

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA RECAPTURA DE SEROTONINA EN EL
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TESTÍCULO Y FUNCIÓN GONADAL**

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 N:

GONZÁLEZ CARPIO ROQUE AYARI

OLIVARES MORÍN RODRIGO MIGUEL

Directora de Tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar



México, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

CARRERA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA INHIBICION DE LA RECAPTURA DE SEROTONINA EN EL
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TESTÍCULO Y FUNCIÓN GONADAL**

TESIS QUE PRESENTAN

PARA OBTENER EL TITULO DE BIÓLOGO:

**GONZÁLEZ CARPIO ROQUE AYARI.
OLIVARES MORÍN RODRIGO MIGUEL.**

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

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

La presente tesis fue posible gracias al subsidio IN223714 del Programa de Apoyo
para la Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Ayala Escobar y al Dr. Andrés Aragón Martínez por su ayuda y apoyo brindado en la elaboración de esta tesis.

A los miembros del jurado:

M.C. Raúl Zavala Chavero

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Juana Monroy Moreno

Por su contribución en la revisión y elaboración de esta tesis.

A los miembros de la Unidad de Investigación de Biología de la Reproducción y a nuestros compañeros del laboratorio.

A nuestra *Alma máter* Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de pertenecer a esta honorable máxima casa de estudios y a nuestra Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

DEDICATORIAS

A mis mamitas Rocio y Josefina:

Mis mamis les agradezco infinitamente el apoyo, confianza y motivación que siempre me dieron, desde que inicie mi vida académica hasta ahora en esta cima tan imponente.

Mamá Rosy con todo mi esfuerzo, perseverancia y corazón, espero recompensarte por todo tu tiempo y dedicación que me has dado.

Mamá Josefina siempre te estaré agradecida por tu fortaleza que ha sido un ejemplo para mí y admiro en ti.

A mi Ruy:

Las palabras no alcanzan ni en esta hojas ni en este cosmos para dar gracias a la vida por permitirme el seguir junto a ti, el afrontar y luchar juntos ante aquellos días grises. Fue un camino complejo pero nada que no pudiéramos lograr. Gracias por todo tu tiempo, por incentivar me y brindarme tu mano a cada paso.

A mi Carrera:

Por las memorias que siempre vivirán en mí, esos divinos momentos de aprender ciencia complementaron mi ser. Gracias mi Biología por abrirme los ojos ante un universo tan increíble.

-“Te amo con todo mi hipotálamo”.-

- “Porque siempre he creído en mi”.-

Ayari.

- El Arte es "yo"; la Ciencia es "nosotros".-

Claude Bernard.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Jamás podré devolverles ni una ínfima parte de lo me han dado, gracias por brindarme todo su apoyo, asesoría y amor a pesar de las eventualidades adversas, por estar conmigo en cada desvelada. Los amo.

A Ayari:

Gracias mi cielo por todo el soporte, ayuda y complicidad en cada idea, proyecto, y ocurrencia que he tenido, por todos los momentos compartidos, por todas las lágrimas y los gozos, eres mi fuerza, mi ímpetu, mi corazón. Nada de esto sería posible sin ti. Gracias. Te amo. O3O

“Mis muertes prematuras y mis momentos, sólo con ella”

Fernando Benavides

“Sin duda no hay progreso”

Charles Darwin

“En biología nada tiene sentido, si no es a la luz de la evolución”

Theodosius Dobzhansky

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
<i>Serotonina</i>	3
<i>Sistema serotoninérgico</i>	3
<i>Síntesis y Metabolismo</i>	7
<i>Receptores a serotonina</i>	8
<i>Funciones</i>	9
<i>Aparato reproductor Masculino</i>	11
<i>Funciones del testículo</i>	21
<i>Espermatogénesis</i>	22
<i>Esteroidogénesis</i>	23
<i>Regulación Hormonal de las Funciones del Testículo</i>	26
<i>Serotonina y Regulación de la Función Gonadal</i>	28
<i>Proteína transportadora de serotonina (SERT)</i>	30
<i>Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS)</i>	31
<i>Fluoxetina y SERT</i>	32
<i>Fluoxetina y funciones del testículo</i>	33
<i>Pubertad en el macho</i>	35
<i>Etapa Juvenil</i>	35
JUSTIFICACIÓN.....	39
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVOS.....	41
MATERIAL Y MÉTODO.....	42
<i>Administración de fármaco</i>	42
<i>Procedimiento de Autopsia</i>	42
<i>Cuantificación de neurotransmisores</i>	43
<i>Cuantificación de hormonas esteroides y gonadotropinas en suero</i>	44
<i>Evaluación de espermatogénesis</i>	44
<i>Movilidad espermática</i>	44
<i>Viabilidad espermática</i>	45

<i>Morfología espermática</i>	45
<i>Número espermático</i>	45
<i>Estudio histológico</i>	46
<i>Inclusión y tinción del testículo</i>	46
<i>Estudio morfométrico del testículo</i>	46
<i>Análisis estadístico</i>	47
RESULTADOS	48
<i>Peso corporal</i>	48
<i>Concentración de serotonina y su metabolito en:</i>	49
<i>Hipotálamo</i>	49
<i>Hipófisis</i>	51
<i>Testículo</i>	52
<i>Peso de testículos y masa testicular</i>	53
<i>Concentración de gonadotropinas</i>	55
<i>Espermatogénesis:</i>	56
<i>Número espermático</i>	56
<i>Movilidad espermática</i>	56
<i>Viabilidad</i>	57
<i>Anormalidades en los espermatozoides</i>	58
<i>Concentración de Hormonas Esteroides</i>	63
<i>Evaluación Morfométrica del testículo</i>	64
DISCUSION.....	66
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75

RESUMEN

La serotonina (5-HT) participa en la modulación de la secreción de la hormona hipotálamica liberadora de las gonadotropinas (GnRH), y de las hormonas folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), por la hipófisis que son esenciales en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del testículo, la esteroidogénesis y la espermatogénesis. Además, la 5-HT también ejerce un efecto directo en el testículo modulando su funcionamiento.

En la actualidad se ha incrementado la utilización de los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (ISRS), como la fluoxetina (FLX) para el tratamiento de distintos trastornos como depresión, desórdenes alimenticios y de conducta. Tales sustancias se están utilizando en niños y adolescentes. Sin embargo, no se han considerado los efectos sobre las funciones reproductivas. Por ello, en el presente estudio se evaluaron en la rata macho prepúber, los efectos de la inhibición de la recaptura de 5-HT en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, inducido por la administración de FLX, al evaluar la concentración de 5-HT y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en los componentes de este eje, en la concentración de FSH, LH, progesterona y testosterona en suero, en la estructura del testículo y en la espermatogénesis evaluada por número, movilidad, formas anormales y viabilidad de los espermatozoides. Por lo que a ratas macho de 30 días de edad se les administró 5mgKg^{-1} de p.c. de FLX diariamente hasta el día 50 de edad (grupo FLX). Como grupo de comparación se utilizaron ratas macho a las que se les administró solución salina al 0.9 % del día 30 al 50 de edad (Grupo VH). Otro grupo de animales no se sometieron a ningún tratamiento, testigo absoluto (Grupo TA). Todos los animales se sacrificaron a los 65 días de edad.

En comparación con el grupo TA, en los animales del grupo VH no se presentaron cambios en ninguno de los parámetros evaluados. En los animales con FLX no se modificó la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo, la hipófisis y el testículo en comparación con los que recibieron VH o TA. La masa testicular en

los animales tratados con FLX disminuyó significativamente en comparación con los tratados con VH o TA (FLX: 2.88 ± 0.05 vs. VH: 3.12 ± 0.08 ; TA: 2.98 ± 0.07 , $p < 0.05$).

La concentración de FSH (FLX: 1.22 ± 0.36 vs. VH: 2.74 ± 0.55 ; TA: 2.48 ± 0.34 , $p > 0.05$), LH (FLX: 0.51 ± 0.07 vs. VH: 0.97 ± 0.09 ; TA: 0.95 ± 0.10 , $p > 0.05$) y testosterona (FLX: 2.42 ± 0.29 vs. VH: 3.85 ± 0.58 ; TA: 3.36 ± 0.32 , $p < 0.05$) en el suero de los animales tratados FLX disminuyó significativamente en relación con el grupo de animales con VH o TA. Este mismo efecto se observó en el diámetro promedio de los túbulos seminíferos (FLX: 481.40 ± 5.98 vs. VH: 438.91 ± 5.54 ; TA: 500.58 ± 4.69 , $p < 0.05$).

Cuando se analizaron los aspectos de la espermatogénesis, se observó que en comparación con los animales que se les inyectó VH o en los TA, en el grupo que recibió FLX disminuyó significativamente el número y la movilidad de los espermatozoides; número (FLX: 28.24 ± 5.45 vs. VH: 42.70 ± 3.10 ; TA: 42.70 ± 6.30 , $p < 0.05$) y movilidad (FLX: 12.26 ± 2.33 vs. VH: 26.15 ± 2.71 ; TA: 24.26 ± 1.71 , $p < 0.05$). Se incrementó el porcentaje de formas anormales en los espermatozoides (FLX: 44.56 ± 1.35 vs. VH: 30.10 ± 1.83 ; TA: 27.23 ± 2.46 , $p < 0.05$). Mientras que la viabilidad de los espermatozoides no se modificó. En conjunto los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que la FLX altera la estructura del testículo y disminuye las funciones de este órgano, esteroidogénesis y espermatogénesis, sin alterar significativamente la concentración de 5-HT y su metabolito en los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-testículo.

INTRODUCCIÓN

Serotonina

La Serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), es una monoamina biogénica con un peso molecular de 176 Daltons. Tiene un grupo hidroxilo en la posición 5 del núcleo indol y una amida nitrogenada primaria que actúa como aceptador de un protón a pH fisiológico (Sánchez y col., 2009) (Fig. 1). Esto le confiere la propiedad hidrofílica y como tal, no atraviesa la barrera hematoencefálica fácilmente (Siegel y col., 1999; Contreras y Mancillas, 2005).

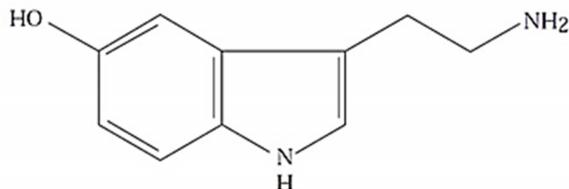


Figura 1. Estructura de la 5-HT (Tomado de Contreras y Mancillas 2005).

Se le encuentra tanto en el reino animal (vertebrados e invertebrados) como en el reino vegetal (Villalón y col., 1993). En los mamíferos, se le identifica en el sistema nervioso central (SNC), en donde actúa como neurotransmisor. Así como en células y tejidos periféricos, como las células enterocromafines de la mucosa gastrointestinal (células de Kulchitsky), en las plaquetas, vasos sanguíneos, mastocitos, páncreas, pulmón, timo, tiroides, glándulas salivales, el corazón, en el tracto urogenital y órganos reproductivos (Villalón y col., 1993).

Sistema serotoninérgico

En el SNC, los cuerpos de las células serotoninérgicas están restringidas a grupos de células en el tronco cerebral que conjuntamente se denomina el núcleo del rafé, cuyas fibras, inervan casi todas las áreas del cerebro (Jacobs y Azmitia, 1992). Este núcleo comprende nueve paquetes de neuronas serotoninérgicas que

se identifican del B1 al B9 (Dahlstroem y Fuxe, 1964; Törk, 1990). En función de su localización en el tronco cerebral, los núcleos serotoninérgicos del rafe se dividen en inferior (caudal) y los grupos superiores (rostral) (Lidov y Molliver, 1982).

Los grupos superiores consisten de: El caudal lineal (NCL; B8), el medial del rafe (NMR; B8 y B5, que también se les denomina núcleos centrales superiores), el grupo de neuronas laterales B9 se sitúan en la región dorsal al lemnisco medial (LM) y el núcleo dorsal del rafe (NDR, B7 y B6). El grupo inferior consta de cinco núcleos principales: rafe obscurus (NRO; BZ), rafe pallidus (NRPA; B1 y B4), rafe magnus (NRM; B3), paragigantocelular lateral (LPGN) y reticulares intermedios (NRI)] (B1/B3) (Jacobs y Azmitia, 1992) (Fig. 2).

Los diferentes núcleos serotoninérgicos poseen características individuales, tales como la presencia de cotransmisores que pueden influir en su fisiología. El NDR contiene neuronas no serotoninérgicas que sintetizan dopamina (DA), ácido gamma-aminobutírico (GABA), óxido nítrico (NO), factor liberador de corticotropina (CRF), polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y colecistoquinina (CCK) (van der Kooy y col., 1981; Kozicz y col., 1998; Kiss y col., 2002). Sólo el 25-50% del total de la población neuronal del NDR contiene 5-HT (Moore, 1981).

En comparación con el NDR, el NMR contiene menos neuronas 5-HT. Las células serotoninérgicas del NDR son largas (30-40 μ m), fusiformes y tienen de cuatro o cinco dendritas primarias que se irradian desde el soma celular (Vertes y col., 2010). Las células serotoninérgicas del NMR se dispersan de manera uniforme en todo el núcleo. Las neuronas que están localizadas dorsalmente en NMR, son pequeñas (10-12 μ m), son ovales, mientras que las células serotoninérgicas ventrales del NMR son de tamaño mediano (15-22 μ m) tienen forma oval o de huso (Vertes y col., 2010).

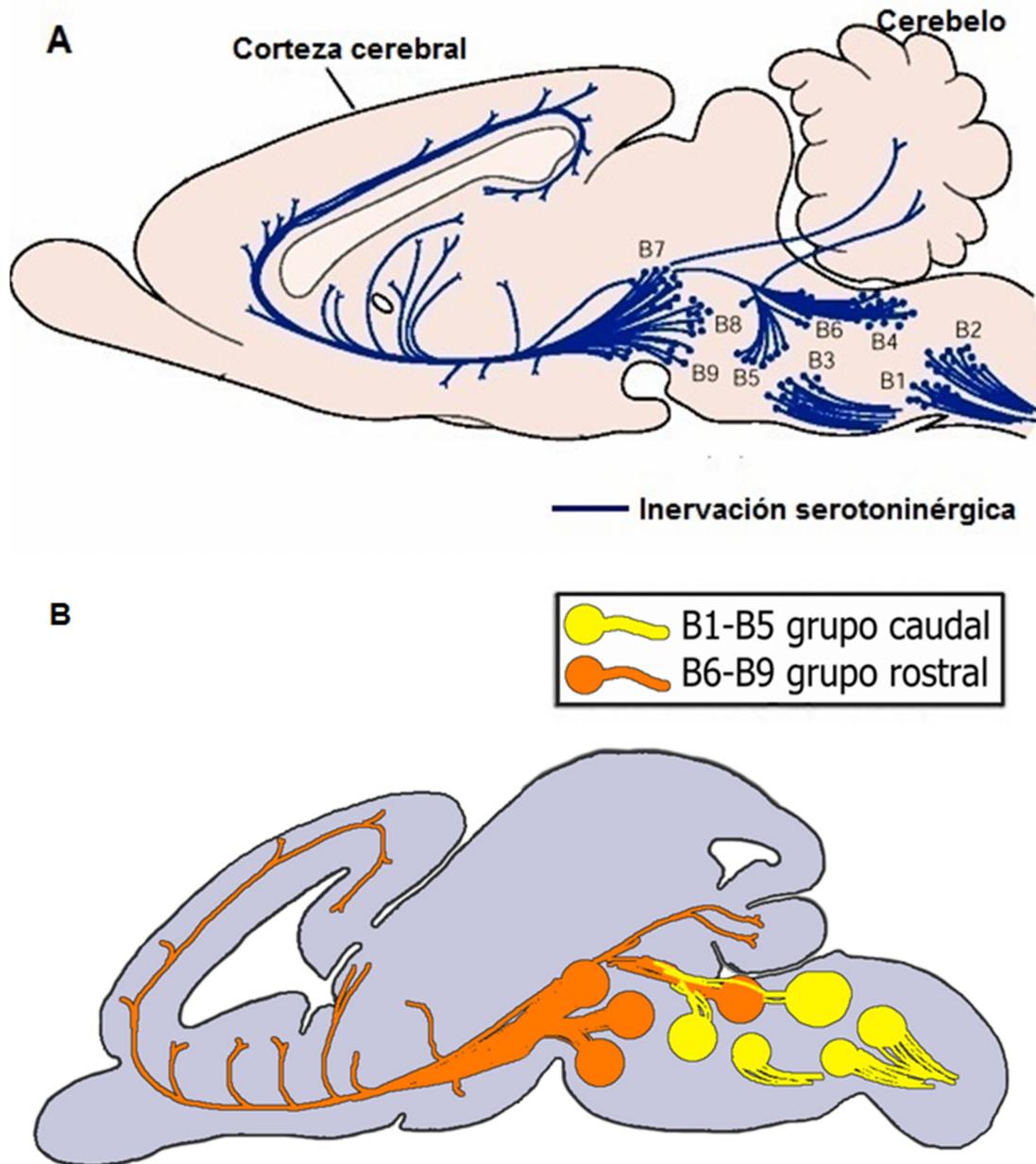


Figura 2. Organización de las neuronas serotoninérgicas en el tronco cerebral: A. Se muestran los nueve grupos de células serotoninérgicas (B1-B9) (Modificado de Hale y Lowry, 2011). B. Los grupos serotoninérgicos caudales B1-B5 (amarillo) proyectan hacia el tronco cerebral y la médula espinal, mientras que los grupos celulares rostrales B6-B9 (naranja), envían sus terminales al diencefalo y telencefalo (Tomado de Gaspar y col., 2003).

Las fibras serotoninérgicas que se originan en el NDR y NMR inervan diferentes regiones del cerebro, como el hipotálamo y el área preóptica medial. Se ha mostrado que las terminales serotoninérgicas se encuentran en contacto sináptico, con las dendritas, con la terminal y el soma de las neuronas que secretan GnRH, lo que indica que la 5-HT participa en la regulación de la secreción de este factor liberador y de las gonadotropinas por la hipófisis (Descarries y Beaudet, 1978; Steinbusch, 1984, en Descarries y col., 2010).

La inervación serotoninérgica que se originan de los núcleos NDR y NMR tienen características morfológicas, anatómicas y funcionales diferenciales, lo que les confiere tener una respuesta y sensibilidad diferencial a la acción de las anfetaminas, como la metilendioxiamfetamina (MDA) y P-Cloroanfetamina (PCA). Las fibras que se origina en el NDR son más susceptibles a los efectos neurotóxicos de estos fármacos, mientras las que se originan en el NMR son más resistentes (Mamounas y Molliver, 1988). Debido a estas características es que se les consideran como sistemas serotoninérgicos distintos.

Además del sistema nervioso central a la 5-HT también se le encuentra en la hipófisis. En el lóbulo neural, intermedio y anterior, existen terminales nerviosas serotoninérgicas que se origina en el NDR (Vanhatalo y col., 1995). Saavedra y col. (1975) reportaron en la hipófisis la presencia de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), que participa en la síntesis de 5-HT y de la monoamino oxidasa (MAO), que metaboliza la 5-HT (Saland y col., 1993; Zill y col., 2009), así como del receptor 5-HT₃ (Quirk y Siegel, 2005). Estos hechos han llevado a los autores a proponer que la 5-HT actúa directamente en la hipófisis en donde modula la secreción de las gonadotropinas.

La 5-HT también se ha identificado en tejidos periféricos como el epidídimo, el conducto deferente (Leung y col., 1999) y el testículo (Mayerhofer, 1996; Frungieri y col., 2002). Se sugiere que la fuente de 5-HT de la gónada son las plaquetas y la que se sintetiza directamente en la célula de Leydig (Kormano y Penttilä, 1968;

Tinajero y col., 1993; Mayerhofer y col., 1996; Frungieri y col., 2002). En el testículo de la rata macho recién nacida se encuentran altas concentraciones de 5-HT a diferencia del adulto en donde las concentraciones son bajas (Zieher y col., 1971).

Syed y colaboradores (1999) mostraron en cocultivos de células de Sertoli y germinales (espermatoцитos en paquiteno), observaron la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del receptor a 5-HT en la célula de Sertoli. Por inmunohistoquímica se ha identificado en las células de Leydig a la triptófano hidroxilasa (Frungieri y col., 2002). También en el parénquima y cápsula testicular se encuentra la 5-HT y el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), la fuente de 5-HT son los mastocitos (Frungieri y col., 1999). Jiménez y col. (2007), cuantificaron 5-HT y la actividad de la TPH en el epidídimo de la rata y observaron que estos dos parámetros aumentan durante la maduración sexual.

Síntesis y Metabolismo

El paso inicial en la síntesis de 5-HT es el transporte facilitado del aminoácido L-triptófano que contiene un anillo de indol y una cadena lateral carboxiamida, este se obtiene de la dieta, penetra en la circulación sanguínea donde el 80-90% se une a la albúmina y el resto circula libremente, y por medio de un aminoácido transportador ingresa a la neurona o célula que sintetiza a la amina. El triptófano es hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por medio de la acción de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) (TPH-1) junto con el cofactor tetrahydrobiopterina y oxígeno ($L\text{-triptófano} + \text{tetrahydrobiopterina} + \text{O}_2 \rightarrow 5\text{-hidroxitriptófano} + \text{dihydrobiopterina} + \text{H}_2\text{O}$), el 5-HTP es descarboxilado y convertido en 5-HT por la descarboxilasa (L-aminoácido aromático descarboxilasa), que requiere fosfato de piridoxal como cofactor (Kruk y Pycocck, 1991).

La 5-HT se almacena en vesículas por un transportador vesicular de monoamina (VMAT) y su liberación por exocitosis es disparada por la entrada de Ca^{2+} a la

terminal de la neurona presináptica. En el espacio sináptico la 5-HT se une a su receptor de membrana localizado en la célula postsináptica y la amina que queda libre se une a una proteína transportadora (SERT) y es transportado a la terminal presináptica. La recaptura de 5-HT es el primer paso en el proceso de inactivación de la 5-HT (Muñoz y Vargas, 2004; Vera, 2005; Jorgensen, 2007). En consecuencia reduce la disponibilidad de la amina y finaliza la neurotransmisión serotoninérgica (Siegel y col., 1999).

Con la 5-HT recapturada por la neurona presináptica se llevan a cabo dos reacciones de conjugación, para facilitar su excreción. La principal vía catabólica es la desaminación oxidativa catalizada por la monoamina oxidasa (MAO) (Molinoff y Axelrod, 1971; Gershon y col., 1990) principalmente por MAO-A (Salín, 2008), dando origen a su principal metabolito inactivo, el ácido 5-hidroxi-indolacetaldehído. Este producto a continuación es oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa, dependiente de NAD⁺, obteniéndose 5-HIAA como producto final (Iversen, 2000) (Fig. 3).

Receptores a serotonina

La 5-HT presenta una gran diversidad de efectos que son mediados por su unión a diversos receptores específicos de membrana. Sus receptores están presentes en el SNC y en el sistema nervioso periférico (SNP), en numerosos tejidos no neuronales como el intestino, sistema cardiovascular y en células sanguíneas. Hasta el momento, se han identificado siete miembros dentro de la familia (5-HT₁ a 5-HT₇) y algunas de ellas tienen varios subtipos (5-HT_{1A} a 5-HT_{1F}). Ello ha conducido a la descripción y consideración de un total de 14 tipos distintos. Por lo tanto, los efectos de la 5-HT están mediados por múltiples subtipos de receptores con distinta localización pre y postsináptica (Hoyer y Martín, 1997).

La unión de la 5-HT a sus receptores desencadena diferentes cascadas de señalización intracelular. Algunos receptores a 5-HT forman parte de los

receptores acoplados a la familia de proteínas G y al complejo enzimático de la adenil ciclasa (5-HT₁, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇) o a la fosfolipasa C (5-HT₂). La 5-HT también se une al receptor acoplado a un canal iónico (5-HT₃) (Villegas y Villegas, 2004) (Fig. 4).

Funciones

En el SNC la 5-HT funciona como neurotransmisor; regula el funcionamiento del sistema cardiovascular, la vasoconstricción, la coagulación y el flujo sanguíneo así como la memoria, apetito, el sueño-vigilia, la temperatura corporal, la conducta sexual, el dolor, la actividad motora, las funciones cognitivas y la secreción de hormonas hipofisarias e hipotalámicas. La deficiencia en la producción de la 5-HT se le asocia con: ansiedad, depresión, agresión, déficit de atención y trastornos de la alimentación (Collin y col., 1996; Aragón y col., 2005; Berger y col., 2009; Celada y col., 2013).

A la 5-HT se le asocia con la regulación del funcionamiento de algunas glándulas endocrinas, debido a que actúa sobre el hipotálamo y modula la producción de los factores liberadores, que en la hipófisis estimulan la producción de hormonas. Por ejemplo, modula la secreción de la GnRH, que viaja por el sistema portal y es transportada hasta la adenohipófisis en donde estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas, esenciales en el funcionamiento del testículo y por tanto en la actividad reproductiva del macho (Tresguerres, 2003; Berger y col., 2009; Celada y col., 2013).

La 5-HT también actúa en tejidos y órganos periféricos, como la hipófisis y los componentes del aparato reproductor del macho, en donde se le asocia con la producción de testosterona y la espermatogénesis (Tinajero y col., 1993; Frungieri y col., 2002; Aragón y col., 2005).

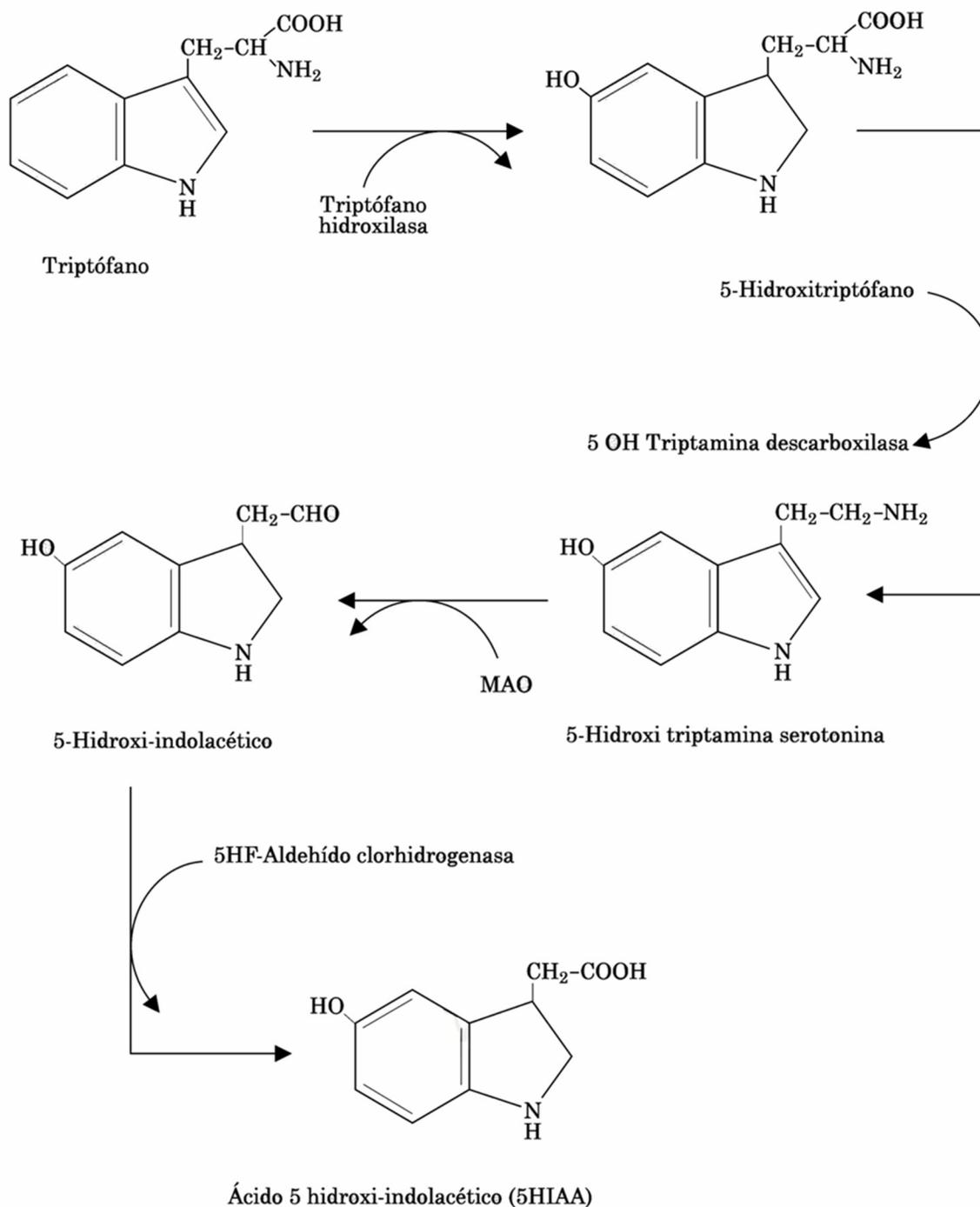


Figura 3. Ruta de Síntesis y degradación de la 5-HT. Enzimas: Triptófano hidroxilasa, 5-OH Triptamina descarboxilasa, Monoamino oxidasa (MAO), 5HF-Aldehído clorhidrogenasa (Tomado de Contreras y Mancillas, 2005).

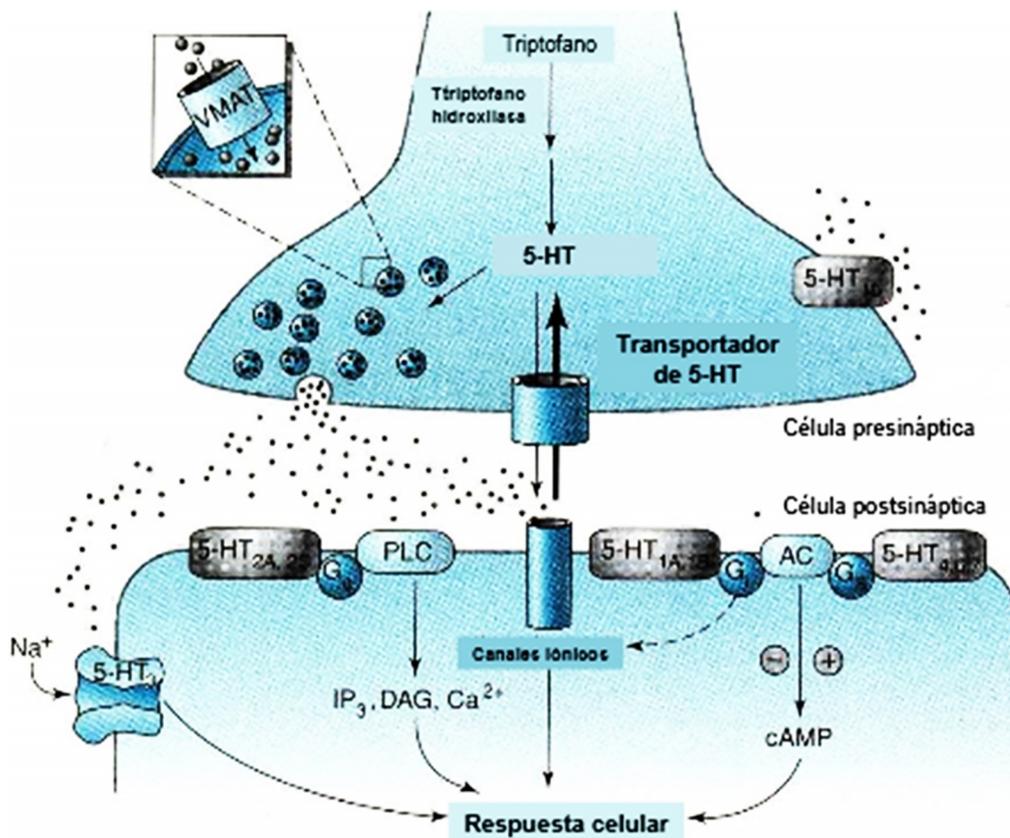


Figura 4. Esquema de las vías de señalización que desencadena la unión de la 5-HT a sus receptores (Modificado de Nestler y col., 2001).

Aparato reproductor Masculino

El aparato reproductor del macho está constituido de órganos sexuales internos y externos, dentro de los órganos sexuales internos se encuentran a las gónadas, los epidídimos, los conductos deferentes y las glándulas sexuales anexas (próstata, vesícula seminal, y bulbouretrales) (Cuadro 1), mientras que los órganos sexuales externos son el pene y el escroto (Setchell y col., 1994; Curtis, 2000).

Los testículos son órganos pares, cada uno de ellos situados dentro de la bolsa testicular, el escroto y se encuentra rodeado por una cavidad serosa estrecha que se desarrolla a partir de la cavidad peritoneal (Welsch y Sobotta, 2008). Son

órganos generalmente ovalados (anfibios, aves y mamíferos) (Estrada y Uribe, 2002). Desde afuera hacia adentro las cubiertas testiculares incluyen el dartos en la piel, con células musculares lisas, el músculo cremáster y las fascias espermáticas externas e internas, así como la túnica vaginal del testículo (Welsch y Sobotta, 2008).

En el testículo, la túnica albugínea se proyecta al interior del testículo y se forman tabiques de tejido conjuntivo que dividen al testículo en 350 lobulillos. En cada uno de estos se encuentra el tejido testicular conformado de los túbulos seminíferos y el tejido intersticial. Cada lobulillo contiene entre 2-4 túbulos seminíferos, por tanto hay un total de alrededor de 1000 por testículo (Welsch y Sobotta, 2008).

Los túbulos seminíferos están rodeados de tejido intersticial, que consiste en tejido conjuntivo laxo con vasos sanguíneos, linfáticos, células de Leydig y fibras nerviosas (Estrada y Uribe, 2002). Son contorneados y tienen una longitud alrededor de 30-70 cm en la rata. Su diámetro es de unos 150-200 μm . La altura de su epitelio (epitelio germinativo) fluctúa y puede alcanzar los 80 μm . En algunos túbulos la luz está vacía, pero puede contener espermatozoides aislados. En el epitelio germinativo se encuentran células germinales y de sostén, células de Sertoli (Welsch y Sobotta, 2008).

Los túbulos seminíferos se componen de epitelio seminífero grueso rodeado por tejido conectivo delgado, la túnica propia. Están rodeados por una capa de células alargadas, mioideas y que tienen la propiedad de contraerse. La túnica propia se compone de haces entrelazados de colágeno I, con varias capas de fibroblastos. Internamente está conformado por el epitelio germinal (seminífero) que tiene varias capas con dos tipos celulares las germinales y de Sertoli (Ross y col., 2004) (Fig. 5).

Cuadro 1. Principales funciones de glándulas accesorias y epidídimo.

Estructura	Función
Próstata	Produce un fluido incoloro con alta concentración de ácido cítrico, fosfatasa alcalina y fibrolisina. Estas secreciones forman parte del semen y otorgan movilidad a los espermatozoides. El funcionamiento de la próstata es regulado por testosterona (Mann y Lutwak-Mann, 1990; Gartner y Hiatt, 1997).
Vesículas seminales	Producen una secreción amarilla, viscosa, rica en fructuosa y prostaglandinas, cuya función es fungir como un vehículo para los espermatozoides en el aparato reproductor femenino. Su actividad está regida por la acción de la testosterona (Coffey y col., 1988).
Vesículas bulbouretrales	Generan una secreción de características mucoides y transparentes que son importantes para limpiar la uretra, así como lubricarla (Okó y Clermont, 1990).
Epidídimo	Transporte de los espermatozoides Desarrollo de la motilidad del espermatozoide Desarrollo de la capacidad de fertilización del espermatozoide La maduración a través de la absorción y secreción del epitelio del epidídimo. Los espermatozoides una vez liberados en el lumen de los túbulos seminíferos pasan a la rete de testis donde son transportados a través del epidídimo (Robaire y col., 2006). Ocurre la maduración espermática que se refiere al cambio funcional que adquiere el espermatozoide mediante la alteración de la membrana y la oxidación de los disulfuros intracelulares (Baumgarten y col., 1971; Cooper, 1999).

Al interior de los túbulos seminíferos, ocurre la formación de los gametos masculinos mediante el proceso de espermatogénesis. Las células germinales están acompañadas de las células de Sertoli, único tipo de célula somática que son de gran importancia en el desarrollo de las células germinales ya que, además

de su actividad hormonal que determina las condiciones internas de los túbulos seminíferos; nutren y sostienen las células germinales y fagocitan los cuerpos residuales una vez formados los espermatozoides (Estrada y Uribe, 2002).

Las células de Sertoli forman un epitelio de células alargadas e irregulares, con base en la membrana basal y su extremo apical hacia la luz del túbulo seminífero. Su núcleo es basal, claro y esférico, con uno o dos nucléolos, muestran uniones intercelulares específicas que determinan la formación de la barrera de permeabilidad hemato-testicular (Estrada y Uribe, 2002).

El intersticio situado entre los túbulos seminíferos es tejido conectivo laxo, en el que hay macrófagos, mastocitos; vasos sanguíneos linfocitos y agregados de células de Leydig (Stevens y Lowe, 2000) (Fig. 6).

Las células de Leydig son las encargadas de llevar a cabo la síntesis de estas hormonas sexuales. Estas células se localizan aisladas o formando pequeños grupos en el tejido intersticial son ovoides o irregulares, con núcleo denso esférico finamente granular y vacuolado (Estrada y Uribe, 2002). Se ubican fuera de los túbulos seminíferos cerca de los vasos sanguíneos (Gal y col., 2007). Los espermatozoides una vez liberados en la luz de los túbulos seminíferos pasan a la *rete de testis* donde son transportados hacia el epidídimo. En este órgano se almacenan los espermatozoides y es una estructura en la que se lleva a cabo la maduración e inicia la capacitación de los espermatozoides (Robaire y col., 2006).

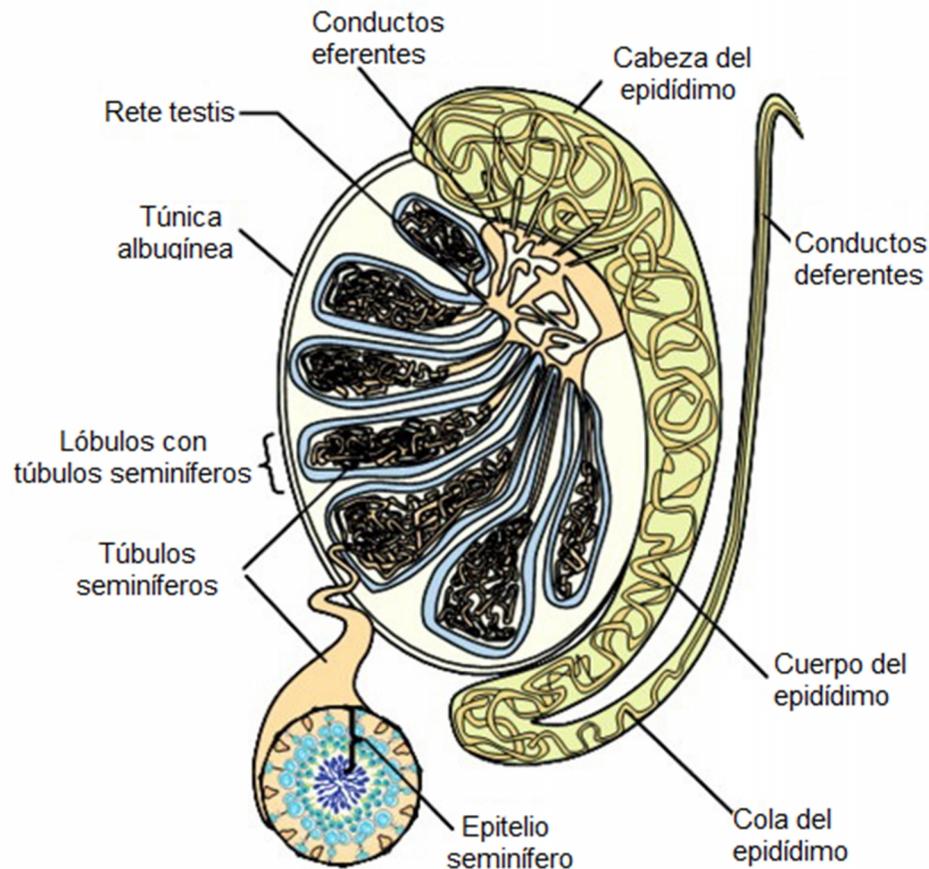


Figura 5. Representación esquemática de la estructura del testículo en los mamíferos (Modificado de Lagarrigue y col., 2011).

En todas las especies de mamíferos estudiados hasta la fecha, cada región del epidídimo se organiza en lóbulos separados por septos de tejido conectivo. Estos septos no sólo sirven como soporte interno para el órgano sino también se ha propuesto que proporcionan una separación funcional entre lóbulos que permite la expresión selectiva de genes y proteínas dentro de los lóbulos individuales (Turner y col., 2003).

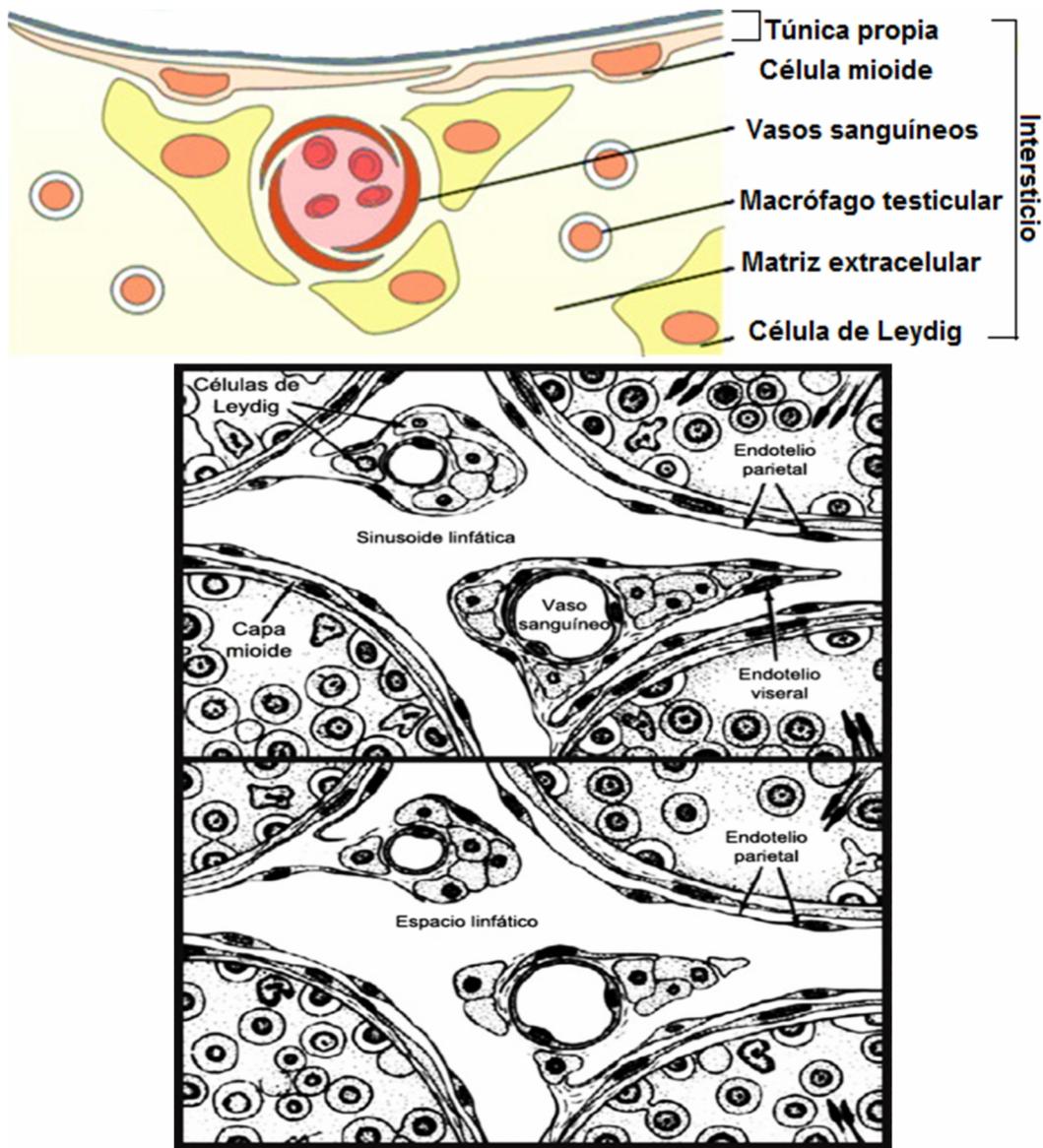


Figura 6. Diagrama que ilustra la anatomía del tejido intersticial de los testículos de rata. Las células de Leydig y los túbulos seminíferos están investidos por endotelio, el cual limita las extensas sinusoides linfáticas. El endotelio visceral es discontinuo y las células de Leydig están directamente expuestas a la linfa (Modificado de Fawcett, 1973; Lagarrigue y col., 2011).

El epidídimo consiste de una convergencia de túbulos y forma parte del conducto mesonefrítico (Baumgarten y col., 1971). Se divide en cuatro regiones anatómicas: el segmento inicial, la cabeza, el cuerpo y cauda (Robaire y col., 2006) (Fig. 7). Los espermatozoides son transportados por el conducto del epidídimo con ayuda del músculo liso que rodea al conducto principal del órgano (Baumgarten y col., 1971).

La composición de fluido luminal del epidídimo es diferente de la del plasma sanguíneo. La barrera hemato-epidídimal mantiene los dos fluidos en compartimentos separados (Hinton y Palladino 1995). Esta barrera está formada por uniones gap y permite la comunicación entre las células del epitelio (Cyr y col., 1995). También mantiene un microambiente luminal especializado para la maduración de espermatozoides mediante la restricción del paso de iones, solutos, y macromoléculas por el epidídimo (Hinton y Palladino 1995).

En el epidídimo, los espermatozoides se convierten funcionalmente maduros a medida que viajan por el órgano (Baumgarten y col., 1971; Cooper, 1999). También se produce la migración de la gota citoplasmática a lo largo del flagelo, remodelación acrosomal, cambios en la cromatina nuclear y en la membrana plasmática del espermatozoide (Bedford, 2004 en Robaire y col., 2006).

En este trayecto, los espermatozoides también adquieren su motilidad característica (Parra y del Sol, 2002). Cuando salen del testículo los espermatozoides son inmóviles o sólo muestran un leve movimiento del flagelo. Cuando se encuentran en la cabeza del epidídimo nadan con un patrón circular, mientras que los liberados de la cauda se mueven progresivamente y con fuerza hacia adelante (Bedford, 2004 en Robaire y col., 2006).

El transporte de los espermatozoides se lleva a cabo en contra de un gradiente de presión hidrostática creciente desde los testículos a la cola del epidídimo, el mecanismo responsable de la conducción a través del lumen de este último órgano se ha atribuido principalmente a las contracciones musculares rítmicas del músculo liso que lo recubren (Robaire y col., 2006). Una vez que el espermatozoide ingresa en el epidídimo, posee movilidad baja y se mueve por este conducto por movimientos peristálticos estimulados por la inervación adrenérgica y colinérgica del órgano, así como por acción de la vasopresina y oxitocina (Cooper, 1999).

Cuando los espermatozoides se liberan del epidídimo, maduran y adquieren la habilidad de moverse hacia delante y con ello la capacidad fecundante. A partir de este momento, los espermatozoides pueden potencialmente ascender por el aparato genital femenino, en donde esta célula tiene el potencial de llevar a cabo la reacción acrosomal, como consecuencia penetrar en las cubiertas del ovocito y lograr la fusión de su material genético con la del gameto femenino (Robaire y col., 2006).

El conducto deferente recorre el escroto, sigue en la pelvis, al llegar a la vejiga urinaria se curva y termina encima de la próstata. A continuación del conducto deferente se encuentran las vesículas seminales, cuya función principal es colaborar en la formación del semen. Los conductos eyaculadores son los encargados de llevar el semen hasta la uretra (Cooper, 1999).

Las vesículas seminales son glándulas pares, miden de 5 a 6 centímetros de largo por 1.5 de ancho, se encuentran enrolladas conformando una masa (Gartner y Hiatt, 1997; Coffey y col., 1988). La estructura de éste órgano es similar a la del conducto deferente (Coffey y col., 1988). Están revestidas por un epitelio cilíndrico sencillo secretor que junto con el tejido conjuntivo que forma la lámina propia o corion, se proyectan para formar vellosidades ramificadas. Poseen un conducto que desemboca en el conducto eyaculador (Gartner y Hiatt, 1997).

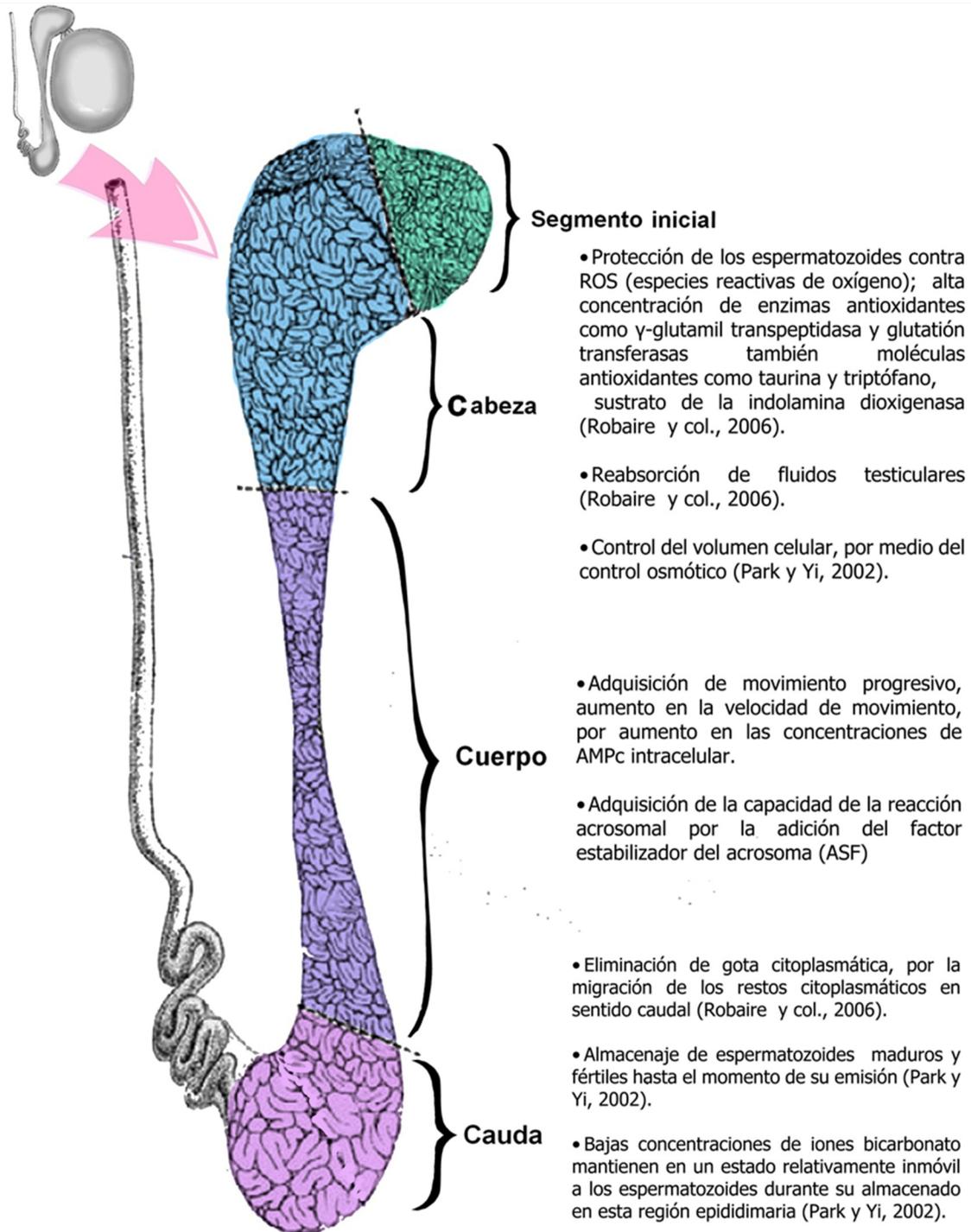


Figura 7. Representación esquemática de la estructura y funciones del epidídimo (Modificado de Robaire y col., 2006).

La próstata y las glándulas bulbouretrales se encuentran en la uretra proximal y distal respectivamente, están compuestas de glándulas alveolares secretoras. En algunas especies estas son glándulas mucosas (Setchell y Breed 2006). Anatómicamente la próstata es una glándula compleja formada por varios lóbulos. Tiene una túnica externa fibrosa conocida como cápsula prostática (Coffey y col., 1988). Las unidades glandulares de la próstata, denominadas alvéolos prostáticos, forman lóbulos y lobulillos que a través de pequeños conductos desembocan en la uretra. Las secreciones prostáticas forman parte del semen y otorgan movilidad a los espermatozoides (Gartner y Hiatt, 1997). La próstata al igual que las secreciones de las vesículas seminales ayudan en el transporte de los espermatozoides y además aumenta el volumen del eyaculado (Mann y Lutwak-Mann, 1990). Esta glándula secreta los fluidos producidos hacia la uretra a través de los conductos prostáticos (Coffey y col., 1988).

Las glándulas bulbouretrales son dos órganos de tamaño reducido (Oko y Clermont, 1990). La secreción contribuye a proporcionar alcalinidad al semen (Gartner y Hiatt, 1997; Stevens y Lowe, 2000). Además, las secreciones de las glándulas accesorias contiene fructuosa, ácido cítrico, zinc, fosfatasa ácida, estos componentes se combinan con el semen en la eyaculación (Kim y Paick, 2004).

La arteria testicular se origina a partir de la aorta abdominal, y se alarga para compensar la migración del testículo al escroto, con la consecuencia de que se convertirá en espiral antes del nacimiento (Setchell, 1970) (Fig. 8). Los órganos del tracto reproductor masculino reciben nervios que derivan de un grupo de ganglios cercanos al cordón espinal, los ganglios: celiaco, aórtico, mesentérico caudal, hipogástrico y pélvico (Setchell y Breed, 2006).

Los testículos son inervados por los nervios espermáticos superior e inferior (Hodson, 1970; Sato y Kihara, 1998). Ambos nervios están conformados por fibras, simpáticas y parasimpáticas (Hodson, 1970). En ratas, el testículo está mucho menos inervado que el resto del tracto reproductor (Properzi y col. 1992).

En la inervación del testículo se han identificado fibras nerviosas que coexisten y liberan catecolaminas y en menor proporción componentes del sistema colinérgico y neuropéptidos. También se propone que el testículo recibe inervación serotoninérgica (Campos y col., 1990), sin embargo no existen datos concluyentes al respecto.

En la túnica y alrededor de los vasos sanguíneos intracapsulares existen receptores adrenérgicos (Properzi y col. 1992). La inervación se observa en el mediastino testicular, en la túnica albugínea, en la vasculosa y acompaña a los vasos sanguíneos intracapsulares. Sin embargo, estas fibras nerviosas no se han observado cerca de las células de Leydig o en los túbulos seminíferos (Dayan, 1970; Bell y McLean, 1973).

Funciones del testículo

El testículo cumple dos funciones, la producción de espermatozoides y de hormonas esteroideas como los andrógenos, que son esenciales en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del resto de los componentes del aparato reproductor del macho y también produce proteínas como inhibina, activina y factores de crecimiento (Ross y col., 2004; Gartner y Hiatt, 2008)

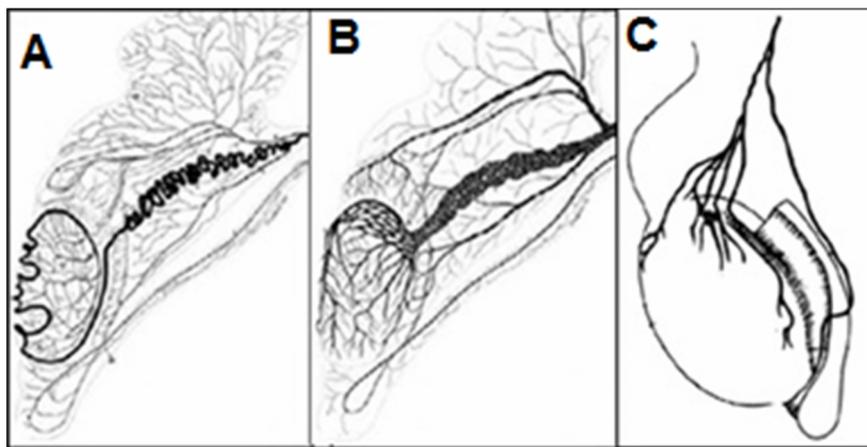


Figura 8. Diagramas de las arterias (A), las venas (B) y los vasos linfáticos (C) que suministran los testículos de la rata (Tomado de Setchell y Breed, 2006).

Espermatogénesis

La espermatogénesis comprende la proliferación mitótica de las espermatogonias, divisiones meióticas de espermatocitos y la diferenciación de las espermátides haploides a espermatozoides, e involucra un balance controlado entre proliferación y muerte celular. Las células germinales o espermatogonias se forman durante la vida fetal y su transformación a espermatozoide comienza al inicio de la pubertad llevándose a cabo en los túbulos seminíferos (Lizama y col., 2007).

Las células germinales rodean a las células de Sertoli y se apoyan en la membrana basal del túbulo seminífero (Maeda y col., 2000). En el macho, los gonocitos se encuentran inactivos hasta antes de que inicie la pubertad. En esta etapa se comienzan a dividir y convierten en espermatogonias (Maeda y col., 2000).

Las espermatogonias A se clasifican en: tipo A0, A1 intermedias y B. Las A0 permanecen en la base de la membrana del túbulo seminífero y tienen la habilidad de dividirse en dos células hijas, una de las cuales se convertirá en espermatogonia A1, la cual continuará con el proceso de espermatogénesis, mientras que la otra permanecerá como célula troncal (Maeda y col., 2000).

En la rata, la espermatogonia A1 presenta 6 divisiones mitóticas y subsecuentemente se convierten en espermatocitos preleptoténicos, los cuales se convertirán en espermatocitos secundarios en el componente adluminal de la célula de Sertoli en el túbulo seminífero (Maeda y col., 2000). Durante esta fase meiótica cada espermatocito dará origen a cuatro espermátides haploides. En este último tipo celular se producen una serie de eventos que incluyen el desarrollo del acrosoma, la condensación del material genético en el núcleo, la elongación de la célula y la eliminación de la mayor parte del citoplasma. Finalmente el espermatozoide recién formado se libera de la región apical de la célula de Sertoli hacia la luz del túbulo seminífero (Maeda y col., 2000) (Fig. 9).

Esteroidogénesis

Los testículos secretan hormonas sexuales, que colectivamente reciben el nombre de andrógenos, como la testosterona, la 5 α -dihidrotestosterona (DTH) y la androstenodiona (Gal y col., 2007). La testosterona y la DTH son dos hormonas importantes en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y la espermatogénesis, así como la conducta sexual (Tortora y Anagnostakos, 1984; Gómez-Chang y col., 2012). La síntesis de las hormonas esteroideas se lleva a cabo en las células de Leydig, a partir del colesterol (Gómez-Chang y col., 2012).

Las células de Leydig, sintetizan colesterol a partir del acetilCoA o lo obtienen principalmente del plasma, otra fuente son las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales se introducen en la célula por endocitosis mediada por receptor. El colesterol independientemente de su origen se almacena en forma de ésteres de colesterol. El primer paso en la síntesis de las hormonas esteroideas es la transformación del colesterol en pregnenolona bajo la acción de la enzima de escisión de la cadena lateral, el citocromo (P-450_{scc}) (Graner, 1988; Tresguerres, 2003).

En el transporte del colesterol desde la cara externa de la membrana de la mitocondria hasta la interna, donde se realiza la transformación del colesterol a pregnenolona, intervienen los fosfolípidos de membrana y un péptido activador de la esteroidogénesis (Tresguerres, 2003).

El paso de colesterol a pregnenolona es limitante en esta ruta biosintética. La pregnenolona sale de la mitocondria y pasa al retículo endoplasmático liso. Dos rutas metabólicas conducen a la síntesis de testosterona en el testículo, una a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona conocida como ruta $\Delta 5$ y la otra a partir de la hidroxiprogesterona o $\Delta 4$ (Gal y col., 2007).

Los esteroides intermedios de la ruta $\Delta 5$ pueden utilizar la ruta $\Delta 4$. La importancia de estas dos rutas varía según la especie; en el testículo humano la más importante es la $\Delta 5$, mientras que en los roedores es la $\Delta 4$ (Tresguerres, 2003)

La testosterona por la ruta de la 5α -reductasa se transforma primero a dihidrotestosterona (DHT) y a continuación en 3α -diol o 3β -diol. Por la aromatasas, la testosterona se transforma en estradiol y la androstenediona en estrona. Aunque los estrógenos son las hormonas producidas en menor cantidad en la esteroidogénesis testicular, también están presentes en el macho (Gal y col., 2007) (Fig. 10).

Sólo entre el 1 y el 2% de la testosterona circulante se encuentra de forma libre. La testosterona y la DHT circulan en su mayor parte unida a una globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG), que es producida por las células de Sertoli. El resto se une a la albúmina, sólo los andrógenos ligados débilmente a la albúmina son biológicamente activos por tanto la fracción ligada a la SHBG sirve como reservorio de andrógenos circulantes, ya que la testosterona no se almacena en las células de Leydig, debido a que se libera y se difunde a la sangre conforme se sintetiza (Gal y col., 2007).

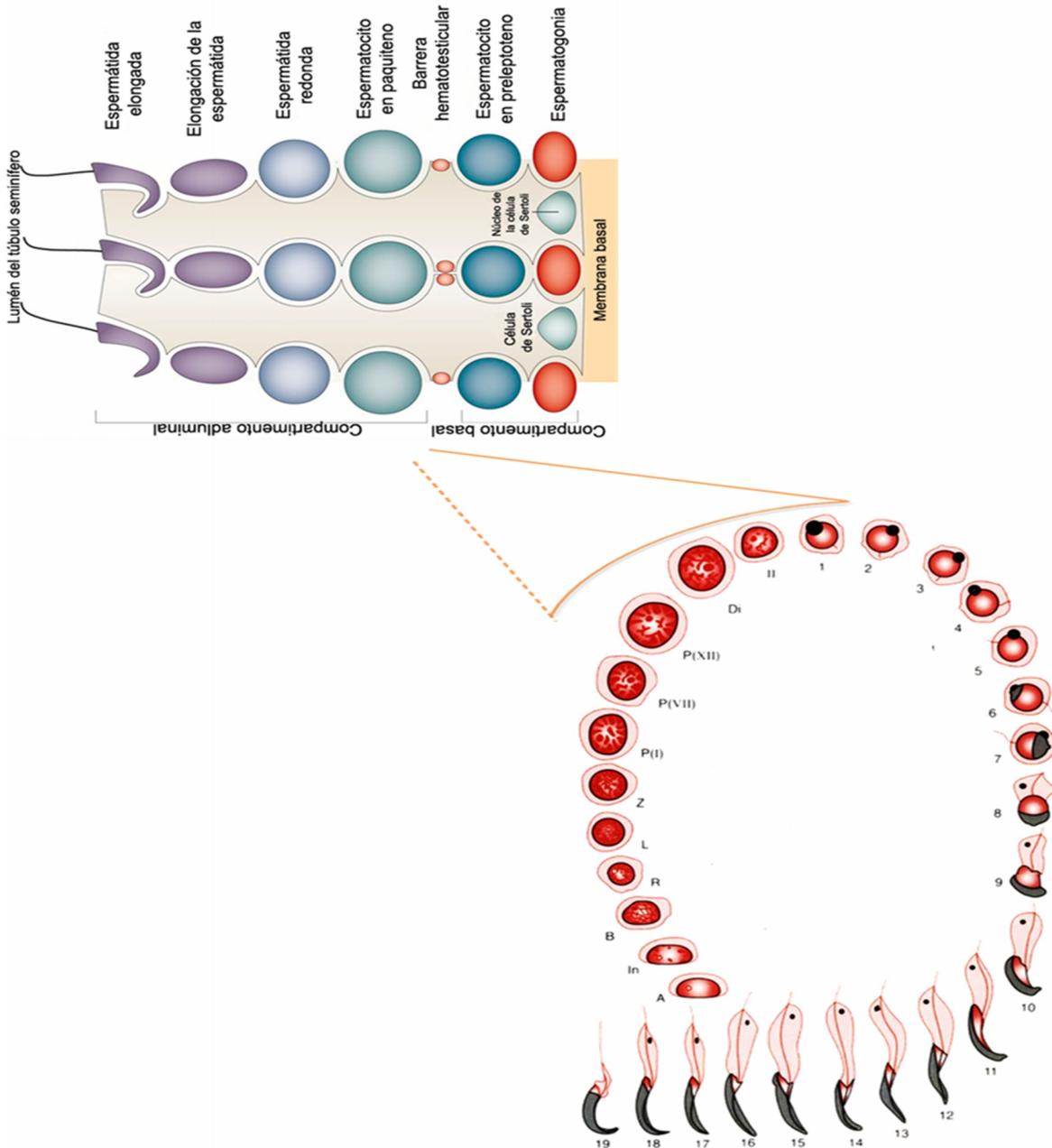


Figura 9. Ciclo espermatogénico de la rata. En sentido del reloj. A, espermatogonia tipo A; In, espermatogonia intermedia; B, Espermatogonia B; R, espermatocito primario; L, espermatocito en leptoteno; Z, espermatocito en zigoteno; P(I), P(VII), P(XII), espermatocitos en paquíteno, temprano, medio y tardío; Di, diploteno; II, espermatocito secundario; 1-19 etapas de la espermiogénesis. (Modificado de Maeda y col., 2000; Cheng y Mruk, 2010).

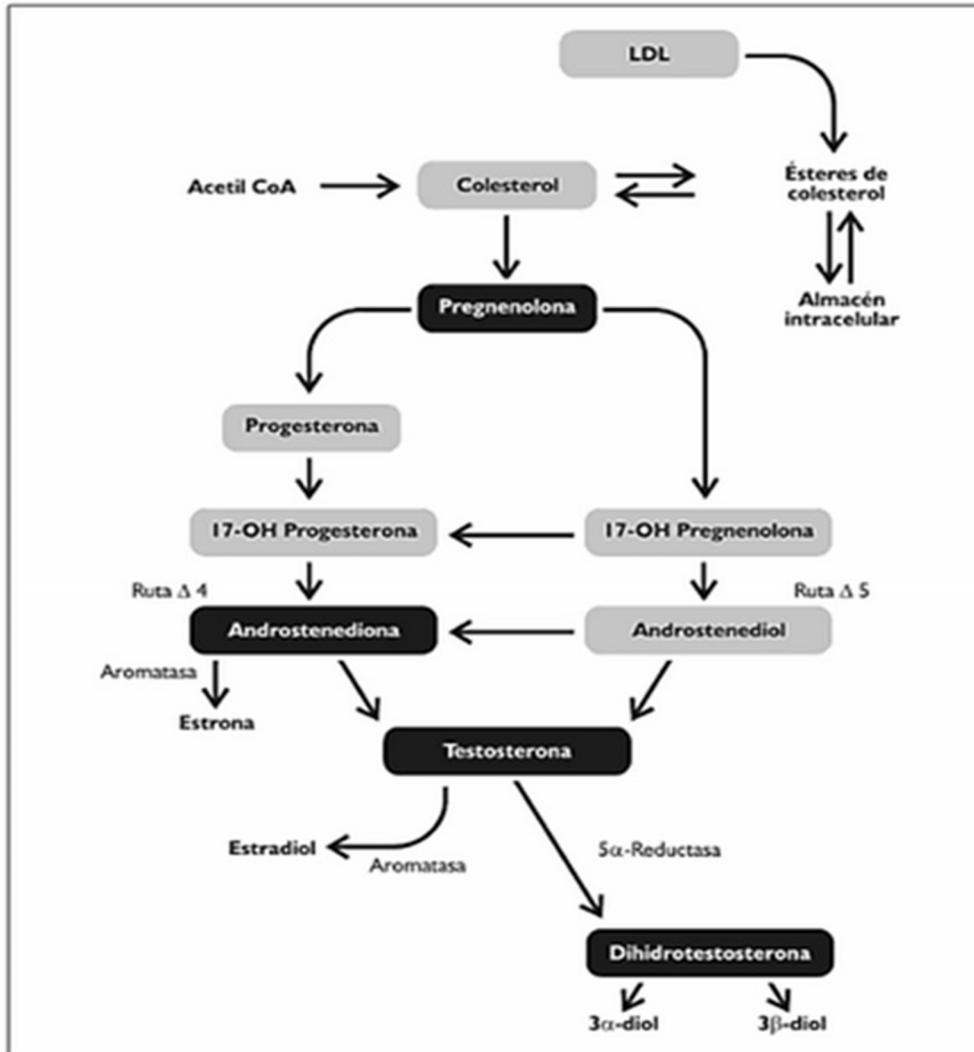


Figura 10. Esteroidogénesis testicular. Enzimas: P450scc, P45017α-Hidroxilasa, P450c1720α-liasa, 17β-Hidroxiesteroide dehidrogenasa, Aromatasa, 5α-reductasa, 3α-HSD (3α-Hidroxiesteroide dehidrogenasa), 3β-HSD (3β-Hidroxiesteroide dehidrogenasa) (Tomado de Gal y col., 2007).

Regulación Hormonal de las Funciones del Testículo

La GnRH y las gonadotropinas son factores esenciales en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del testículo (Malgor y Valsecia, 2003). La FSH estimula la división, diferenciación y maduración de las espermatogonias y la transformación de las espermátides a espermatozoides. El efecto que ejerce la FSH es el resultado de su acción en la célula de Sertoli, quien proporciona el

soporte, protege y nutre a las espermatogonias (Gartner y Hiatt, 2008). Bajo el control de la LH, las células de Leydig secretan la testosterona, hormona que también es esencial para que se lleve a cabo la espermatogénesis (Fig. 11) (McLachlan y col., 1996; Prieto y Velázquez, 2002).

Russell y colaboradores (1998), realizaron la hipofisectomía a ratas macho de 25 días de edad y administraron flutamida, antagonista de los andrógenos, observaron que tanto en las ratas con hipofisectomía o hipofisectomía más flutamida, disminuye la concentración de testosterona en suero, el peso del testículo y el diámetro de los túbulos seminíferos. Cuando se les administraba FSH, se observa la recuperación de los parámetros antes mencionados y en los túbulos seminíferos se observó la distribución normal de los diferentes tipos celulares en los túbulos seminíferos. Con base en esto, los autores sugieren que la FSH y la testosterona son esenciales en el mantenimiento de la viabilidad de las células germinales, en la espermatogénesis y en la esteroidogénesis en el animal prepúber.

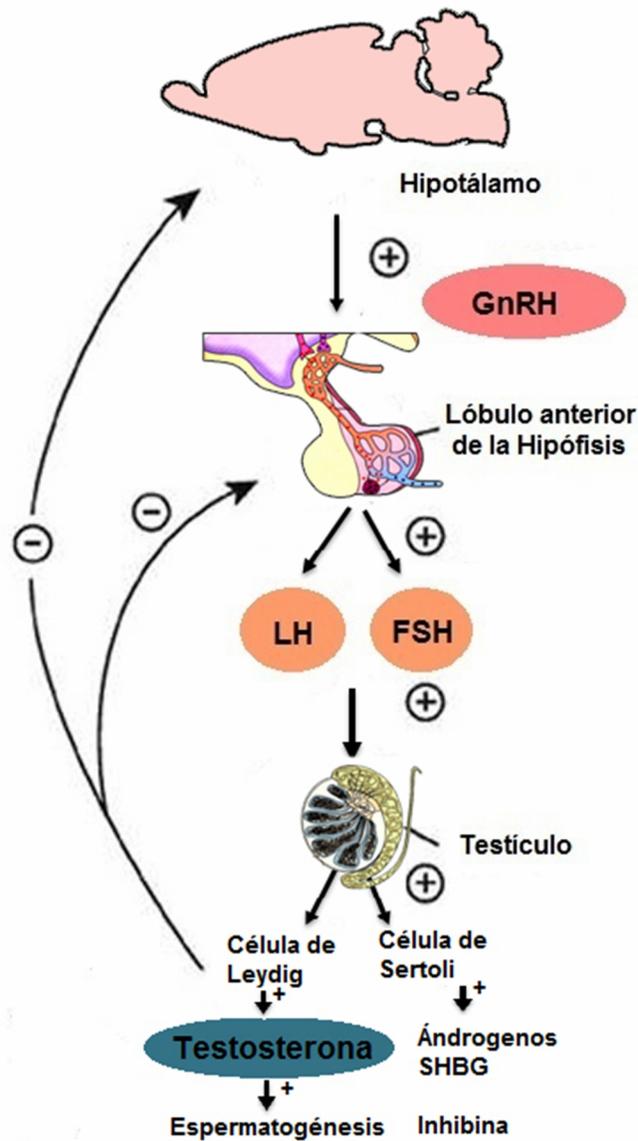


Figura 11. Representación esquemática del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada. (+): feedback positivo; (-) feedback negativo.

Serotonina y Regulación de la Función Gonadal

La 5-HT se encuentra en los tres componentes del eje reproductivo Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (Urry y Dougherty, 1975; Naumenko y Shishkina, 1978; Das y col., 1985; Kordon y col., 1994). Se ha demostrado que en el caso de la rata hembra la 5-HT modula la secreción de LH, mientras que en el caso de la rata

macho regula la secreción de FSH. Por lo que se propone que la función de la 5-HT en la secreción de las gonadotropinas varía con el sexo del animal (Arias y col., 1990, Pinilla y col., 2003).

En relación a esto, Justo y col. (1989) administraron el 5-HTP, precursor de la síntesis de 5-HT, en ratas macho de 16, 26, 30 ó 60 días de edad y observaron que se incrementó la concentración de FSH en suero. Un efecto similar se observa cuando se administra 5-HT a la rata macho de 30 días (Moguilevsky y col., 1987). Sin embargo, cuando a la rata macho de 26 días de edad se le administra vía intraventricular 5,7 Dihidroxitriptamina (5,7-DHT) (neurotóxico del sistema serotoninérgico) disminuye la secreción de LH y no se modifica la de FSH. Las discrepancias entre estos resultados pueden deberse a que este fármaco no es selectivo para 5-HT, sino que puede afectar a otros sistemas de neurotransmisión. Conjuntamente estos resultados permiten proponer que la 5-HT participa en la modulación de la secreción de gonadotropinas y que sus efectos varían con la edad del animal.

Aragón y colaboradores (2005) mostraron que cuando se inhibe al sistema serotoninérgico mediante la administración de p-Cloroanfetamina (pCA) a ratas macho de 30 días se observa que a los 65 días de edad disminuye el número, la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides. Pero no se modifican las concentraciones de LH ni de FSH. Con base a esto los autores proponen que la 5-HT es esencial para que se lleve a cabo una de las funciones del testículo, la espermatogénesis, y que este efecto es el resultado de la acción de la amina en el eje hipotálamo-hipófisis y en el propio testículo.

También se ha mostrado que la amina favorece la producción del CRF por las células de Leydig y ésta actúa como un regulador autócrino negativo disminuyendo la síntesis de testosterona en estas células (Tinajero y col., 1992).

Proteína transportadora de serotonina (SERT)

El transportador de 5-HT (SERT) es una proteína clave del sistema serotoninérgico que regula la disponibilidad del neuromodulador en la sinapsis. Esta proteína transportadora en el SNC y en tejidos periféricos es responsable del transporte activo de la 5-HT en las neuronas, las células enterocromafines, plaquetas y otros tipos celulares (Murphy y col., 2004).

En las neuronas, la SERT se localiza en las membranas de las terminales axónicas y se encuentra en menor proporción en el soma y en dendritas (Carneiro y Blakely, 2006). Por lo tanto, esta proteína tiene un papel crítico en la regulación de la duración y la distribución espacial de las señales que llegan a los receptores de 5-HT (Murphy y col., 2004).

La SERT consta de 12 dominios transmembranales con 20-24 residuos hidrofóbicos, pertenece al grupo de transportadores neuronales de membrana dependiente de la relación Na^+/Cl^- y de la concentración de K^+ en el medio intracelular para poder transportar 5-HT al interior celular (Salín, 2008) (Fig. 12). Es decir se piensa que SERT puede operar principalmente por un mecanismo de acceso alternado, en la que un único sitio de unión, accesible desde el exterior de la célula, se une a Na^+ , Cl^- , y 5-HT simultáneamente. Cuando el sitio de unión se completa, se desencadena un cambio conformacional que cierra el sitio de acceso al medio externo y abre el acceso a la superficie citoplásmica de la membrana. Después de la disociación de 5-HT, Na^+ y Cl^- , K^+ se une al mismo sitio de unión para facilitar el cambio conformacional de nuevo a la forma con un sitio de unión extracelular accesible (Murphy y col., 2004).

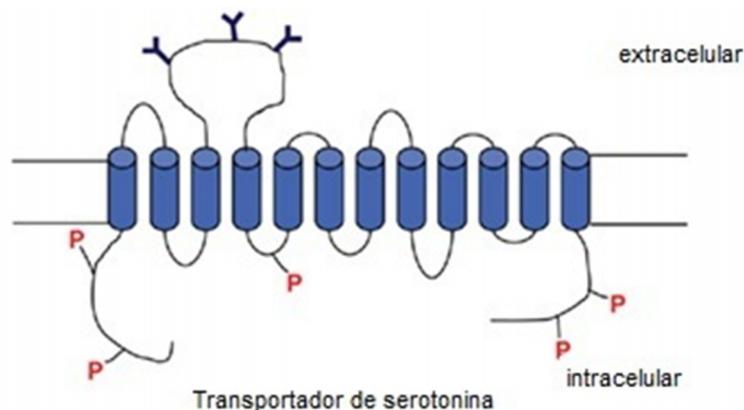


Figura 12. Modelo esquemático del transportador de la serotonina (SERT) (Modificado de Longone y col., 2011).

En este proceso, un único sitio de unión multifuncional es responsable del movimiento de Na^+ , Cl^- , 5HT, y el transporte de todos estos sustratos SERT depende del mantenimiento de gradientes iónicos a través de la membrana celular por $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasas}$ (Murphy y col., 2004).

Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS)

Actualmente los antidepresivos, inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), constituyen el tratamiento farmacológico de primera elección, ya que han desplazado a los antidepresivos tricíclicos como tratamiento del trastorno depresivo mayor (Nemeroff y Schatzberg, 2007). La alta liposolubilidad de los ISRS determina que se distribuyan rápida y ampliamente en el organismo, difundiéndose a través de la barrera hematoencefálica (Otero y col., 1996). Los ISRS, son utilizados como un tratamiento para pacientes con diagnósticos psiquiátricos, incluyendo trastornos del estado de ánimo, ansiedad, obsesivo-compulsivo, estrés postraumático, disfórico premenstrual y desórdenes alimenticios como la bulimia nervosa, entre otros trastornos (Therrien y Markowitz, 1997; Chávez-León y col., 2008).

En 1987 se introdujo en la terapéutica antidepresiva la fluvoxamina, primer representante comercializado en España de una nueva clase de antidepresivos

denominados ISRS, seguido por la FLX en 1988 y en Estados Unidos fue el primer ISRS autorizado por la FDA (Food and Drug Administration: Administración de Alimentos y Medicamentos).

En la actualidad se encuentran disponibles en México seis antidepresivos ISRS: fluoxetina, paroxetina, sertralina, fluvoxamina, citalopram y escitalopram (Chávez-León y col., 2008). Sin embargo, presentan un perfil de efectos adversos secundarios (Otero y col., 1996).

Fluoxetina y SERT

En 1998, la FLX fue introducida en la práctica médica para el tratamiento del trastorno depresivo (Otero y col., 1996). Desde su introducción médica, se ha convertido en la molécula antidepresiva más recetada del mundo. En los años subsiguientes, ésta fue aprobada para su empleo en el tratamiento de pacientes con Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC), bulimia nerviosa y el trastorno depresivo mayor en niños y adolescentes. Recientemente se administra a niños con trastornos por déficit de atención e hiperactividad (TDA-H) (Rossi y col., 2004; Londoño y Arango-Dávila, 2011; Aggarwal y col., 2012).

La FLX es un compuesto bicíclico (Mårtensson y col., 1989), su fórmula molecular es $C_{17}H_{18}F_3NO$ y tiene un peso molecular de 345.8g. Su vida media en el plasma es de 2 a 4 días, y su metabolito, la norfluoxetina (NorFLX) (Fig. 13), tiene una vida media de 7 a 15 días (Stahl, 1998; Heerlein, 2000).

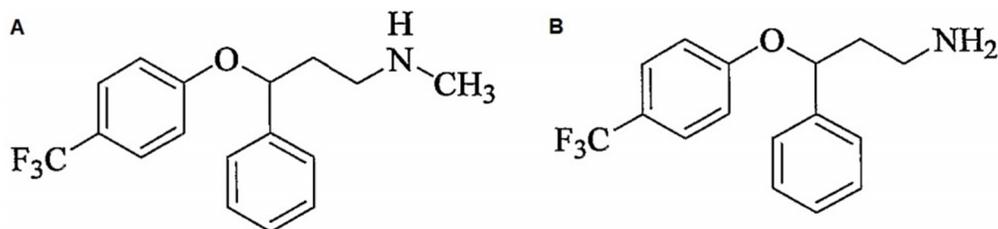


Figura 13. A. Estructura química de FLX (prozac). B. Estructura química de NorFLX (Tomado de Clare y Phil, 1999).

Este agente antidepresivo tiene un efecto serotoninérgico, ya sea actuando a nivel presináptico o bien actuando como agonistas de los receptores postsinápticos. La FLX inhibe a la bomba de recaptación presináptica de 5-HT, esta inhibición selectiva de la recaptación de 5-HT aumenta inicialmente la disponibilidad de 5-HT en el espacio sináptico, lo que posteriormente produce una regulación hacia la baja de los mismos receptores, incrementando finalmente la transmisión neta serotoninérgica (Stahl, 1998; Jufe, 2001).

Diversos estudios han mostrado la existencia de al menos dos sitios de unión en la proteína SERT: un sitio primario de alta afinidad, que permite el transporte de 5-HT, y un sitio alostérico de baja afinidad, que modula la unión de ligandos en el sitio de alta afinidad y, que en consecuencia, controla el transporte de 5-HT (Wennogle y Meyerson, 1985; Plenge y col., 1991). La 5-HT puede unirse a ambos sitios (Neubauer y col. 2006), actuando como un modulador alostérico para la unión de numerosos ligandos de alta afinidad de SERT (Chen y col., 2005). Dentro de los ISRS, se ha descrito que la FLX no interacciona con el sitio alostérico.

Fluoxetina y funciones del testículo

A la FLX se le atribuyen efectos benéficos en el tratamiento de la depresión, sin embargo no se han considerado los efectos secundarios en el aspecto reproductivo. Este ISRS induce disfunción sexual y disminución de la libido en ambos sexos (Balon, 1995).

Silva y colaboradores (2008) probaron en ratas macho recién nacidas tratamientos con FLX con dosis de 10 y 20 mg / kg vía i.p. desde el día 1 hasta el día 21 de vida. Bajo estas condiciones observaron aumento del diámetro de los cordones sexuales / túbulos seminíferos, reducción del número de espermatogonias y células de Sertoli, sin cambios significativos en la población de células de Leydig. Estos resultados llevaron a los autores a proponer que el sistema serotoninérgico es esencial en el desarrollo del testículo durante la etapa neonatal e infantil.

Posteriormente, Aggarwal y col., (2012), mostraron que cuando a la rata macho en la etapa juvenil se le administran 5, 10 ó 20 mg/kg/día de FLX no se modifica el número de células de Sertoli, pero, sí disminuye la población de espermatogonias, lo que se acompaña de la alteración del epitelio seminífero, de un menor diámetro de los túbulos seminíferos y de la densidad de espermatozoides en el lumen de los túbulos, así como en el número de espermatozoides y de la movilidad de estos.

Conjuntamente todos estos resultados apoyan la idea de que la FLX modifica al sistema serotoninérgico y esto puede ser una de las causas de infertilidad masculina y desordenes sexuales. En relación a esto se ha planteado que el tratamiento con antidepresivos durante el período crítico de desarrollo de los testículos, induce alteraciones y determina el tamaño del testículo y la producción de espermatozoides en animales cuando alcanzan la madures sexual. Estos cambios son el resultado del daño que genera la FLX en las células de Sertoli (Wieseler y col., 2000), que son las que proporcionan el soporte mecánico y los elementos necesarios para que se lleve a cabo la espermatogénesis (Welsch y Sobotta, 2008).

Pubertad en el macho

Se define a la pubertad como una etapa entre la inmadurez y la madurez sexual. El inicio de la pubertad y su progresión es controlado por múltiples factores y mecanismos neuroendocrinos y hormonales. También denominada como una etapa de transición del desarrollo durante el cual se logra la competencia reproductiva (Zemunik y col., 2003).

El inicio de la pubertad en la rata macho se caracteriza por la terminación de la primera ola de la espermatogénesis, es decir, cuando es posible encontrar espermatozoides en los testículos. En la rata, el esperma testicular aparece a los 45-50 días de edad (Russell y col., 1987, Malkov y col., 1998) y a los 65 días de edad es posible observar espermatozoides en los conductos deferentes. El macho es capaz de liberar gametos y mostrar un comportamiento sexual. El inicio de la pubertad es regulado por la madurez del eje hipotálamo–hipófisis-testículo para ser posible la reproducción (Picut y col., 2014).

El signo externo que marca el inicio de la pubertad en la rata macho, es la separación balano-prepucial (45 días) (Aguilar y col., 1997; Zemunik y col., 2003). Su desarrollo sexual se divide en función de parámetros morfológicos y fisiológicos, en cuatro etapas: 1. Neonatal (primera semana de nacido), 2. Infantil (día 8 al día 21), 3. Juvenil (del día 21 al día 35) y 4. Peripuberal (del día 35 al día 50) culminando con la madurez que se caracteriza por la presencia de espermatozoides maduros en los conductos deferentes (Ojeda y Urbanski, 1994).

Etapa Juvenil

Comprende del día 21 al día 35. Al inicio de esta etapa el principal andrógeno secretado por el testículo es el androstenediol. En el día 30 se incrementan las concentraciones de testosterona y de dihidrotestosterona, mientras el androstenediol disminuye.

En comparación con las etapas previas, la concentración de PRL se incrementa alrededor del día 25, el aumento en la concentración de esta hormona se correlaciona con el aumento en el crecimiento y desarrollo del testículo, vesícula seminal y próstata. Durante esta etapa la concentración de FSH es mayor que en las otras etapas del desarrollo prepuberal. Al parecer el incremento en la secreción de esta gonadotropina es necesario para el inicio de la espermatogénesis y la formación de los receptores a LH en las células de Leydig, este evento se refleja en el aumento en la producción de testosterona. En el día 30 también se incrementa la expresión de los receptores a la GnRH en la hipófisis (Adams y Steiner, 1988; Ojeda y Urbanski, 1994; Zhang y col., 2010).

Además del aumento de la secreción de andrógenos, del desarrollo testicular y de los órganos sexuales secundarios, durante el desarrollo puberal en la rata macho se producen los siguientes fenómenos:

- a. sustitución de la población fetal de células de Leydig por la población adulta
- b. proliferación de las células de Sertoli
- c. modificación del andrógeno secretado (a partir del día 30 el testículo secreta inicialmente compuestos $5-\alpha$ reducidos y testosterona.
- d. aumento de la sensibilidad testicular a LH debido al aumento de los receptores a esta hormona [Cuadro 2, Fig. 14] (Aguilar y col., 1997).

Cuadro 2. Cambios que se presentan en el eje Hipotálamo-Hipofisis-Testículo (H-H-T) durante el desarrollo prepupal en la rata macho.

Etapa	Edad	Eje Hipotálamo-Hipófisis	Testículo
Neonatal	1-7 día posnatal	La concentración de LH en suero es la mitad comparado con la del adulto. La concentración de FSH es baja Testosterona (T) transformada a Estradiol (E2) a nivel hipotalámico donde se regula la secreción de GnRH.	La T ejerce efecto sobre las glándulas accesorias, para manutención de la estructura de las mismas.
Infantil	8-20 días de vida.	La LH decae.	En el día 21 se observan espermatoцитos primarios en los túbulos seminíferos.
Juvenil	21-35 días de vida.	Principal andrógeno secretado por el testículo es el androstenediol. Existe aumento en la concentración de FSH FSH y PRL Aumenta la producción de testosterona y DHT Día 25: incrementa prolactina (PRL) Día 30: incrementan las concentraciones de testosterona y de dihidrotestosterona, mientras que la concentración del androstenediol disminuye. También se expresan los receptores a GnRH en la hipófisis.	Inicia espermatogénesis y la formación de los receptores a LH en las células de Leydig. Se estimula la proliferación de las células de Sertoli. Día 25°: aumenta el crecimiento y desarrollo testicular, de las vesículas seminales y de la próstata.
Peripuberal	36-55 días de vida.	Disminución en la concentración de FSH Día 40: aumenta secreción de Testosterona Día 50: segundo incremento en la concentración de PRL	Día 40: El testículo secreta principalmente Testosterona Día 45: primeros espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos. Día 58-60: espermatozoides en los conductos deferentes.

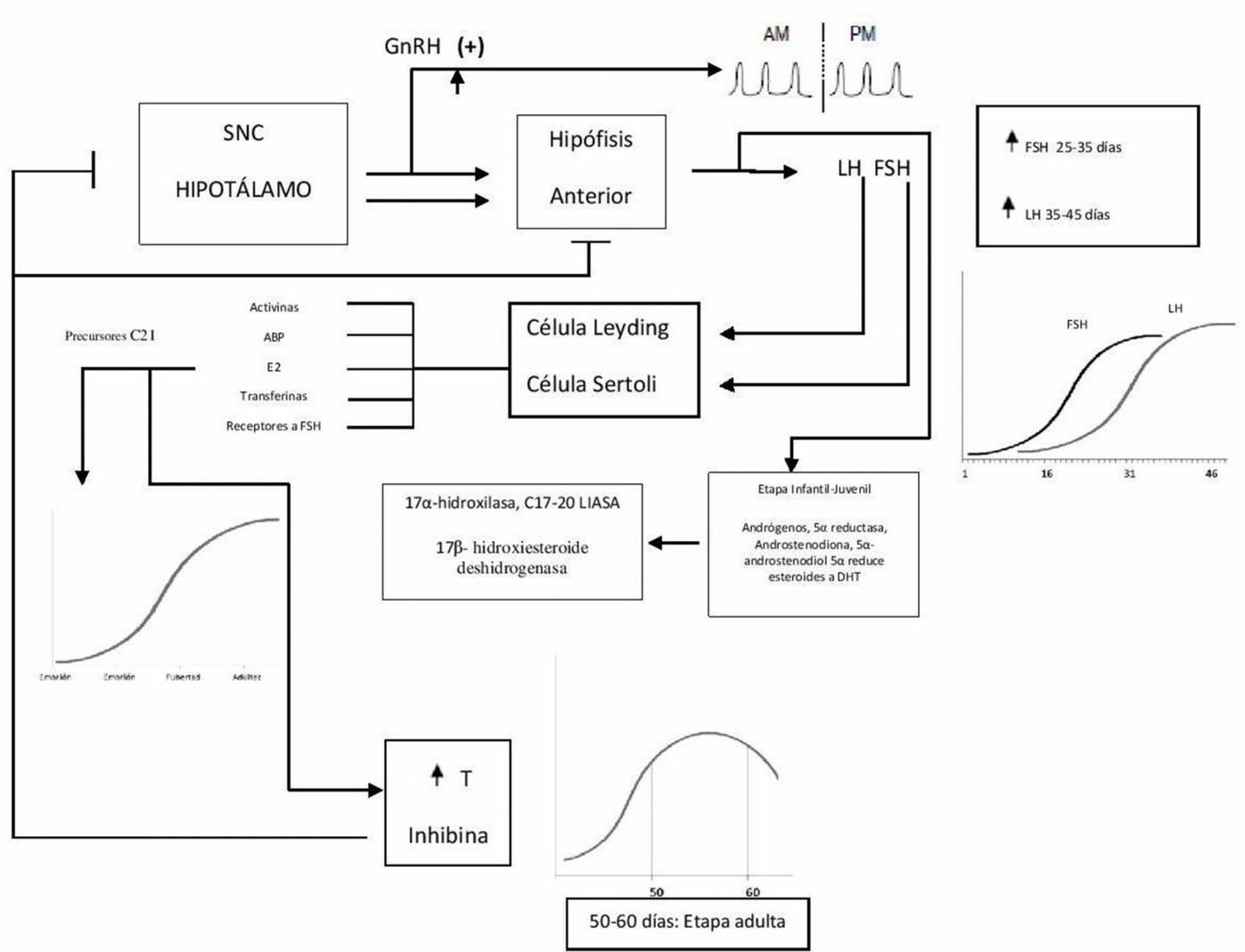


Figura 14. Factores hormonales que controlan el desarrollo sexual de la rata macho durante el período juvenil. La secreción de la hormona luteinizante (LH) y (FSH) es variable durante el día. Se muestran los mecanismos de control involucrados en la regulación de la función testicular. Facilitador: + ; Inhibidor: -

JUSTIFICACIÓN

A la 5-HT se le ha identificado en los tres componentes del eje reproductivo, hipotálamo-hipófisis-testículo y se le asocia con la modulación de la secreción de la GnRH, gonadotropinas y en las funciones del testículo, espermatogénesis y esteroidogénesis.

En la actualidad existen una serie de sustancias que modifican la actividad del sistema serotoninérgico, entre los que se encuentran los ISRS, como la FLX.

Sin embargo, no se han considerado los efectos que genera al incrementar la actividad del sistema serotoninérgico en los tres componentes del eje reproductivo, sobre las funciones del testículo.

Por ello, en el presente estudio se evaluaron en la rata macho prepúber de 30 días de edad los efectos de la inhibición de la recaptura de serotonina en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, inducido por la administración de FLX, sobre la concentración de serotonina y de su metabolito el 5-HIAA en el hipotálamo, la hipófisis y el testículo, en la concentración de FSH, LH, progesterona, testosterona, en la estructura del testículo y en la espermatogénesis evaluada por número, movilidad y viabilidad de los espermatozoides.

HIPÓTESIS

En el animal prepúber, el sistema serotoninérgico modula de manera inhibitoria los mecanismos que regulan las funciones del testículo, por lo que la estimulación del sistema serotoninérgico mediante la administración de FLX, disminuirá la espermatogénesis, la concentración de hormonas esteroides sexuales y gonadotropinas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los efectos de la inhibición de la recaptura de serotonina, inducida por la administración de fluoxetina, en las funciones de la gónada, esteroidogénesis y espermatogénesis en la rata macho prepúber.

Objetivos particulares

Analizar en la rata prepúber los efectos de la administración de fluoxetina en la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético en el hipotálamo, la hipófisis y los testículos.

Analizar en la rata prepúber los efectos de la inhibición de la recaptura de serotonina inducido por la administración de fluoxetina en la concentración de FSH y LH en suero.

Evaluar en la rata prepúber los efectos de la inhibición de la recaptura de serotonina inducido por la administración de fluoxetina en el número, movilidad y formas anormales de espermatozoides.

Analizar en la rata prepúber los efectos de la inhibición de la recaptura de serotonina inducido por la administración de fluoxetina en la secreción de progesterona y testosterona en el suero.

Evaluar en la rata prepúber los efectos de la inhibición de la recaptura de serotonina inducido por la administración de fluoxetina en el diámetro y la estructura del testículo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron rata macho de la cepa CII-ZV de 30 días de edad, los cuales se mantuvieron a temperatura (20-21° Celsius) e iluminación controlada (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad), con libre acceso a la madre hasta el destete (21 días de edad) y al agua y alimento *ad libitum*.

Administración de fármaco

Los animales fueron seleccionados al azar y se dividieron en tres grupos experimentales: 1. Grupo testigo absoluto (TA) 2. Grupo Vehículo (VH), se les inyectó por vía i.p. solución salina al 0.9 %, 3. Grupo con administración de 5 mgKg⁻¹ de p.c. de clorhidrato de fluoxetina (FLX) (Sigma. Chemical, St Louis, USA). La administración de VH y de FLX se realizó diariamente durante 20 días. Se seleccionó la dosis de 5mgkg⁻¹, debido a que en modelos de animales se ha reportado que la administración de ésta dosis no causa efectos de anorexia en los animales, por lo cual los animales se alimentan de la misma manera y no repercute sobre su desarrollo (Brandes y col., 1992Wong y col., 1988; Mancilla y col., 2006; Lauzurica y col., 2013; Scopinho y col., 2013).

Previo a la administración del VH o FLX, se realizó el registro diario del peso corporal de los animales, durante el tiempo del tratamiento, posteriormente el peso de los animales se registró cada tercer día hasta el día de su sacrificio, con la finalidad de minimizar el estrés que la manipulación pudiera generar en ellos.

Procedimiento de Autopsia

Grupos de animales de los diferentes tratamientos se sacrificaron por decapitación al día 65 de edad en un horario de 9:30 a 10:30 h. Se colectó la sangre del tronco, se dejó reposar durante 20 minutos, se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos. El

suero se separó y almacenó a -20°C , para la posterior cuantificación de hormonas esteroideas (progesterona y testosterona) y de gonadotropinas (FSH y LH) por radioinmunoanálisis. Al momento del sacrificio se extrajeron los testículos, se pesaron y se colectó un fragmento de tejido testicular, en la zona cercana a la rete testis, la que se almacenó a -70°C , para la posterior cuantificación de 5-HT y de 5-HIAA por cromatografía de líquidos. El tejido testicular restante se fijó por inmersión en solución de Bouin.

En el momento del sacrificio se disecaron los conductos deferentes, se colectó el paquete espermático de cada conducto y se colocó en tubos Eppendorf con 800 μL de solución Tyrode's y se incubaron en baño María durante 15 minutos a una temperatura de 37°C . En el día del sacrificio se extrajo el cerebro, se colocó en solución salina fría (0°C) con la finalidad de eliminar el exceso de sangre. Se realizó la disección de hipotálamo anterior y medio, siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta la cuantificación de 5-HT, noradrenalina (NA), dopamina (DA) y sus respectivos metabolitos, 5-HIAA el 3-Methoxy-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) por la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).

Cuantificación de neurotransmisores

El sistema de cromatografía consistió de una bomba isocrática (Modelo L-250, Perkin Elmer), una válvula de inyección (Reodine modelo 7125) con una capacidad de 20 μl , una precolumna de silica (3.5 cm x 4.6 mm) y una columna C-18 de fase reversa (25cmx4.6mm) acoplada a un detector electroquímico amperométrico LC-4C (Bioanalytical System Inc. USA) acoplado a un inyector Nelson 1020 (Perkin Elmer).

El hipotálamo, la hipófisis y el tejido testicular se pesaron y homogenizaron en ácido perclórico (HClO_4) al 0.1 N. Hipotálamo en 300 μL , hipófisis en 150 μL y

testículo en 300 μ L. Las muestras se centrifugaron a 12, 000 rpm, a -4 °C durante 30 minutos, el sobrenadante se filtró usando filtros de celulosa regenerada de tamaño de poro de 0.2 μ m, y se inyectaron 20 μ L del filtrado al sistema de cromatografía previamente calibrado.

Los neurotransmisores y sus metabolitos se identificaron y cuantificaron por un integrador Nelson 1020 (perkin Elmer, México). El equipo identificó al neurotransmisor por su tiempo de retención y se realizó el cálculo de su concentración, al comparar el área bajo la curva de los picos de la muestra problema, con el área bajo la curva de los estándares. La concentración del neurotransmisor se expresó en ng/mg de tejido y la actividad serotoninérgica se calculó siguiendo la relación de Kerdelhue y col., (1989).

Actividad de la neurona serotoninérgica = $[5 - HIAA]/[5 - HT]$

Cuantificación de hormonas esteroides y gonadotropinas en suero

La concentración de progesterona y testosterona en suero se cuantificó por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), con un kit comercial Coat-A-Count, USA (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, USA) para cada hormona. La concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/ml.

La cuantificación de LH y FSH se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo, empleando anticuerpos para NIAMDDRat-A-LH-RP-3 y NIAMDD-Rat-FSH-RP-2 proporcionados por la Nacional Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). La concentración de las gonadotropinas se expresó en ng/ml.

Evaluación de espermatogénesis

Movilidad espermática

Se tomaron 20 μ L de la solución espermática y se colocaron en un portaobjetos precalentado a 37°C, encima se colocó un cubre objetos evitando que se formaran

burbujas, con ayuda de un microscopio se observó la preparación a 400X y se contaron como móviles las células que presentaron movimiento rectilíneo y uniforme, así como las células que no presentaron movimiento. En promedio se contaron 100 células, los resultados se expresaron en porcentaje.

Viabilidad espermática

Uno de los aspectos importantes en el funcionamiento de los espermatozoides, son los procesos metabólicos que se llevan a cabo en la mitocondria y que contribuyen a mantener la viabilidad de estas células. Por ello, una alícuota de 100 μ L de suspensión espermática se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente con 1 μ L del fluorocromo, resazurin más 1 μ L del fluorocromo verde SYTOX (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) y posteriormente con ayuda del citómetro de flujo se realizó la evaluación de actividad mitocondrial, un indicador de la viabilidad de los espermatozoides (Zrimsek y col., 2006). Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides móviles e inmóviles.

Morfología espermática

Se tomarán 10 μ L de la solución espermática y se colocaron en un cubre objetos, con ayuda de otro portaobjetos se realizó el barrido de la muestra de espermatozoides. La preparación se dejó secar, se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina y con ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 10X se contó el número de espermatozoides con morfología normal y anormal. Se consideraron las siguientes anomalías: espermias sin cabeza, cabeza de alfiler, cabeza plana, pieza media doblada, flagelo corto, gota citoplasmática, flagelo enroscado, doble flagelo y microcabeza en gancho.

Número espermático

Se realizó una dilución 15:75 de la solución espermática y Tyrode's respectivamente. Quince microlitros de esta dilución se colocaron en una cámara de Neubauer. Se realizó conteo del número de espermatozoides situados en 5 cuadrantes y posteriormente se realizó un promedio.

Estudio histológico

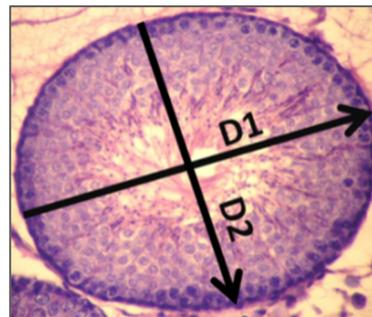
Inclusión y tinción del testículo

Los testículos de todos los animales de los diferentes grupos experimentales se fijaron por inmersión en solución de Bouin, posteriormente se realizaron lavados con alcohol al 70%. Los órganos se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones, 70%, 96 % y 100% y finalmente con cloroformo. Se incluyeron en parafina y se realizaron bloques de parafina. Con ayuda de un micrótopo se realizaron cortes histológicos seriados de 10 μm , se colocaron en portaobjetos previamente etiquetados y preparados con albúmina. Los cortes de testículo se tiñeron por la técnica de Hematoxilina-Eosina para posteriormente realizar el estudio morfométrico.

Estudio morfométrico del testículo

Se revisaron cada uno de los cortes y con ayuda de un ocular micrométrico adaptado a un microscopio óptico (Nikon optiphot-2) se realizó la medición de dos diámetros del túbulo seminífero, el mayor y perpendicular a este. Con estos dos valores se calculó el diámetro promedio (D_p) mediante la siguiente relación:

$$D_p = \frac{\text{diámetro 1} + \text{diámetro 2}}{2}$$



Análisis estadístico

Los datos obtenidos de: peso corporal, la masa testicular, el número espermático, la concentración de gonadotropinas, hormonas esteroides y la concentración de neurotransmisores y sus metabolitos se analizaron por medio de análisis de varianza (ANDEVA), seguida de prueba de Tukey. Para la comparación de dos grupos, los resultados se analizaron por la prueba “t” de Student. Los parámetros de viabilidad, movilidad espermática y anormalidades fueron expresados en porcentaje y evaluados por prueba de χ^2 . Se consideraron como diferencias significativas aquellas en las que la probabilidad fue menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

Peso corporal

En la figura 15 se presentan los resultados del peso corporal de los animales de los diferentes grupos experimentales, en la que se observa que en los animales que se les administró VH no se modificó el peso corporal durante el tiempo de tratamiento, en comparación con el grupo TA. Este mismo comportamiento se observa en los animales que se les inyectó FLX en relación al grupo que se les administró VH. En el día del sacrificio, el peso corporal de los animales de los diferentes grupos experimentales fue similar (Fig.16).

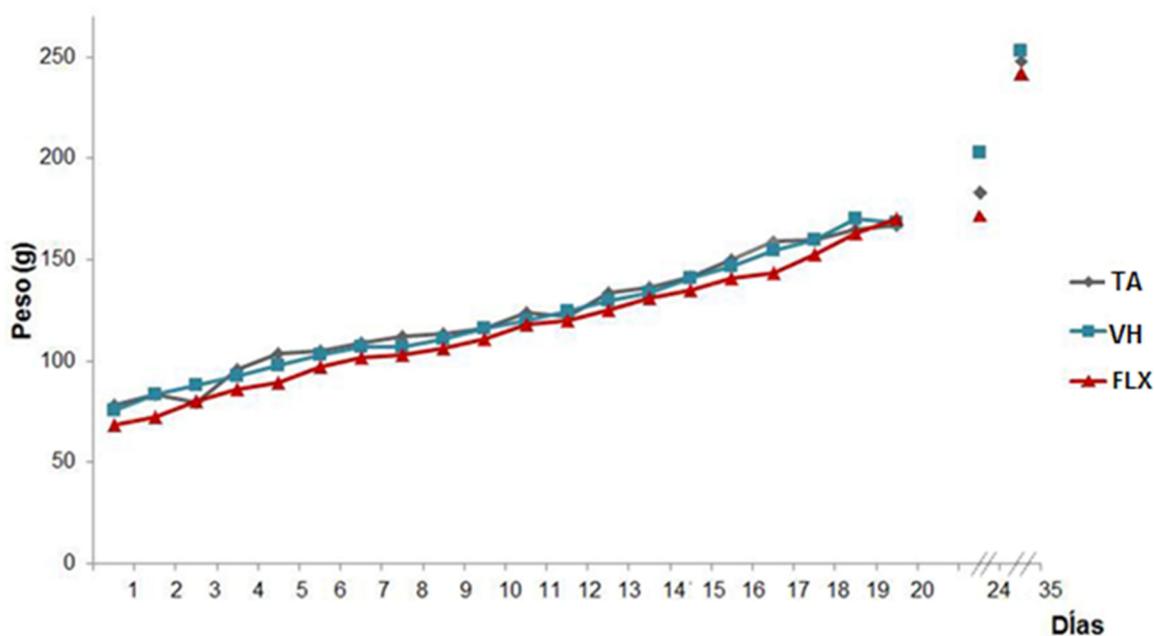


Figura 15. Peso corporal (g) de ratas macho TA, o inyectadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

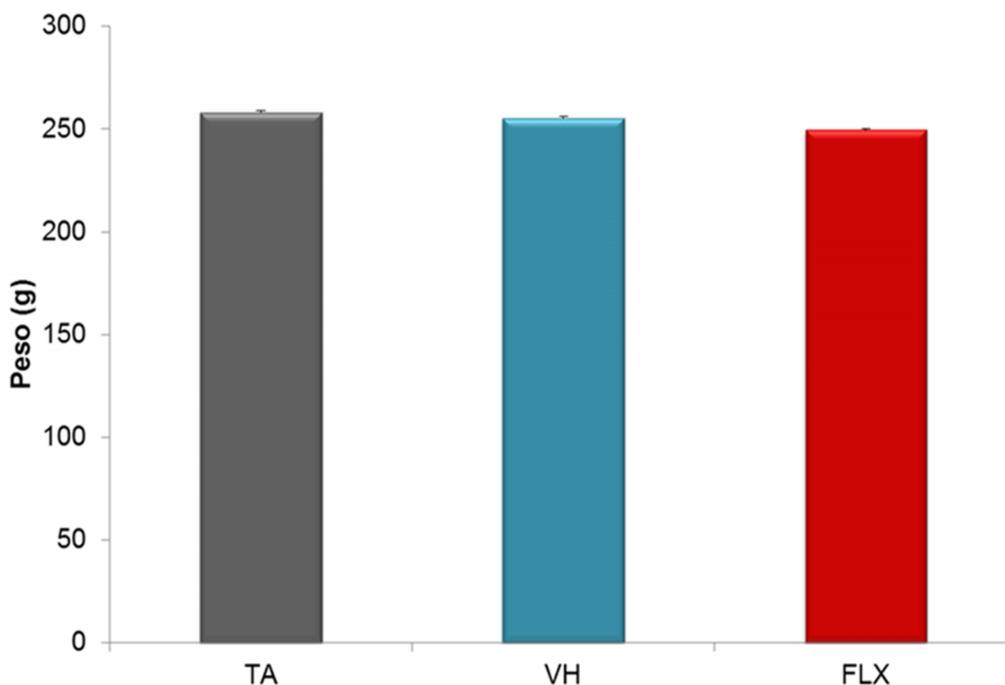


Figura 16. Peso corporal en el día de sacrificio (media \pm e.e.m.) de ratas macho TA, tratados con VH o con FLX y sacrificados a los 65 días de edad.

Concentración de serotonina y su metabolito en:

Hipotálamo

En comparación con el grupo de animales TA, en el hipotálamo anterior y medio de los animales que se les administró el VH no se modificó la concentración de 5-HT, de su metabolito, el 5-HIAA y de la relación 5-HIAA/5-HT (Fig. 17). En el hipotálamo anterior y medio de los animales que se les inyectó la FLX no se observaron cambios en estos parámetros.

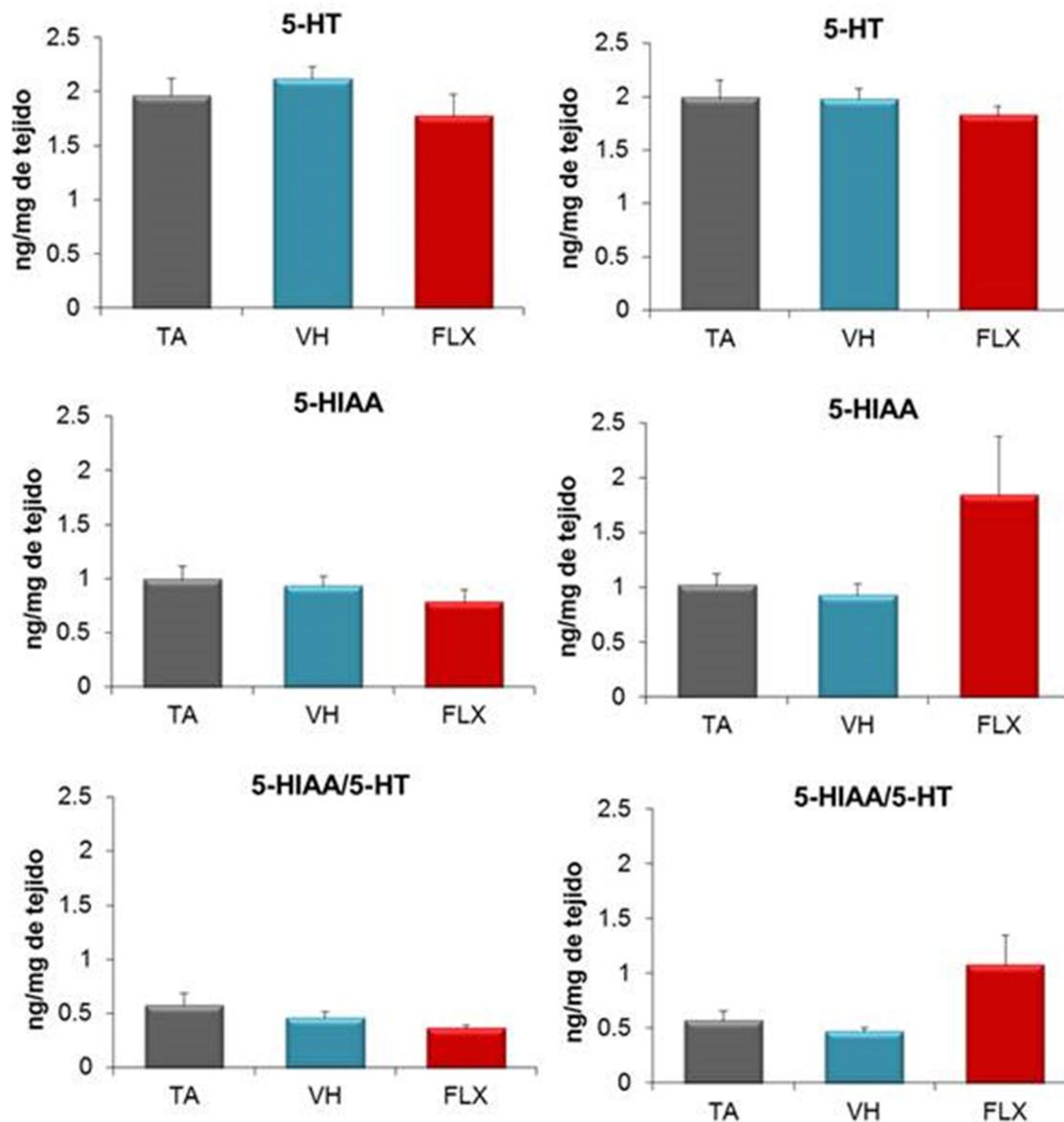


Figura 17. Concentración (media \pm e.e.m.) de 5-HT y del 5-HIAA y relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo anterior (izquierda) e hipotálamo medio (derecha) de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.

Hipófisis

La concentración de 5-HT y del 5-HIAA en la hipófisis de los animales que se les administró VH o FLX no se modificó (Fig. 18).

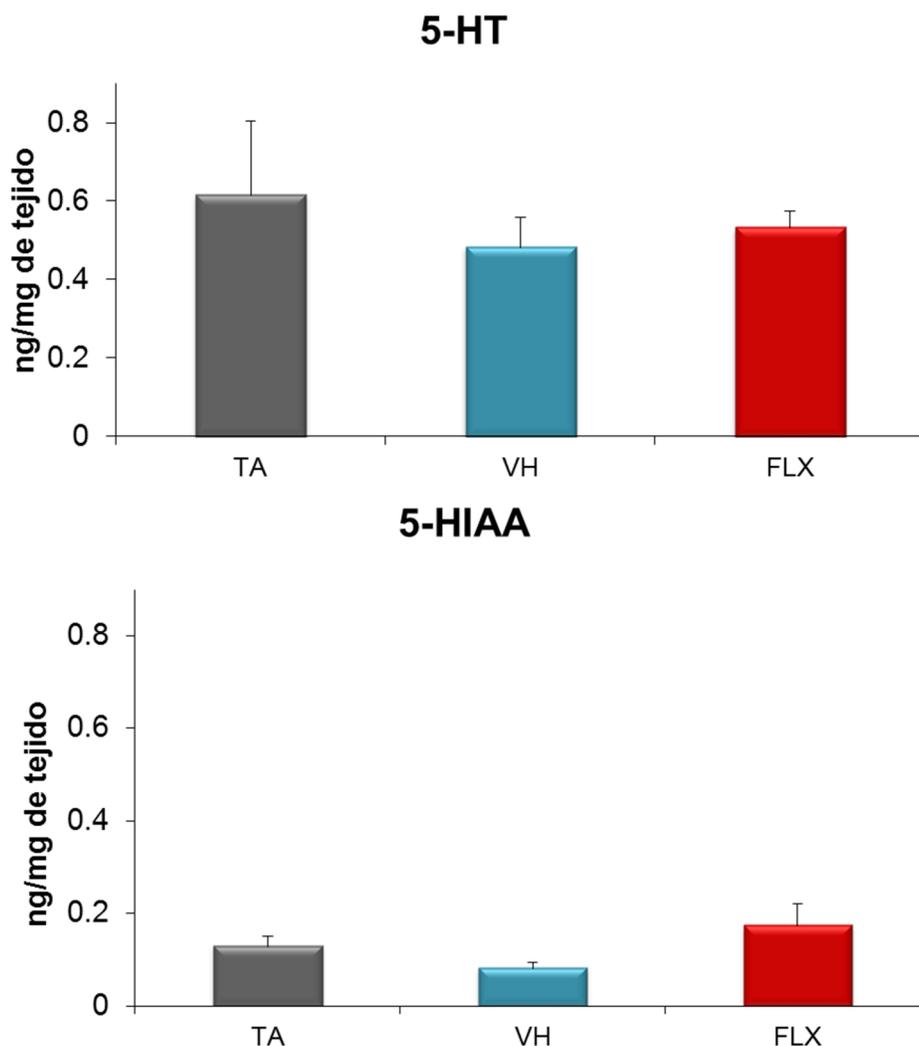


Figura 18. Concentración (media \pm e.e.m.) de 5-HT y del 5-HIAA en la hipófisis de ratas macho TA, tratados con VH o con FLX y sacrificados a los 65 días de edad.

Testículo

La concentración de 5-HT y del 5-HIAA, en el testículo izquierdo y derecho de los animales que se les administró VH fue similar al grupo TA. Este mismo comportamiento se observó en los animales que se trataron con FLX en comparación con el grupo con VH (Fig. 19).

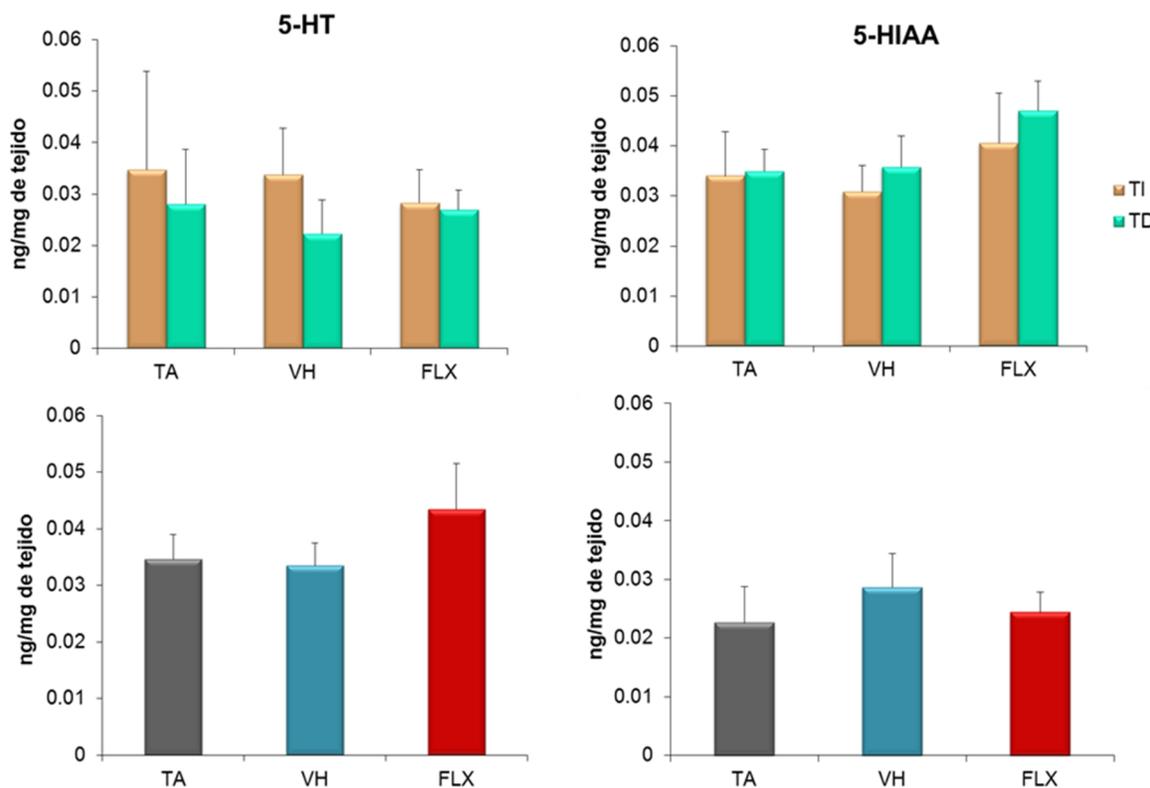


Figura 19. Concentración (media \pm e.e.m.) de 5-HT y de 5-HIAA en testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) y concentración de 5-HT y de 5-HIAA en ambos testículos de ratas macho TA, tratados con VH o con FLX y sacrificados a los 65 días de edad.

La concentración de NA, DA y sus respectivos metabolitos, MHPG y DOPAC en el hipotálamo y en la hipófisis de los animales tratados con VH no se modificó en comparación con el grupo TA, este mismo comportamiento se observó en los animales tratados con FLX (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Concentración (media \pm e.e.m.) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y sus respectivos metabolitos, el 3-Methoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en el hipotálamo anterior (HA) y medio (HM) de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

Tratamiento		TA	VH	FLX
Estructura				
HA	NA	1.67 \pm 0.34	1.55 \pm 0.32	1.90 \pm 0.2
	MHPG	0.62 \pm 0.08	0.64 \pm 0.09	1.48 \pm 0.38
	DA	0.38 \pm 0.03	0.37 \pm 0.07	0.44 \pm 0.11
	DOPAC	0.20 \pm 0.01	0.25 \pm 0.06	0.20 \pm 0.02
HM	NA	1.15 \pm 0.16	0.80 \pm 0.18	1.50 \pm 0.45
	MHPG	3.09 \pm 0.36	4.01 \pm 0.41	3.42 \pm 0.43
	DA	0.48 \pm 0.15	0.92 \pm 0.41	0.35 \pm 0.11
	DOPAC	0.38 \pm 0.06	0.35 \pm 0.03	0.32 \pm 0.05

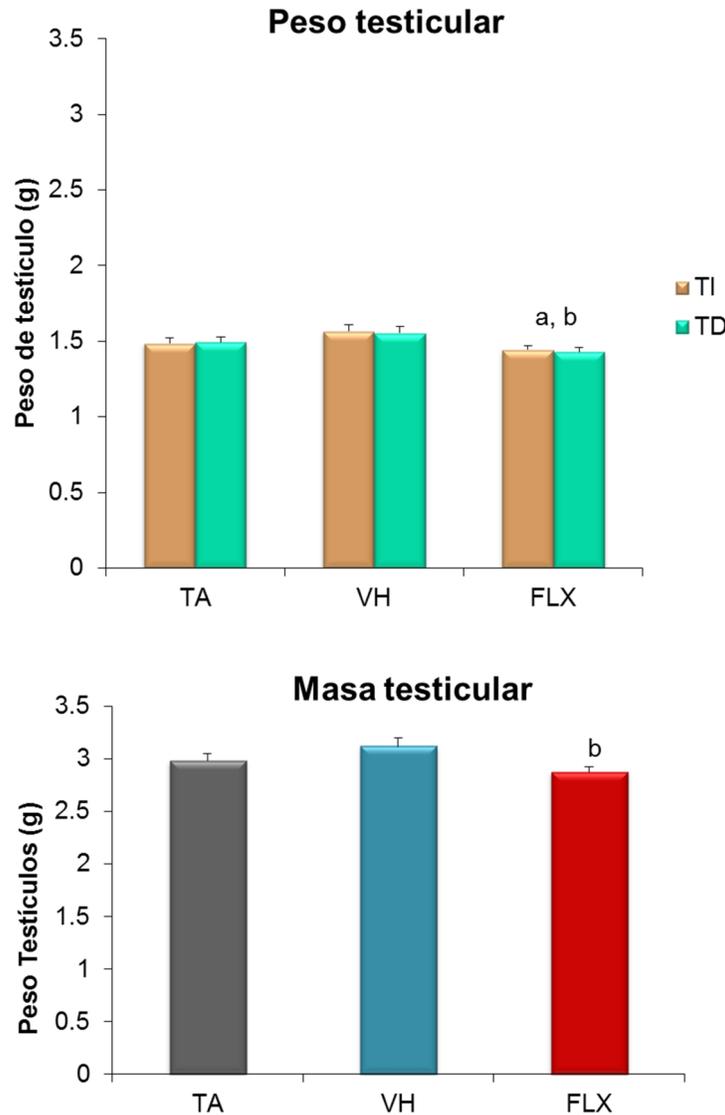
Cuadro 4. Concentración (media \pm e.e.m.) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y sus respectivos metabolitos, el 3-Methoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en la hipófisis de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

Tratamiento	TA	VH	FLX
NA	0.20 \pm 0.04	0.21 \pm 0.04	0.42 \pm 0.16
MHPG	0.3 \pm 0.10	0.50 \pm 0.10	0.44 \pm 0.22
DA	0.22 \pm 0.06	0.11 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
DOPAC	0.23 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02	0.27 \pm 0.06

Peso de testículos y masa testicular

En comparación con el grupo TA, en los animales que se les administró el VH, no se modificó el peso de los testículos. Cuando se administró FLX, el peso del testículo izquierdo y derecho disminuyó significativamente en comparación con el grupo que se inyectó con VH (Fig. 20). La masa testicular de los animales que se les inyectó VH no se modificó significativamente en comparación con el grupo de

animales TA. En los animales que se les administró FLX, el peso de los testículos disminuye significativamente en comparación con el grupo de animales con VH (Fig. 20).



a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)
b, $p < 0.05$ vs. VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 20. Peso (media \pm e.e.m.) de testículo izquierdo (TI) y testículo derecho (TD) y masa testicular de ratas macho TA, tratados con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

Concentración de gonadotropinas

En comparación con el grupo de animales TA, en los animales que se trataron con VH no se modificó la concentración de LH y FSH en el suero. En el grupo tratado con FLX disminuyó significativamente la concentración tanto de LH como de FSH en comparación con el grupo VH o TA (Fig. 21).

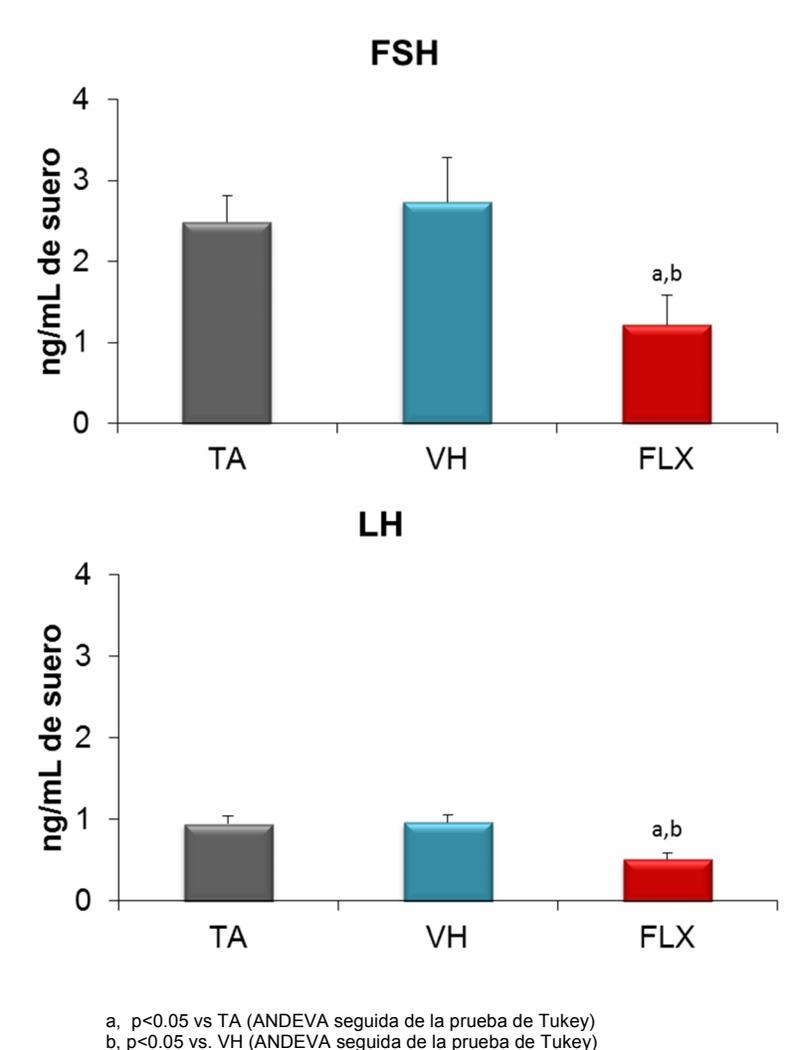
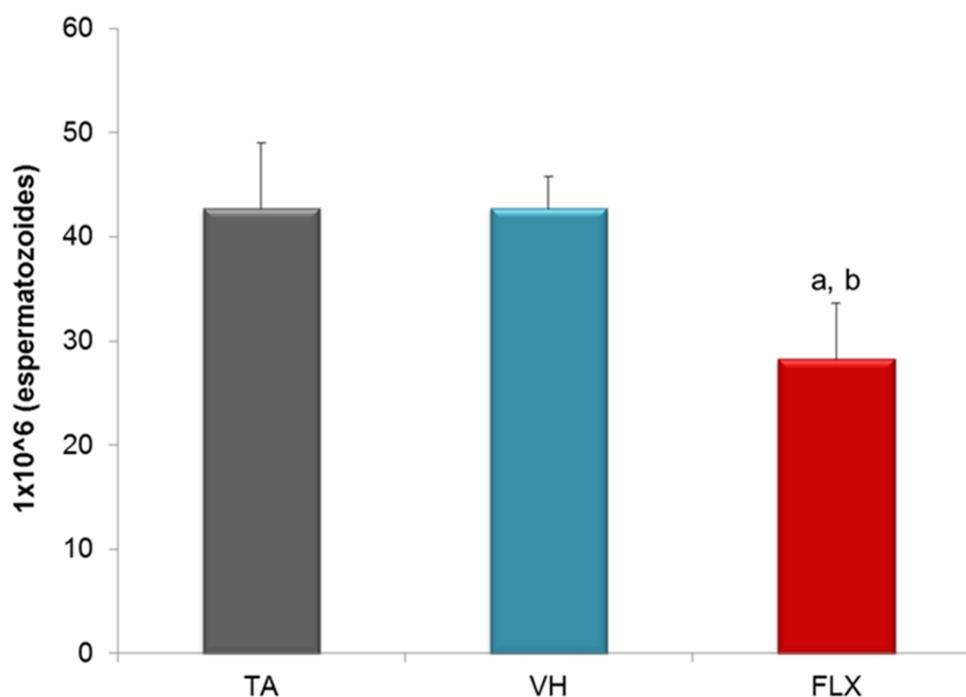


Figura 21. Concentración de FSH y LH (media \pm e.e.m.) en suero de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

Espermatogénesis

Número espermático

En los animales que se les administró el VH no se modificó el número de espermatozoides en comparación con los animales TA, mientras que en los que se les inyectó FLX disminuyó significativamente en comparación con el grupo TA o que recibieron VH (Fig. 22).



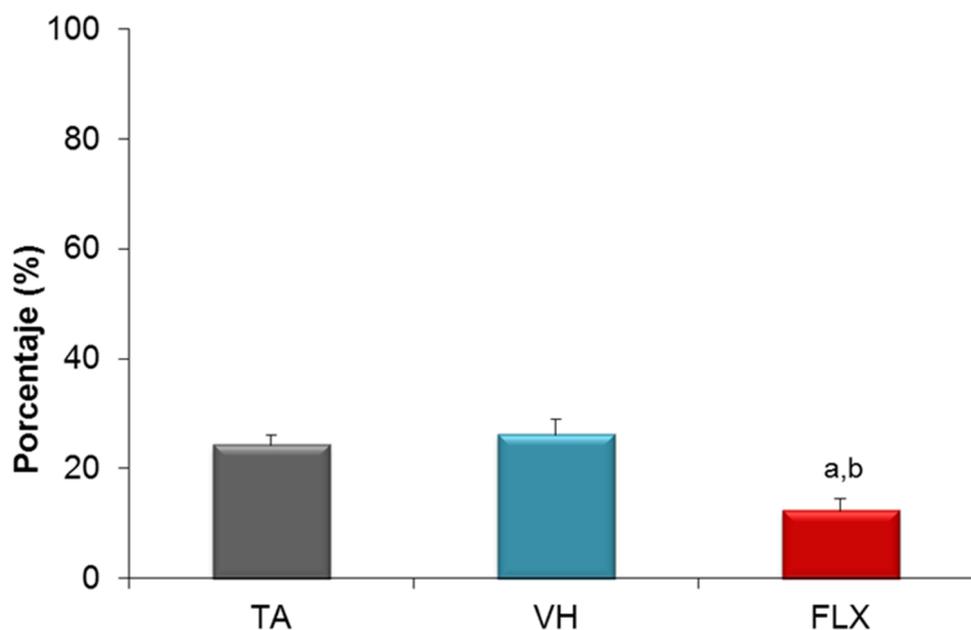
a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)
b, $p < 0.05$ vs. VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 22. Número espermático (media \pm e.e.m.) de ratas macho TA, tratados con VH o con FLX a partir del día 30 de edad y sacrificados al día de edad.

Movilidad espermática

En comparación con el grupo de animales TA, en los que se les administró VH, no se modificó el porcentaje de espermatozoides móviles, mientras que en los que se

les inyectó la FLX este parámetro disminuyó significativamente en comparación con el grupo VH (Fig. 23).



a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de la prueba de X^2)
b, $p < 0.05$ vs. VH (ANDEVA seguida de la prueba de X^2)

Figura 23. Porcentaje de espermatozoides móviles (media \pm e.e.m.) de ratas macho TA, tratados con VH o con FLX a partir del día 30 de edad y sacrificados al día de edad.

Viabilidad

En el presente estudio se utilizaron dos indicadores de viabilidad (actividad mitocondrial (Resazurin + SYTOS) e integridad de la membrana (SYBR + IP). En ambas pruebas, el porcentaje de espermatozoides viables no se modificó en los animales que se les administraron el VH o la FLX en comparación con el grupo TA (Fig. 24).

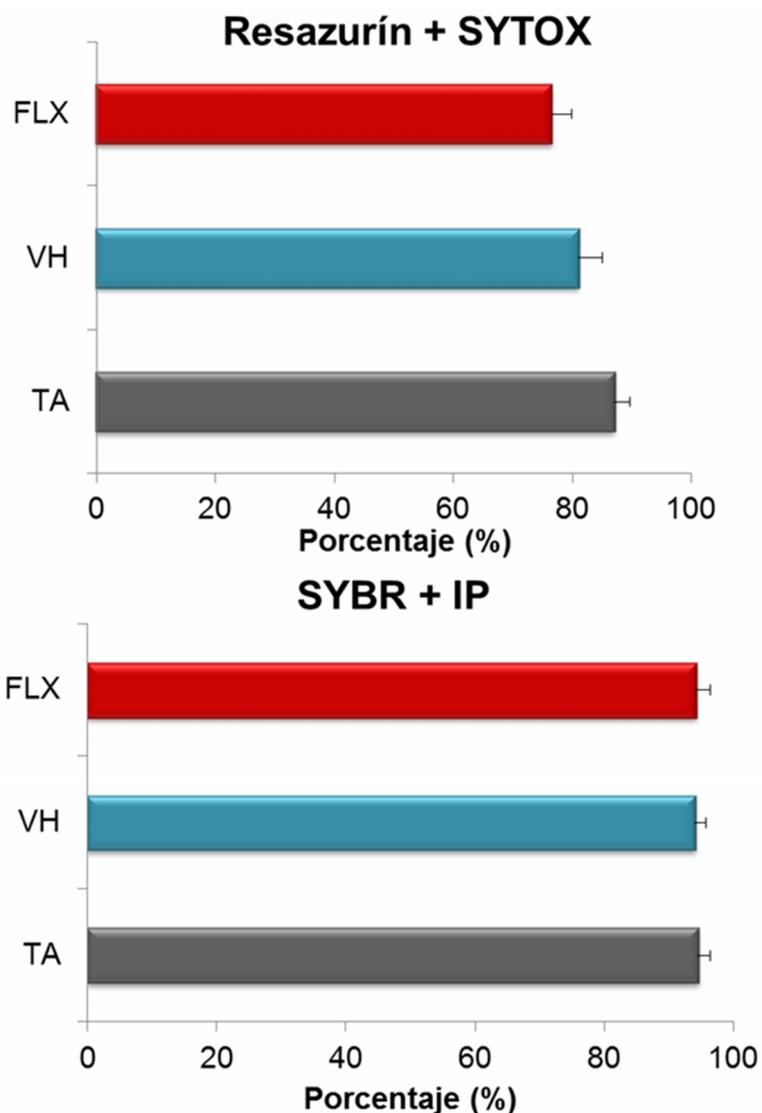


Figura 24. Porcentaje de espermatozoides viables (vivos) (media \pm e.e.m.) de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

Anormalidades en los espermatozoides

En el análisis de la estructura de los espermatozoides se observó que en los animales que se les administró el VH no se modificó el porcentaje de espermatozoides con una estructura normal. En el grupo de animales que se les

administró FLX se observó disminución significativa del porcentaje de espermatozoides normales en comparación con el grupo VH o TA (Fig. 25).

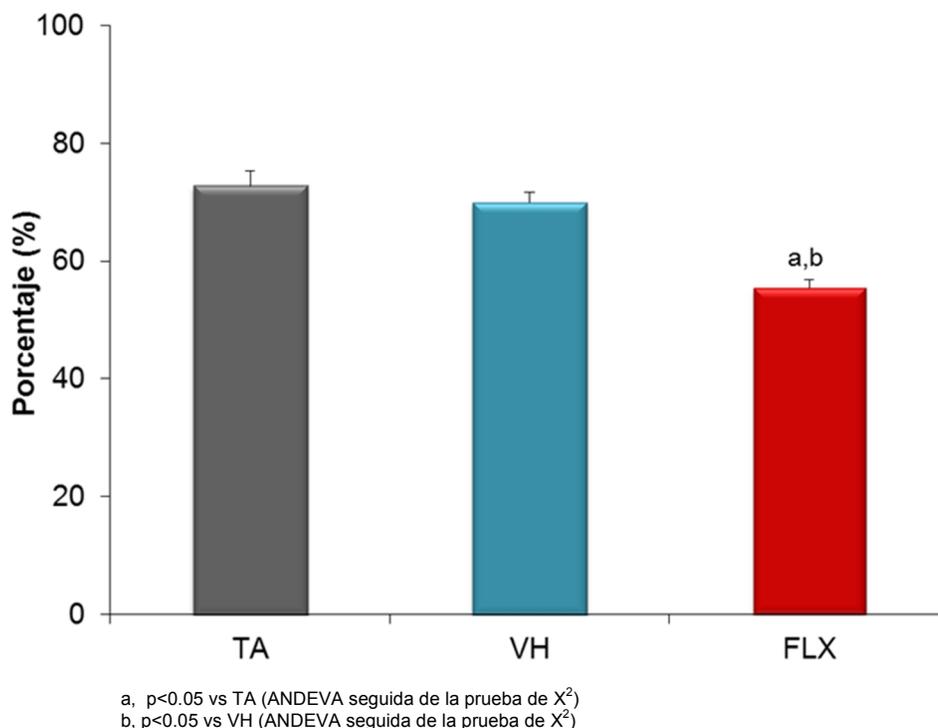
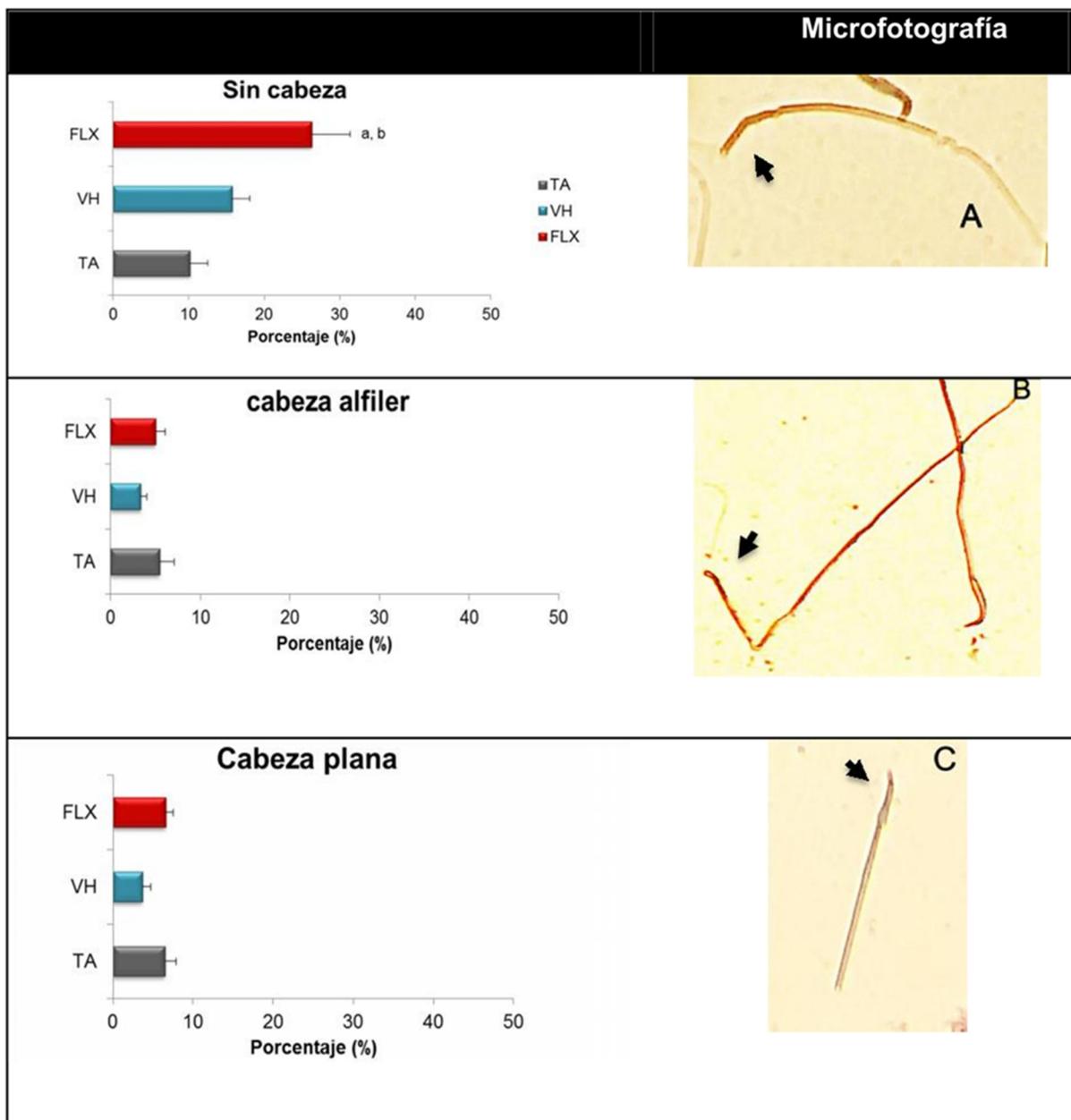


Figura 25. Porcentaje de espermatozoides normales (media \pm e.e.m.) de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

Las anomalías que se consideraron en los espermatozoides fueron: sin cabeza, cabeza de alfiler, pieza media doblada, flagelo corto, cabeza plana, gota citoplasmática y otras anomalías. En comparación con los grupos de animales TA o con VH, en los animales que se les administró FLX se incrementó significativamente la presencia de espermatozoides sin cabeza (Fig. 26). En el porcentaje del resto de anomalías no se presentaron cambios significativos (Fig. 26, 27 y 28).



a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de la prueba de X^2)
b, $p < 0.05$ vs VH (ANDEVA seguida de la prueba de X^2)

Figura 26. Porcentaje de espermatozoides anormales (media \pm e.e.m.) de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad. A. Microfotografía de espermatozoide

con anomalía de tipo sin cabeza; B. cabeza de alfiler ; C: cabeza plana. (40x).

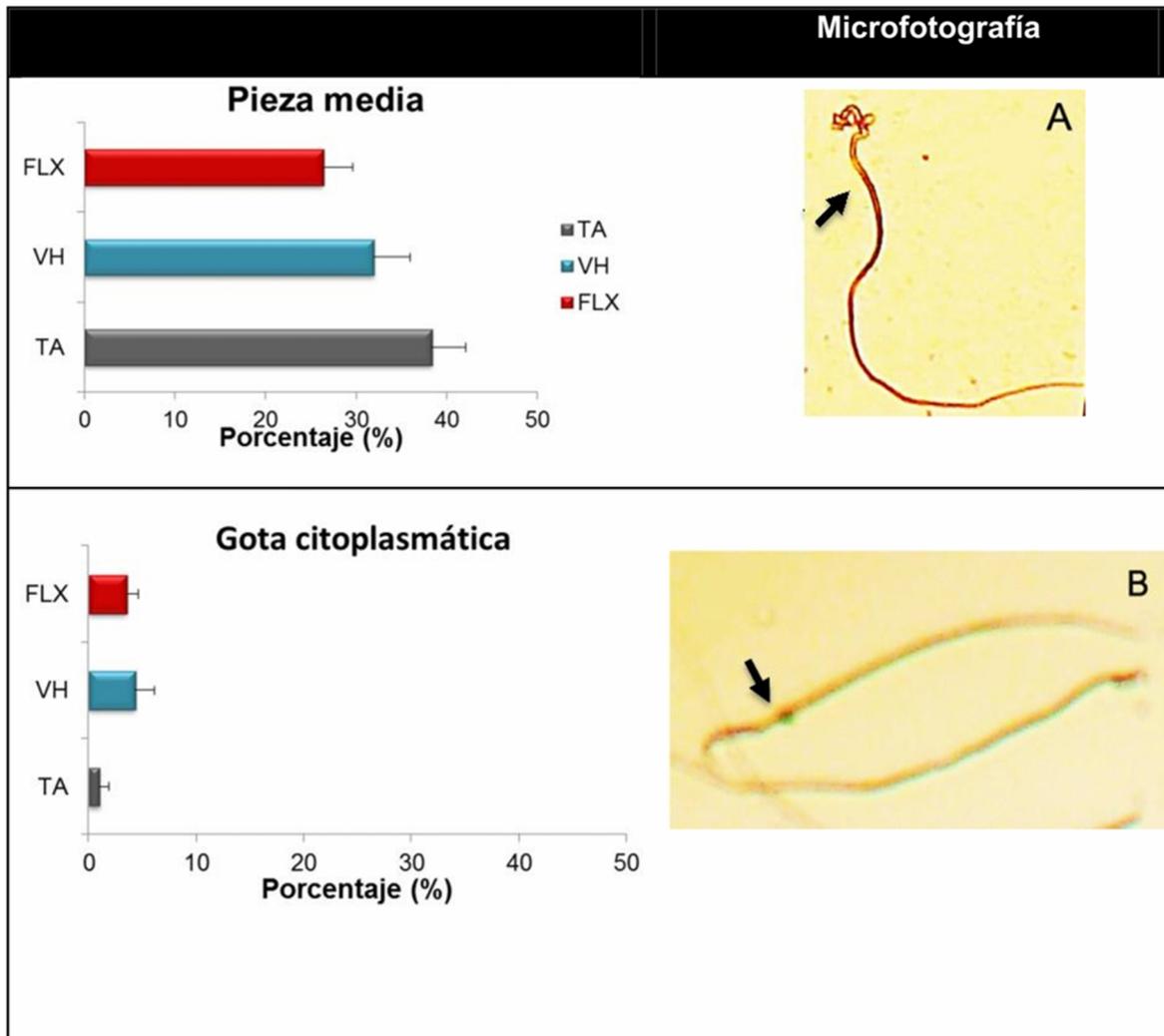


Figura 27. Porcentaje de espermatozoides anormales (media \pm e.e.m.) de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad. A. Microfotografía de espermatozoide con anomalía de tipo pieza media doblada; B. gota citoplasmática. (40x).

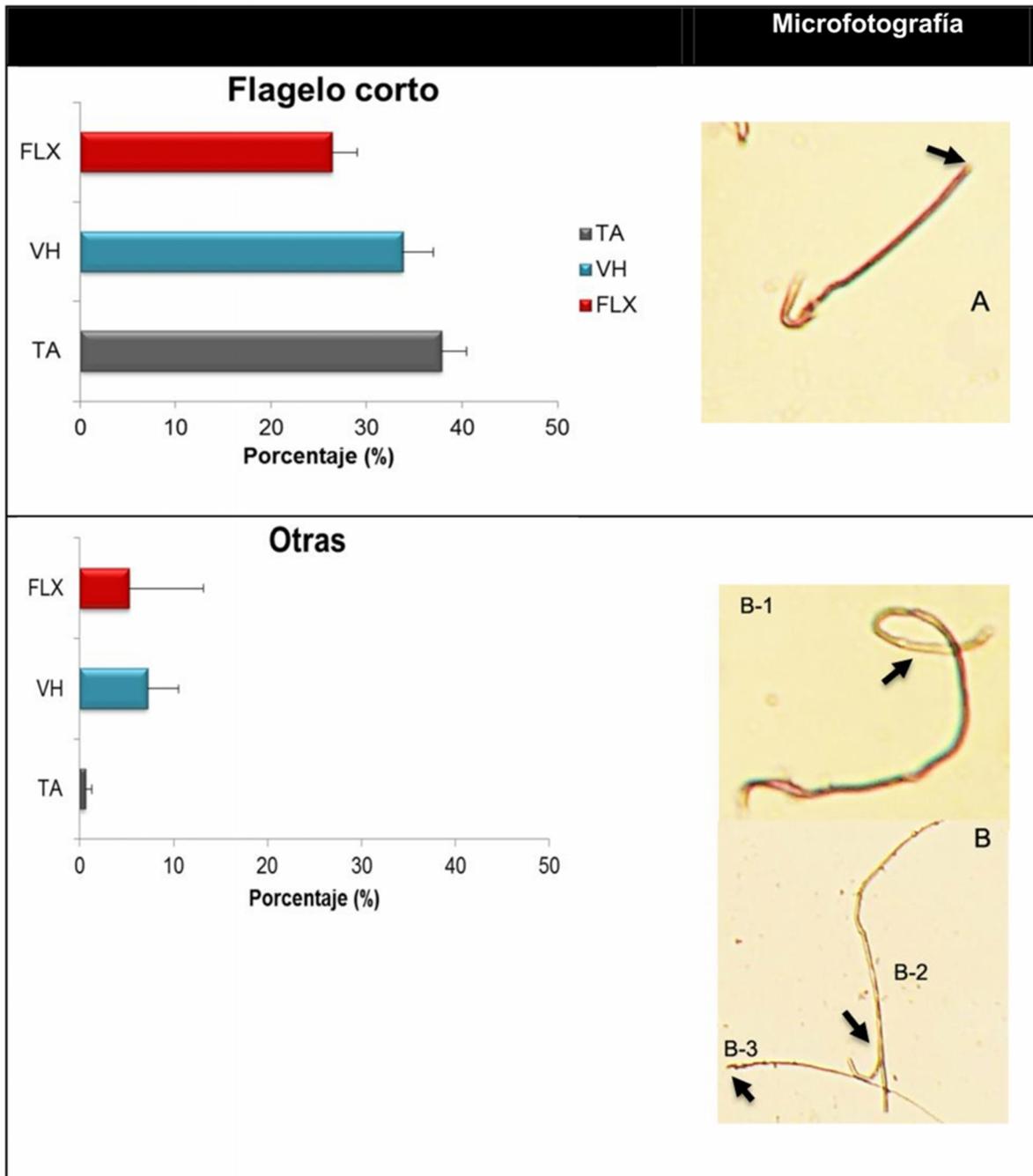
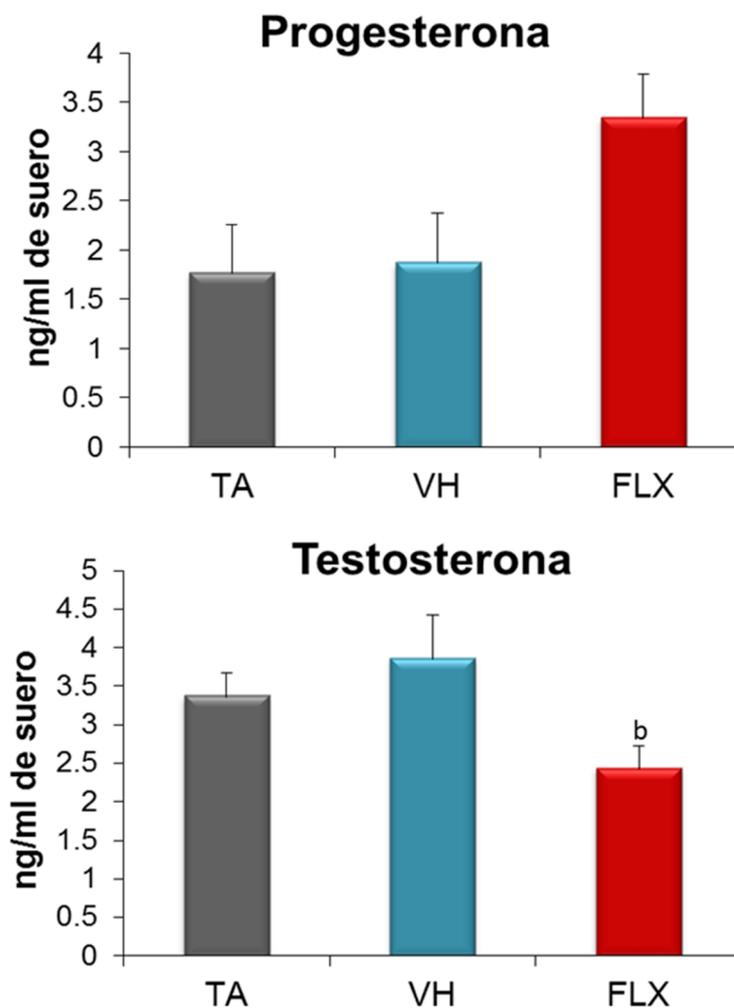


Figura 28. Porcentaje de espermatozoides anormales (media \pm e.e.m.) de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad. A. Microfotografía de espermatozoide con anomalía de tipo flagelo corto; B. Otro tipo de anomalías; B-1. flagelo enroscado; B-2. doble flagelo y B-3: microcabeza en gancho. (40x).

Concentración de Hormonas Esteroides

En comparación con el grupo de animales TA, en los animales que se trataron con VH no se modificó la concentración de progesterona y testosterona en el suero. Mientras que en los animales que se les administró FLX no se modificó significativamente la concentración de progesterona, pero disminuyó significativamente la de testosterona (Fig. 29).

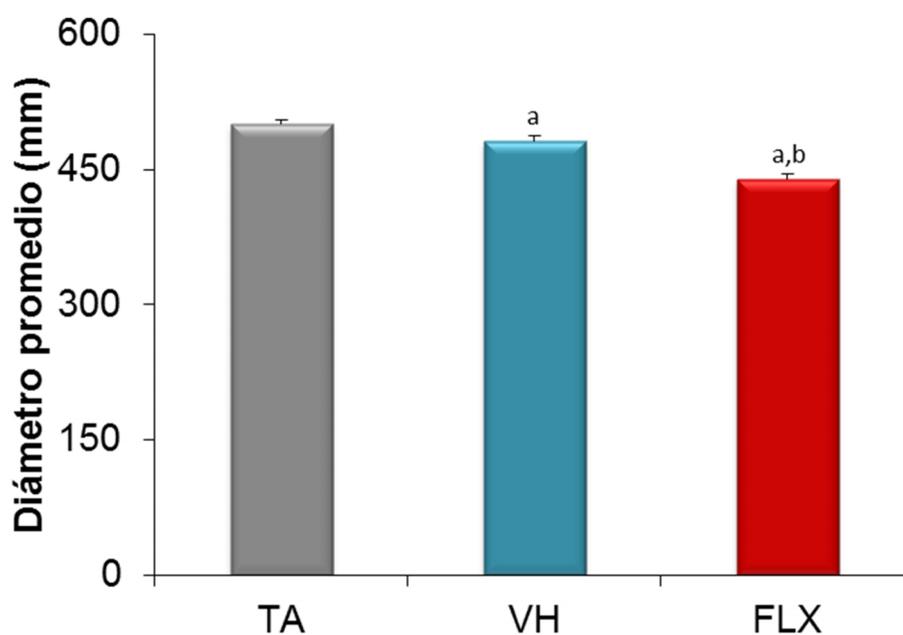


b, $p < 0.05$ vs VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 29. Concentración de progesterona y testosterona (media \pm e.e.m.) en suero de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

Evaluación Morfométrica del testículo

Con respecto a la evaluación del diámetro del túbulo seminífero se observó la disminución del diámetro promedio de los túbulos del grupo VH con respecto al grupo TA. En el grupo FLX se observó una disminución estadísticamente significativa en comparación con los grupos VH y TA. También en los túbulos del grupo FLX se observaron características como la discontinuidad en el grosor del epitelio seminífero así como células en la luz del túbulo (Fig. 30 y 31).



a, $p < 0.05$ vs TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)
b, $p < 0.05$ vs. VH (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Figura 30. Diámetro promedio de los túbulos seminíferos (media \pm e.e.m.) de ratas macho TA, tratadas con VH o con FLX a partir del día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

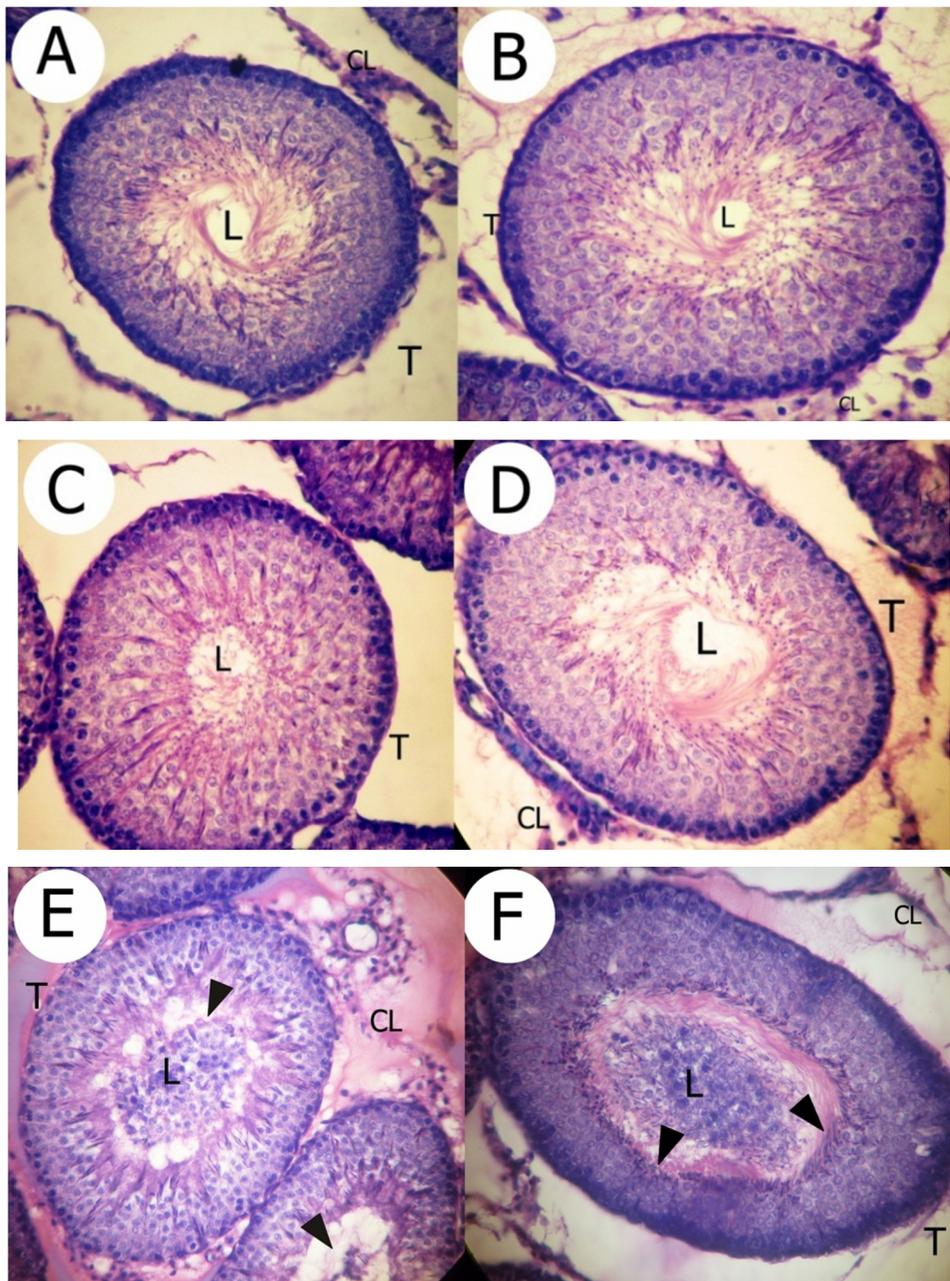


Figura 31. Fotomicrografías de túbulos seminíferos de ratas sacrificadas a los 65 días de edad teñidos con técnica hematoxilina-eosina. CL, Célula de Leydig; T, túbulo seminífero; L, luz del túbulo seminífero. A, B: túbulos seminíferos de ratas TA; C, D: túbulos seminíferos de ratas tratadas con VH; E, túbulos seminíferos de ratas tratadas con FLX, flechas indican células en el túbulo seminífero; F, túbulos seminíferos de ratas tratadas con FLX, flechas indican alteraciones en grosor del epitelio seminífero. 40x.

DISCUSION

Con base en los resultados del presente estudio se muestra que la administración de FLX modifica las funciones del testículo, espermatogénesis y esteroidogénesis. Esta afirmación se apoya en el hecho de que en estos animales se observó la disminución del número y movilidad de los espermatozoides, en la concentración de testosterona en suero y en el incremento del porcentaje de espermatozoides anormales.

El que no se modificara el peso corporal de los animales que se les administró FLX, nos indica que la dosis de 5 mg/ kg de p.c. que se utilizó en el presente estudio no modificó la ingesta de alimentos en los animales. En relación a esto se ha mostrado que la 5-HT al unirse a sus receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ presentes en el hipocampo, modula la ingesta de alimentos (Mancilla y col., 2006). Cuando en ratas adultas se realiza la microinyección de 20 nmol/100 nL de FLX en la región dorsal del hipocampo (Scopinho y col., 2013) o cuando se administra por vía sistémica una o cinco dosis consecutivas de 10 mg/kg del fármaco a ratas hembras o machos en la etapa juvenil (Lauzurica y col., 2013), así como en la rata macho adulta (Wong y col., 1988) se induce hipofagia y esto se acompaña de la disminución del peso corporal de los animales. Este efecto también se ha observado en la rata macho juvenil cuando se les administra FLX por vía sistémica a dosis de 10 y 20 mg/kg (Silva y col., 2008). Conjuntamente los resultados del presente estudio y los reportados en bibliografía permiten mostrar que la FLX disminuye la ingesta de alimentos y esto repercute en el peso corporal de los organismos, en dosis superiores a las utilizadas en el presente estudio (5 mg/kg).

El efecto de la FLX en la ingesta de alimentos además de ser dosis dependiente, se asocia con el tiempo en que dura el tratamiento con el fármaco, debido a que cuando en la rata macho adulta se realiza durante 30 días, la administración a diferentes dosis de FLX, 1, 5 ó 10 mg/kg, observaron que con la dosis de 10 mg/Kg el peso de los animales disminuyó significativamente (Cantor y col., 1999).

Bendele y colaboradores (1992), mostraron que cuando a ratas macho o hembras en la etapa peripuberal (35 a 40 días de edad) se les administra durante 24 meses 10mg/kg/día de FLX, se induce reducción del peso corporal de los animales, pero éste efecto no se observa con dosis de 5 mg/kg/día. Estos resultados coinciden con lo observado en nuestro estudio, debido a que la administración crónica de 5 mgKg⁻¹ de FLX por 20 días no modificó el peso corporal de los animales. Con base en esto mostramos que la dosis empleada de FLX y el esquema de tratamiento que se utilizó en el presente estudio no modifica la ingesta de alimento de los animales y como consecuencia los cambios que se observaron en algunos de los parámetros de la espermatogénesis y en la secreción de testosterona no se asocian con problemas de nutrición.

Contrario a lo esperado, en el presente estudio no se observaron cambios en la concentración de 5-HT y de su metabolito, el 5-HIAA, así como en la relación [5-HIAA]/[5-HT] en ninguna de las regiones hipotalámicas, lo que nos indicaría que no se modificó al sistema serotoninérgico, de igual manera en los testículos de los animales que se les administró FLX no se presentaron diferencias significativas en la concentración de 5-HT y su metabolito. Ya que, cuando se promedia la concentración de la amina de ambos testículos de los animales que se les administró la FLX, se observa la tendencia al aumento en la concentración de la amina sin llegar a ser estadísticamente significativo, esto nos indica que la FLX no actuó sobre el transportador de la 5-HT. Es posible a que la falta de cambios en el neurotransmisor sea debido a que cuando la administración de FLX se realizó del día 30 al 50 de edad y el tiempo que transcurrió entre la última administración y el día del sacrificio (día 65 de edad), fue suficiente para que se presentara la recuperación del sistema serotoninérgico, tanto en su síntesis como en su metabolismo. Por ello, no descartamos que la FLX haya modificado la actividad del transportador de la serotonina, la SERT y cómo consecuencia incremento la actividad del sistema serotoninérgico como lo reportan algunos autores (Chen y col., 2005; Echave, 2008).

Otra posible explicación a la falta de cambios en la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo de los animales que se les administró FLX posiblemente sea el reflejo de la inhibición de la síntesis de 5-HT. Esta posibilidad se sustenta en los resultados de Cabrera-Vera y colaboradores (1997), mostraron que cuando a ratas preñadas se les administran 10 mg/kg de FLX del día 13 al 20 de gestación y se evalúa la concentración de 5-HT en los machos en la etapa prepúberal y pospuberal se observa disminución del 28% de la amina en la corteza frontal en cambio en los machos adultos esta disminución del 28% se presenta en el cerebro medio. Estos resultados permiten pensar que la administración de FLX si produce cambios en las neuronas serotoninérgicas, pero que estos efectos son diferentes en las regiones del cerebro y dependen de la edad del animal. Estudios de Berg y colaboradores (2013) mostraron que la administración crónica de FLX durante el desarrollo prepúberal si modifica al sistema serotoninérgico, debido a que la concentración del 5-HIAA disminuye después de la exposición a FLX, este resultado no se observa en la etapa adulta.

La posibilidad de que la administración de FLX a largo plazo se acompaña de la inhibición de la síntesis de 5-HT se basa en los resultados en los que se muestra que el tratamiento crónico con FLX en ratas macho, disminuye la expresión de los receptores 5-HT_{1B} en las neuronas del núcleo dorsal del rafe, lo que ocasiona una menor síntesis y liberación de esta amina (Neumaier y col., 1996).

Aunado a lo antes mencionado, se plantea el efecto de inhibición que ejercen los ISRS en la síntesis de 5-HT, se presenta de forma diferencial en las regiones del cerebro. Maciag y colaboradores (2006), administraron a ratas en la etapa neonatal 5 mg/kg de citalopram (ISRS), durante 21 días y observaron que en el hipotálamo la concentración de 5-HT fue similar a su grupo control mientras que, en la corteza prefrontal medial y somatosensorial, así como en el hipocampo aumenta la concentración de la amina. Por medio de estudios de inmunohistoquímica, observaron que disminuyó en el núcleo dorsal la SERT y la expresión del TPH.

De forma similar a lo observado en el hipotálamo, en la hipófisis de los animales que se les administró FLX no se observó el incremento en la concentración de 5-HT y de su metabolito, esta falta de cambios en el neurotransmisor y su metabolito, nos permite pensar que posiblemente está relacionada con la aportación de 5-HT que proviene de la inervación serotoninérgica que recibe la hipófisis y que se origina en el NMR como se ha mostrado en diferentes estudios (Van de Kar y Lorens, 1979), así como la que proviene de fuentes extrínsecas, como plaquetas y mastocitos (Saland y col., 1987). En relación a la inervación serotoninérgica que se origina en el NMR, no se puede descartar que sea más resistente a los efectos de la FLX en comparación a la que se origina en el NDR, esta posibilidad se sustenta en evidencias que han mostrado que la inervación proveniente de estos núcleos posee una susceptibilidad diferencial al efecto de algunos fármacos como las anfetaminas y que la que se origina en el NMR es más resistente (Mamouna y Molliver, 1988). En apoyo a esta interpretación, Mirmiran y colaboradores (1981, 1983) mostraron que cuando a ratas macho en la etapa neonatal se les administran dos dosis diarias del antidepresivo, clomipramina, no se modifica la concentración de 5-HT en la hipófisis, mientras que disminuye en el cuerpo estriado y estructuras límbicas (Feenstra y col., 1996; Zeskind y Stephens, 2004). Se ha sugerido que los ISRS además de modificar la actividad del sistema serotoninérgico, afectan a otros sistemas de neurotransmisión como el noradrenérgico y el dopaminérgico (Cabrera-Vera y col., 1997; Kiryanova y col., 2013). En el presente estudio no se observaron cambios en la concentración de noradrenalina, dopamina y MHPG y DOPAC en el hipotálamo anterior y medio.

La disminución en la concentración de FSH y LH en los animales que se les administró FLX, nos indica que este ISRS actuó en el eje hipotálamo-hipófisis. En relación a esto Pinilla y col. (1997), observaron que cuando en la rata macho prepúber administran agonistas de los receptores 5-HT₂ y 5-HT₃, disminuye la concentración de LH en suero. Con base en estas evidencias se sugiere que la

serotonina inhibe la secreción de esta gonadotropina al unirse a los subtipos de receptores antes mencionados.

La disminución en el peso de testículos que se observó en los animales que se les inyectó FLX, coinciden con lo reportado previamente por otros autores (Muscat y col., 1992; Hedger y col., 1995; Taylor y col., 1996; Silva y col., 2008). La disminución del peso de los testículos asociado a la menor concentración de testosterona observada en los animales, coincide con lo reportado previamente en otros estudios (Taylor y col., 1996; da Silva y col., 2013) que cuando a ratas macho recién nacidas se les administra 5mg/Kg de FLX por 21 días, disminuye el peso de los testículos y la concentración de testosterona (da Silva y col., 2013). Un efecto similar en las gónadas, se observó en ratas macho adultas con dosis de 0.75mg/kg de p.c. de FLX durante 4 semanas. Los autores proponen que este efecto se asocia a bajas concentraciones de testosterona.

Es posible que la masa testicular haya disminuido en los animales tratados con FLX, como resultado de la menor concentración de FSH y testosterona, ya que en la ratas que se les administró el fármaco disminuyó la producción de ambas hormonas, que son fundamentales para el mantenimiento de la estructura del testículo, particularmente del epitelio seminífero (Graner, 1988). Se ha mostrado que este esteroide actúa en el testículo mediante su conversión a DHT, a través de la enzima 5α reductasa. La acción principal de la testosterona es facilitar la maduración de las espermátidas tempranas a espermatozoides, espermiogénesis (O'donnell y col., 1994; Holdcraft y Braun, 2004). Chandolia y colaboradores (1991) observaron que cuando disminuye la producción de testosterona, se observa la reducción en el peso del testículo y esto se acompaña de la inhibición del desarrollo de las células germinales, lo que puede ser el resultado del incremento en la apoptosis.

Hikim y colaboradores (1997) observaron que cuando disminuye la concentración de testosterona se incrementa la muerte por apoptosis en las células germinales

en las etapas VII –VIII y IX- XI del epitelio seminífero. Por lo tanto es posible que la disminución del peso del testículo pueda ser debido a daños en las poblaciones celulares que conforman este órgano tales como las células germinales, debido a que la FSH y testosterona actúan como de supervivencia en estas células y ejercen un efecto trófico sobre el epitelio germinal (Woolveridge y col., 1998; Kimura y col., 2003).

Pero ¿Cómo es que la administración de FLX puede dañar la estructura del testículo?. Cuando disminuye la concentración de testosterona, aumenta la supresión de Bcl-2 y posteriormente la del ligando Fas, lo que conduce a la apoptosis en las células germinales (Tapanainen y col., 1993; Nandi y col., 1999; Hikim y Swerdloff, 1999). Otra posibilidad, es que al metabolizarse este fármaco, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan daño en el ADN y en consecuencia la apoptosis en las células germinales. El objetivo de ROS son los lípidos de membrana y el tejido testicular y los espermatozoides son susceptibles a la oxidación, debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas del espermatozoide (Galecki y col., 2009; Morakinyo y col., 2011; Jungwirth y col., 2012).

Bataineh y Daradka (2007) mostraron que la administración de FLX disminuye el peso de los testículos y que este efecto posiblemente se asocia a la disminución en la población de células, particularmente disminuye el número de espermatozoides primarios, secundarios y espermátides. La disminución en el peso de los testículos se acompañó de la disminución en el número de espermatozoides, lo cual posiblemente se asocia al daño en los diferentes tipos celulares de la línea germinal que se diferencian a espermatozoides. Así mismo Aggarwal y col. (2012) observaron que el efecto de 10mg, 20mg y 40mg/kg de FLX vía sistémica en ratas macho adultas producía disminución de la masa testicular y esto se acompañó de la disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y pérdida de la alineación de las células en el epitelio de los túbulos. Estos resultados coinciden con lo observado en nuestro estudio, debido a que en

los animales que se les administró FLX disminuyó el diámetro de los túbulos seminíferos y el número de espermatozoides. Este evento podría asociarse al daño en el epitelio seminífero y a la disminución en la concentración de testosterona, hormona que favorece la espermatogénesis, particularmente la división meiótica y la transformación de la espermátide a espermatozoide (Aggarwal y col., 2013).

La disminución en el número de espermatozoides que se observó en los animales que se les administró FLX, se acompañó del incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales en el conducto deferente. Estos resultados coinciden con los de Hedger y col. (1995) quienes administraron 10mg/Kg de FLX a ratas macho adultas y observaron degeneración en los espermatozoides. Según Bataineh y Daradka (2007), la administración de FLX a ratas macho adultas a largo plazo, causa degeneración de los espermatozoides, estas anomalías pueden estar relacionadas con las concentraciones bajas de FSH y testosterona. Estas hormonas mantienen la salud de las células germinales, además la testosterona favorece la transformación de la espermátide redonda a espermatozoide (Ross y col., 2004).

Otro componente del aparato reproductor del macho, donde la testosterona actúa es el epidídimo, debido a que mantiene su estructura y funcionamiento (Ross y col., 2004; Aggarwal y col., 2013), por lo tanto cuando baja la concentración de ésta hormona, posiblemente disminuye la función del epidídimo, lo que se reflejó en la reducción de la movilidad de los espermatozoides en los animales que se les administró FLX. La asociación de que la disminución en la concentración de testosterona se acompaña de disminución en la motilidad y densidad espermática ya ha sido previamente planteada por otros autores (Bataineh y Daradka, 2007). Las alteraciones observadas en la espermatogénesis (formas anormales de espermatozoides, conteo, movilidad y disminución del diámetro de los túbulos seminíferos) son resultado de la disminución en la secreción de FSH ya que la concentración de esta gonadotropina es importante en el mantenimiento de las

poblaciones de las células de Sertoli, lo cual está directamente relacionado con el tamaño del testículo y la producción de espermatozoides. Silva y colaboradores (2008) mostraron cuando en la rata macho se administran 5 ó 10mg/Kg de FLX disminuye significativamente la concentración de FSH en el suero. Esta gonadotropina actúa como un factor mitogénico responsable de la proliferación de las células de Sertoli (França y col., 2000). Por lo tanto es posible que administración de FLX inhibiera la proliferación de las células de Sertoli, lo que se reflejó en modificaciones en la espermatogénesis.

La disminución en la concentración de testosterona en los animales tratados con FLX, nos indica que se modificó la esteroidogénesis en el testículo, como resultado de la menor producción de LH que se observó en estos animales. Esta gonadotropina actúa en las células de Leydig y estimula la transformación de progesterona a testosterona (Tresguerres, 2003). La disminución significativa en la concentración LH coincide con lo reportado por otros autores (Bataineh y Daradka, 2007; Erdemir y col., 2014), debido a que cuando en la rata se le administra fluoxetina disminuye la producción de esta gonadotropina y testosterona.

Otra posibilidad es que en los animales que se les administró FLX, se incrementará la concentración de 5-HT y este actuara como un factor inhibidor en la esteroidogénesis en el testículo. En relación a esto, en las células de Leydig se expresan los receptores 5-HT₂ y de LH (Erdemir y col., 2014). Aunado a esto, Hedger y colaboradores (1995) mostraron que en células de Leydig en cultivo, la 5-HT inhibe la producción de testosterona. Además, se ha mostrado que las células de Leydig sintetizan 5-HT que al unirse a sus receptores 5-HT₂ en esta célula actúa de manera autócrina y estimulan la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) e inhibe la secreción de testosterona (Tinajero y col., 1993).

Conjuntamente estos resultados nos permiten mostrar que la administración del ISRS, FLX modifica la función del eje reproductivo, hipotálamo-hipófisis-testículo y como consecuencia la espermatogénesis y esteroidogénesis.

CONCLUSIONES

- Con el esquema de tratamiento del presente estudio no se observó inhibición de la recaptura de serotonina en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo.
- La administración Fluoxetina disminuye la secreción de la FSH y LH en suero.
- La administración de Fluoxetina disminuye el peso de los testículos.
- La Fluoxetina disminuye la espermatogénesis evaluada por número, movilidad y aumento de formas anormales de los espermatozoides.
- La administración de Fluoxetina no modifica la viabilidad de los espermatozoides evaluada por integridad de la membrana y actividad mitocondrial.
- La administración Fluoxetina disminuye la esteroidogénesis en el testículo, lo que se reflejó en una menor concentración de testosterona en suero.
- En los animales tratados con Fluoxetina disminuye el diámetro promedio de los túbulos seminíferos, lo que se acompañó de la disminución del grosor del epitelio seminífero.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Adams AL., Steiner R. (1988). Puberty. *Reviews of Reproductive Biology*, 10: 1-52.
- ❖ Aggarwal A., Jethani SL., Rohatgi RK., Kalra J. (2012). Effects of fluoxetine on testis of albino rats—a histological assessment. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 3, 1-5.
- ❖ Aggarwal A., Jethani SL., Rohatgi RK., Kalra J. (2013). Effect of Fluoxetine on Epididymis of Albino Rats: A Histological Study. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 4, 8, 1457- 1462.
- ❖ Aguilar E., Pinilla L., Tena-Sempere M., Bellido C., Gaytán F. (1997). La pubertad masculina y femenina. En: *La evolución de la sexualidad y los estados intersexuales*, Botella J. y Fernández A. (Eds.). Díaz de Santos y Fundación Gregorio Marañón, Madrid España, pp.163-177.
- ❖ Aragón MA., Ayala ME., Marín M., Avilés A., Damián-Matsumura, P., Domínguez, R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction*, 129(6), 717-727.
- ❖ Arias P., Szwarcfarb B., de Rondina DC., Carbone S., Sverdlik R., Moguilevsky JA. (1990). In vivo and in vitro studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in prepubertal and peripubertal female rats. *Brain research*, 523(1), 57-61.
- ❖ Balon R. (1995). Fluoxetine and sexual dysfunction. *Journal of the American Medical Association*, 273 (19), 1489-1490.
- ❖ Baumgarten HG., Holstein AF., Rosengren E. (1971). Arrangement, ultrastructure and adrenergic innervation of smooth musculature of ductuli efferentes, ductus epididymis and ductus deferens of man. *Z. Zellforsch.* 120, 37–79.
- ❖ Bataineh HN., Daradka T. (2007). Effects of long-term use of fluoxetine on fertility parameters in adult male rats. *Neuroendocrinology letters*, 28(3), 321-325.

-
- ❖ Bedford JM. (2004). Sperm dynamics in the epididymis. *Gamete Physiology*, 53-67.
 - ❖ Bell C., McLean JR. (1973). The autonomie innervation of the rat testicular capsule. *Journal. Reproductive. Fertility*. 32, 253-258.
 - ❖ Bendele RA., Adams ER., Hoffman WP., Gries CL., Morton DM. (1992). Carcinogenicity studies of fluoxetine hydrochloride in rats and mice. *Cancer research*, 52(24), 6931-6935.
 - ❖ Berg C., Backström T., Winberg S., Lindberg R., Brandt I. (2013). Developmental exposure to fluoxetine modulates the serotonin system in hypothalamus. *Public library of science*, 8(1), 5053.
 - ❖ Berger M., Gray JA., Roth BL. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. *Review of Medicine*, 60:355–366.
 - ❖ Brandes LJ., Arron R.J., Bogdanovic, R. P., Tong, J., Zaborniak, C. L., Hogg, G. R., LaBella, F. S. (1992). Stimulation of malignant growth in rodents by antidepressant drugs at clinically relevant doses. *Cancer research*, 52(13), 3796-3800.
 - ❖ Cabrera-Vera TM., Garcia F., Pinto W., Battaglia G. (1997). Effect of prenatal fluoxetine (Prozac) exposure on brain serotonin neurons in prepubescent and adult male rat offspring. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(1), 138-145.
 - ❖ Campos MB., Vitale ML., Calandra RS., Chiochio SR. (1990). Serotonergic innervations of the rat testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88:475-9.
 - ❖ Carneiro AMD., Blakely RD. (2006). Serotonin-, protein kinase C-, and Hic-5-associated redistribution of the platelet serotonin transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24769-24780.
 - ❖ Cantor JM., Binik YM., Pfaus JG. (1999). Chronic fluoxetine inhibits sexual behavior in the male rat: reversal with oxytocin. *Psychopharmacology*, 144(4), 355-362.
 - ❖ Celada P., Puig MV., Artigas F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7.

- ❖ Chandolia RK., Weinbauer GF., Behre HM., Nieschlag E. (1991). Evaluation of a peripherally selective antiandrogen (Casodex) as a tool for studying the relationship between testosterone and spermatogenesis in the rat. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 38(3), 367-375.
- ❖ Chávez-León E., Ontiveros UMP., Serrano GC. (2008). Los antidepresivos inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS, ISR-5HT). *Salud mental*, 31(4), 307-319.
- ❖ Chen F., Larsen MB., Neubauer HA., Sánchez C., Plenge P., Wiborg O. (2005). Characterization of an allosteric citalopram-binding site at the serotonin transporter. *Journal of neurochemistry*, 92(1), 21-28.
- ❖ Cheng CY., Mruk DD. (2010). A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(7), 380-395.
- ❖ Clare SS., Phil D. (1999). Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) Past, Present and Future. Department of Pharmacology University College London R.G. Landes Company Austin, Texas, U.S.A. 25-32.
- ❖ Coffey DS., Berry SW., Walsh PC. (1988). *Endocrinology of male reproduction*. Philadelphia Saunders Company. EUA. pp. 5-49.
- ❖ 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(1), 17-22.
- ❖ Contreras CNA., Mancillas ALG. (2005). El papel de la serotonina en la dependencia al alcohol. Bases e implicaciones clínicas. *Fundación Clínica Médica Sur. México*. pp. 112-125.
- ❖ Cooper TG. (1999). Epididymis. En: *Encyclopedia of Reproduction*, 2, Academic Press USA., pp. 1-17.
- ❖ Curtis H. (2000). *Biology*. McGraw-Hill. México, pp. 147-159.
- ❖ Cyr DG., Robaire B., Hermo L. (1995). Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microscopy research and technique*, 30(1), 54-66.

- ❖ Dahlstroem A., Fuxe K. (1964). An evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiologica Scandinavica*, 62: 232-255.
- ❖ Das TK., Mazunder R., Biswas NM. (1985). Effect of intraventricular injection of 5,6-dihydroxytryptamine on spermatogenesis and plasma testosterone levels in rat. *Journal Endocrinology*, 106:395-400.
- ❖ Dayan AD. (1970). Variation between species in the innervation of intratesticular blood vessels. *Experientia*, 26, 1359-1360.
- ❖ Descarries L., Beaudet A. (1978). The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience*, 3(10), 851-860.
- ❖ Descarries L., Watkins KC., Garcia S., Beaudet A. (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *Journal of Comparative Neurology*, 207: 239 – 254 .
- ❖ Descarries L., Riad M., Parent M. (2010). Ultrastructure of the Serotonin Innervation in the Mammalian Central Nervous System. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 21, 65-101.
- ❖ Echave DRI. (2008). Caracterización del transportador de serotonina humano en células caco-2: estudio de los mecanismos de regulación fisiológica. Departamento de farmacología y fisiología unidad de fisiología. Facultad De Veterinaria Universidad De Zaragoza.
- ❖ Erdemir, F., Atilgan, D., Firat, F., Markoc, F., Parlaktas, B. S., & Sogut, E. (2014). The effect of Sertraline, Paroxetine, Fluoxetine and Escitalopram on testicular tissue and oxidative stress parameters in rats. *International Braz J Urol*, 40(1), 100-108.
- ❖ Estrada E., Uribe M. (2002). Atlas de Histología de Vertebrados. Impresores FOC. México. UNAM. pp. 143-148.
- ❖ Fawcett DW. (1973). Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 10. pp. 83–99.

- ❖ França LR., Silva VA., Chiarini-Garcia H., Garcia SK., Debeljuk L. (2000). Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1629-1636.
- ❖ Feenstra MG., van Galen H., Te RPJ., Botterblom MH., Mirmiran M. (1996). Decreased hypothalamic serotonin levels in adult rats treated neonatally with clomipramine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 55: 647–652.
- ❖ Frungieri MON., Gonzalez CS., Rubio M., Ozu M., Lustig L., Calandra R. (1999). Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology*, 69(4), 299-308.
- ❖ Frungieri MON., Zitta B., Pignataro OP., Gonzalez CSI., Calandra RS. (2002). Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic, and corticotropin-releasing hormone systems modulating cAMP and testosterone production in the golden hamster. *Neuroendocrinology*, 76(1), 35-46.
- ❖ Gal IB., Lopez GM., Velasco M., Prieto AI., Montalvo J. (2007). Bases de la fisiología. Editorial Tebar. España, pp. 468-484.
- ❖ Galecki P., Szemraj J., Bienkiewicz M., Florkowski A., Galecka E. (2009). Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacological reports*, 61(3), 436.
- ❖ García CM., Andrade R. J., Lucena M. I., González GR., Camargo R., Fernández BE., Alcántara R. (2005). Hepatotoxicidad secundaria a fármacos de uso común. *Gastroenterología y hepatología*, 28(8), 461-472.
- ❖ Gartner L., Hiatt J. (1997). *Histología: texto y atlas*. tercera ed. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana. México, pp. 506-507.
- ❖ Gartner LP., Hiatt JL. (2008). *Texto Atlas de Histología*. 3ª ed. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana. México, pp. 489-510.
- ❖ Graner DK. (1988). Hormonas de las gónadas. En Bioquímica Harper. RK. Murray, DK. Graner, PA. Mayes, VW. Rodwel (eds). Manual Moderno, onceava ed. México, pp. 530-546.

-
- ❖ Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12), 1002-1012.
 - ❖ Gershon MD., Sherman DL., Pintar JE. (1990). Type-specific localization of monoamine oxidase in the enteric nervous system: relationship to hydroxytryptamine neuropeptides and sympathetic nerves. *Journal Comparative Neurology*. 301: 191-213.
 - ❖ Gómez-Chang E., Larrea F., Martínez MF. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1):24-36, 20.
 - ❖ Hale MW., Lowry CA. (2011). Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology*, 213(2-3), 243-264.
 - ❖ Hedger MP., Khatab S., Gonzales G. (1995). Acute and short-term actions of serotonin administration on the pituitary-testicular axis in the adult rat. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(5), 1101-1109.
 - ❖ Heerlein A. (2000). Antidepresivos. *Psiquiatría Clínica*. Santiago de Chile, Ediciones de la Sociedad de Neurología, Psiquiatría y Neurocirugía. 40(1), 21-45.
 - ❖ Hikim AS., Rajavashisth TB., Hikim IS., Lue Y., Bonavera JJ., Leung A., Swerdloff RS. (1997). Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biology of Reproduction*, 57(5), 1193-1201.
 - ❖ Hikim AS., Swerdloff RS. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction*, 4(1), 38-47.
 - ❖ Hinton BT., Palladino MA. (1995). Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microscopy research and technique*, 30(1), 67-81.
 - ❖ Hodson N. (1970). The nerves of the testis, epididymis and scrotum. En: *The Testis* A. D. Johnson, W. R. Gomes, and N. L. Vandemark, I. 47-99.

- ❖ Holdcraft RW., Braun RE. (2004). Hormonal regulation of spermatogenesis. *International journal of andrology*, 27(6), 335-342.
- ❖ Hoyer D., Martin GR. (1997). 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*. 36 4-5: 419-28.
- ❖ Iversen L. (2000). Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS discovery. *Molecular Psychiatry*. 5:357-62.
- ❖ Jacobs BL., Azmitia EC. 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 72: 165-215.
- ❖ Jiménez TF, Tapia RM, Queiroz DB, Padilla P, Avellar MC, Rivas MPR, Manjarrez GG., 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.
- ❖ Jufe G. (2001). *Psicofarmacología Práctica*. Editorial Polemos, Buenos Aires, pp. 45-78.
- ❖ Jungwirth A., Giwercman A., Tournaye H., Diemer T., Kopa Z., Dohle G., Krausz C. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*, 62(2), 324-332.
- ❖ Justo SN., Rossano GL., Szwarcfarb 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(4), 382-386.
- ❖ Kerdelhue B., Bojna F., Lesieur P., Pasqualini C., El Abad A., Lenoir B., Doviller P., Chiueh MC., Palkovits M. (1989). Median eminence dopamine and serotonin neuronal activity. *Neuroendocrinology*, 49: 176-180.
- ❖ Kim SW., Paick JS. (2004). Peripheral effects of serotonin on the contractile responses of rat seminal vesicles and vasa deferentia. *Journal of Andrology*. 25, 893–899.

- ❖ Kimura M., Itoh N., Takagi S., Sasao T., Takahashi A., Masumori N., Tsukamoto T (2003). Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *Journal of andrology*, 24(2), 185-191.
- ❖ Kiryanova V., McAllister BB., Dyck RH. (2013). Long-Term Outcomes of Developmental Exposure to Fluoxetine: A Review of the Animal Literature. *Developmental neuroscience*, 35(6), 437-449.
- ❖ Kiss J, Csáki Á, Bokor H, Kocsis K, Kocsis B. (2002). Possible glutamatergic/aspartatergic projections to the supramammillary nucleus and their origins in the rat studied by selective [3H]D-aspartate labeling and immunocytochemistry. *Neuroscience* 111:671–69.
- ❖ Kordon C, Drouva SV, Martinez EG, Weiner RI. (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. *The physiology of reproduction*, 1, 1621-1681.
- ❖ Kormano M., Penttilä A. (1968). Distribution of endogenous and administered 5-hydroxytryptamine in the rat testis and epididymis. *Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae*. 46, 468-173.
- ❖ Kozicz T., Vigh S., Arimura A. (1998). The source of origin of PACAP- and VIP-immunoreactive fibers in the laterodorsal division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain Research* 810:211–219.
- ❖ Kruk ZL., Pycock C. (1991). *Neurotransmitters and Drugs*. 3° edición. Vol. I. Editorial Chapman & Hall Dalla, Tx, U.S.A. 216.
- ❖ Lagarrigue M., Becker M., Lavigne R., Deininger, SO., Walch A., Aubry F., Pineau C. (2011). Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20- μ m resolution. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(3), M110-005991.
- ❖ Lauzurica N., García GL., Fuentes JA., Delgado M. (2013). Hypophagia and induction of serotonin transporter gene expression in raphe nuclei of male and female rats after short-term fluoxetine treatment. *Journal of physiology and biochemistry*, 69(1), 69-74.

- ❖ Leung GPA., Dun SL., Dun NJ., Wong PYD. (1999). Serotonin via 5-HT and 5-HT receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium. *Journal of Physiology* 519 657–667.
- ❖ Lidov HGW., Molliver ME. (1982). Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Research Bulletin* 9:559-604.
- ❖ Lizama C., Alfaro I., Reyes JC., Moreno RD. (2007). Up-regulation of CD95 (Apo-1/Fas) is associated with spermatocyte apoptosis during the first round of spermatogenesis in the rat. *Apoptosis*. 12: 449-512.
- ❖ Londoño AC., Arango-Dávila CA. (2011). Efecto neuroprotector de la fluoxetina en un modelo experimental de isquemia cerebral en ratones. *Revista Médica. Sanitas* 14 (4): 30-38.
- ❖ Longone P., di Michele F., D'Agati E., Romeo E., Pasini A., Rupprecht R. (2011). Neurosteroids as neuromodulators in the treatment of anxiety disorders. *Frontiers in endocrinology*, 2.
- ❖ Maciag D., Simpson KL., Coppinger D., Lu Y., Wang Y., Lin RC., Paul IA. (2006). Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry. *Neuropsychopharmacology*, 31(1), 47-57.
- ❖ Maeda K., Ohkura S., Tsukamura H. (2000). Spermatogenesis and testicular functions. En: laboratory rat. *Handbook of Experimental Animals*. Academic Press. EUA. pp. 145-176
- ❖ Malgor LA y Valsecia. ME. (2003). Hormonas Sexuales Masculinas. *Farmacología*; 211-219.
- ❖ Malkov M., Fisher Y., Don J. (1998). Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biology of reproduction*, 59(1), 84-92.
- ❖ Mancilla DJ., Escartín PRE., López AV. (2006). Efectos de la 5-HT en ratas pretratadas con ketanserina sobre la estructura de la conducta alimentaria. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 32(1), 55-71.
- ❖ Mamounas LA., Molliver ME. (1988). Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: Axons from the dorsal and median raphe nuclei

- are differentially vulnerable to the neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA). *Experimental neurology*, 102(1), 23-36.
- ❖ Mann T., Lutwak-Mann C. (1990). *Male Reproductive Function and Semen. Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. pp: 139-156.
 - ❖ Mårtensson BS., Nyberg G., Toresson E., Brodin L., Bertilsson. (1989). Fluoxetine treatment of depression; Clinical effects, drug concentrations and monoamine metabolites and N-terminally extended substance P in cerebrospinal fluid. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 79, 586–596.
 - ❖ Mayerhofer, A. (1996). *Leydig cell regulation by catecholamines and neuroendocrine messengers. The Leydig cell*. Cache River Press, Vienna, IL, 407-418.
 - ❖ 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.
 - ❖ Mirmiran M., van de Poll NE., Corner MA., van Oyen HG., Bour HL. (1981). Suppression of active sleep by chronic treatment with chlorimipramine during early postnatal development: effects upon adult sleep and behavior in the rat. *Brain Research*. 204: 129–146.
 - ❖ Mirmiran M., Scholtens J., van de Poll NE., Uylings HB., van der Gugten J., Boer GJ. (1983). Effects of experimental suppression of active (REM) sleep during early development upon adult brain and behavior in the rat. *Brain Research*. 283: 277–286.
 - ❖ Moguilevsky JA., Faigon MR., Scacchi P., Szwarcfarb B. (1987). Role of sexual differentiation of the hypothalamus in the differential effect of the serotonergic system on LH in prepubertal male and female rats. *Neuroendocrinology*, 45(4): 274-277.
 - ❖ Molinoff PB., Axelrod J. (1971). Biochemistry of catecholamines. *Annual Review of Biochemistry*. 40: 465-500.
 - ❖ Moore RY. (1981). The anatomy of central serotonin neuron systems in the rat brain. *Serotonin neurotransmission and behavior*, 35-71.

-
- ❖ Morakinyo AO., Iranloye BO., Daramola AO., Adegoke OA. (2011). Antifertility effect of calcium channel blockers on male rats: association with oxidative stress. *Advances in medical sciences*, 56(1), 95-105.
 - ❖ Muscat R., Papp M., Willner P. (1992) Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. *Psychopharmacology* 109:433–438
 - ❖ Murphy DL., Lerner A., Rudnick G., Lesch KP. (2004). Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Molecular interventions*, 4(2), 109.
 - ❖ Muñoz CH., Vargas RA. (2004). Síndrome serotoninérgico. Hospital Militar Central-Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia. 7, 144-150.
 - ❖ Nandi S., Banerjee PP., Zirkin BR. (1999). Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1, 2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas?. *Biology of reproduction*, 61(1), 70-75.
 - ❖ Naumenko EV., Shishkina GT. (1978). Role of serotonin in feedback control of hypothalamic-pituitary-testicular complex in male rats. *Neuroendocrinology* 26:359- 366.
 - ❖ Nemeroff CB., Schatzberg AF. (2007). The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *Journal of Psychiatric Research*, 41(3), 189-206.
 - ❖ Nestler E., Hyman S., Malenka R. (2001) . Mood and emotion, Chapters 8, 9 y 15. *Molecular Neuropharmacology* (pp. 167-190; 191-200; 327-354). USA: McGraw-Hill.
 - ❖ Neubauer HA., Hansen CG., Wiborg O. (2006). Dissection of an allosteric mechanism on the serotonin transporter: a cross-species study. *Molecular pharmacology*, 69(4), 1242-1250.
 - ❖ Neumaier JF., Root DC., Hamblin MW. (1996). Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT1B mRNA in a sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*, 15(5), 515-522.

- ❖ O'donnell L., McLachlan RI., Wreford NG., Robertson DM. (1994). Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology*, 135(6), 2608-2614.
- ❖ Ojeda RS., Urbanski FH. (1994). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill (Eds). Raven Press, New York, EUA, 363-404.
- ❖ Oko R., Clermont Y. (1990). Mammalian spermatozoa: Structure and assembly of the tail. En: Gagnon C. Editor. *Control of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Boca Raton Florida Fl. CRC Press, 427.
- ❖ Otero MJ., Santos L., Santos BD., Domínguez GA. (1996). Farmacocinética Clínica de los Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina. *Farm Hosp*, 20(2), 73-85.
- ❖ Parra R., del Sol M. (2002). Estudios histológico e histoquímico del epidídimo de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). *Revista chilena de anatomía*, 20(3), 269-274.
- ❖ Paxinos G., Watson C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press Australia.
- ❖ Picut CA., Remick AK., Asakawa MG., Simons ML., Parker GA. (2014). Histologic Features of Prepubertal and Pubertal Reproductive Development in Female Sprague-Dawley Rats. *Toxicologic pathology*, 42(2), 403-413.
- ❖ Pinilla L., Gonzalez LC., Tena SM., Aguilar E. (2003). 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor activation reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-stimulated LH secretion in prepubertal male and female rats. *European journal of endocrinology*, 148(1), 121-127.
- ❖ Plenge P., Mellerup ET., Laursen H. (1991). Affinity modulation of [³H] imipramine, [³H] paroxetine and [³H] citalopram binding to the 5-HT transporter from brain and platelets. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 206(3), 243-250.
- ❖ Prieto GB., Velázquez PM. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Facultad de Medicina, UNAM*; 45, 6:252-255.

- ❖ Properzi G., Cordeschi G., Francavilla S. (1992). Postnatal development and distribution of peptide-containing nerves in the genital system of the male rat. *Histochemistry*, 97(1), 61-68.
- ❖ Quirk PL., Siegel RE. (2005). The serotonin Type 3^a Receptor Facilitates Luteinizing Hormone Release and LH Beta Promoter Activity in Immortalized Pituitary Gonadotropes. *Endocrine* 27: 37-43.
- ❖ Raap DK, Evans S., Garcia F., Li Q., Muma NA., Wolf WA., Van De Kar LD. (1999). Daily injections of fluoxetine induce dose-dependent desensitization of hypothalamic 5-HT_{1A} receptors: reductions in neuroendocrine responses to 8-OH-DPAT and in levels of G_z and G_i proteins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288(1), 98-106.
- ❖ Robaire B., Hinton BT., Orgebin-Crist MC. (2006). The epididymis. *Physiology of reproduction*, 1, 1071-1148.
- ❖ Ross MH., Gordon IK., Wojciech P. (2004). Aparato genital masculino. En *Histología*. M. H. Ross IK., Gordon P., Wojciech (Edits.). Editorial Medica Panamericana, cuarta edición, Buenos Aires, Argentina, 685-714.
- ❖ Rossi A., Barraco A., Pietro D. (2004). Fluoxetine: a review on evidence based medicine. *BioMedcentral: Annals of General Hospital Psychiatry*. 3:2. 1-8.
- ❖ Russell LD., Alger LE., Nequin LG. (1987). Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology*, 120(4), 1615-1632.
- ❖ Russell LD., Kershaw M., Borg KE., ShennawyA., Rulli SS., Gates RJ., Calandra RS. (1998). Hormonal Regulation of Spermatogenesis in the Hypophysectomized Rat: FSH Maintenance of Cellular Viability During Pubertal Spermatogenesis, *Journal of Andrology*. 19(3), 308-319.
- ❖ 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(3), 257-260.
- ❖ Saland LC., Wallace JA., Reyes E., Samora A., Maez D., Comunas F. (1987). Effects of the serotonin-uptake inhibitor, fluoxetine, on

- immunoreactive serotonin innervation in the rat pituitary gland. *Brain research bulletin*, 19(2), 261-267.
- ❖ Saland LC., Samora A., Sánchez P., Chávez G. (1993). Immunocytochemical Studies of tryptophan Hydroxylase, Tyrosine Hydroxylase, and Serotonin Innervation in the Aging Rat Neurointermediate Pituitary. *Experimental Neurology*, 121: 119-126
 - ❖ Salín PR. (2008). *Neurobioquímica y psicofarmacología de las enfermedades psiquiátricas*. ISBN-978-1-4092-0382-7. España. pp. 80-85.
 - ❖ Sato K., Kihara K. (1998). Spinal cord segments controlling the canine vas deferens and differentiation of the primate sympathetic pathways to the vas deferens. *Microscopy Research & Technique*. 42, 390–397.
 - ❖ Sánchez LA., Centurión D., Lozano-Cuenca J., Muñoz-Islas E., Cobos-Puc LE., Vetillalón CM. (2009). Receptores de la serotonina que inhiben el tono simpático vasopresor en la rata descerebrada y desmedulada. *IPN. Archivos Cardiología México*; 79: 83-94.
 - ❖ Scopinho AA., de Aguilar FM., Resstel LBM. (2013). Involvement of 5-HT1A receptors into the dorsal hippocampus in the hypophagic effect caused by fluoxetine in rats. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 27, 1176-2.
 - ❖ Setchell BP. (1970). Testicular blood supply, lymphatic drainage and secretion of fluid. En: *The Testis* (A. D. Johnson, W. R. Gomes, and N. L. Vandemark, Eds.), pp. 101–239. Academic Press, New York.
 - ❖ Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. (1994). Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y JD. Neill. (Edits.) Vol. 1. Ed. Raven Press. EUA. pp. 1063-1170.
 - ❖ Setchell BP, Breed WG. (2006). Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill (Eds.). Raven Press, New York, EUA, 802-839.

- ❖ Siegel G, Agranoff B., Wayne R., Fisher S., Uhler M. (1999). Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. 1183.
- ❖ Silva JVA., Lins AM., Amorim JA., Pinto CF., Deiró TB., Oliveira JR., Peixoto C. (2008). Neonatal administration of fluoxetine decreased final sertoli cell number in Wistar rats. *International Journal Morphology*, 26(1), 51-62.
- ❖ da Silva JVA., Monteiro Filho WO., Pinto CF., de Torres SM., Tenorio BM. (2013). Testis evaluation of adult Wistar rats after neonatal treatment with fluoxetine. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, 35(1).
- ❖ Stahl SM. (1998). Basic psychopharmacology of antidepressants: Part 1. Antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *Journal of Clinical Psychiatry*.
- ❖ Steinbusch HW. (1984). Histamine-immunostaining in the rat median eminence: an unexpected form of cross-reactivity with LH-RH. *Brain research*, 405(2), 353-357.
- ❖ Steinbusch HW, Nieuwenhuys R, Verhofstad AA, Vander Kooy D. (1981). The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J Physiol (Paris)* 77:157-174.
- ❖ Stevens A., Lowe J. (2000). *Texto y atlas de histología*. Segunda edición. México. Mc Graw Hill. 458.
- ❖ Syed V., Gomez E., Hecht NB. (1999). Messenger Ribonucleic Acids Encoding a Serotonin Receptor and a Novel Gene Are Induced in Sertoli Cells by a Secreted Factor from Male Rat Meiotic Germ Cells . *Endocrinology*, 140(12), 5754-5760.
- ❖ Tapanainen JS., Tilly JL., Vihko KK, Hsueh AJ. (1993). Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 7(5), 643-650.

- ❖ Taylor G., Bardgett M., Csernansky J., Early T., Haller J., Scherrer J., Womack S. (1996). Male reproductive systems under chronic fluoxetine or trimipramine treatment. *Physiology & behavior*, 59(3), 479-485.
- ❖ Therrien F., Markowitz JS. (1997). Selective serotonin reuptake inhibitors and withdrawal symptoms: a review of the literature. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 12(4), 309-323.
- ❖ Tinajero JC., Fabbri A., Dufau ML. (1992). Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. *Endocrinology*, 130(4), 1780-1788.
- ❖ Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca DR., Dufau ML. (1993). Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology*, 133(6), 3026-3029.
- ❖ Tresguerres JFA. (2003). *Fisiología Humana*. Ed. McGraw-Hill, 2ª edición, Madrid, España, 1033-1047.
- ❖ Törk I. (1990). Anatomy of the Serotonergic Systema. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 600(1), 9-34.
- ❖ Tortora GJ., Anagnostakos NP. (1984). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Tercera Edición, Editorial Harla, México, 904-915.
- ❖ Turner TT., Bomgardner D., Jacobs JP., Nguyen QA. (2003). Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*, 125(6), 871-878.
- ❖ Urry RL, Dougherty MS. (1975). Inhibition of rat spermatogenesis and seminiferous tubule growth after short-term and long-term administration of a monoamine oxidase inhibitor. *Fertility Sterility*, 26:232-8.
- ❖ Van de Kar LD., Lorens SA. (1979). Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and median midbrain raphe nuclei. *Brain research*, 162(1), 45-54.
- ❖ Van der Kooy D, Hunt SP., Steinbusch HW., Verhofstad AA. (1981). Separate populations of cholecystokinin and 5-hydroxytryptamine-containing neuronal cells in the rat dorsal raphe, and their contribution to the ascending raphe projections. *Neuroscience Letters*, 26:25–30.

- ❖ Vanhatalo S., Soinilla S., Kaartinen K., Bäck N. (1995). Colocalization of Dopamine and Serotonin in the Rat Pituitary Gland and in the Nuclei Innervating It. *Brain Research* 16: 275-284.
- ❖ Vera DKS. (2005). Neurobiología de la depresión mayor y de su tratamiento farmacológico. Facultad de Medicina; Maestría en Ciencias Fisiológicas. Colima, Colima. 17-21.
- ❖ Vertes, RP, Fortin WJ, Crane AM. (2010). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 407(4), 555-582.
- ❖ Villalón CM., Terrón JA., Hong E., Saxena PR. (1993). Efectos cardiovasculares de agonistas y antagonistas de los receptores de la 5-HT (Parte I). *Archivos de Cardiología de México*. 63:441-7.
- ❖ Villegas GI., Villegas GJA. (2004). Cátedra de Fisiología de la Universidad Católica de Murcia. En: Colaboración con la Cátedra de Psicogeriatría de la Universidad Católica de Murcia.
- ❖ Welsch Ulrich, Sobotta J. (2008). *Histología*. Ed. Médica Panamericana. pp. 476-480.
- ❖ Wennogle LP., Meyerson LR. (1985). Serotonin uptake inhibitors differentially modulate high affinity imipramine dissociation in human platelet membranes. *Life sciences*, 36(16), 1541-1550.
- ❖ Wieseler FJL., Hendricks SE., Olson CH. (2000). Multiple ejaculations and chronic fluoxetine: effects on male rat copulatory behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66(2), 337-342.
- ❖ Wong DT., Reid LR., Threlkeld PG. (1988). Suppression of food intake in rats by fluoxetine: comparison of enantiomers and effects of serotonin antagonists. *Pharmacology Biochemistry and Behavioral*. 31(2): 475-479.
- ❖ Woolveridge I., Bryden AA., Taylor MF., George NJ., Wu FC., Morris ID. (1998). Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short-and long-term anti-androgen treatment. *Molecular human reproduction*, 4(7), 701-707.

-
- ❖ Zemunik T., Peruzovic M., Capkun V., Zekan L., Tomic S., Milkovic K. (2003). Reproductive ability of pubertal male and female rats. *Brazilian journal of medical and biological research*, 36(7), 871-877.
 - ❖ Zeskind PS., Stephens LE. (2004). Maternal selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy and newborn neurobehavior. *Pediatrics*, 113(2), 368-375.
 - ❖ Zhang H., Wang H., Wang Q., Zhao XF., Liu P., Ji YL., Xu DX. (2010). Pubertal and early adult exposure to fenvalerate disrupts steroidogenesis and spermatogenesis in mice at adulthood. *Journal of Applied Toxicology*, 30(4), 369-377.
 - ❖ Zieher LM., Debeljuk L., Iturriza F., Mancini R.E. (1971). Biogenic amine concentration in testes of rats at different ages. *Endocrinology* 83, 351-354.
 - ❖ Zill P., Büttner A., Eisenmenger W., Müller J., Möller HJ., Bondy B. (2009). Predominant expression of tryptophan hydroxylase 1 mRNA in the pituitary: a postmortem study in human brain. *Neuroscience*, 159(4), 1274-1282.
 - ❖ Zrimsek P., Kosec M., Kunc J. (2006). Determination of the diagnostic value of the resazurin reduction assay for evaluating boar semen by receiver operating characteristic analysis. *Asian Journal of Andrology*, 8: 343-348.