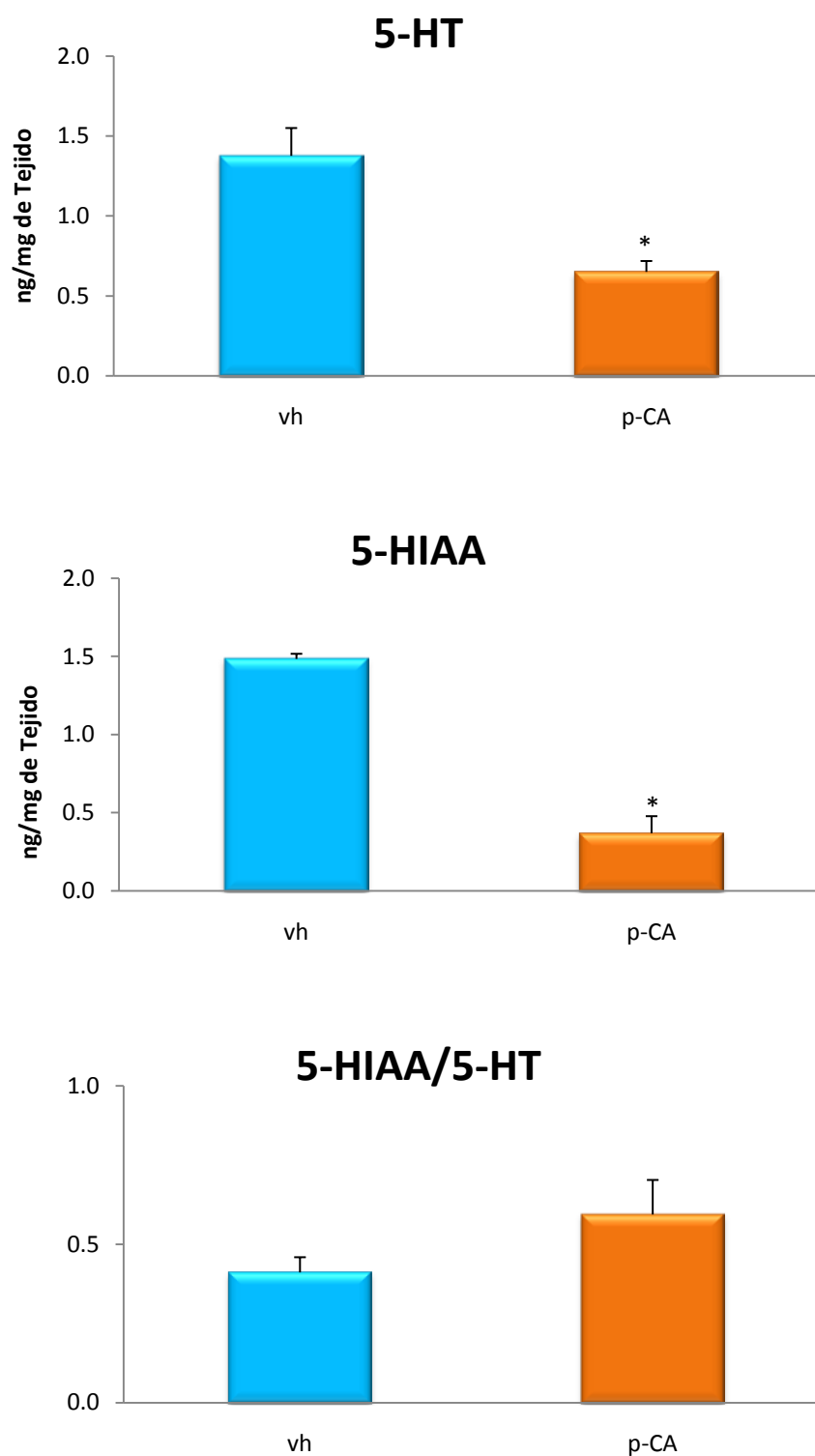
Cuadro 2. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT) y del 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en la hipófisis, testículo y adrenal de ratas macho sin tratamiento (TA) o tratados con solución salina (Vh) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

Hipófisis		
Grupo	5-HT	5-HIAA
T. A.	0.52 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.19
Vh	0.28 $\pm$ 0.04 *	0.29 $\pm$ 0.06 *
Testículo		
T. A.	0.05 $\pm$ 0.005	0.032 $\pm$ 0.02
Vh	0.13 $\pm$ 0.026	0.046 $\pm$ 0.08 *
Adrenal		
T. A.	1.61 $\pm$ 0.22	0.040 $\pm$ 0.01
Vh	1.57 $\pm$ 0.06	0.072 $\pm$ 0.01 *

* $p < 0.05$ vs TA (prueba “t” de Student)

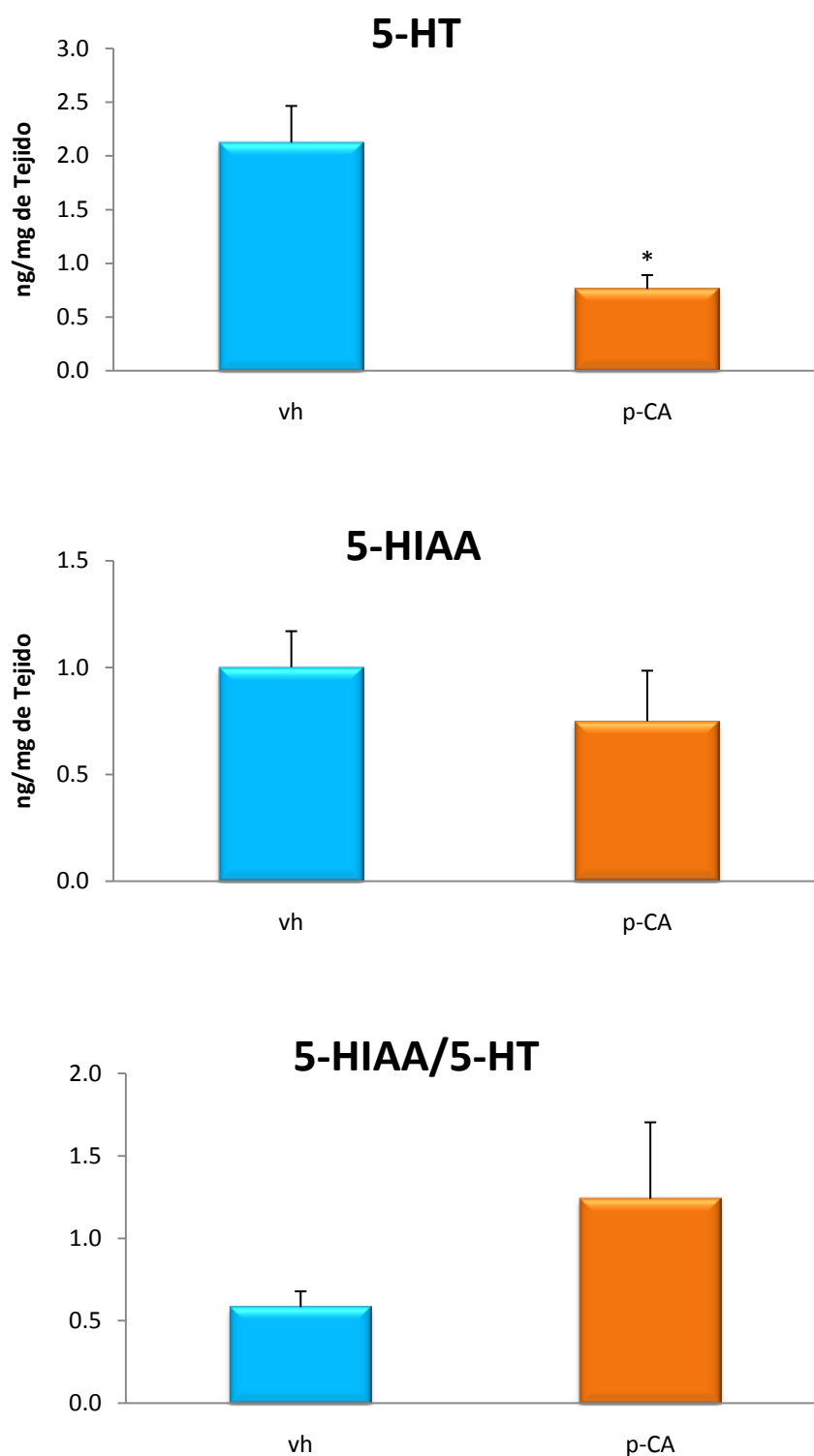
Debido a que la administración de Vh modificó algunos de los parámetros evaluados en la hipófisis, los testículos y las adrenales, así como en hipotálamo anterior y medio, se utilizó como grupo de comparación al grupo con Vh, para realizar el análisis de los efectos de la administración de pCA. En comparación con los animales que se les administro solución salina al 0.9%, en aquellos que fueron tratados con pCA disminuyó significativamente la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético en el hipotálamo anterior; la 5-HIAA/5-HT se incrementó pero no fue estadísticamente significativo (Figura 12). En el hipotálamo medio, la concentración de serotonina también disminuyó y no se modificó la concentración del 5-HIAA, ni la relación 5-HIAA/5-HT (Figura 13).

La concentración de 5-HT y del 5-HIAA en hipófisis de los animales tratados con pCA, no se modificó en comparación con el grupo Vh (Figura 14). En el testículo y la glándula adrenal de estos animales se observó la disminución significativa en la concentración de la amina y su metabolito (figuras 15 y 16). En relación con el grupo Vh, la concentración de testosterona en suero de los animales tratados con pCA, no se modificó significativamente (figura 17).



* $p < 0.05$ vs grupo Vh (prueba "t" de Student)

Figura 12. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y la relación $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ en el hipotálamo anterior de ratas macho, tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



* $p < 0.05$ vs grupo Vh (prueba "t" de Student)

Figura 13. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo medio de ratas macho, tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

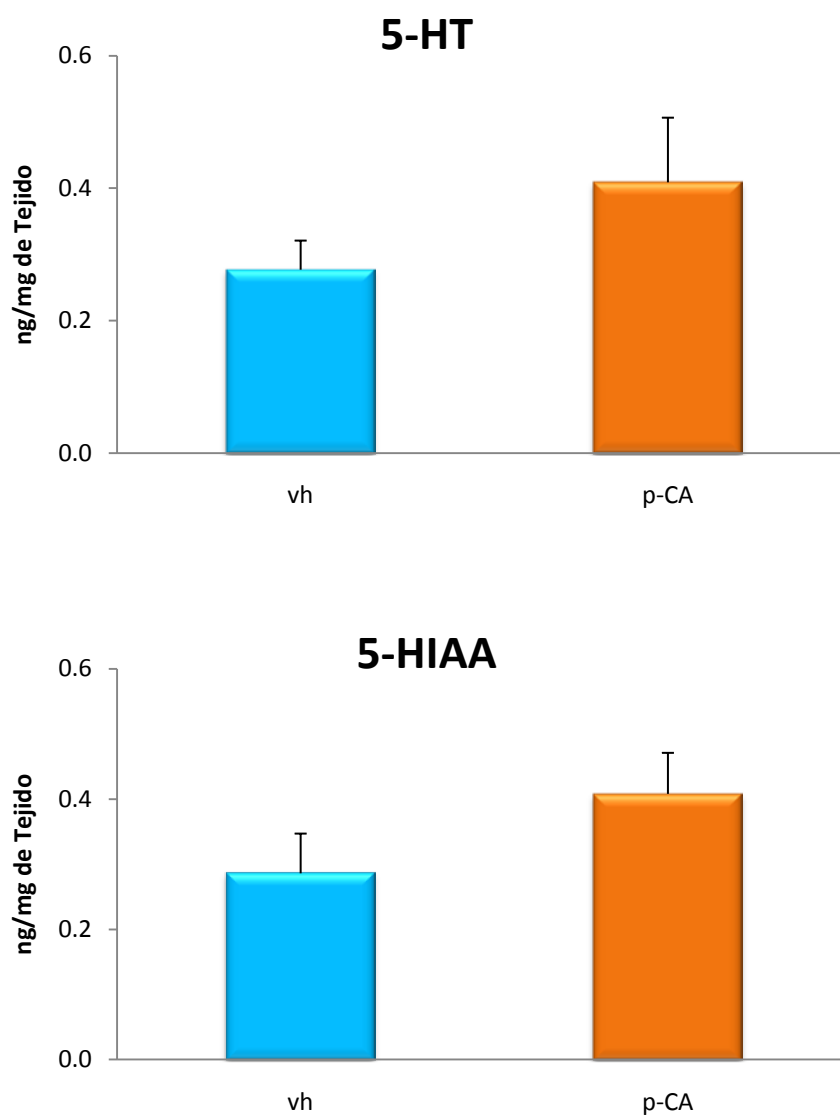
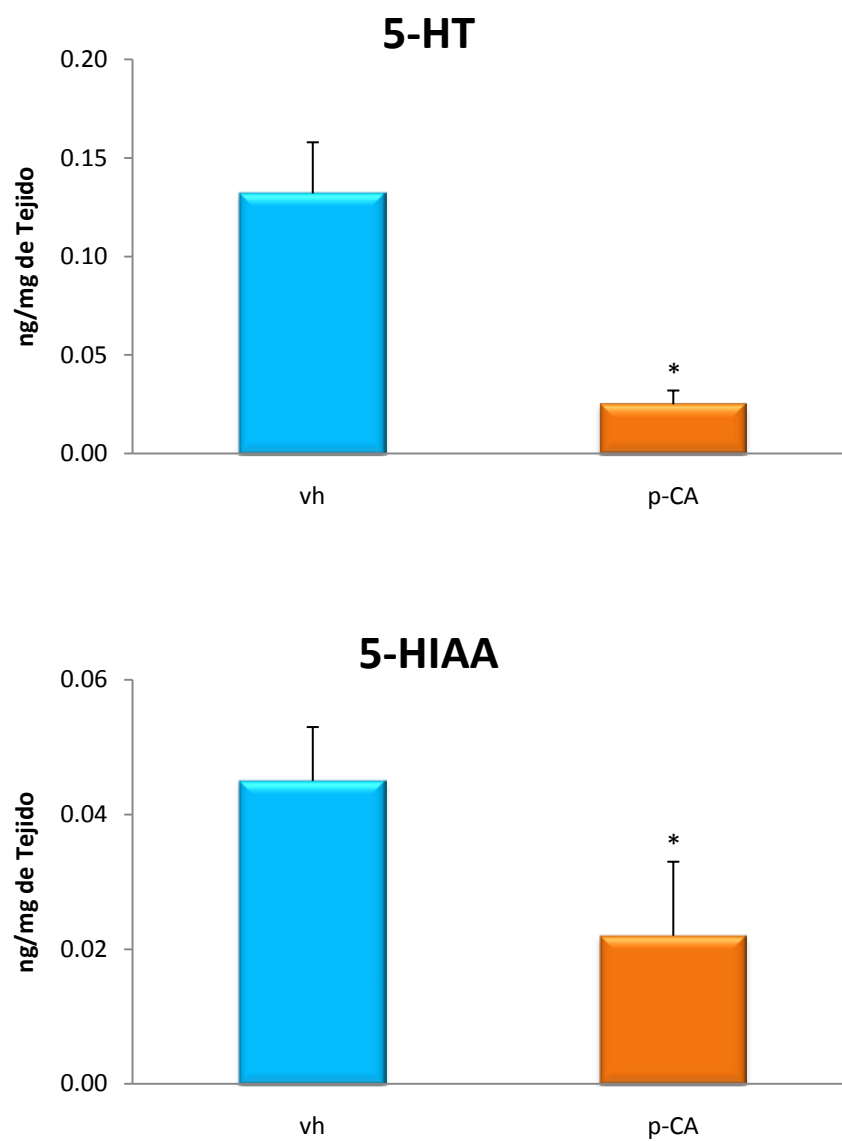


Figura 14. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT) y del 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en la hipófisis de ratas macho, tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



* $p < 0.05$ vs grupo Vh (prueba "t" de Student)

Figura 15. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT) y del 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en los testículos de ratas macho, tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

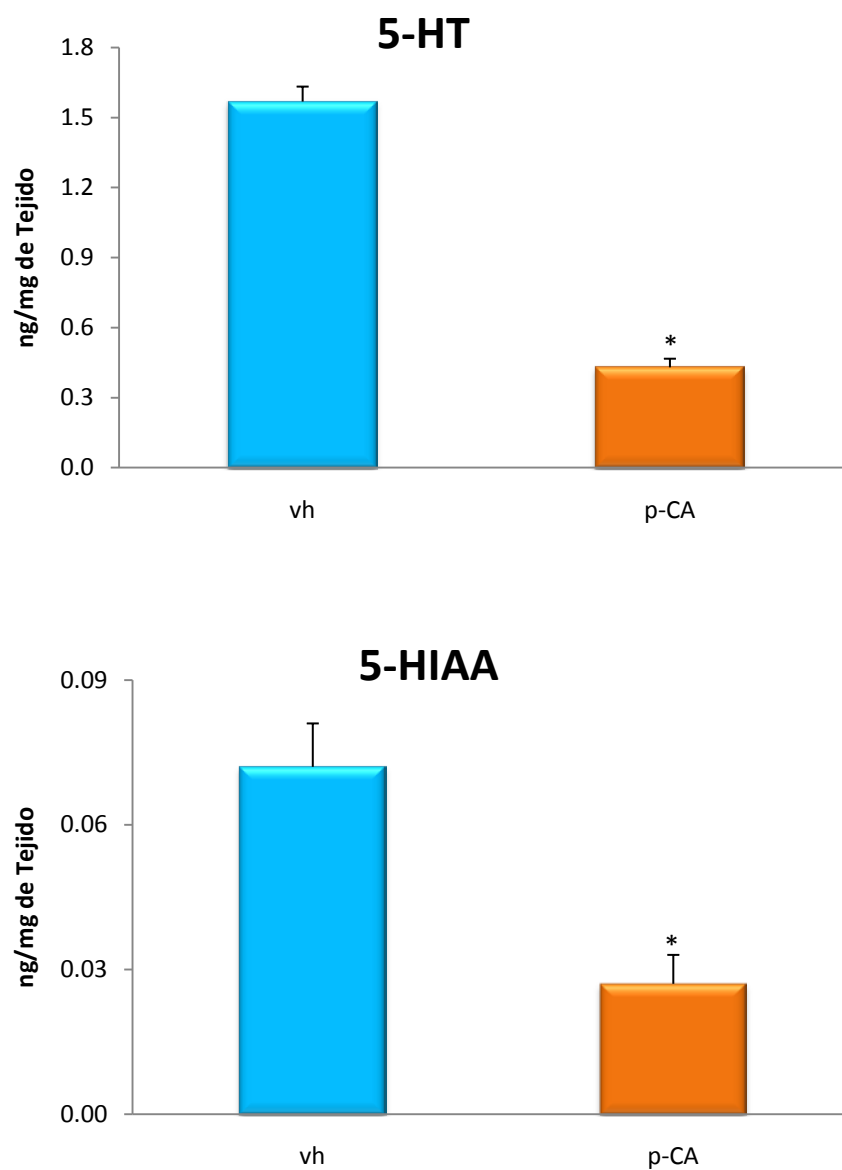


Figura 16. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT) y del 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en las adrenales de ratas macho, tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

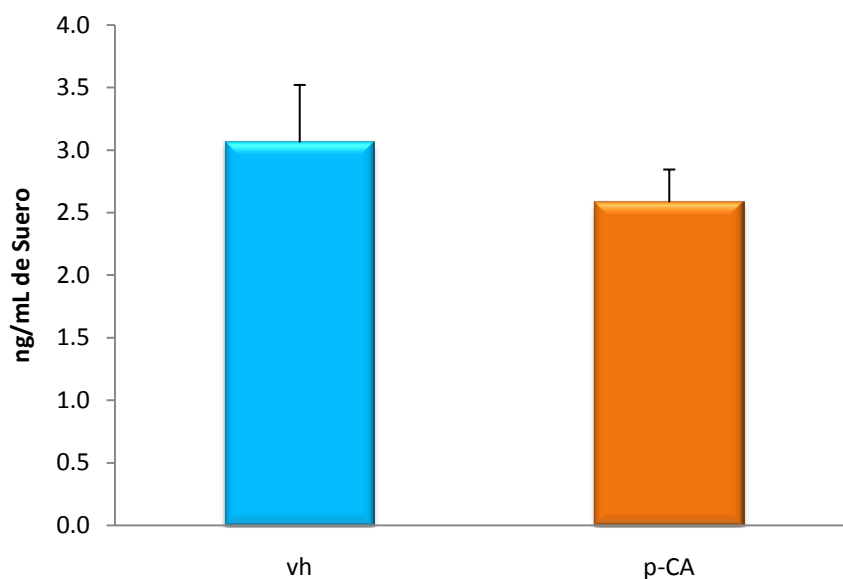


Figura 17. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración de testosterona en el suero de ratas macho, tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina vía sistémica en el ciclo del epitelio seminífero

En los testículos de los animales testigo absoluto y de los que recibieron solución salina, la organización del epitelio seminífero presentó un arreglo normal, considerando los criterios establecidos por Russell y col., (1987) lo que reflejo que el 100% de los túbulo analizados fueron normales.

En los animales TA, la mayoría de los túbulos se encontraban en las etapas de la IV a la VIII, que se caracterizan por la presencia de la vesícula acrosómica, la cual se extiende sobre la superficie del núcleo (IV); el ángulo de posición del acrosoma se extiende a partir de 40° hasta los 90° (V); el ángulo del acrosoma se extiende hasta los 120°, con presencia de espermátides alargadas (VI); las espermátides alargadas se extienden en la zona adluminal del epitelio seminífero, mientras que el ángulo del acrosoma es superior a los 120° (VII) y el núcleo de las espermátides aun no cambia a una forma elongada (VIII) (Figuras 18 y 19).



En los que recibieron Vh predominaron los túbulos en las etapas IV a VI, XII y XIII, que se caracterizan por la presencia de espermatogonias, espermatocitos y espermátides en transformación, la condensación de la cromatina aun no se completa (XII); la condensación de la cromatina está por finalizar, formando la cabeza caudal (XIII) (Figuras 18 y 19).

Mientras que, en los testículos de los animales que se les administró la pCA un alto porcentaje de túbulos presentó desorganización del epitelio, por lo que fueron considerados como anormales. En aquellos túbulos que si presentaban una organización normal del epitelio, predominaron las etapas VI a VIII y XII (Figuras 18 y 19).

Las microfotografías A y B presentan un corte de testículo de animal TA, donde se aprecian los estadios IV (A) y V (B) que son de los más representativos para este grupo de animales. En el grupo de animales que se les administró solución salina vía sistémica C y D, se observaron los estadios VI (C) y VII (D), donde se observan espermatocitos y espermátides. En las microfotografías relacionada con el grupo pCA (E y F) se observó un daño severo en el epitelio seminífero y un alto porcentaje de túbulos se encontraron en el estadio VIII (E).

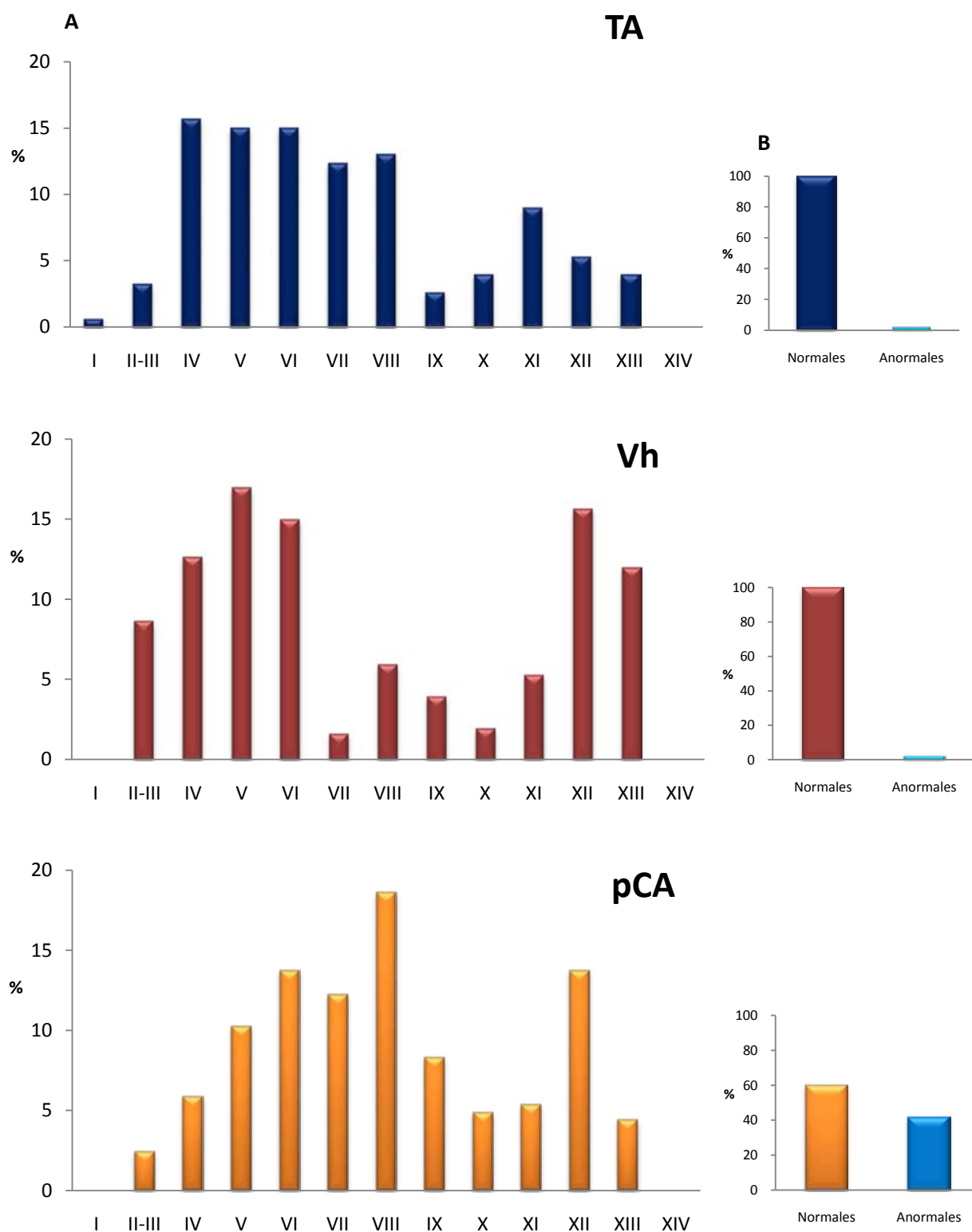


Figura 18. Porcentaje de túbulos en los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero (A) y porcentaje de túbulos normales y anormales (B) de ratas macho, sin tratamiento (TA), tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

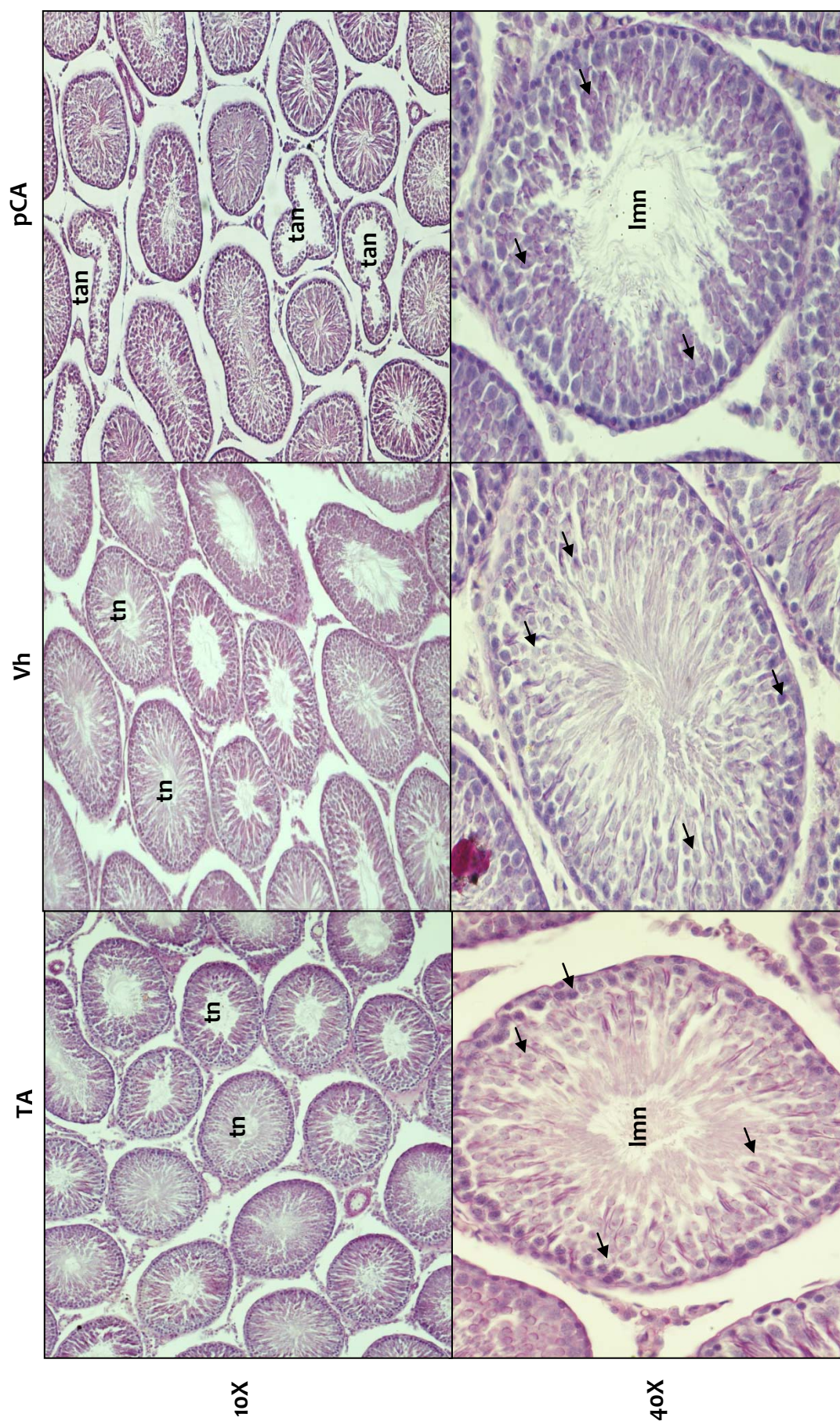


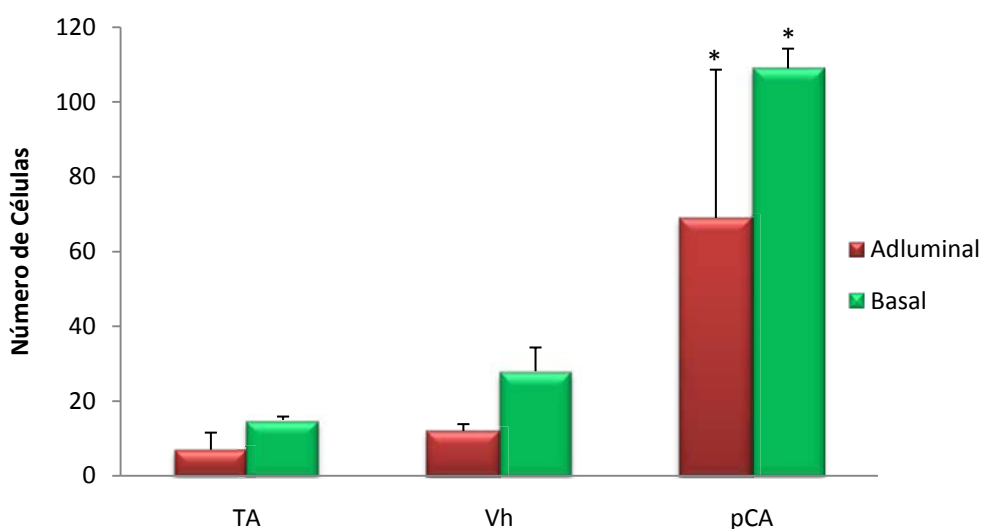
Figura 19. Microfotografías (10X y 40X) de corte de testículo de ratas macho, sin tratamiento (TA), tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días. Etapa IV en testigo absoluto, etapa V en Vh y etapa VIII en pCA. Lumen (lmn), túbulo normal (tn), túbulo anormal (tan), marcado en flechas espermatozonias, espermatozonios y espermátides.



Apoptosis en el compartimiento basal o adluminal del epitelio seminífero

Cuando se analizó la presencia de células muertas por apoptosis en el compartimiento basal y adluminal del epitelio seminífero se observó que tanto en los testículos de los animales TA como aquellos que recibieron Vh, en ambos compartimentos el número de células en apoptosis fue bajo. En comparación con los animales tratados con VH, en los animales que recibieron pCA se observó el incremento en el número de células en apoptosis en ambos compartimentos, pero esto fue más evidente en el compartimiento basal (Figura 20).

En los animales TA o aquellos que recibieron Vh, no se observó gran daño en las células que conforman el epitelio seminífero, debido a que muy pocas células del compartimiento basal presentaron las características de apoptosis (Figura 21, A, B, C y D). Mientras que en aquellos que recibieron pCA se presentó un gran daño en las células germinales, espermatogonias y espermatoцитos (Figura 21, E y F).



* $p < 0.05$ vs Vh (prueba "t" de Student)

Figura 20. Media $\pm$ e.e.m. del número de células en apoptosis el compartimiento basal o adluminal del epitelio seminífero de ratas macho sin tratamiento (TA), tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días.

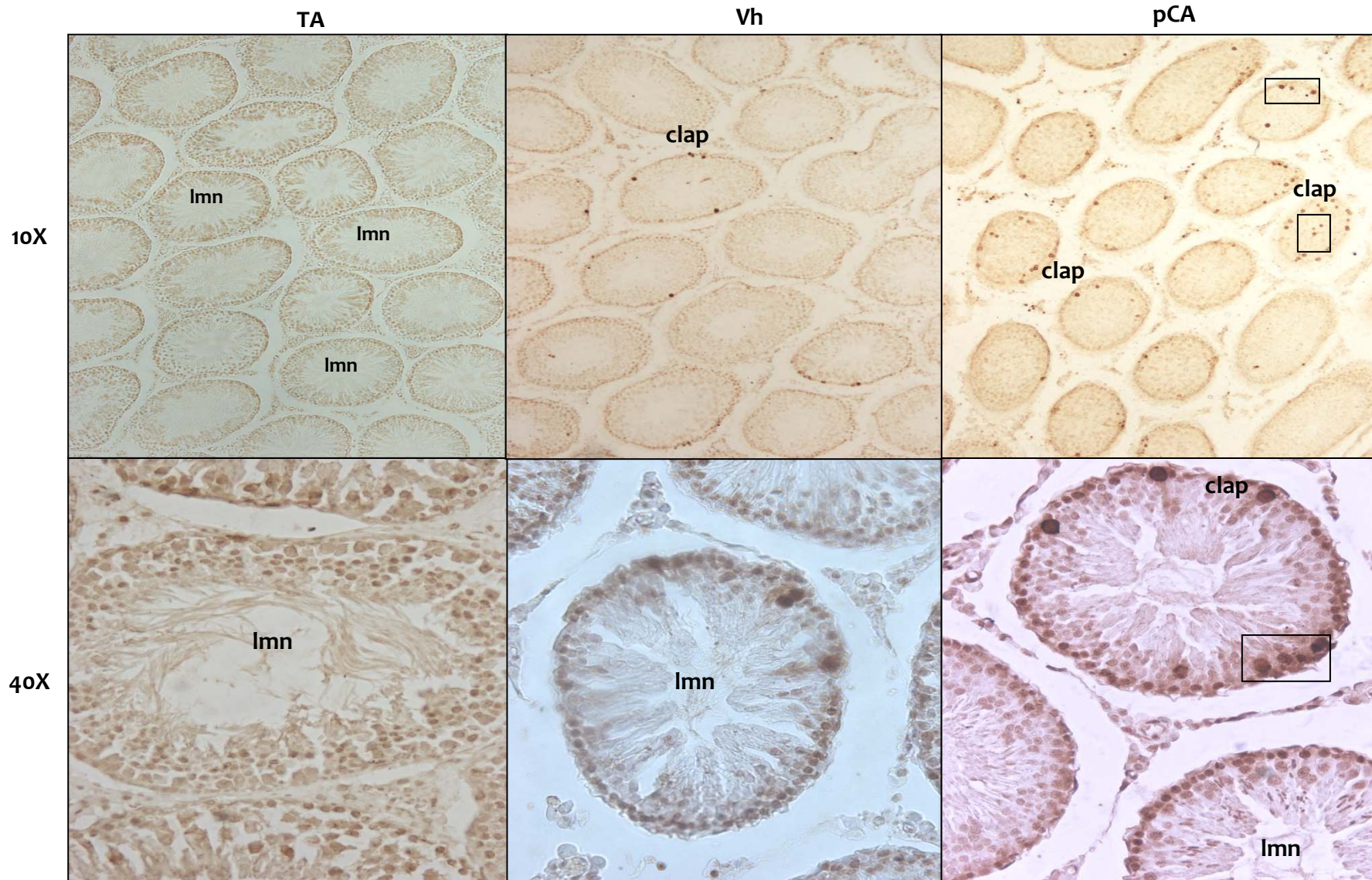


Figura 21. Microfotografías (10X y 40X) de túbulos seminíferos teñidos por la técnica de Tunel de ratas macho sin tratamiento (TA), tratados con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días. Lumen (lmn), células en apoptosis (clap); los recuadros representan la presencia de células apoptóticas en el compartimiento basal o adluminal.



Cuadro 3. Resumen de los resultados observados por la administración de pCA sobre la concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), testosterona, ciclo, estructura y apoptosis del epitelio seminífero, en ratas macho tratados vía sistémica y sacrificados a los 65 días de edad. Las flechas en rojo indican la disminución significativa en los parámetros, flechas en amarillo indica un aumento significativo y el signo igual indica que no se observó un movimiento significativo.

Parámetro	[5-HT]	[5-HIAA]
Estructura		
Hipotálamo Anterior	↓	↓
Hipotálamo Medio	↓	=
Hipófisis	=	=
Testículos	↓	↓
Adrenal	↓	↓
Testosterona	=	
Estructura del túbulo seminífero	Normal	↓
	Anormal	↑
Ciclo del epitelio seminífero	↑ VI, VIII y XII	
Apoptosis	Basal	↑
	Adluminal	↑

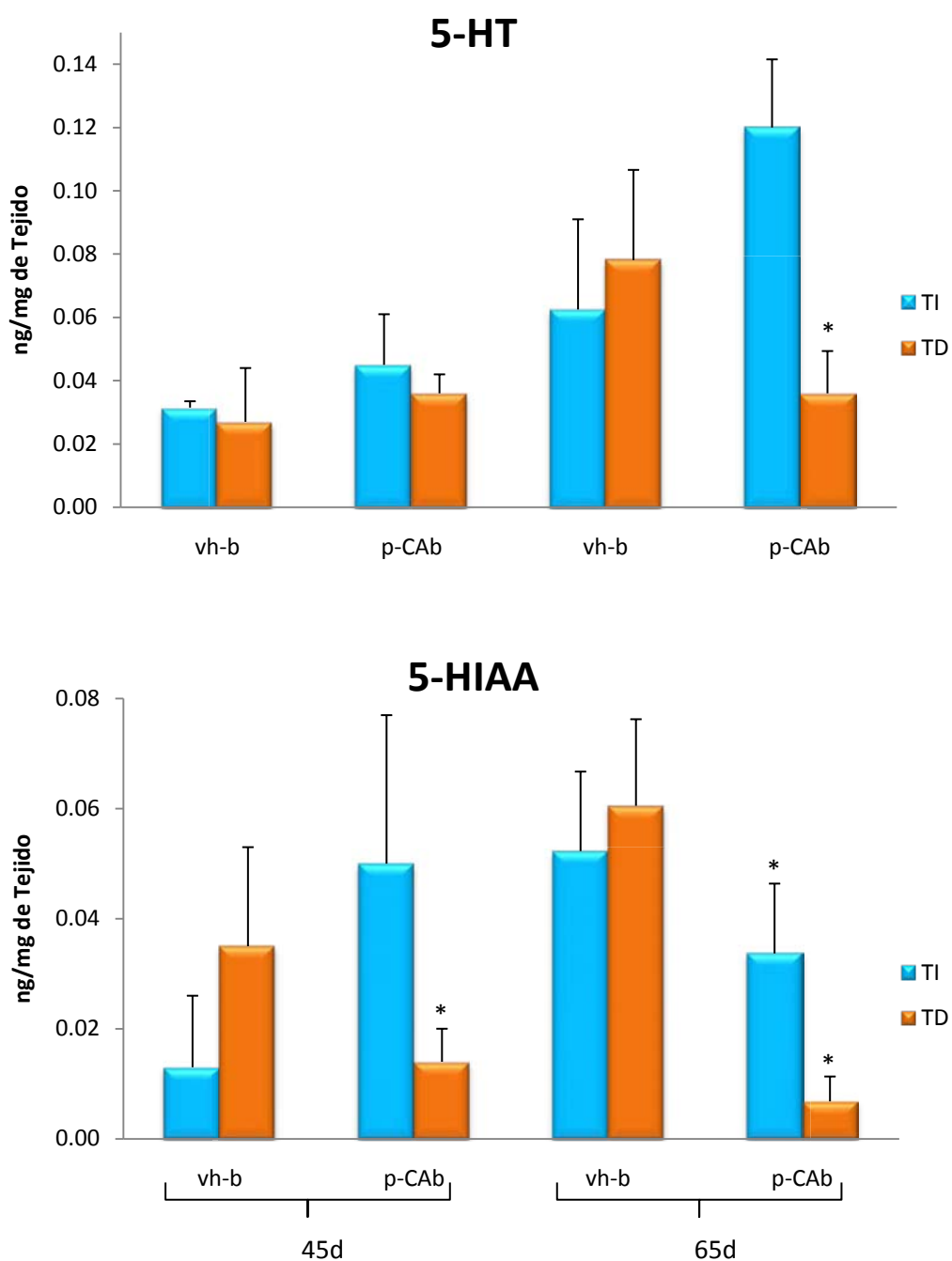


Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina intratesticular

En los animales que se les administró solución salina en ambos testículos y sacrificados a los 45 ó 65 días, la concentración de serotonina y de su metabolito fue similar. Este mismo comportamiento se observó en la concentración de serotonina de los animales con inyección intratesticular bilateral de pCA y sacrificados a los 45 días, mientras que la concentración de su metabolito disminuyó en el testículo derecho (Figura 22).

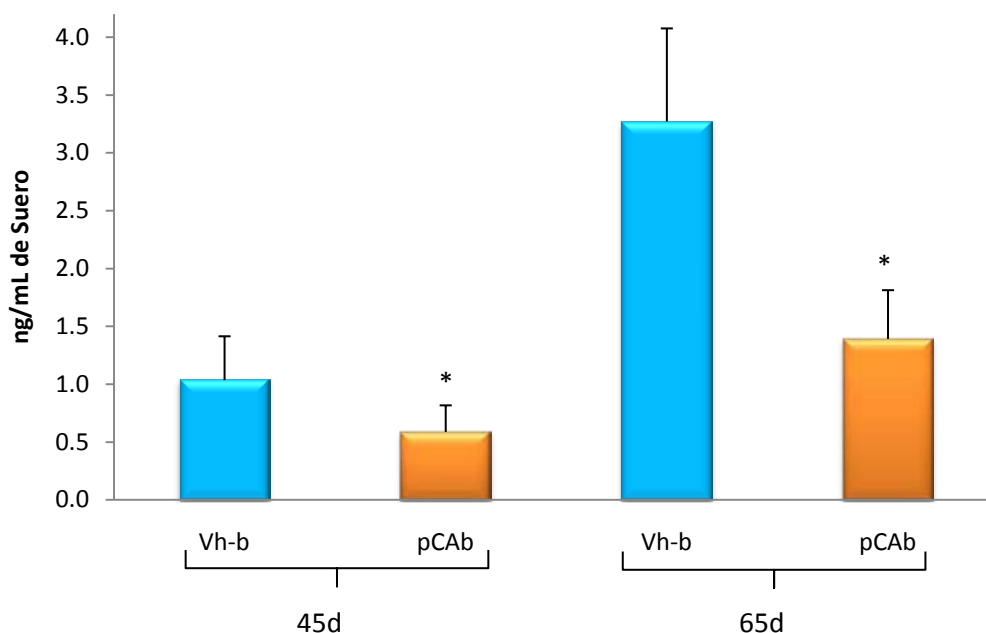
En los animales con inyección intratesticular bilateral de pCA y sacrificados a los 65 días de edad, la concentración de serotonina disminuyó únicamente en el testículo derecho y la del metabolito en ambos testículos en comparación con el grupo de animales que se les inyectó Vh en ambos testículos (Figura 22).

En comparación con el grupo con Vh-b, en los animales con inyección intratesticular bilateral de pCA se observó la disminución en la concentración de testosterona en el suero (figura 23).



* $p < 0.05$ vs grupo Vh (prueba "t" de Student)

Figura 22. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT) y del 5-hidroindolacético (5-HIAA) en el testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratas macho, tratados con inyección en ambos testículos (bilateral) de solución salina (Vh-b) o con p-Cloroanfetamina (p-CAb) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días.



* $p < 0.05$ vs grupo Vh (prueba “t” de Student)

Figura 23. Media $\pm$ e.e.m. de la concentración testosterona en el suero de ratas macho, tratados con inyección en ambos testículos (bilateral) de solución salina (Vh-b) o con p-Cloroanfetamina (pCAB) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días.

Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina bilateral en el ciclo del epitelio seminífero

En los cortes histológicos de ambos testículos de los animales tratados con Vh-b y sacrificados a los 45 días se observó que un mayor número túbulos se encontraban en los estadios (II-III, IV, V y VI). En el TD aumentó el porcentaje de túbulos en el estadio (XII). En el grupo de animales que recibieron Vh-b y sacrificados a los 65 días, la mayor proporción de túbulos se encontraban entre las etapas los estadios IV-VIII y nuevamente en el TD aumento el porcentaje de túbulos en el estadio XII. En ambas edades estudiadas la totalidad de los túbulos evaluados presentaron un arreglo normal del epitelio seminífero (Figura 24).



En los animales con inyección de pCAB y sacrificado a los 45 días se observó que tanto en el TI como TD, la mayoría de los túbulos presentaron una organización del epitelio característica de los estadios (IV-VIII). Así mismo en estos animales se observó que en algunos túbulos se presentó la desorganización del epitelio (túbulos anormales), en comparación con el grupo tratado con Vh-b y sacrificado a la misma edad (Figura 25).

En los animales tratados con pCAB sacrificados a los 65 días se observó un mayor porcentaje de túbulos anormales, destacando un mayor número de estadios a la mitad del ciclo del epitelio seminífero (V-IX), en comparación con el grupo Vh-b sacrificado a la misma edad (Figura 25).

En la evaluación del ciclo del epitelio seminífero en el grupo de animales a los que se les administró solución salina bilateral y se sacrificó a los 45 días se observó un mayor porcentaje de túbulos en los estadios V y XII. La figura 26 presenta el estadio V (A), la etapa II-III (B) se observó la formación de los gránulos acrosómicos. Al comparar las microfotografías del grupo a los que fue administrada la pCA en ambos testículos con aquel grupo Vh-b ambos sacrificados a los 45 días, se observó epitelio seminífero con daño en estructura (C), y severo daño en túbulo seminífero (D).

En los grupo de animales sacrificados a los 65 días se observó el estadio VII y en la parte inferior derecha de la microfotografía (A) el estadio XI, también se presentó el estadio XII (B), esto para los animales tratados con solución salina en ambos testículos. En cambio para aquellos donde se administro la pCA bilateral el epitelio seminífero se daño en estructura (C), sin embargo se observaron estadios en buen estado como el VII (D), quien fue el estadio más representativo (Figura 27).

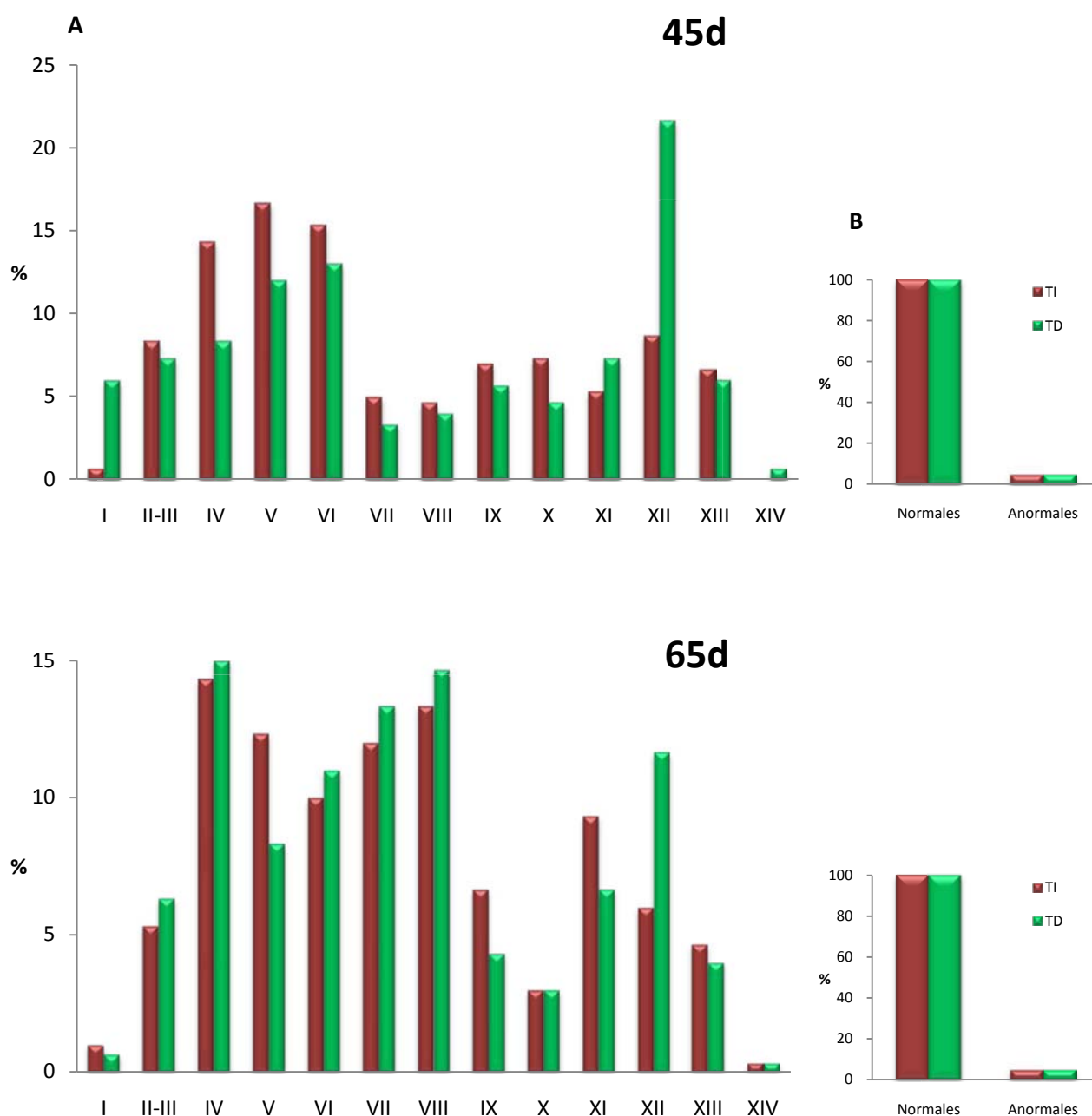


Figura 24. Porcentaje de túbulos en los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero (A) y porcentaje de túbulos normales y anormales (B) en el testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratas macho, tratados con inyección en ambos testículos (bilateral) de solución salina (Vh-b) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días.

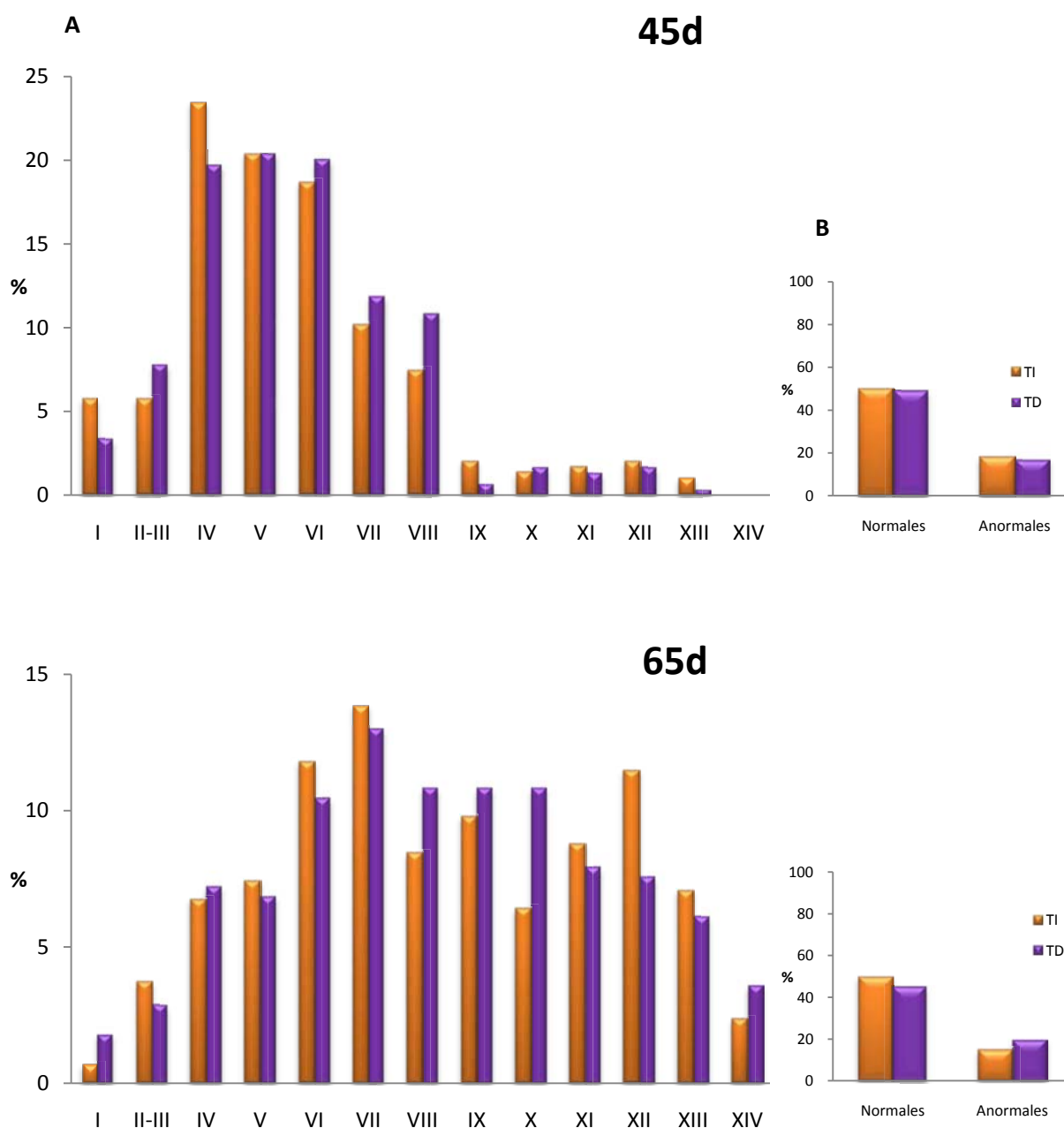


Figura 25. Porcentaje de túbulos en los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero (A) y número de túbulos normales y anormales (B) en el testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratas macho, tratados con inyección en ambos testículos (bilateral) de p-Cloroanfetamina (pCAb) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 ó 65 días.

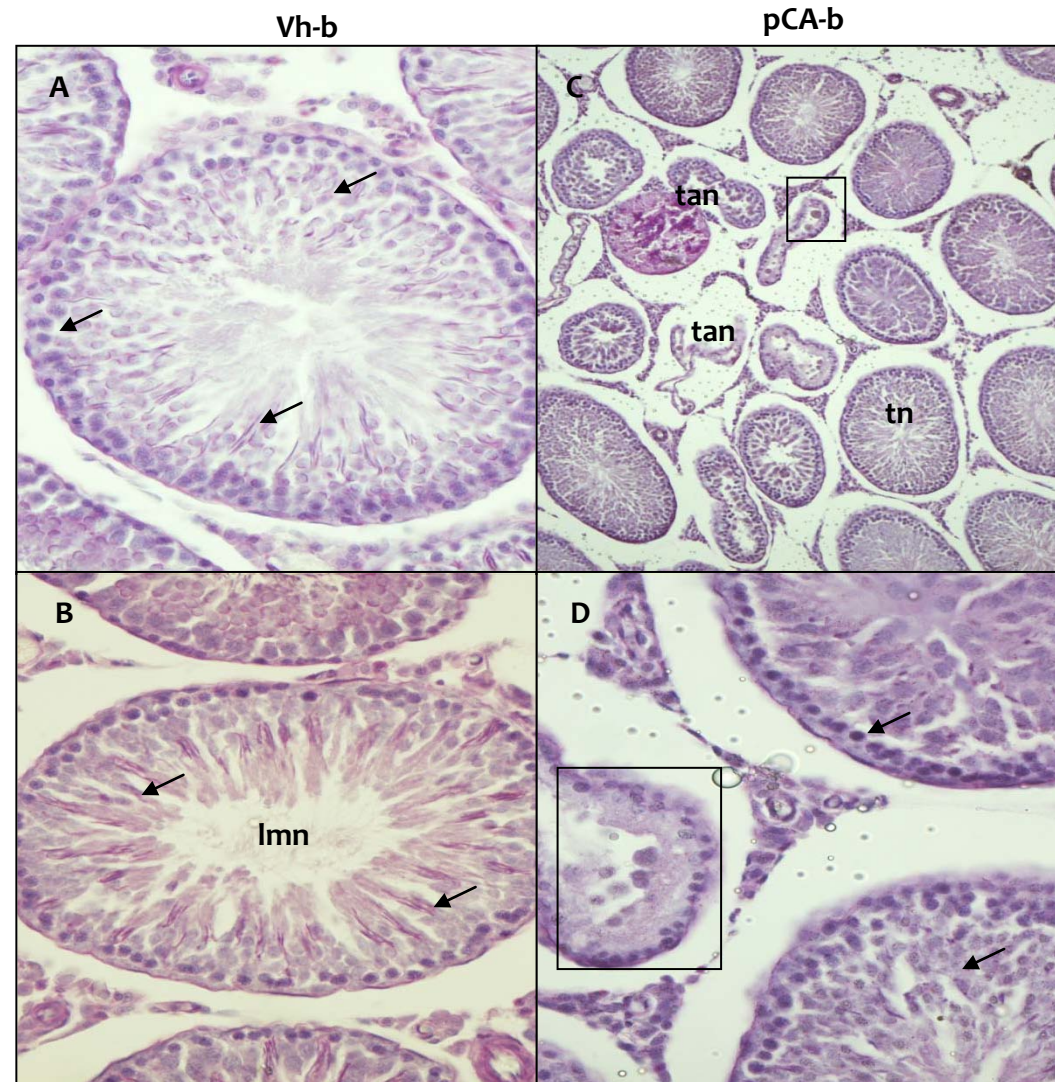


Figura 26. Microfotografías (10X/C) y (40X/A, B yD) de corte de testículo de ratas macho con inyección intratesticular bilateral de solución salina (Vh-b) o con p-Cloroanfetamina (pCAb) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 días. Etapa VI y XII en Vh-b. Lumen (lmn), túbulo normal (tn), túbulo anormal (tan), marcado en flechas espermatogonias, espermatocitos y espermatídes; los recuadros representan el daño del túbulo.

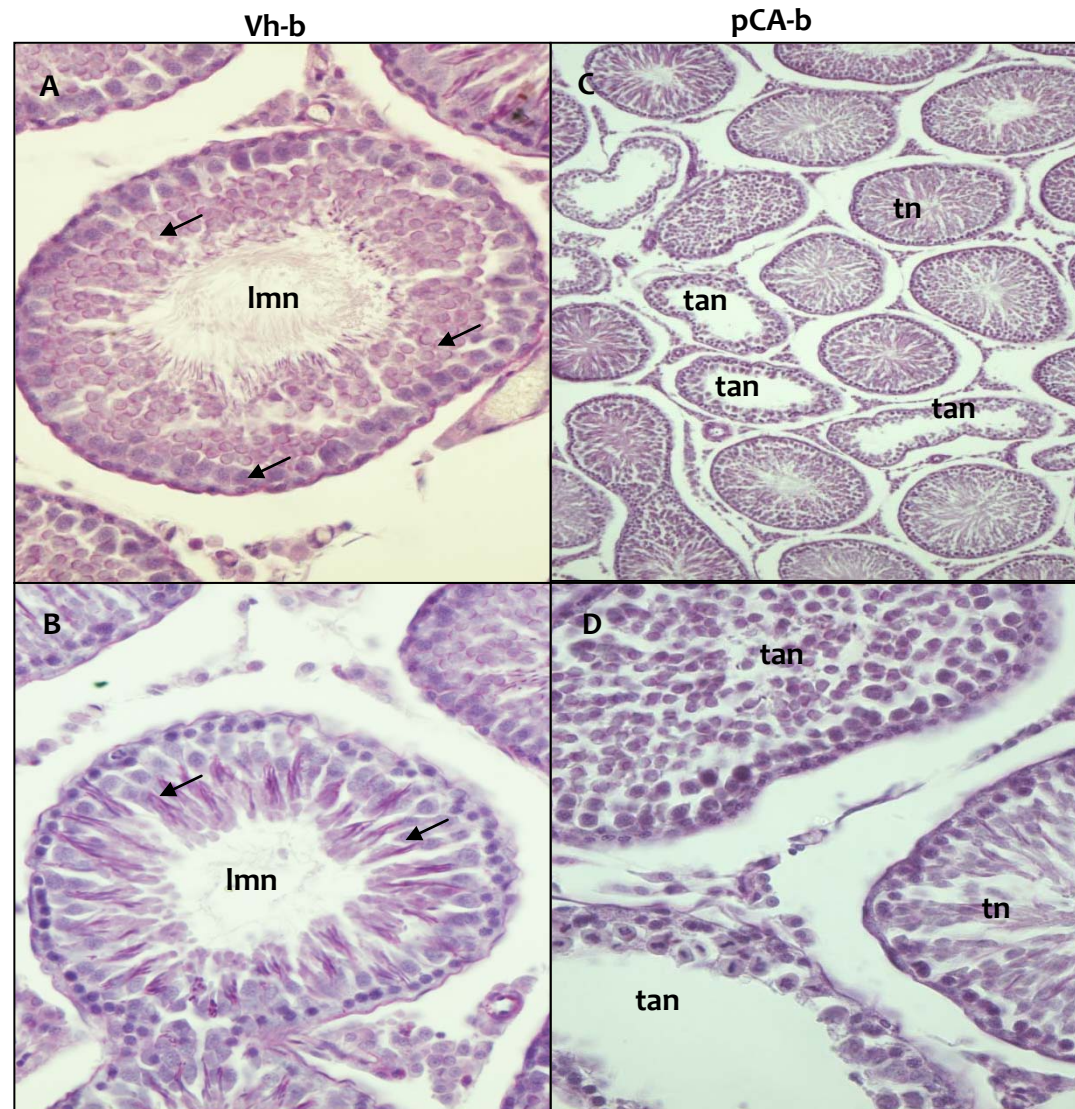


Figura 27. Microfotografías (10X/C) y (40X/A, B y D) de corte de testículo de ratas macho con inyección intratesticular bilateral de solución salina (Vh-b) o con p-Cloroanfetamina (pCAB) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días. Etapa VII y XI en Vh-b. Lumen (lmn), túbulo normal (tn), túbulo anormal (tan), marcado en flechas espermatogonias, espermatocitos, espermátides y acrosomas, los recuadros representan el daño del túbulo.



Apoptosis en el compartimiento basal o adluminal del epitelio seminífero por efecto de la administración de p-Cloroanfetamina bilateral

En comparación con los animales tratados con solución salina bilateral, en los animales que recibieron pCA en ambos testículos se observó el incremento en el número de células en apoptosis en ambos compartimientos para TI y TD.

El análisis del epitelio seminífero reflejó un mayor número de células en apoptosis para el grupo tratado con el fármaco en ambos testículos y sacrificado a los 45 días al ser comparado con el grupo Vh-b en el mismo día de sacrificio; el compartimiento basal fue el que recibió un severo daño en presencia de células apoptóticas (Figuras 28).

Sin embargo, la proliferación de células apoptóticas no aumentó en los grupos pCAb y Vh-b ambos sacrificados a los 65 días al ser comparado con el grupo Vh-b y pCAb sacrificados a los 45 días, sin embargo se observó el doble en número de células en apoptosis en ambos compartimientos para los animales tratados con pCAb al ser comparado con el grupo que se administró solución salina bilateral ambos sacrificados a los 65 días (Figura 29).

Al comparar el grupo de animales Vh-b con el grupo pCAb ambos sacrificados a los 45 días, las microfotografías presentaron pocas células en apoptosis (A), sin daño en la estructura del túbulo (B). Sin embargo el epitelio seminífero de los animales tratados con fármaco en ambos testículos sufrió un severo daño en estructura (C), presentando un mayor número de células en apoptosis (D) (Figura 30).

En los grupos de animales sacrificados a los 65 días se observó una recuperación del epitelio seminífero para el grupo Vh-b (A, B), ya que no presento daño en estructura. En los animales tratados con pCAb se observó muerte celular en la zona basal y un mayor número de células en apoptosis para ambos compartimientos, (C, D) (Figura 31).

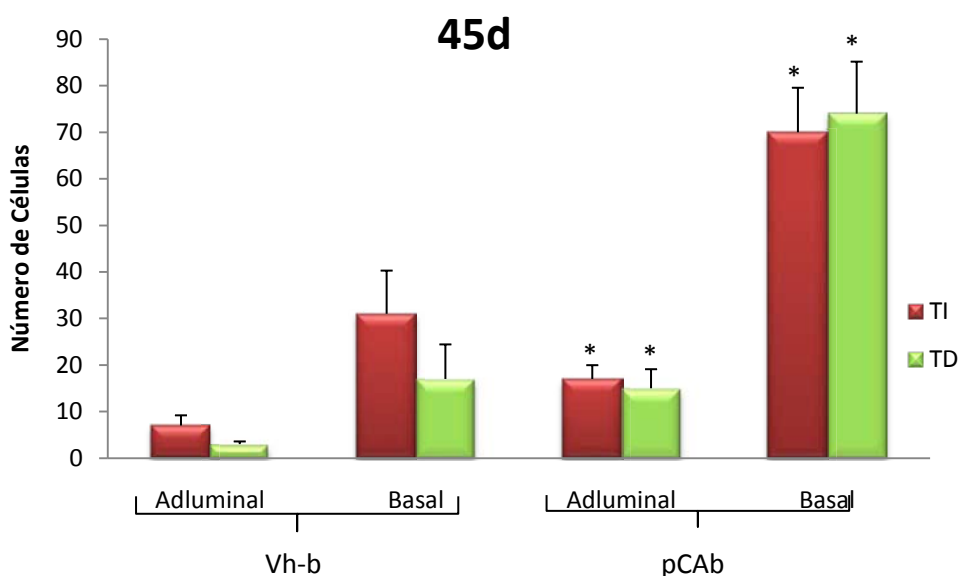


Figura 28. Media $\pm$ e.e.m. del número de células en apoptosis en el compartimiento basal o adluminal del epitelio seminífero del testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratas macho tratados con inyección en ambos testículos (bilateral) de solución salina (Vh-b) o con p-Cloroanfetamina (pCAB) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 días.

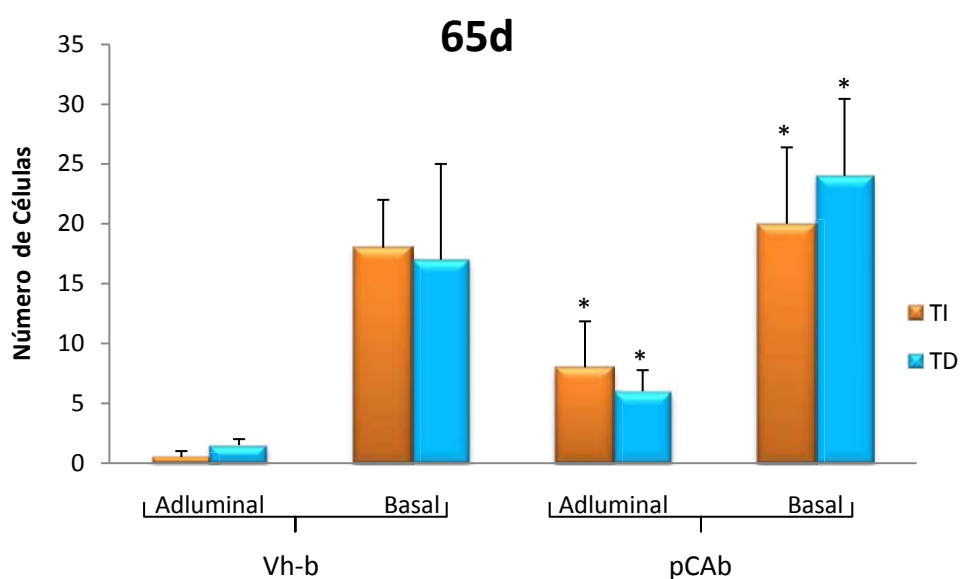


Figura 29. Media $\pm$ e.e.m. del número de células en apoptosis en el compartimiento basal o adluminal del epitelio seminífero del testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratas macho tratados con inyección en ambos testículos (bilateral) de solución salina (Vh-b) o con p-Cloroanfetamina (pCAB) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

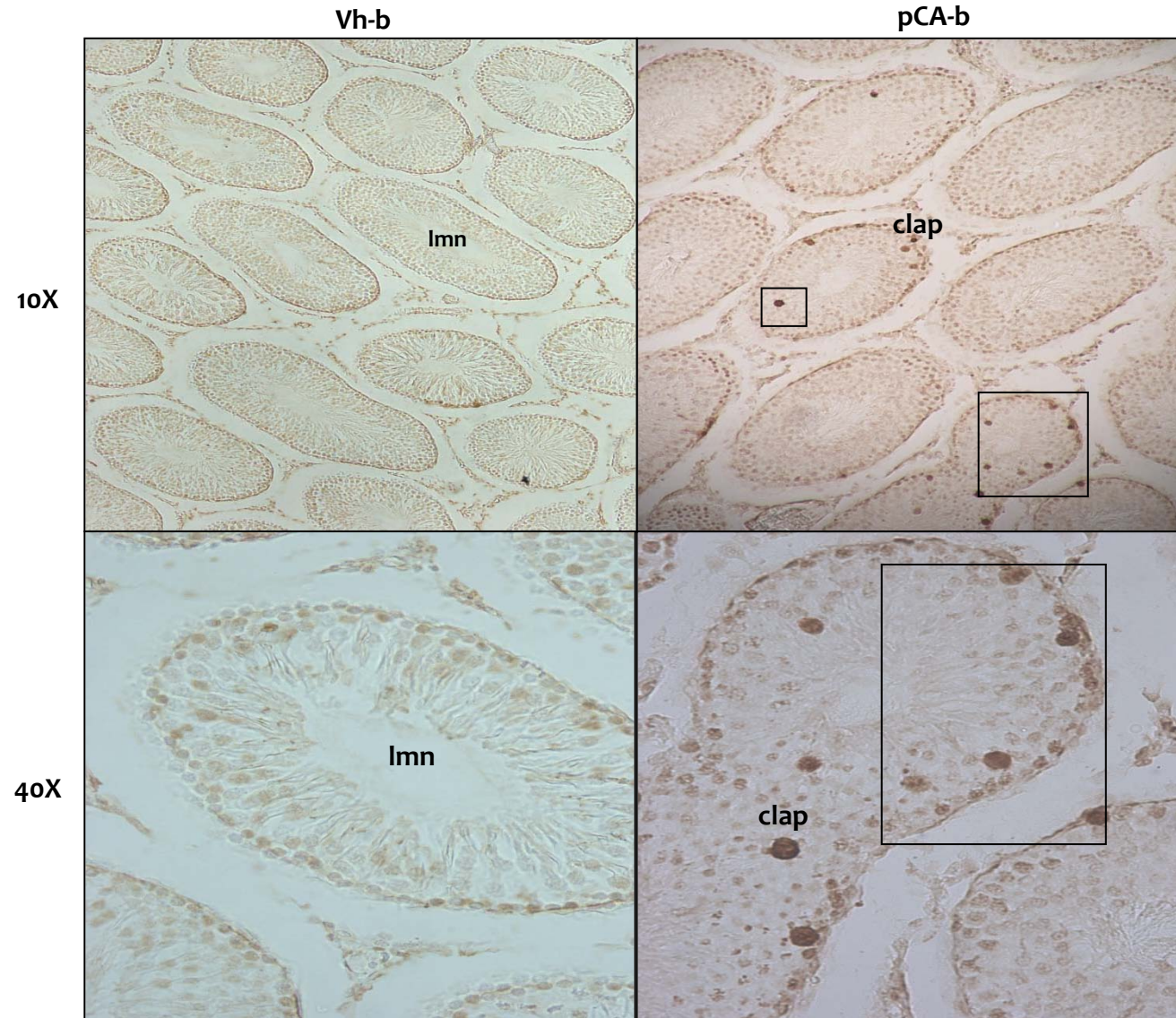


Figura 30. Microfotografías (10X y 40X) de túbulos seminíferos teñidos por la técnica de Tunel de ratas macho tratados con inyección intratesticular bilateral de solución salina (Vh-b) o con p-Cloroanfetamina (pCAb) en el día 30 de edad y sacrificados a los 45 días. Lumen (lmn), células en apoptosis (clap); los recuadros representan la presencia de células apoptóticas en el compartimiento basal o adluminal y el daño del epitelio seminífero.

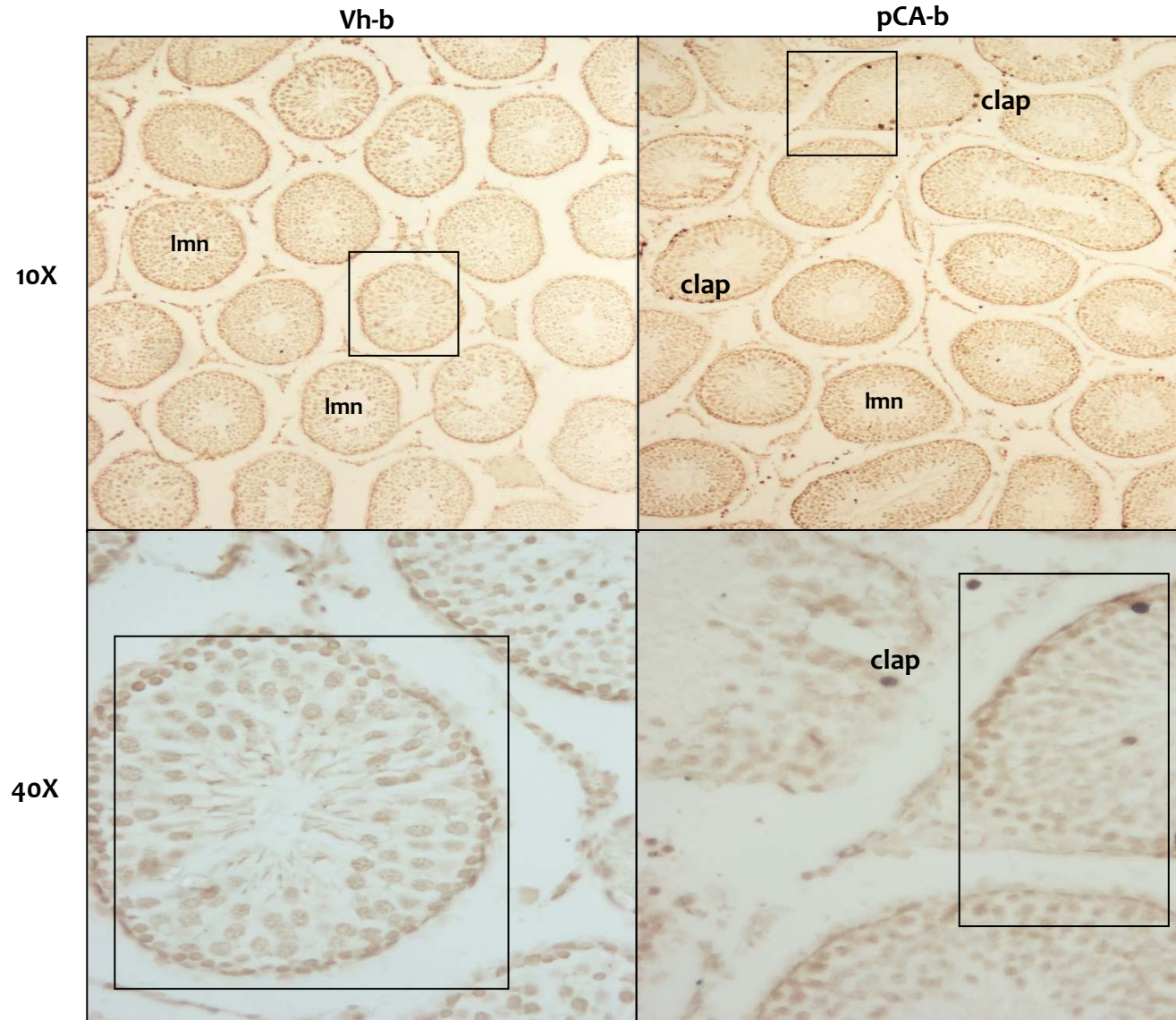


Figura 31. Microfotografías (10X y 40X) de túbulos seminíferos teñidos por la técnica de Tunel de ratas macho tratados con inyección intratesticular bilateral de solución salina (Vh-b) o con p-Cloroanfetamina (pCAb) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días. Lumen (lmn), células en apoptosis (clap); los recuadros representan la presencia de células apoptóticas en el compartimiento basal o adluminal y el daño del epitelio seminífero.



Cuadro 4. Resumen de los resultados observados por la administración de pCA sobre la concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), testosterona, ciclo, estructura y apoptosis del epitelio seminífero, en el testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratas macho, tratados con inyección en ambos testículos (bilateral) y sacrificados a los 45 ó 65 días de edad. Las flechas en rojo indican la disminución significativa en los parámetros, flechas en amarillo indica un aumento significativo y el signo igual indica que no se observó un movimiento significativo.

Estructura Parámetro	45 días		65 días	
	TI	TD	TI	TD
[5-HT]	=	=	=	↓
[5-HIAA]	=	↓	↓	↓
Testosterona	45 días		65 días	
	↓		↓	
Estructura del túbulo seminífero	Normal	↓	↓	↓
	Anormal	↑	↑	↑
Ciclo del epitelio seminífero	↑ IV, V y VI	↑ IV, V y VI	↑ VI, VII y XII	↑ V - X
Apoptosis	Basal	↑	↑	↑
	Adluminal	↑	↑	↑



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio nos llevan a sugerir que la serotonina juega un papel importante en las funciones del testículo al actuar en los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Dicha idea se apoya en los resultados obtenidos en el presente estudio, debido a que la disminución en la síntesis de serotonina en el hipotálamo y en el testículo, inducido por la administración sistémica de pCA o intratesticular en la rata macho prepúber, se acompaña de la disminución en la secreción de testosterona y de modificaciones en el ciclo del epitelio seminífero, así como el incremento en la apoptosis en las células germinales.

En estudios previos se ha reportado que cuando se administra una anfetamina como la p-Cloroanfetamina por vía sistémica, esta tiene la capacidad de ser transportado de la circulación al encéfalo, debido a que atraviesa la barrera hematoencefálica y es incorporada por algunas neuronas e inhibe sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico, dado que disminuye la actividad de las enzimas triptófano hidroxilasa y monoamino oxidasa (MAO) (Fuller 1966; Sanders-Bush y col., 1972; Ruddick y col., 2006). Estas evidencias nos permiten explicar la disminución en la concentración de serotonina y de su metabolito, el 5-HIAA en el hipotálamo y en el testículo que observamos en los animales que se les administró la p-Cloroanfetamina por vía sistémica. Los resultados antes mencionados no indican que en los animales tratados con la anfetamina disminuyó tanto la síntesis como el metabolismo de la serotonina.

La administración sistémica de las anfetaminas, como la pCA, produce múltiples efectos a corto y largo plazo sobre las neuronas serotoninérgicas en el cerebro de rata, como en el núcleo dorsal y medial, fuente principal de serotonina para el hipotálamo (Berger, 1992; Walther y Bader, 1999). El hecho de que en los animales a los que se les administró la pCA a partir del día 30 y posteriormente cada ocho días hasta que los animales cumplieron los 65 días de edad, nos permitió mantener el efecto crónico del fármaco y así asegurar la disminución sostenida en la síntesis y metabolismo de la serotonina. Se plantea esta idea, debido a que se ha mostrado que cuando se aplica una sola inyección de 10 mg/kg de p.c.



de pCA a ratas machos adultos, la concentración de serotonina disminuye a las 48 horas después de su administración y sus efectos se mantienen hasta por 10 días, pero a partir de los 8 días postratamiento se inicia la recuperación del sistema (Sanders-Bush y col., 1975).

La fuente de serotonina para el hipotálamo son los grupos de neuronas que conforman los núcleos dorsal y medial del rafé (Berger, 1992; Walther y Bader, 1999). Por estudios farmacológicos se ha demostrado que los axones del NDR son más susceptibles al daño cuando se administra algún derivado de las anfetaminas, como la pCA, en comparación con los axones del NMR (Mamounas y Molliver, 1988; Mamounas y col., 1991; Frazer y Hensler, 1999), de tal manera que se puede inhibir la actividad del dorsal hasta en un 70%. Este hecho nos permite explicar el porqué en los animales que se les administró la pCA, la serotonina no se eliminó por completo en el hipotálamo, debido a que las neuronas que conforman el NMR e inervan al hipotálamo son más resistentes a los efectos de las anfetaminas, lo que aseguro que estas neuronas fueran la fuente principal de la amina que se cuantificó en los animales tratados.

Otra posible explicación a la presencia de serotonina en el hipotálamo, es que parte de la serotonina que se origina en la glándula pineal, estructura del cerebro donde se ha demostrado que la amina es un precursor para la producción de melatonina, se sintetiza en grandes cantidades en dicha estructura (Frazer y Hensler, 1994). Aunado a esto se ha demostrado que existen dos isoformas de la triptófano hidroxilasa (TPH), enzima que cataliza la transformación del triptófano en 5-hidroxitriptofano. La isoforma TPH2 se expresa predominantemente en el cerebro y la TPH1 en la glándula pineal y en tejidos periféricos (Patel y col., 2004; Walther y Bader, 1999; Walther y col., 2003). Además se ha demostrado que la suceptibilidad de las isoformas de la TPH a las anfetaminas es diferente (Walther y col., 2003). La isoforma presente en la glándula pineal es más resistente a los efectos de la anfetamina, tal y como se ha mostrado en los mastocitos localizados en la duramadre de la glándula pineal (Mathiau y col., 1994). Con base en estas evidencias reportadas en bibliografía, es posible que al ser más resistente la isoforma presente en la glándula pineal, el daño en la síntesis en esta glándula es menor, lo que contribuyó a que no se eliminara por completo la amina del hipotálamo.



La serotonina es recapturada por la proteína transportadora de la serotonina (SERT) y es incorporada nuevamente a la neurona que la libero, particularmente a la mitocondria, donde la MAO actúa sobre la amina y la metaboliza, lo que genera la formación del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), metabolito inactivo de la serotonina (Frazer y Hensler, 1999; Linder y col., 2007; Jorgensen, 2007). En estudios previos se ha mostrado que la actividad de la MAO también es inhibida por la pCA (Urtilla, 2000), lo que explica la caída en la concentración del 5-HIAA en el hipotálamo que observamos en los animales que se les administró la pCA.

Se ha reportado que la isoforma de la triptófano hidroxilasa presente en la hipófisis es la TPH1 (Walther y col., 2003), la cual es más resistente a los efectos de las anfetaminas, además esta isoforma tiene mayor afinidad por el precursor de la síntesis de serotonina, el triptófano, por lo tanto esto se reflejó en que no se presentaron cambios en el sistema serotoninérgico de la hipófisis de los animales a los que se les administró la pCA por vía sistémica. También se ha mostrado que en las células de la adenohipófisis se produce la incorporación de serotonina (Saavedra y col., 1975; Saland y col., 1993; Vanhatalo y col., 1995), la que posiblemente proviene de las plaquetas o de las fibras nerviosas que la inervan, lo que evitó que se presentara la disminución significativa en la concentración de serotonina en la hipófisis.

La presencia de 5-HT, 5-HIAA y la MAO en la glándula adrenal de la rata se ha demostrado por estudios de inmunohistoquímica, que el neurotransmisor es sintetizado por las células cromafines y se encuentra en las fibras nerviosas de la glándula adrenal (Dinan, 1996; Contesse y col., 2000; Lefebvre y col., 2001). Por lo tanto, con base en lo reportado en la bibliografía y a los resultados del presente estudio es posible que la pCA administrada a la rata prepúber, además de actuar en el hipotálamo también actúa en órganos o tejidos periféricos y como consecuencia disminuya la síntesis y metabolismo en esta glándula y modifique su funcionamiento.

La disminución en la concentración de serotonina en el testículo fue similar a la del metabolito, lo que nos indica que tanto la síntesis como el metabolismo están



disminuidos en la gónada de los animales que recibieron la pCA. Se ha mostrado que las células de Leydig poseen la maquinaria necesaria para sintetizar y metabolizar la serotonina (Tinajero y col., 1993). La posibilidad de que la serotonina se sintetice en el testículo se apoya en resultados previos donde se muestra que cuando en la rata prepúber de 30 días de edad se le administra por vía sistémica, el 5-hidroxitriptofano, se incrementa la concentración de la amina una hora después del tratamiento (García y col., 2007). Por lo tanto es posible que la caída en la concentración de serotonina en el testículo sea el resultado de que la pCA actúa directamente en testículo e inhibe a las enzimas triptófano hidroxilasa y monoamino oxidasa.

La disminución no significativa en la concentración de testosterona en los animales tratados por vía sistémica con pCA, posiblemente se asocie a la edad en la que se realizó la evaluación de la concentración de la hormona, a los 65 días de edad, etapa de transición a la madurez sexual (Ojeda y Urbaski, 1994), en este período del desarrollo del animal se sugiere que la serotonina ejerce un efecto inhibitorio en la regulación de la esteroidogénesis (Csaba y col., 1998).

La ligera disminución de la concentración de testosterona observada en los animales tratados vía sistémica con pCA fue esencial para provocar un daño severo en el ciclo del epitelio seminífero y especialmente en los estadios (I y II-III), durante los cuales se produce el desarrollo de las espermatogonias y espermatocitos, hecho que se reflejó en la disminuyendo hasta en un 40% la presencia de túbulos normales, es decir con el arreglo normal del epitelio seminífero reportado en bibliografía (Russell y col., 1987), lo anterior se sustenta debido a que la testosterona es un factor esencial en el mantenimiento de la estructura epitelio seminífero y como consecuencia del testículo (McLachlan y col., 1996; Levy y col., 2006).

En nuestro estudio la administración sostenida de pCA resultó en el incremento en el proceso de apoptosis de las células germinales, acompañado de la ligera disminución en la concentración plasmática de testosterona. Por lo que el daño en la estructura del epitelio seminífero puede ser explicada porque la disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo inducida por la administración de la pCA modificó alguna vía



de comunicación neural, que se ha demostrado que existe entre el hipotálamo y el testículo (Gerendai y col., 2000; Selvage y River, 2003), lo que se reflejó en el incremento de la apoptosis en el testículo. En apoyo a esta idea se ha demostrado que cuando se realiza la denervación bilateral del testículo se incrementa la apoptosis en las células germinales (Gong y col., 2006a). También es posible que al modificarse esta vía de comunicación neural se modificó la respuesta del testículo a la LH, debido a que la denervación bilateral de este órgano disminuye la expresión de los receptores a esta gonadotropina en las células de Leydig (Huo y col., 2010). Esto resultó en la disminución en la síntesis intratesticular de testosterona y cuya concentración es de 50 a 100 veces mayor a la que se encuentra en la circulación sistémica (Jarow y Zirkin, 2005); concentraciones que son necesarias para mantener el desarrollo de las células germinales y el funcionamiento normal de las células de Sertoli (Sharpe y col., 1992).

En apoyo a la idea de que cuando se modifica la inervación que recibe el testículo se afecta su funcionamiento, se induce apoptosis, lo que resulta en daño en su estructura, se ha mostrado en la rata adulta que la denervación testicular disminuye la secreción de testosterona y altera la estructura del testículo (Zhu y col., 2002; Chow y col., 2000). Cuando en la rata adulta se realiza la remoción bilateral del nervio espermático superior e inferior se observa la disminución de las células de Sertoli y germinales y se induce la regresión de los túbulos seminíferos al mes y dos meses de realizada la cirugía. También se presenta el incremento en la muerte por apoptosis en las células de Leydig y germinales y esto se acompaña de la expresión del gen Bax, inductor de la apoptosis (Gong y col., 2006a y b).

Otra posible explicación al incremento en el proceso de apoptosis es que la pCA actuará directamente en el testículo, en donde disminuyó la síntesis de la amina en la célula de Leydig que posee la maquinaria enzimática para llevar cabo este proceso (Tinajero y col., 1993), así como el funcionamiento de esta célula, la síntesis de esteroides y como consecuencia disminuyó la concentración de testosterona intratesticular, en apoyo a esta idea se ha reportado que cuando se administran las anfetaminas a células de Leydig mantenidas en cultivo, disminuye la secreción basal y estimulada con gonadotropina coriónica humana se acompaña de la inhibición de la actividad de las enzimas



3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y de la P45c17 ambas importantes para la síntesis de testosterona (Tsai y col., 1997).

A diferencia de lo observado en los animales en los que se administró la pCA por vía sistémica, en los que se realizó la inyección bilateral del fármaco, la concentración de testosterona si disminuyó significativamente. Lo anterior apoya la idea de que la anfetamina si actúa directamente en el testículo inhibiendo al sistema serotoninérgico del testículo, lo que se reflejo en la disminución en la concentración de serotonina y del 5-HIAA en el órgano. No se eliminó por completo la concentración de la serotonina en el testículo de estos animales, posiblemente debido a que otra de las fuentes importantes de amina del órgano, los mastocitos, son más resistente a los efectos de la anfetamina (Mathiau y col., 1994).

La administración de pCA intratesticular bilateral al igual que la administrada sistémicamente generaron la caída en la concentración de serotonina en la gónada, lo que afectó la actividad en algunas enzimas involucradas en la esteroidogénesis en las células de Leydig y como consecuencia se generó la disminución en la síntesis de testosterona, este posible efecto que ejerce la pCA en el testículo, previamente lo mostraron Tsai y col., (1997) para las anfetaminas.

En el análisis del ciclo del epitelio seminífero de los animales con inyección intratesticular bilateral de pCA, observamos que existe una vinculación estrecha entre la caída en la concentración de testosterona plasmática y el daño en el arreglo de los diferentes tipos de células germinales, ya que las células germinales de los estadios I, II-III, y IX-XIV resultaron ser las más dañadas a los 45 días de edad, sin embargo, se registró una ligera recuperación en la estructura del epitelio, ya que los animales sacrificados a los 65 días solo presentaron daño en las etapas I, II-III, lo que nos llevó a pensar que posiblemente a esta edad se presentó una recuperación y se reorganizó el epitelio seminífero. El hecho de que transcurrieran 35 días de la administración de la anfetamina al momento de la evaluación nos permite pensar en una ligera recuperación, sin embargo, esto no se reflejó en la proporción de túbulos normales ya que en ambas edades disminuyeron hasta en un 50%.



Al igual que en los animales que se les administró la pCA por vía sistémica, el incremento en la incidencia de apoptosis en el epitelio seminífero es similar a lo observado en los animales con inyección intratesticular bilateral de la anfetamina. En este último grupo, se reafirma la idea de que la apoptosis que se observó en el compartimento basal (espermátogonias y espermátocitos primarios) y en el adluminal (espermátocitos secundarios) es el resultado en la caída de testosterona. Las concentraciones de FSH, LH y testosterona actúan como factores de sobrevivencia de las células germinales y de Leydig e inhiben la apoptosis. Si se presentan una baja concentración de estas hormonas, se traduce en muerte celular, lo que se manifiesta en un desbalance en la espermatogénesis (McLachlan y col., 1996; Levy y col., 2006,).

Es posible que la caída en la producción de testosterona inducida por la inyección intratesticular bilateral de pCA, modificara el funcionamiento de la célula de Sertoli, responsable del soporte y de proporcionar lo necesario a las células germinales para su desarrollo y diferenciación (Chow y col., 2000; Sharpe y col., 1992), lo que se reflejó en el incremento en la apoptosis y en el daño en la estructura del túbulo seminífero. La idea antes planteada se apoya en las evidencias que señalan que las células de Sertoli y las peritubulares son las que expresan los receptores para testosterona (Sar y col., 1990). Hormona que estimula en la célula de Sertoli, la producción de proteínas y factores de crecimiento necesarios para el desarrollo de las células germinales (Sharpe y col., 1992) y mantener la integridad de la barrera hematotesticular (Xia y col., 2005). Por lo tanto, es posible que al disminuir la testosterona en los animales de nuestro estudio, se modificara el funcionamiento de la célula de Sertoli, así como la comunicación entre estas células y con las germinales, lo que modificó el microambiente en el que se desarrollan las células germinales y se indujo su muerte por apoptosis. Este proceso de muerte posiblemente se presentó a partir de las 48 horas después de la administración de la anfetamina y se continuó, por lo que paulatinamente se perdieron las células germinales, esto generó que algunos túbulos, los anormales presentara la disminución del grosor del epitelio y un aumento de diámetro del túbulo, como ya lo mostramos previamente (Aragón y col., 2005; Pérez y col., 2006).



CONCLUSIONES

- La p-Cloroanfetamina disminuye la síntesis y metabolismo de la serotonina en el hipotálamo, testículo y glándula adrenal, mientras que no tiene efecto en estos parámetros en la hipófisis.
- La p-Cloroanfetamina actúa directamente en el testículo e inhibe la secreción de serotonina por la célula de Leydig.
- La inhibición del sistema serotoninérgico del testículo disminuye la secreción de testosterona en la rata prepúber.
- La disminución en la concentración de testosterona inducido por la pCA, se traduce en el daño en la estructura del testículo.
- La disminución en la concentración de testosterona induce la muerte por apoptosis de las células germinales, espermatogonias y espermatocitos en la rata prepúber.



BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar R., Anton F., Bellido C., Aguilar E., Gaytan F. (1995) *Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat*. Journal of Endocrinology, 46: 15-21.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson JD., (1996) *Biología molecular de la célula*. Tercera Edición. Editorial Omega. 1083-1108.
- Aragón MA., Ayala ME., Marín M., Avilés A., Matsumura PD., Domínguez R. (2005) *Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development*. Reproduction, 129: 717-727.
- Audesirk T. (2003) *Biología*. Sexta Edición. Editorial Pearson Education. México, D. F. 720-726.
- Bartlett JMS., Weinbauer GF., Nieschlag E. (1989) *Differential effects of FSH and testosterone on the maintenance of spermatogenesis in the adult hypophysectomized rat*. Journal of Endocrinology, 121: 49-58.
- Bellido MC. (1999) *Reproducción en el varón*. En: *Fisiología humana*. JAF. Tresguerres (Edit.). Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. 1049-1063.
- Berger UV., Grzanna R., Molliver ME. (1992) *The neurotoxic p-chloroamphetamine in rat brain are blocked by prior depletion of serotonin*. Brain Research, 578: 177-185.
- Brown RE. (1994) *Neurotransmitter*. En: *An introduction to Neuroendocrinology*. Cambridge University Press. Inglaterra. 56-87.
- Campos MB., Vitale ML., Calandra RS., Chiochio SR. (1990) *Serotonergic innervation of the rat testis*. Journal of Reproduction and Fertility, 88: 475-479.
- Chow SH., Giglio W., Anesetti R., Ottenweller JE., Pogach LM., Huang HF. (2000) *The effects of testicular denervation on spermatogenesis in the Sprague-Dawley rat*. Neuroendocrinology, 72: 37-45.
- Collin O., Damber JE., Bergh A. (1996) *5-hydroxytryptamine: a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats*. Journal of Reproduction and Fertility, 106: 17-22.



- Comella JX., Llecha N., Yuste VJ., Boix J., Sánchez I., Bayascas JR. (1999) *Bases moleculares de la apoptosis celular y su relación con la patología renal*. Sección de Apoptosis del Grupo de Neurobiología Molecular. Universidad de Lleida. Lleida, España.
- Contesse V., Lefebvre H., Lenglet S., Kuhn JM., Delarue C., Vaudry H. (2000) *Role of 5-HT in the regulation of the brain-pituitary-adrenal axis: effects of 5-HT on adrenocortical cells*. Journal of Physiology and Pharmacology; 78(12):967-83.
- Cordova A. (2003) *Fisiología Dinámica*. Editorial Masson. Barcelona, España. 548-623.
- Cryns V., Yuan J. (1998) *Proteases to die for*. Genes and Development, 12: 1551-1570.
- Csaba Z., Csernus V., Generendai I. (1998) *Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis*. Journal of Neuroendocrinology, 10: 371-376.
- Curtis H., Barnes N. (1996) *La reproducción*. En: *Invitación a la Biología*. H. Curtis, N. Barnes (Edits.). Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 665-673.
- Curtis H., Barnes NS., Shneck A., Massarini A. (2008) *Biología*. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana. Chile. 783-786.
- Dinan TG., (1996) *Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function*. LifeScience, 58: 1683-1694.
- Drucker R. (2005) *Fisiología Médica*. El Manual Moderno, México, D. F. 595-606.
- Fawcett DW. (1990) *Tratado de Histología*. Décima primera Edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México, D. F. 802-854.
- Frassetto A., Zhang J., Lao JZ., White A., Metzger JM., Fong TM., Chen RZ., (2008) *Reduced sensitivity to diet induced obesity in mice carrying a mutant 5-HT₆ receptor*. Brain Research, 21: 140-144.
- Frazer A., Hensler J.G. (1999) *Serotonin*. En: *Basic neurochemistry*. GJ. Siegel, BW. Agranoff, RW. Albers, PB. Molinoff (Edits.). Raven Press, New York, USA. 283-308.
- Fuller RW. (1985) *Persistent effects of amphetamine, p-chloroamphetamine, and related compounds on central dopamine and serotonin neurons in rodents*. Psychopharmacology, 21:528-532.
- Fuller RW., (1966) *Serotonin oxidation by rat brain monoamine oxidase: inhibition by p-chloroamphetamine*. Life Science, 5: 2247-2252.



- García M., Monroy MJ., Gallegos E., Chavira R., Ayala ME., Domínguez R. *Efecto de la estimulación del sistema serotoninérgico en la secreción de progesterona y testosterona, en la rata macho prepúber*. C-145. L Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Puebla, México. 9 al 13 de septiembre del 2007.
- Gartner L., Hiatt J. (2007) *Histología, texto y atlas*. Tercera Edición. Editorial McGraw Hill. México, D. F. 628-645.
- Geneser F. (2000). *Histología sobre las bases biomoleculares*. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 614-623.
- Gerendai I., Banczerowski P., Csernus V., Halász B. (2007) *Innervation and serotoninergic receptors of the testis interact with local action of interleukin-1beta on steroidogenesis*. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical; 131: 21-27.
- Gerendai I., Sziebert P., Görcs T., Csaba Z., Csernus V. (2000) *Effect of intratesticular administration of TRH or anti-TRH antiserum on function of rat testis*. Life Sciences, 6: 269-281.
- Gilbert SF. (2005) *Fecundación desarrollo de un nuevo organismo* En: *Biología del Desarrollo*. SF. Gilbert (Edit.). Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana. España. 197-229.
- Gong YG., Yang YR., Zhang W., Gu M., Yin CJ. (2006)a. *Apoptosis in male germ cells induced by testicular denervation*. Zhonghua Nan Ke Xue, 12(11): 968-963.
- Gong YG., Yang YR., Zhang W., Gu M., Yin CJ. (2006)b. *Expression of Bax and Bcl-2 gene in rat testis tissues induced by testicular denervation*. Zhonghua Nan Ke Xue, 12(12): 1063-1065.
- Granner DK., Murray DK. (1988) *Bioquímica de Harper*. Décima primera Edición. El Manual Moderno. México, D. F. 530-546.
- Green RA. (2006) *Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamin*. British Journal of Pharmacology, 147: 145-152.
- Ham AW., Cormack, DH. (1985) *Tratado de Histología*. Octava Edición. Editorial Interamericana. México, D. F. 985-990.
- Henry JA., Jeffreys KJ., Dowling D. (1992) *Toxicity and deaths effects from 3, 4- methylenedioxymethamphetamine "ecstasy"*. Lancet, 340: 384-387.
- Holdcraft RW., Brawn RE. (2004) *Hormonal regulation of spermatogenesis*. International Journal of Andrology, 27: 335-342.



- Horrobin DF. (1976) *Fisiología y bioquímica médicas*. Editorial Salvat. España. 464-465.
- Huo S., Xu Z., Zhang X., Zhang J., Cui S. (2010) *Testicular denervation in prepuberty rat inhibits seminiferous tubule development and spermatogenesis*. Journal of Reproduction and Development; 56 (4): 370-378.
- Iyer RN., Sprouse JS., Aghajanian UK., Roth R., Bradberry, CW. (1994) *Tryptophan pretreatment augmentation of p-chloroamphetamine induced serotonin and dopamine release and reduction in neurotoxicity*. Biochemistry Pharmacology, 48:1501-1508.
- Jarow JP., Zirkin BR. (2005) *The androgen microenvironment of the human testis and hormonal control of spermatogenesis*. Ann. NY. Acad. Sci. 1061.
- Jiménez Trejo F., Tapia RM., Queiroz DBC., Padilla P., Avellar MC., Rivas MP., Gutiérrez G., Gutiérrez OG. (2007) *Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymis during sexual maturation and variations associated with adult mating status: morphological and biochemical studies*. Journal of Andrology, 28: 136-149.
- Jorgensen HS. (2007) *Studies on the neuroendocrine role of serotonin*. Danish Medical Bulletin, 54: 266-288.
- Justo SN., Rossano GL., Szwedfarb B., Rubio MC., Moguilevsky JA. (1989) *Effect of serotonergic system on FSH secretion in male and female rats: evidence for stimulatory and inhibitory actions*. Neuroendocrinology, 50: 382-386.
- Kerr JFR., Wyllie AH., Currie AR. (1972) *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics*. Journal of Cancer, 26: 239-257.
- Krester DM., Kerr JB. (1994) *The cytology of the testis*. En: *Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill. (Edits.). Segunda Edición. Raven Press. New York, USA. 1621-1681.
- Lassen JB. (1974) *The effect of p-chloroamphetamine on motility in rats after inhibition of monoamine synthesis, storage, uptake and receptor interaction*. Psychopharmacology, 34:243- 254.



- Lefebvre H., Compagnon P., Contesse V., Delarue C., Thuillez C., Vaudry H., Kuhn JMC. (2001) *Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 10: 5001–5007.
- Lehninger AL. (2003) *Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular*. Segunda Edición. Editorial Omega. Barcelona. 728-729.
- Levy MN., Koeppen BM., Stanton BA. (2006) *Fisiología*. Quinta Edición. Editorial El Sevier Mosby. Madrid, España. 387-415.
- Linder AE., Ni W., Diaz JL., Szasz T., Burnett R., Watts SW. (2007) *Serotonin (5-HT) in veins: Not All in vain*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 343: 415-421.
- Madhwa Raj HG., Martin D. (1976) *The effects of selective withdrawal of FSH or LH on spermatogenesis in the immature rat*. Biology of Reproduction, 14: 489-494.
- Mamounas LA., Molliver ME. (1988) *Evidence for serotonergic projections to neocortex: axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to the neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA)*. Experimental Neurology, 102: 23-36.
- Mamounas LA., Mullen CA., O'Hearn E., Molliver ME. (1991) *Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives*. Journal of Comparative Neurology, 314: 558-86.
- Manzana EP., Chen WA., Champney TH. (2001) *Acute melatonin and para-chloroamphetamine interactions on pineal brain and serum serotonin levels as well as stress hormone levels*. Brain Research, 3: 127-137.
- Mathiau P., Bakalara N., Aubineau P. (1994) *Tryptophan hydroxylase can be present in mast cells and nerve fibers of the rat dura mater but only mast cells contain serotonin*. Neuroscience Letters, 182: 133-137.
- McLachlan RI., Wreford NG., O'Donnell L., Krester DM., Robertson DM., (1996) *The endocrine regulation of spermatogenesis: Independent roles for testosterone and FSH*. Journal of Endocrinology, 148: 1-9.



- O'Shaughnessy PJ., Morris ID., Huhtaniemi I., Baker PJ., Abel MH. (2008) *Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice*. Molecular and Cellular Endocrinology, 10: 2-8.
- Ogren SO., Johansson C. (1985) *Separation of the associative and nonassociative effects of brain serotonin released by p-chloroamphetamine: Dissociable serotonergic involvement in avoidance learning, pain and motor function*. Psychopharmacology, 86:12-26.
- Ojeda RS., Urbanski FH. (1994) *Puberty in the rat*. En: *The Physiology of Reproduction* Chapter 40, Raven Press Ltd. New York, USA. 363-404.
- Patel PD., Pontrello C., Burke S. (2004) *Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland*. Biol. Psychiatry, 55: 428-433.
- Paxinos G., Watson C. (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press Australia.
- Pérez CJ., Monroy MJ., Chavira RR., Aragón A., Ayala ME., Domínguez R. *Papel de la serotonina (5-HT) en el proceso de esteroidogénesis de la rata macho prepúber*. C279. XLIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Querétaro Qro., México. 4 al 8 de septiembre del 2006.
- Rang HP., Dale MM., Ritter JM., Moore PK. (2004) *Farmacología*. Quinta Edición. Elsevier. España. 184-188.
- Raven HP., Johnson BG., Losos BJ., Singer RS. (2005) *Biology*. Editorial McGraw-Hill. New York, USA. 1123-1150.
- Ross MH., Gordon IK., Wojciech P. (2004) *Aparato genital masculino*. En: *Histología*. MH. Ross, IK. Gordon, P. Wojciech (Edits.). Cuarta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 685-714.
- Ruddick JP., Evans AK., Nutt DJ., Lightman SL., Rook GAW., Lowry ChA. (2006) *Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications*. Expert Reviews, 8: 1-27.
- Russell LD., Alger LE., Lynn GN. (1987) *Hormonal control of pubertal spermatogenesis*. Journal of Endocrinology, 87: 1615-1631.



- Saavedra JM., Palkovits M., Kizer JS., Brownstein M., Zivin JA. (1975) *Distribution of biogenic amines and related enzymes in the rat pituitary gland*. Journal of Neurochemistry, 25: 257-260.
- Saland LC., Samora A., Sanchez P., Chavez G. (1993) *Immunocytochemical studies of tryptophan hydroxylase, tyrosine hydroxylase and serotonin innervation in the ageing rat neurointermediate pituitary*. Experimental Neurology, 121: 119-126.
- Sanders-Bush E., Bushing JA., Sulser F. (1975) *Long term effects p-chloroamphetamine on tryptophan hydroxylase activity and on the levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in brain*. European Journal of Pharmacology, 20: 385-388.
- Sar M., Lubahn DB., French FS., Wilson EM. (1990) *Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues*. Endocrinology, 127: 3180-3186.
- Schmidt RF., Thews, G. (1993) *Fisiología Humana*. Vigésima cuarta Edición. Editorial Interamericana McGraw-hill. España.
- Selvage JD., Rivier C. (2003) *Importance of the paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway between the brain and the testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary*. Journal of Endocrinology, 144: 594-598.
- Setchel B., Maddocks S., Brooks DE. (1994) *Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract*. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill (Edits.). Raven Press. New York, EUA, 1063-1170.
- Sharpe RM. (1994) *Regulation of Spermatogenesis*. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill (Edits.). Raven Press. New York, EUA. 1363-1434.
- Sharpe RM., Maddocks B., Millar M., Ker JB., Saunderson PTK., McKinnell C. (1992) *Testosterone and spermatogenesis. Identification of stage-specific, androgen-related protein secreted by adult rat seminiferous tubules*. Journal of andrology, 13: 172-184.
- Shishkina GT., 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, 125: 45-51.



- Shulgin AT. (1990) *History of MDMA*. En: *Ecstasy: The Clinical, Pharmacological and Neurotoxicological Effects of the Drug MDMA*. Peroutka, SJ. Kluwer (Edits.) Academic Publishers. 1-20.
- Silverman AJ., Livne I., Witkin JW. (1994) *The gonadotropin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: immunocytochemistry and in situ hybridization*. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill (Edits.). Segunda Edición. Raven Press. New York, EUA. 1683-1710.
- Smith MC., Reynard MA. (1992) *Textbook of Pharmacology*. Editorial Saunders Company. USA. 1198-1213.
- Smith MJ., Jennes L. (2001) *Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle*. *Journal of Reproduction*, 122: 1-10.
- Solowij N., Hall W., Lee, N. (1992) *Recreational MDMA use in Sydney: a profile of 'ecstasy' users and their experiences with the drug*. *British Journal of Addiction*, 87: 1161-1172.
- Sprague EJ., Johnson PM., Schmidt JC., Nichols ED. (1996) *Studies on the mechanism of p-chloroamphetamine neurotoxicity*. *Biochemical Pharmacology*, 52: 1271-1277.
- Terranova TF., Taylor CC. (1999) *Apoptosis (cell death)*. *Encyclopedia of Reproduction*, 1: 261-273.
- Tiba T., Yoshida K., Miyake M., Tsuchiya K., Kita I., Tsubota T. (1993) *Regularities and irregularities in the structure of the seminiferous epithelium in the domestic fowl*. *Anatomical and Histological Embryology*, 21: 241-253.
- Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca RD., Dufau LM. (1993) *Serotonin secretion from rat Leydig cells*. *Endocrinology*, 128: 3026-3029.
- Tresguerres JFA. (1999) *Fisiología Humana*. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. 1033-1047.
- Tsai SC., Chen JJ., Chiao YC., Lu CC., Lin H., Yeh JY., Lo MJ., Kau MM., Wang SW., Wang PS. (1997) *The role of cyclic amp production, calcium channel activation and enzyme activities in the inhibition of testosterone secretion by amphetamine*. *British Journal of Pharmacology*, 122: 949-955.
- Utrilla P. (2000) *Pharmacological Aspect of Amphetamines*. *ARs Pharmaceutica*, 41: 67-77.



- Vanhatalo S., Soinila S., Kaartinen K., Bäck N. (1995) *Colocalization of dopamine and serotonin in the rat pituitary gland and in the nuclei innervating it.* Brain Research, 669: 275-284.
- Vega Matuszcyk J, Larsson K, Eriksson E. (1998) *The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sexual motivation in male rats.* Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2: 527-532.
- Wagner SM., Wajner MS., Maia AL. (2008) *The role of thyroid hormone in testicular development and function.* Journal of Endocrinology, 199: 351-365.
- Walther DJ., Bader M. (1999) *Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells.* Brain Research Molecular, 68: 55-63.
- Walther DJ., Bader M. (2003) *A unique central tryptophan hydroxylase isoform.* Biochemical Pharmacology, 66: 1673-1680.
- Walther J., Peter JU., Bashammakh S., Hortnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. (2003) *Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform.* Science, 299: 76-80.
- Wang RS., Yeh S., Lin HY., Zang C., Ni J. (2006) *Androgen receptor in Sertoli cells is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testis.* Endocrinology, 147: 5624-5633.
- Working PK. (1995) *Reproductive toxicology* En: *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. Tercera Edición. 193-230.
- Xia W., Wong CH., Lee NPY., Lee WM., Cheng CY. (2005) *Disruption of sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of the rat testis can be limited to adherens junctions without affecting the blood-testis barrier integrity: An in vivo study using an androgen suppression model.* Journal of Cellular Physiology, 205: 141-157.
- Zhu BC., Palmada MN., Aguado LI., Cavicchia JC. (2002) *Administration of acetylcholine to the spermatic nerve plexus inhibits testosterone secretion in an in vitro isolated rat testis nerve plexus system.* Journal of Andrology, 25: 134-138.

Citas de Internet:

1. <http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia>
2. http://www.vi.cl/foro/topic/6988-capitulos-de-biologia-cuestiones-resueltas/page__st__58