



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“Análisis del efecto de pCA en la estructura de testículo
y en la expresión de SERT, 17 α -hidroxilasa y 17 β -HSD;
la rata como modelo de estudio”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA
P R E S E N T A:
CORIA VARGAS DENISSE SUJEY

Directora: Dra. María Elena Ayala Escobar



Ciudad de México

Octubre, 2023



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
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CARRERA DE BIOLOGÍA
FORMATO F-5



OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Le comunico que al alumno: **CORIA VARGAS DENISSE SUJEY** con número de cuenta **419115829** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **25 de Octubre de 2023** a las **11:00 hrs.** para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. EN C. FLORES RAMIREZ ANGELICA	
VOCAL	DRA. AYALA ESCOBAR MARIA ELENA	
SECRETARIO	DRA. ROLDAN REYES ELIA	
SUPLENTE	DRA. MONROY MORENO JUANA	
SUPLENTE	DRA. VIEYRA VALDEZ ELIZABETH	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

"Análisis del efecto de pCA en la estructura de testículo y en la expresión de SERT, 17 α -hidroxilasa y 17 β -HSD; la rata como modelo de estudio"

En la modalidad de: **TESIS**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CDMX, a 29 de Agosto de 2023

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“Análisis del efecto de pCA en la estructura de testículo
y en la expresión de SERT, 17 α -hidroxilasa y 17 β -HSD;
la rata como modelo de estudio”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA
P R E S E N T A:
CORIA VARGAS DENISSE SUJEY

Jurado de examen

Directora: Dra. María Elena Ayala Escobar
Asesor: Dra. Juana Monroy Moreno
Asesor: M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez
Sinodal: Dra. Elia Roldán Reyes
Sinodal: Dra. Elizabeth Vieyra Valdez



Ciudad de México

Octubre, 2023

Agradecimientos institucionales

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT- IN226017 y IN218920) por el apoyo otorgado para la realización del presente proyecto.

A mi directora de tesis, la Dra. María Elena Ayala Escobar por toda su ayuda, dedicación y facilidades brindadas durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Comité tutorial y jurado de examen, por sus aportaciones para enriquecer el presente proyecto:

Dra. María Elena Ayala Escobar

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez

Dra. Juana Monroy Moreno

Dra. Elia Roldán Reyes

Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

Agradecimientos

A la Dra. María Elena Ayala Escobar, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Por toda su dedicación, paciencia y profesionalismo, así como el conocimiento transmitido y grandes enseñanzas en lo académico y personal. Gracias por todo.

Al Dr. Eloir Gómez Pacheco por todas las explicaciones brindadas a lo largo del proyecto.

A los M.V.Z. Adriana Altamirano Bautista, Román Hernández Meza y Dolores Elizabeth Guzmán Andrade, responsables del bioterio de la FES Zaragoza, por su trabajo en el cuidado y mantenimiento de los animales usados en este estudio.

Al Dr. Andrés Aragón Martínez y Cindy Rivas Arzaluz de la UBIMED, FES-Iztacala por todo el apoyo con la técnica de inmunohistoquímica.

A los Técnicos Laboratoristas por toda su ayuda en la realización de los cortes histológicos utilizados en la realización de este trabajo.

A mi familia, por todo el amor incondicional, por todo su apoyo y sobre todo por siempre creer en mí.

A mis compañeros de trabajo del laboratorio de pubertad por todo su apoyo y ayuda.



Dedicatorias

A **mi mami**, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Este logro es tuyo. Gracias por mostrarme día con día el verdadero significado del amor. Gracias por estar conmigo en todo momento, y por enseñarme que, aunque las circunstancias no sean fáciles, jamás debemos rendirnos, siempre tenemos que luchar por nuestros sueños, hasta verlos realizados. Jamás me alcanzará la vida para devolverte tanto que me has dado. *Tè amo.*

A **Lupi**, por ser y por estar. Gracias por esos consejos tan valiosos, los cuales llevo siempre en mi corazón; por esas hermosas historias tan entretenidas, por las canciones, y por los momentos de risa. Me has enseñado tanto y te debo mucho de lo que soy. Te quiero mucho Lupi.

A **Gerardo, Dulce y Perla**, gracias por todas esas horas de risa, por todo su cariño, por escucharme y siempre estar conmigo, son todo lo que tengo y agradezco que sean ustedes. Los quiero mucho.

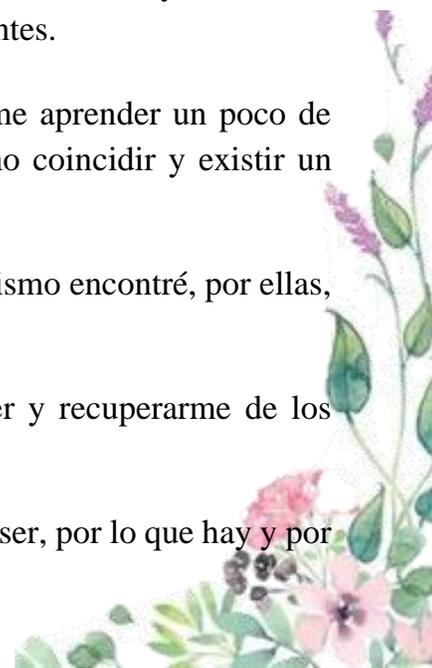
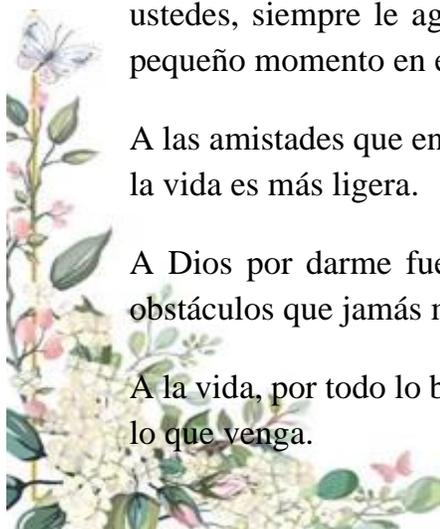
A **Armando y Estela**, ni con todas las palabras del mundo alcanzaría a agradecerles todo lo que han hecho por mí, quiero que sepan que los admiro y estimo mucho, y que siempre tendrán todo mi respeto, gracias por todo su apoyo, enseñanzas y sobre todo por todos sus consejos, que les aseguro siempre tendré presentes.

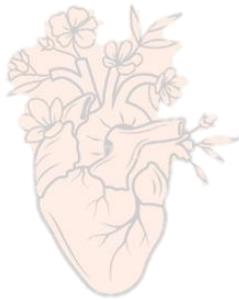
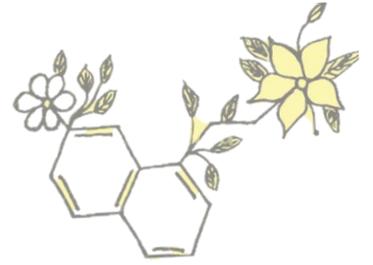
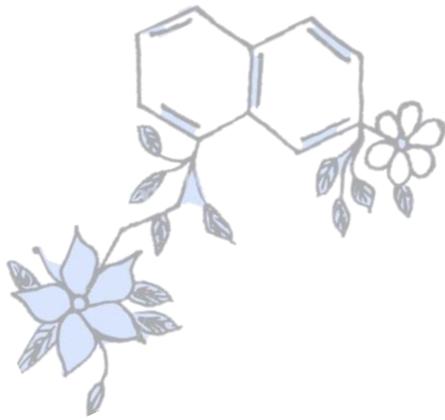
A todas las personas que amo y amé, gracias por permitirme aprender un poco de ustedes, siempre le agradeceré a la vida por habernos hecho coincidir y existir un pequeño momento en esta vida. Sin ustedes, no estaría aquí.

A las amistades que en el camino quedaron y a las que ahí mismo encontré, por ellas, la vida es más ligera.

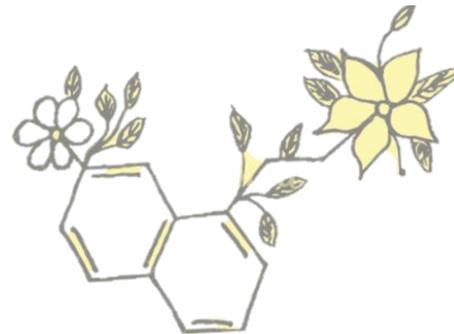
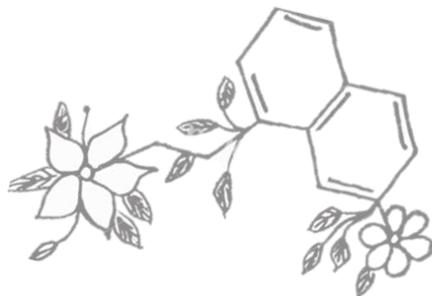
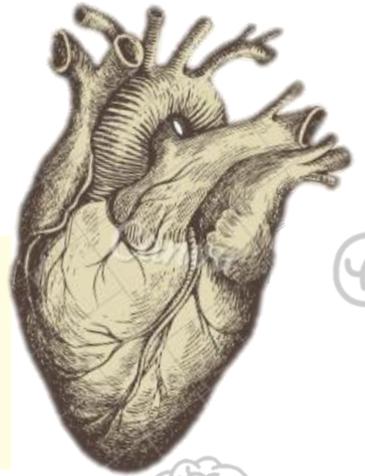
A Dios por darme fuerzas para levantarme después de caer y recuperarme de los obstáculos que jamás me vencerán.

A la vida, por todo lo bueno y lo malo, por lo que fue y pudo ser, por lo que hay y por lo que venga.





“Donde quiera que vayas, ve con todo tu corazón”.
Confucio





“Si realmente quieres hacer algo
encontrarás la manera, de lo contrario
encontraras excusas”.



Índice

Introducción	1
Marco Teórico	3
Aparato reproductor masculino.....	3
Estructura testicular.....	3
Células de Leydig	5
Células de Sertoli	6
Inervación testicular	8
Eje hipotálamo-hipófisis-testículo	8
FSH.....	10
LH.....	10
Esteroidogénesis	12
Vía $\Delta 4$ y $\Delta 5$	13
3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta 5 \rightarrow \Delta 4$ Isomerasa (3β HSD o HSD3B)	13
17α -hidroxilasa.....	14
17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 3 (17β -HSD3)	14
Regulación de la esteroidogénesis	16
Historia de la serotonina	18
Sistema serotoninérgico	18
Síntesis de serotonina	19
Transportador de serotonina (SERT)	20
Serotonina y esteroidogénesis en el testículo	23
Anfetaminas y p-Cloroanfetamina (pCA).....	25
Anfetaminas, pCA y SERT	27
Anfetaminas, pCA y testículo	28
Planteamiento del problema	30
Pregunta de investigación.....	30
Hipótesis	31
Objetivo general.....	31

Objetivo particular.....	31
Material y métodos.....	32
Perfusión.....	33
Inclusión y cortes histológicos.....	34
Inmunohistoquímica.....	35
Autopsia.....	38
Cuantificación de proteínas.....	38
Electroforesis.....	39
Electrotransferencia.....	39
Inmunodetección.....	39
Revelado.....	40
Cuantificación de hormonas esteroides.....	40
Análisis estadístico.....	40
Resultados.....	42
Proteína transportadora de serotonina (SERT).....	42
17 α -hidroxilasa.....	46
17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD).....	50
Hormonas esteroides.....	54
Discusión de resultados.....	56
Conclusiones.....	65
Literatura citada.....	66

Resumen

La serotonina (5-HT) es esencial en la regulación de la esteroidogénesis del testículo. Sin embargo, hoy en día no se ha abordado la relación que existe entre la concentración de serotonina en el testículo, la proteína encargada del transporte de serotonina (SERT) y las enzimas que regulan la producción de testosterona. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la inhibición del sistema serotoninérgico inducido por la p-Cloroanfetamina (pCA) en la presencia de la SERT, las enzimas esteroidogénicas: 17 α -hidroxilasa (P450c17) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD).

Para ello, se utilizaron ratas macho de 30 días de edad de la cepa CII-ZV, mantenidas en condiciones controladas de iluminación, (14 h luz/10 h oscuridad), y temperatura (22 \pm 2 °C); con acceso al alimento y agua *ad libitum*. Se dividieron al azar en tres grupos experimentales: Testigo absoluto (TA), ratas sin ningún tratamiento; Grupo (Vh), a las cuales se les inyectó solución salina (NaCl) al 0.9 %; Grupo con p-Cloroanfetamina (pCA), a las que se les inyectó 10 mg/Kg de pCA. Los animales de los diferentes grupos experimentales se autopsiaron a los 32 o 35 días de edad (48 o 120 h postratamiento).

En el testículo se evaluó y cuantificó la presencia de la proteína SERT, de la 17 α -hidroxilasa y de la 17 β -HSD, en suero se midieron las concentraciones de la progesterona y testosterona.

En el grupo que se inyectó con Vh la presencia de SERT disminuyó a las 120 h postratamiento en comparación con el grupo TA (3.97 \pm 0.262 vs. 6.49 \pm 0.320, p<0.0001). Un comportamiento inverso se observó en los animales con pCA en comparación con el grupo con Vh (5.41 \pm 0.3598 vs. 3.97 \pm 0.262, p<0.0434) y el TA (5.41 \pm 0.359, vs. 6.49 \pm 0.320, p<0.0041).

En el tejido intersticial, inmunoreactividad a la enzima 17 β -HSD, se identificó en el endotelio de los vasos sanguíneos y células de Leydig, principalmente. El número de células de Leydig inmunoreactivas a la proteína disminuyó en los animales inyectados con pCA en

comparación con los animales TA (2.56 ± 0.255 vs. 6.81 ± 0.399 , $p < 0.0001$) o con Vh (2.56 ± 0.255 vs. 6.23 ± 0.365 , $p < 0.001$). La presencia de esta proteína en el testículo de los animales inyectados con pCA disminuyó a las 120 h postratamiento (84.65 ± 9.82 vs. 65.47 ± 15.52 , $p < 0.0076$).

En comparación con los animales TA las concentraciones de progesterona y testosterona no se modificaron en los animales inyectados con Vh. En los animales que se les administro pCA las concentraciones de progesterona (48 h: 4.511 ± 0.547 vs. 12.929 ± 1.943 , $p < 0.0275$; 120 h: 2.107 ± 0.5475 vs. 7.336 ± 2.5837 , $p < 0.0188$) y testosterona (0.044 ± 0.005 vs. (TA) 0.236 ± 0.042 , $p < 0.0241$ vs. (Vh) 0.266 ± 0.07 $p < 0.0301$) disminuyeron a las 48 y 120h.

Con base en los resultados obtenidos proponemos que en el animal prepúber la administración de pCA reduce la presencia de SERT, las enzimas 17α -hidroxilasa y 17β -HSD en el testículo, y de progesterona y testosterona en el suero. Esto depende de las horas postratamiento.

Introducción

La serotonina es una indolamina que actúa como neurotransmisor en el Sistema Nervioso Central (SNC) y neuromodulador en órganos periféricos (Siegel *et al.*, 2012; Pourhamzeh, *et al.*, 2022). En el hipotálamo regula la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y en la hipófisis de la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), esenciales en el mantenimiento de la estructura del testículo y en la modulación de sus funciones (Wada *et al.*, 2006). Las fuentes de serotonina del testículo son las plaquetas, la síntesis de *novo* en la célula de Leydig y la que aporta el nervio espermático superior e inferior (Campos *et al.*, 1990, Aguilar *et al.*, 1995). En la gónada del macho también se han identificado algunos marcadores del sistema serotoninérgico, que incluye los receptores a serotonina del tipo 5-HT₂ y 5HT₇, las proteínas que regulan su síntesis (triptófano hidroxilasa, TPH), su recaptura (proteína transportadora de serotonina, SERT) y metabolismo (monoamino oxidasa, MAO) (Tinajero *et al.*, 1992). En la célula de Leydig, la serotonina estimula la síntesis y secreción de hormonas esteroideas; principalmente la testosterona (Aguilar *et al.*, 1995).

Los derivados de las anfetaminas, como la p-Cloroanfetamina (pCA), inhiben la síntesis, recaptura y metabolismo de la serotonina en el Sistema Nervioso Central (SNC). Se sugiere que la SERT es blanco de la pCA, debido a que su presencia disminuye en el cerebro (Reiff *et al.*, 2020).

En la rata macho prepúber de 30 días de edad, la inyección de pCA disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo, aumenta el número de células germinales positivas a TUNEL, indicador de apoptosis, túbulos con lumen grande, de forma irregular y con la presencia de células multinucleadas gigantes, así como disminución en la concentración de testosterona en el suero (Aragón *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2022).

En el testículo, la muerte de las células germinales por apoptosis se relaciona con la disminución en la producción de testosterona (Aragón *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2022). Sin embargo, actualmente no se ha abordado la relación que existe entre la serotonina en el

testículo, con la SERT y las enzimas que regulan la producción de testosterona. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la inhibición del sistema serotoninérgico inducido por la pCA en la concentración de testosterona en el suero, la presencia de la SERT y las enzimas de la esteroidogénesis 17α -hidroxilasa y 17β -HSD, utilizando la rata macho de 30 días como modelo de estudio.

Marco Teórico

Aparato reproductor masculino

El sistema reproductor masculino consta de dos testículos, epidídimos, conductos deferentes; glándulas accesorias, la próstata y la vesícula seminal; estructuras de soporte, el escroto; y el pene. Cumple tres funciones: 1) la producción y almacenamiento de gametos masculinos (espermatozoides); 2) la realización del acto sexual masculino y 3) la biosíntesis y secreción de hormonas sexuales masculinas (andrógenos) (Guyton & Hall., 2011).

Estructura testicular

El testículo es un órgano par, son estructuras ovoides, en humano tiene un diámetro de alrededor de 5 cm y se encuentran en el interior de las bolsas escrotales por fuera de la cavidad abdominal (Tresguerres *et al.*, 2005). Es el órgano primario del aparato reproductor del macho y cumple dos funciones: 1) sintetizar hormonas esteroideas sexuales (andrógenos), las cuales mantienen la estructura y el funcionamiento de los componentes del aparato reproductor y 2) produce los espermatozoides (Adamczewska., 2022).

Está compuesto de túbulos seminíferos, cada uno de más de 0.5 m de longitud, en los que se forman los espermatozoides (Tresguerres *et al.*, 2005). Los testículos del humano, a diferencia del roedor, están divididos radialmente por septos de tejido conectivo, formando espacios llamados lobulillos, en cada espacio se ubican de 1 a 4 túbulos que conducen hacia la rete testis, que es una estructura que se comunica con el epidídimo donde los espermatozoides maduran, son capacitados y adquieren movilidad (Berne & Levy., 2009; Walker *et al.*, 2021).

Cada túbulo seminífero se encuentra delimitado por una capa (roedores) o varias capas (humanos) de células mioides peritubulares con propiedades similares a las del músculo liso (Heinrich & DeFalco., 2020). Estas células delimitan externamente al túbulo, brindan soporte estructural y ayudan a su contracción (Palombi *et al.*, 1992). Las células peritubulares están

en contacto con dos membranas basales. Una membrana basal está orientada hacia el epitelio germinal y la otra hacia las células endoteliales y el intersticio (Losinno *et al.*, 2012).

El colágeno y la laminina forman la membrana basal que sirve de soporte a las células del epitelio seminífero. En este se ubican las células de Sertoli y las células germinales en diferentes etapas organizadas en estratos (Palombi *et al.*, 1992). Las células de Sertoli se apoyan en la lámina basal y se proyectan hacia el lumen del túbulo. Las células germinales se ubican desde la membrana basal hacia la luz del túbulo, tal y como se describe a continuación: espermatogonias, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios y espermátidas en diferentes etapas de diferenciación. Fuera de los túbulos seminíferos se encuentra el tejido intersticial constituido por tejido conectivo y las células intersticiales o de Leydig (Figura 1) (Guyton & Hall., 2011).

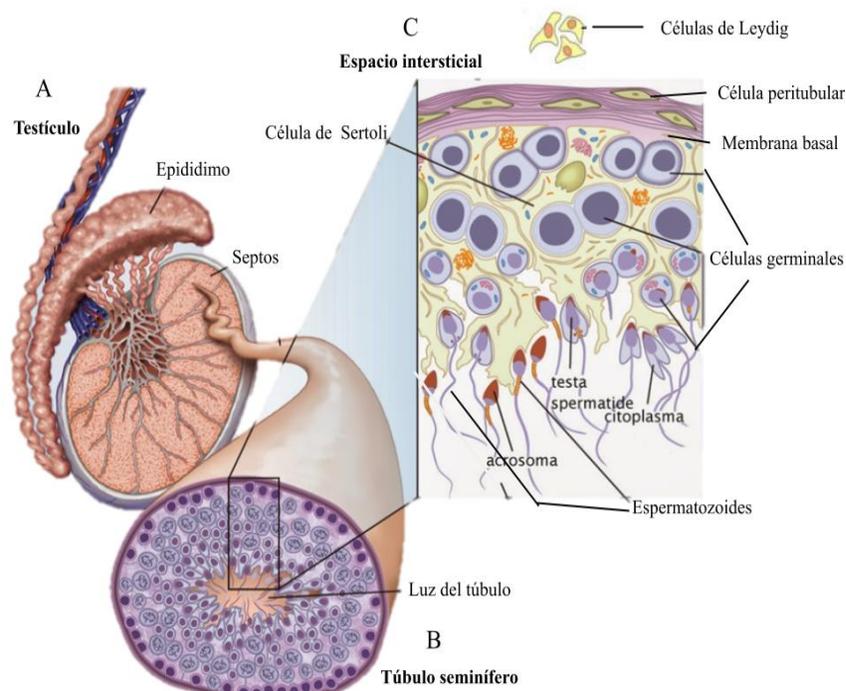


Figura 1. A. Esquema del testículo humano, donde se muestra el epidídimo, y túbulos seminíferos en los septos. B. Ampliación de un corte transversal de túbulo seminífero, C. Porción ampliada de un túbulo seminífero; conformado por células de la línea germinal en diferentes etapas de desarrollo y células de Sertoli. Fuera del túbulo, en el espacio intersticial, se localizan los fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos, macrófagos, terminaciones nerviosas, tejido conjuntivo laxo y células de Leydig. (Tomado y modificado de: <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>, consultado el 22/04/23).

Células de Leydig

Descritas por primera vez en 1850 por el científico alemán Franz Leydig, se sitúan entre los túbulos seminíferos, son de forma multigonal, con retículo endoplásmico liso, mitocondrias y gotitas de lípidos. Son parte del tejido intersticial, conformado de fibroblastos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, macrófagos, terminaciones nerviosas y tejido conjuntivo laxo. En ellas se lleva a cabo la síntesis de testosterona (Breed & Setchell., 2006; Tremblay., 2015).

Estas células son el componente endocrino del testículo, en ellas se expresan las enzimas que regulan la esteroidogénesis testicular. Entre las hormonas que secretan estas células se encuentran los andrógenos como la testosterona y la dehidroepiandrosterona (Tresguerres *et al.*, 2005).

En ratas y ratones existen dos poblaciones de células de Leydig: fetales y adultas con capacidad de sintetizar andrógenos, mientras que en humanos se ha identificado un grupo adicional, las neonatales. Las células de Leydig fetales tienen forma ovoide y aparecen en el testículo embrionario poco después de la determinación del sexo masculino. Se diferencian durante la gestación. Forman grupos y expresan enzimas esteroides, su actividad de secreción aumenta al final de la gestación y antes del nacimiento. Durante el nacimiento disminuyen su número y son reemplazadas por células de Leydig adultas en las primeras semanas postnatales (Griswold & Behringer., 2009; Inoue *et al.*, 2018). Algunas células persisten en la vida adulta, pero no contribuyen con la producción de andrógenos en el adulto (Figura 2) (Zirkin *et al.*, 2018).

La función principal de las células de Leydig fetales es la secreción de la androstenediona que luego se convierte en testosterona, y estimular así el desarrollo y diferenciación de los genitales internos y externos del feto masculino (Zirkin *et al.*, 2018).

En humanos existe una generación adicional de células de Leydig neonatales durante el período neonatal. Alcanzan un número máximo en los 3 primeros meses de vida, y disminuyen al final del primer año. Desde entonces y hasta la primera década, los testículos están en reposo con ausencia de células de Leydig bien desarrolladas. Sólo están presentes células progenitoras con forma de huso que se diferenciarán en células de Leydig adultas (Ge *et al.*, 2021).

Alrededor del día postnatal 49, las células de Leydig inmaduras se diferencian a adultas, expresan todas las enzimas esteroidogénicas, por lo que son capaces de producir testosterona (Figura 2) (Rouiller-Fabre *et al.*, 1998; Ge *et al.*, 2021).

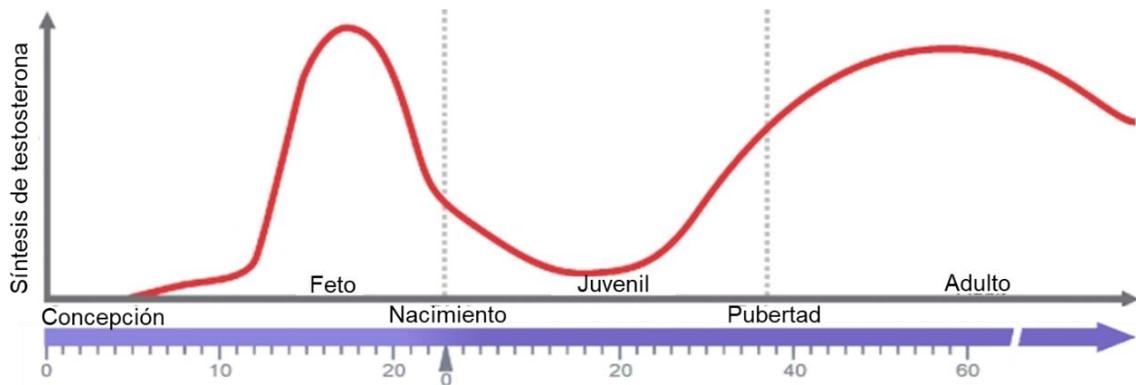


Figura 2. Periodos fetales y adultos de síntesis de testosterona. Las células de Leydig fetales tienen un mayor pico de síntesis de testosterona justo antes del nacimiento, alcanzando un nadir temprano en el periodo postparto. A partir de entonces la producción de testosterona aumenta gradualmente hasta concentraciones elevadas con el desarrollo de las células de Leydig adultas (Tomado y modificado de Zirkin *et al.*, 2018).

Células de Sertoli

Las células de Sertoli se apoyan en la membrana basal y se proyectan hacia el lumen del túbulo. En su citoplasma se encuentran inclusiones de lípidos. Presentan proyecciones citoplasmáticas apicales y laterales, lo que les permite mantener comunicación entre ellas y las germinales (Zomer *et al.*, 2020; Yokinishi *et al.*, 2020).

Estas proyecciones forman uniones y constituyen la barrera hematotesticular que es selectiva para el paso de sustancias del líquido intersticial hacia el interior del túbulo. Esta barrera divide al túbulo en dos compartimientos, el basal y el adluminal (Tresguerres *et al.*, 2005).

Las células de Sertoli son el sostén de las células germinales, regulan la espermatogénesis y fagocitan los cuerpos residuales de citoplasma que se desprenden durante la transformación de la espermátida redonda a espermatozoide (O'Donnell *et al.*, 2022).

Las células de Sertoli y Leydig mantienen una comunicación. Mientras que las células de Leydig fabrican testosterona, la cual actúa sobre las células de Sertoli, las células de Sertoli convierten parte de esta testosterona en estradiol (Boron, *et al.*, 2017). También secretan factores de crecimiento y sustancias que actúan de forma paracrina y autocrina, y mantienen la estructura y funciones testiculares (Huleihel & Lunenfeld., 2004).

Produce el factor del tumor de Wilms (Wt1) y erizo del desierto (DHH), esenciales en la diferenciación, función y mantenimiento de las células de Leydig fetales y adultas, o el factor de fibroblastos 9 (FGF9) y citocinas; necesarios en el aumento de la esteroidogénesis. Por el contrario, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina 1 (IL-1) y la IL-6 la inhiben (Tremblay., 2015).

Además, genera proteínas para la síntesis y la acción de hormonas esteroideas, entre las que se encuentran: 1) la proteína ligadora de andrógenos (ABP), que se une específicamente a los andrógenos para mantener las concentraciones elevadas de testosterona en el testículo. 2) La aromatasa (P-450 aromatasa), enzima que convierte testosterona a estradiol y la 3) Inhibina, que ejerce una retroalimentación negativa sobre el eje hipotalámico-hipofisario-testicular para inhibir la secreción de la FSH (Boron, *et al.*, 2017).

Inervación testicular

Los testículos son inervados por fibras aferentes y eferentes. Principalmente por los nervios espermáticos superior (NES) e inferior (NEI). El NES va desde los plexos mientéricos y renales hacia la arteria testicular, mientras que el NEI, se origina en los plexos pélvico y mesentérico inferior, pasa a lado de los conductos deferentes y penetra en el epidídimo. Las fibras nerviosas llevan hacia el testículo información monoaminérgica (acetilcolina, noradrenalina y serotonina) y peptidinérgica (polipéptido intestinal vasoactivo, sustancia P, calcitonina y galanina), cuya función es modular la acción de las hormonas en los diferentes componentes del testículo y por lo tanto sus funciones (Gerendai *et al.*, 2005).

Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

El mantenimiento de la estructura y funcionamiento del testículo es regulado por el eje hipotálamo-hipófisis. En el hipotálamo se secreta el decapeptido, GnRH. Las neuronas que secretan la GnRH (GnRHérgicas) están distribuidas en el área preóptica hipotalámica anterior (POA) y en el núcleo arqueado. Sus axones se proyectan directamente en la eminencia media, ubicada en el borde inferior del hipotálamo, por encima del tallo hipofisario. En esta región las terminales de las neuronas GnRHérgicas liberan su contenido en la red de vasos sanguíneos del sistema portal que transportan la GnRH hasta el lóbulo anterior de la hipófisis, donde estimula la síntesis de las gonadotropinas FSH y LH (Figura 3) (Jin & Yang., 2014; Boron *et al.*, 2017).

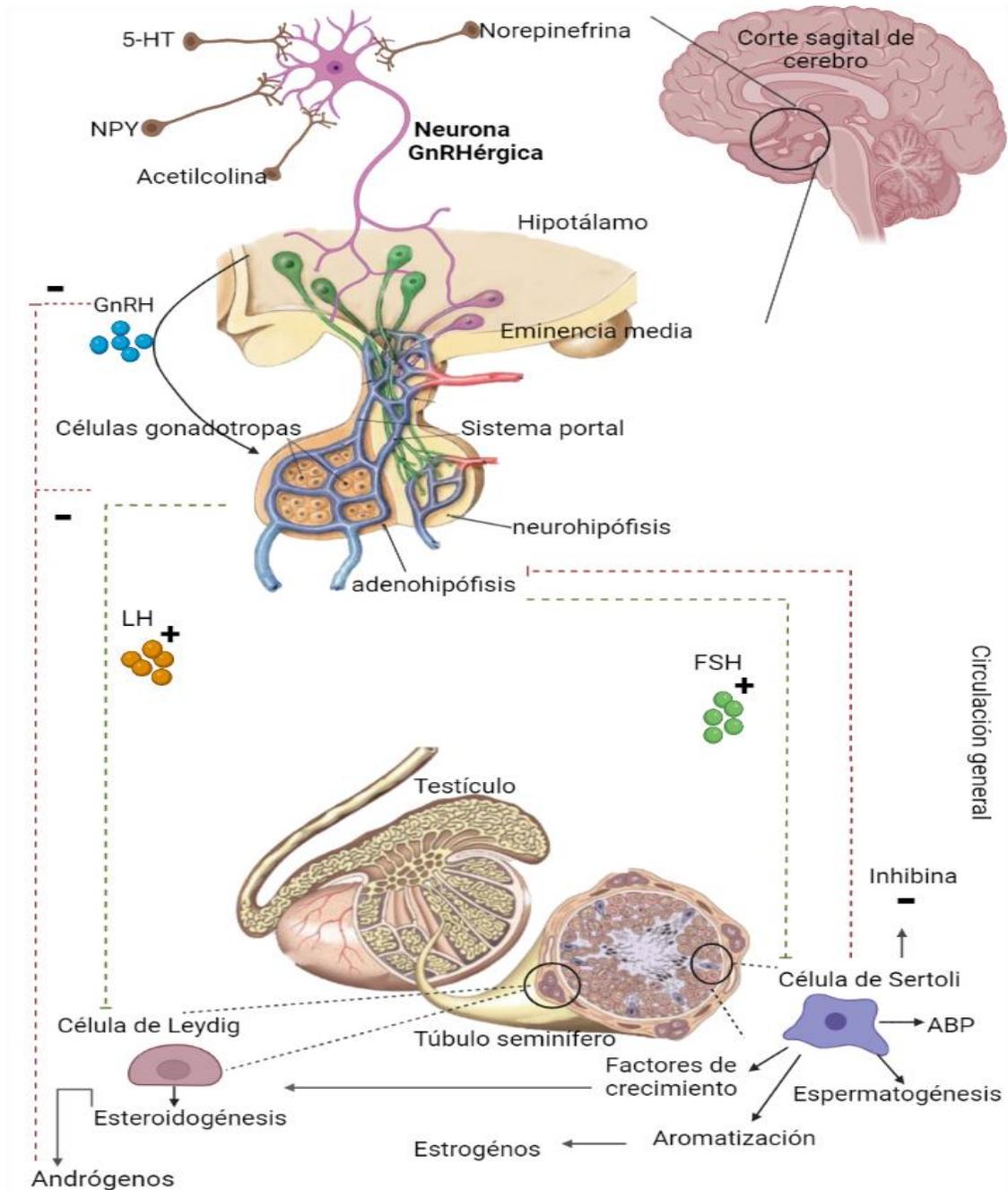


Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La hormona liberadora de gonadotropinas (**GnRH**) se libera al sistema portal, hasta la adenohipófisis, donde modula la liberación de gonadotropinas [hormona estimulante del folículo (**FSH**) y Luteinizante (**LH**)]. Estas salen a circulación general (línea punteada verde) para unirse a sus células blanco (Sertoli y Leydig, respectivamente, ubicadas en el testículo). Regulación positiva (+). La inhibina y andrógenos secretados por el testículo regulan por retroalimentación negativa (-) la inhibición de GnRH, FSH y LH (línea punteada roja). (Tomado y modificado de Guyton & Hall., 2011 y de 7e12e9ce97aa0b9a1e55c46f86ca7aed.jpg (466×600) (pinimg.com) consultado el 02 marzo del 2023).

La unión de la GnRH a sus receptores acoplados a proteína G, en las células gonadotropas de la adenohipófisis activa a la fosfolipasa C, que actúa en la membrana de la célula y transforma el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ estimula la liberación de Ca² desde los depósitos internos, lo que desencadena la liberación de las hormonas FSH y LH a la circulación general (Wada *et al.*, 2006; Jin & Yang., 2014). Ambas hormonas son transportadas hasta su órgano blanco, el testículo, cuyos receptores se localizan en la membrana citoplasmática de las células de Sertoli y Leydig, respectivamente (Jin & Yang., 2014; Boron *et al.*, 2017).

FSH

En la pubertad de los roedores, la FSH favorece la proliferación de las células de Sertoli y determina el número total de estas células en el testículo, así como el volumen testicular en los adultos. Mantiene el número de células germinales y favorece la espermatogénesis, vía la estimulación de las células de Sertoli para que sinteticen proteínas y factores de crecimiento que mantienen la sobrevivencia de las células germinales, favorecen su multiplicación y diferenciación hacia espermatozoides (Santi *et al.*, 2020).

LH

Regula la estructura y morfología de las células de Leydig, además estimula su proliferación y diferenciación, y al unirse con su receptor localizado en la membrana citoplasmática de estas células activa la esteroidogénesis (Figura 4) (Payne & Youngblood., 1995; Inoue *et al.*, 2018).

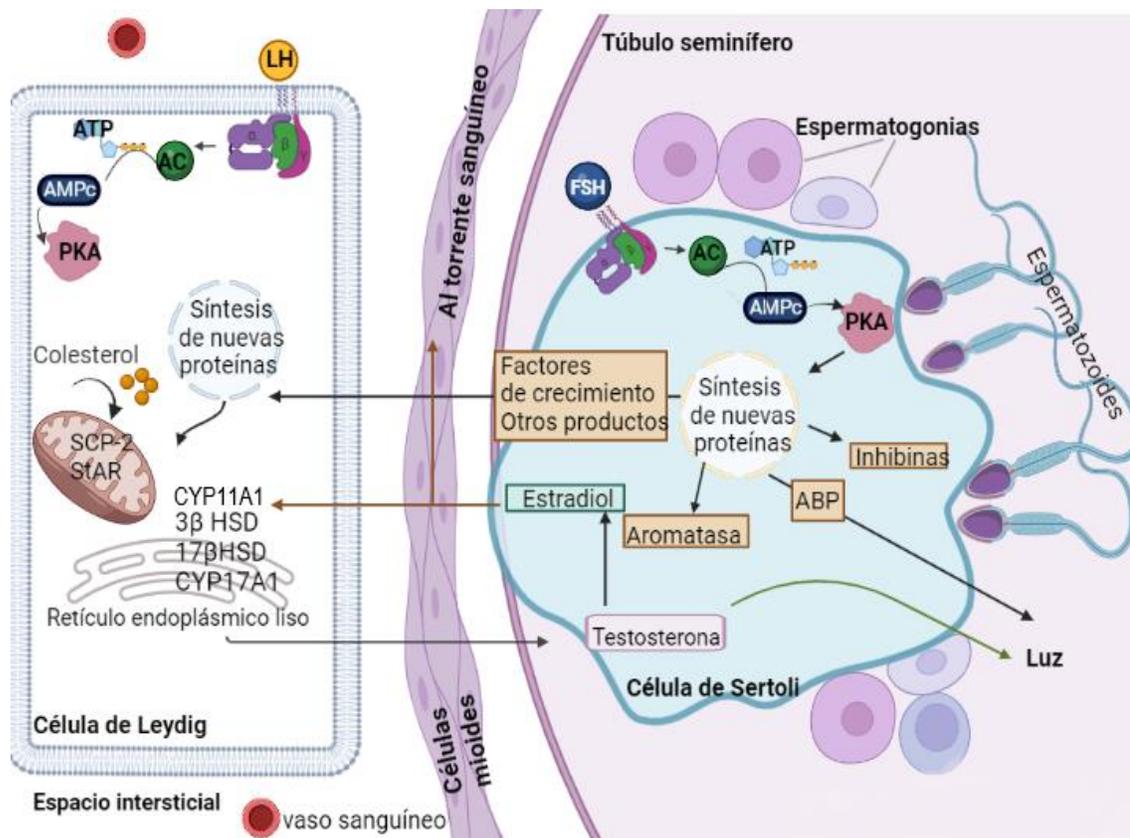


Figura 4. Interacción paracrina entre célula de Leydig y Sertoli. Cuando el ligando hormona luteinizante (LH), se une a las células de Leydig (izquierda) se activa la señalización de segundos mensajeros: el adenilato ciclasa (AC) incrementa el contenido intracelular de adenosina 3',5'-monofosfato (AMPc) a partir de trifosfato de adenosina (ATP), a su vez se activa a la proteína cinasa A (PKA) que activa la síntesis de hormonas esteroideas para la síntesis de andrógenos (testosterona); proteína transportadora de esteroides (SCP-2); proteína reguladora aguda (StAR); 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD); 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD); 17α-hidroxilasa (CYP17A1). La célula de Sertoli (izquierda) expresan receptores para la hormona folículo estimulante (FSH), su unión activa la misma cascada de señalización que las células de Leydig. La FSH favorece la síntesis de proteína ligadora de andrógenos (ABP), aromatasa, factores de crecimiento e inhibina. (Tomado y modificado de [Boron et al., 2017](#)).

En los ratones *Knockout* para la FSH o su receptor, el número de células Leydig, germinales y espermatozoides disminuye. Lo anterior muestra que la deficiencia de FSH o de su acción no induce azoospermia o esterilidad. Mientras que, en los ratones *Knockout* para el receptor de la LH, no producen testosterona y se genera azoospermia, alteración que se revierte cuando se administra testosterona. Lo anterior sustenta que la testosterona es esencial en la producción de espermatozoides ([Santi et al., 2020](#)).

Esteroidogénesis

La esteroidogénesis, es la síntesis y secreción de hormonas esteroides a partir del colesterol. Se produce en las glándulas suprarrenales, placenta, gónadas y SNC. Las hormonas esteroides se clasifican en: 1. mineralocorticoides, 2. glucocorticoides y 3. sexuales, estas últimas incluyen los andrógenos, estrógenos y progesterona (Miller & Auchus., 2011; Gómez-Chang *et al.*, 2012). Los esteroides sexuales son esenciales desde la vida fetal hasta la edad adulta debido a que regulan diferentes aspectos fisiológicos (Miller & Auchus., 2011).

La célula de Leydig obtiene el colesterol de cinco fuentes: 1) lo sintetiza *de novo* en el retículo endoplásmico liso a partir de acetato por acción de la enzima acetil coenzima A (Acetil Co-A); 2) lo capta de las lipoproteínas de baja densidad del líquido extracelular (fuente principal en humanos); 3) por lipoproteínas de alta densidad (principal fuente en roedores); 4) por hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados en el citoplasma de las células de Leydig; 5) y de la membrana plasmática de las células de Leydig (Boron *et al.*, 2017; Zirkin *et al.*, 2018).

La síntesis de esteroides inicia con la unión del colesterol a la proteína transportadora de esteroides (SPC2) y su translocación desde el citoplasma hasta la membrana externa de la mitocondria. Por acción de la proteína esteroidogénica reguladora aguda (StAR), el colesterol es transportado desde la membrana mitocondrial externa a la interna, paso limitante de la esteroidogénesis (Gómez-Chang *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2021). Cuando el colesterol se encuentra en la membrana mitocondrial interna, la enzima citocromo P450_{scc}, por sus siglas en inglés *Cholesterol side cleavage enzyme* (CYP11A1) (Citocromo P450 Familia 11 Subfamilia A1) escinde su cadena lateral en tres reacciones oxidativas secuenciales utilizando O² y NADPH para producir pregnenolona e isocaproaldehído (Ge *et al.*, 2021).

Vía $\Delta 4$ y $\Delta 5$

Todos los esteroides sintetizados en las células de Leydig (ratas, ratones y humanos) necesitan CYP11A1 para la primera catálisis del colesterol a la pregnenolona. En las siguientes reacciones, la síntesis de testosterona se lleva a cabo por dos vías esteroidogénicas, a partir de 17-hidroxi pregnenolona (ruta $\Delta 5$) o de 17-hidroxi progesterona (ruta $\Delta 4$). En roedores la vía que predomina es la $\Delta 4$ (pregnenolona \rightarrow progesterona \rightarrow 17α -hidroxi progesterona \rightarrow androstenediona \rightarrow testosterona). En cambio, en humanos, es la vía $\Delta 5$ (pregnenolona \rightarrow 17α -hidroxi pregnenolona \rightarrow dehidroepiandrosterona \rightarrow androstenediona \rightarrow testosterona) (Ge *et al.*, 2021; Adamczewska *et al.*, 2022).

La mayoría de las enzimas esteroidogénicas se clasifican en dos grupos: las del citocromo P450 (CYP) y las hidroxisteroides deshidrogenasas (HSD) (Payne & Youngblood., 1995). El primer grupo engloba a enzimas oxidativas, denominadas así porque absorben luz a 450 nm en sus estados reducidos. El segundo grupo está conformado por las hidroxisteroides deshidrogenasas (HSD) y cada una de las reacciones que catalizan (reducción u oxidación) se debe a la acción de diferentes isoenzimas (Miller & Auchus., 2011).

3β -hidroxisteroide deshidrogenasa/ $\Delta 5 \rightarrow \Delta 4$ Isomerasa (3β HSD o HSD3B)

Sintetizada la pregnenolona, esta puede ser 17α -hidroxilada por 17α -hidroxilasa para producir 17α -hidroxi pregnenolona, o se convierte en progesterona por acción de 3β -HSD en el retículo endoplásmico liso (Miller & Auchus., 2011).

La 3β -HSD es una enzima de 42 kDa, es parte de la superfamilia de alcohol deshidrogenasas de cadena corta. Existen dos isoformas I (rata) y II (humano). La 3β -HSD cataliza dos vías diferentes para roedor y humano. En el roedor utiliza a la pregnenolona como sustrato para deshidrogenar su grupo 3β -hidroxilo.

Como la pregnenolona tiene un doble enlace entre los carbonos 5 y 6; la actividad isomerasa convierte el doble enlace entre los carbonos 4 y 5 en la progesterona. En humanos, cataliza, 17 α -hidroxipregnenolona y dehidroepiandrosterona, en 17 α -hidroxiprogestero y androstenediona respectivamente (Ge *et al.*, 2021).

17 α -hidroxilasa

17 α -hidroxilasa también llamada P450c17 o CYP17A1 (citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1) se encuentra exclusivamente en el retículo endoplásmico liso de las gónadas; es un marcador específico de las células de Leydig y todas las células que lo expresan se encuentran en la región peritubular (O'Shaughnessy *et al.*, 2009; Zirkin *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2021).

Esta enzima tiene dos actividades: 17 α -hidroxilasa y C17,20-liasa; su acción catalítica depende de la vía Δ 4 o Δ 5. En la Δ 4 cataliza la progesterona a 17 α -hidroxiprogestero por la actividad 17 α -hidroxilasa, posteriormente a androstenediona por C17,20-liasa. Cada reacción requiere coenzima, NADPH. En la Δ 5 17 α -hidroxilasa cataliza la pregnenolona en 17 α -hidroxiprogestero y después en dehidroepiandrosterona. En células MA-10 con nula presencia de 17 α -hidroxilasa, no pueden llevar a cabo las reacciones para sintetizar testosterona por lo tanto el principal producto esteroide producido es la progesterona (Ge *et al.*, 2021).

17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 3 (17 β -HSD3)

Existen diferentes isoformas de 17 β -HSD, sin embargo, en las células de Leydig de la rata, el ratón y el humano se sintetiza la isoforma 3 (17 β -HSD3) (Ge *et al.*, 2021). Pertenece a la familia de las HSD, enzimas que catalizan las reacciones de óxido-reducción de alcoholes o carbonilos utilizando NAD(P)H o NAD(P) como cofactor.

Esta enzima cataliza la última reacción de la biosíntesis de la mayoría de los estrógenos y andrógenos activos, como el estradiol (E2), 5-androsteno-3 β , 17 β -diol (Δ 5-diol), testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) (Poirier., 2003). La deficiencia de 17 β -HSD, provoca reducción en la transformación de androstenediona a testosterona (Folsom *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2021).

Una vez que se sintetiza la testosterona, sale de la célula de Leydig y difunde al líquido intersticial donde se une a la proteína unidora de los andrógenos (ABP), secretada por las células de Sertoli. La testosterona unida a la ABP se transporta a los túbulos seminíferos y al epidídimo (Berne & Levy., 2009). En la circulación general, la testosterona se une a proteínas plasmáticas. En el humano, hay dos tipos: globulina fijadora de hormonas sexuales y albúmina (Folsom *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2021).

En los testículos, las células de Leydig secretan pregnenolona, progesterona, 17-hidroxiprogesterona, androstenediona, androsterona, DHT y testosterona. Esta última es el principal andrógeno en el testículo del macho (humano y roedor) y su concentración es de 25 a 125 veces mayor que en suero. También excede la concentración de DHT de 15 a 40 veces (Boron *et al.*, 2017; Walker., 2021).

La testosterona actúa en el testículo, como regulador paracrino/autocrino, y por lo tanto participa en la regulación de sus funciones. La acción de la testosterona en sus células blanco es mediada por su unión al receptor de andrógenos (AR) nuclear. Se difunde a través de la membrana plasmática de las células para interactuar con el AR intracelular. La testosterona también es necesaria durante el desarrollo del aparato reproductor del macho ya que finaliza el descenso testicular hacia el escroto. En roedores y humanos con insensibilidad a los andrógenos, el testículo permanece en el canal inguinal o en la ingle (Halpern & Brannigan., 2019; Walker., 2021).

La concentración de testosterona alta es esencial en la masculinización del cerebro del macho, en el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, la proliferación y función

de las células de Leydig, también regula la expresión de varios genes que codifican para la síntesis de algunas proteínas de la esteroidogénesis; además de ser un factor de supervivencia en las células germinales, ya que su ausencia induce muerte por apoptosis. Cuando disminuye la síntesis de testosterona o su acción por bloqueo de sus receptores, la concentración intratesticular de este andrógeno también disminuye (Tremblay., 2015; Folsom *et al.*, 2018).

Regulación de la esteroidogénesis

La presencia de proteínas y enzimas involucradas en la síntesis de los andrógenos es regulada por la estimulación crónica de las células de Leydig por la LH. La producción insuficiente o excesiva modifica la síntesis de testosterona (Zirkin *et al.*, 2018).

La unión de la LH a su receptor, compuesto de 7 dominios transmembranales y acoplado a la proteína G, activa varias vías de señalización independientes: 1.-proteína cinasa dependiente de calmodulina (PKC), 2.- iones de cloruro y calcio, 3.- metabolitos derivados del ácido araquidónico, 4.- proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y 5.- del AMPc/cíclico (PKA), siendo esta la principal (Berne & Levy., 2009; Gómez-Chang *et al.*, 2012).

Cuando no se expresa el receptor a la LH, las proteínas G son inactivas. Cuando la LH activa sus receptores se incrementa el contenido intracelular de adenosina 3',5'-monofosfato (AMPC) a partir de trifosfato de adenosina (ATP) (Lei *et al.*, 2001). El AMPc estimula a su vez a la proteína cinasa A (PKA), que fosforila proteínas involucradas en el transporte vesicular y no vesicular de colesterol plasmático hacia la mitocondria para convertirse en testosterona (Berne & Levy., 2009).

En roedores y humanos la concentración de testosterona disminuye progresivamente con el envejecimiento debido a la reducción de la LH y a la capacidad de respuesta de las células de Leydig a esta. La LH disminuye para mantener la homeostasis como resultado del mecani-

smo de regulación de retroalimentación hipotalámica-hipofisiaria-testicular. Su deficiencia ocasiona infertilidad, retraso en el inicio de la pubertad y anomalías reproductivas (Figura 5) (Kazmi & Can., 2022).

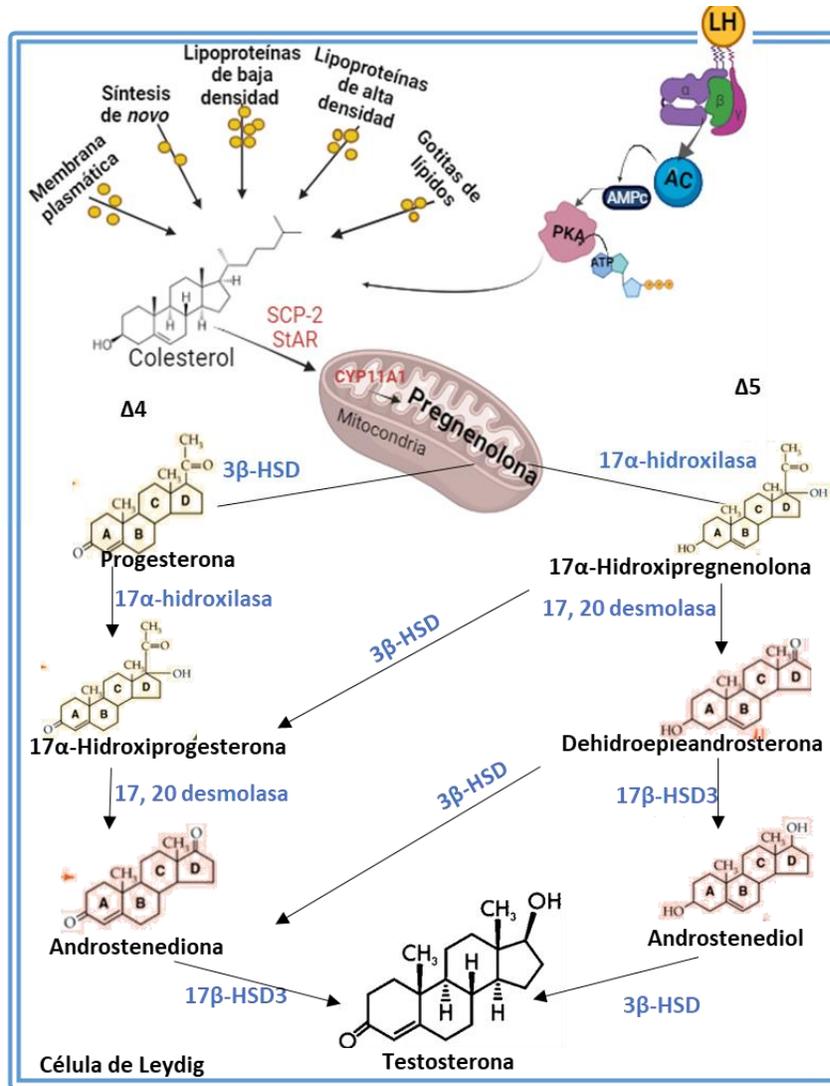


Figura 5. Esteroidogénesis testicular, llevada a cabo por las células de Leydig. La síntesis de testosterona puede ocurrir por dos vías conocidas como $\Delta 4$ y $\Delta 5$. En el humano, a diferencia del roedor, la vía predominante para la síntesis de testosterona es la $\Delta 5$. Cuando el ligando hormona luteinizante (LH), se une a las células de Leydig se activa la señalización de segundos mensajeros: el adenilato ciclasa (AC) incrementa el contenido intracelular de adenosina 3',5'-monofosfato (AMPc) a partir de trifosfato de adenosina (ATP), a su vez se activa a la proteína cinasa A (PKA) que activa la síntesis de hormonas esteroideas para la síntesis de andrógenos (testosterona); proteína transportadora de esteroides (SCP-2); proteína reguladora aguda (StAR); 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD); 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD); 17α-hidroxilasa (CYP17A1) (Tomado y modificado de Zirkin *et al.*, 2018).

Historia de la serotonina

En 1937, el farmacólogo y fisiólogo Italiano Vittorio Erspamer y el profesor Maffu Vialli aislaron una sustancia a partir del extracto de células enterocromafines de la mucosa gástrica del conejo. Dicha sustancia inducía la contracción de la musculatura lisa en el ratón y fue llamada enteramina ya que fue extraída del tracto gastrointestinal y por su estructura, que es una amina (Göthert., 2013).

En 1949 Maurice M. Rapport, aisló a la amina en la sangre, identificó su estructura química, demostrando que era la misma molécula que la enteramina. La denominó 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina; (por ser aislada del suero, y por su acción vasoconstrictora), y químicamente se define como una amina biógena (Göthert., 2013,2020; Bader., 2019).

Sistema serotoninérgico

La serotonina actúa como neurotransmisor en el SNC y como hormona en tejidos periféricos. En el SNC, la mayoría de las neuronas serotoninérgicas se localizan en nueve grupos identificados del B1 a B9 y que conforman el núcleo del rafe, y que se divide en: dorsal (DRN), medial (MRN) y del puente (PRN) (Commons., 2020). Las proyecciones de las neuronas serotoninérgicas que se origina en el DRN y MRN terminan en el hipotálamo, regiones corticales, límbicas, mesencefálicas y en el cerebro posterior. En tejidos periféricos, la serotonina es sintetizada principalmente por células enterocromafines y neuronas intestinales, ubicadas en el sistema gastrointestinal (GI) (Siegel *et al.*, 2012; Guzel., 2022). También se encuentra en las paredes de los vasos sanguíneos, células inmunitarias, pulmones, corazón y gónadas de hembra y macho. Cumple las funciones de factor hormonal, autocrino o paracrino (Tinajero *et al.*, 1993; Guzel., 2022). La serotonina se distribuye por todo el cuerpo vía el sistema plaquetario, aunque estas no la sintetizan la acumulan por un mecanismo de transporte activo que se encuentra en la membrana (Pourhamzeh *et al.*, 2022).

La serotonina de la periferia no cruza la barrera hematoencefálica debido a su disociación

ácida, por lo que la serotonina central es completamente independiente de la periférica (Kanova & Kohout., 2021; Ślifirski *et al.*, 2021). La serotonina participa en la modulación de diferentes funciones fisiológicas como: las emociones, memoria, atención, apetito, agresión, comportamiento sexual, regulación térmica, ciclos de sueño-vigilia y los ritmos circadianos (Ślifirski, *et al.*, 2021).

Síntesis de serotonina

El aminoácido esencial triptófano (Trp) es el precursor en tres vías metabólicas: quinurenina, indol y serotonina. En la vía de síntesis de la serotonina, el Trp es el único precursor. Su disponibilidad depende de la ingesta en la dieta de alimentos proteicos como: leche, atún, pavo, avena, queso, nueces y semillas. Una vez que el Trp es absorbido y se encuentra en la circulación periférica, puede unirse a la albúmina, solubilizarse libremente o ingresar al SNC a través del transportador de aminoácidos de tipo L (LAT1/Lat1) responsable de transportar aminoácidos neutros grandes a través de la barrera hematoencefálica (Kanova & Kohout., 2021; Guzel *et al.*, 2022).

La mayor parte de la producción de serotonina ocurre en las células enterocromafines de la mucosa intestinal (95%) y, en menor medida en el SNC (5%). El Trp es hidroxilado por la triptófano-hidroxilasa (TPH) en el C5 del anillo aromático y forma el 5-hidroxitriptófano. Para llevar a cabo esta reacción utiliza Fe^{2+} como cofactor y O^2 y tetrahidrobiopterina (BH^4) como cosustratos (Walther & Bader., 2003; William *et al.*, 2021). El 5-hidroxitriptófano es descarboxilado por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) que requiere piridoxal-fosfato como cofactor y da lugar a la formación de la serotonina (Walther & Bader., 2003).

La TPH pertenece a la familia de aminoácidos aromáticos hidroxilasas (AAAH). Existen dos isoformas de la TPH (1 y 2). En la periferia se expresa la TPH1, mientras que en el SNC y sistema nervioso entérico se expresa TPH2 (Ślifirski *et al.*, 2021; William *et al.*, 2021). La TPH es la enzima limitante de la síntesis de serotonina debido a: 1) tiene una K_m (constante

de Michaelis-Menten) alta (3×10^{-5} M); 2) no tiene afinidad por otros aminoácidos; y 3) es específica para las células serotoninérgicas (Walther & Bader., 2003; Jones *et al.*, 2020).

Una vez que la serotonina es liberada en la hendidura sináptica puede participar como intermediaria en la síntesis de melatonina (principal regulador endógeno de la iniciación del sueño y los ritmos circadianos), dentro de la glándula pineal o ser recaptada por el transportador de serotonina (SERT o 5-HTT), para ser reciclada o metabolizada (Ślifirski *et al.*, 2021; Pourhamzeh *et al.*, 2022).

Transportador de serotonina (SERT)

La SERT es una proteína de membrana, que está formada por doce dominios y dos terminales citoplasmáticas y tiene un peso molecular de ~71 kDa. Pertenece a la familia de transportadores dependientes de Na^+/Cl^- . La serotonina libre en el espacio sináptico se une a la SERT para su recaptura y transporte a la neurona presináptica (Figura 6) (Rudnick *et al.*, 1992; 1993).

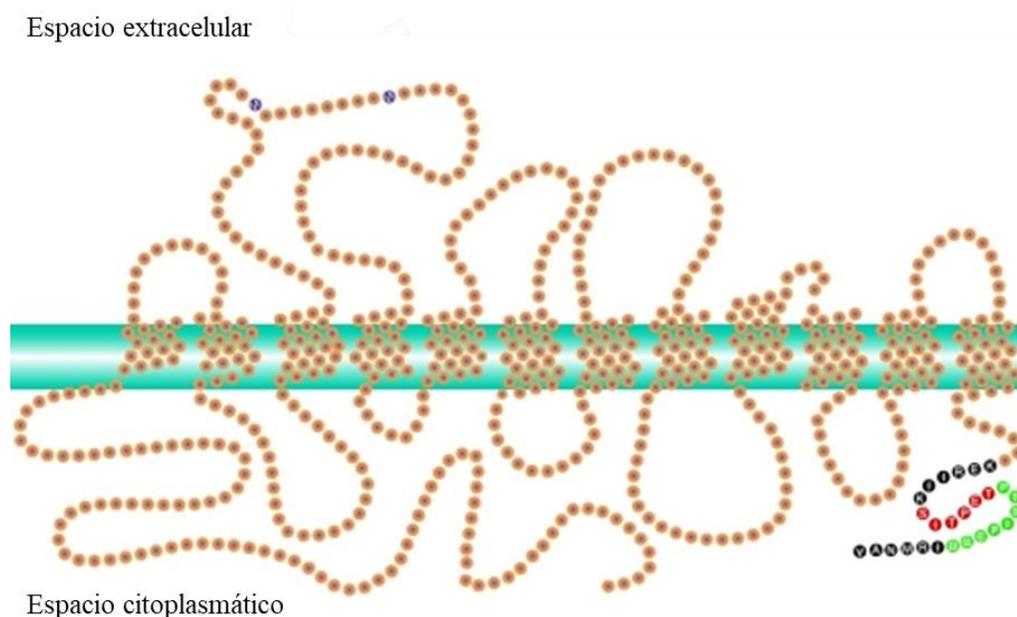


Figura 6. Integración de SERT en la membrana plasmática. Se compone de doce dominios membranales y dos asas citoplasmáticas (Tomado y modificado de Mercado *et al.*, 2010).

La recaptura de serotonina por este transportador depende de la concentración de iones K^+ en el citoplasma y Na^+ y Cl^- extracelulares. Primero, una molécula de Na^+ , seguido de una molécula de serotonina y ion Cl^- se unen a la SERT; el potencial de membrana creado por la adenosina trifosfatasa de sodio-potasio, provoca que el SERT adopte una conformación abierta hacia el citoplasma, liberando las moléculas unidas. Después de la liberación de serotonina, un ion K^+ se une al transportador, devolviéndolo a su estado activo (Mercado & Kilic., 2010; Wang *et al.*, 2013).

La recaptura de serotonina por las células depende del número de moléculas de SERT expresadas en su membrana plasmática; también las concentraciones de serotonina extracelulares regulan la presencia de la SERT. Cuando las células serotoninérgicas están expuestas a concentraciones altas de serotonina aumenta la presencia de la SERT y por ende su recaptura. Sin embargo, cuando se expone a concentraciones cada vez más altas provoca que la SERT disminuya por debajo de la expresión basal, limitando así su disponibilidad (Ramamoorthy *et al.*, 1993).

La serotonina recapturada se almacena en vesículas en las neuronas presinápticas, para evitar su degradación, a través de la isoforma 2 del transportador vesicular de monoaminas (VMA T2), donde permanece hasta que se despolariza la terminal por acción del influjo de Ca^{2+} , provocando su liberación a la hendidura sináptica y su unión a receptores postsinápticos y autorreceptores presinápticos (Cataldo *et al.*, 2014; William *et al.*, 2021).

Se han caracterizado 14 receptores para la serotonina en función de sus propiedades farmacológicas y estructurales. Median los efectos de la serotonina endógena que se une a ellos como ligando, y de una amplia gama de fármacos y psicoactivos. Se agrupan en tres familias; los receptores 5-HT₁, 5-HT₂ y la familia que incluye los receptores 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇. Estos están acoplados a la proteína G, con excepción del 5-HT₃, que es un canal iónico de múltiples subunidades. Los receptores para la serotonina inducen proliferación, apoptosis y diferenciación en neuronas y células somáticas (Ślifirski *et al.*, 2021).

La serotonina es degradada por la monoamino oxidasa (MAO). Hay dos isoformas de MAO (MAO-A y MAO-B) ambas catalizan la degradación de serotonina, noradrenalina, y dopamina (Yeung *et al.*, 2019). Es dependiente del cofactor de flavina adenina dinucleótido (FAD) y se localiza en la membrana externa mitocondrial. La MAO cataliza la desaminación oxidativa de la 5-HT para producir el aldehído mediante la reducción del dinucleótido de flavina y adenina (FAD) a FADH², seguido de la conversión del aldehído en ácido carboxílico a través del aldehído deshidrogenasa ALDH y formar el metabolito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), este se transporta activamente desde el SNC a la periferia y se excreta principalmente en la orina (Figura 7) (Kanova & Kohout., 2021; Ślifirski *et al.*, 2021).

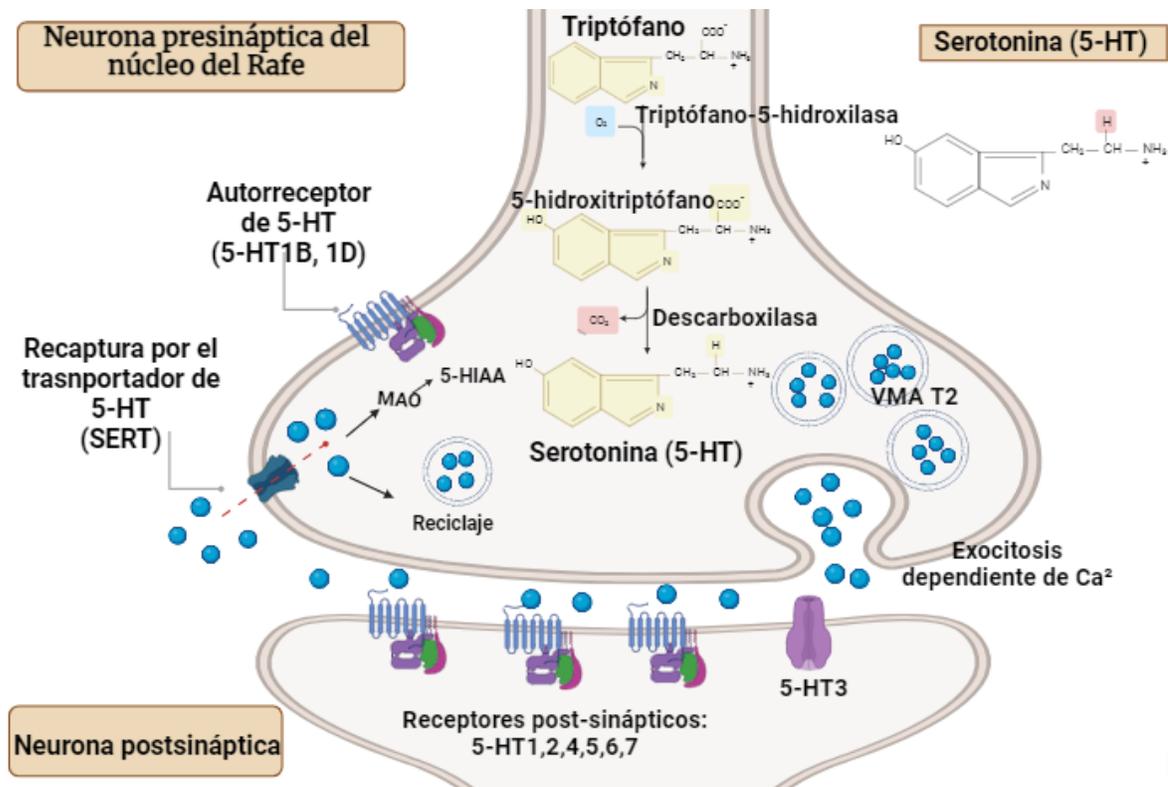


Figura 7. La serotonina (**5-HT**) (círculos azules) es sintetizada en dos reacciones catalíticas a partir del aminoácido esencial triptófano (**Trp**). El influjo de Ca^{2+} la libera a la hendidura sináptica, donde se une a los receptores postsinápticos (**5-HT 1,2,3,4,5,6,7**). El exceso de esta amina es recapturado por el transportador de 5-HT (**SERT**). Puede ser almacenada a través de la isoforma 2 del transportador vesicular de monoaminas (**VMA T2**) para evitar su degradación o puede ser metabolizada en las mitocondrias por acción de la monoamina oxidasa (**MAO**) hasta formar el metabolito ácido 5-hidroxiindolacético (**5-HIAA**). (Tomado y modificado de López-Echeverri., 2021).

Serotonina y esteroidogénesis en el testículo

La serotonina está presente en los compartimentos de la gónada masculina de la rata, en las células de Leydig, en la cápsula testicular, de las células mioides peritubulares, en los túbulos seminíferos y en las células de la línea germinal (Campos *et al.*, 1990).

Al igual que la serotonina, otros componentes serotoninérgicos se expresan en la gónada del macho. Tales como las enzimas encargadas de su síntesis y metabolismo (TPH1 y MAO, respectivamente). La primera se encuentra principalmente en células de Leydig, y en menor

medida en la membrana basal tubular y células espermatogoniales. A diferencia de MAO, que se expresa principalmente en la pared tubular, citoplasma de las células de Sertoli y células germinales maduras e inmaduras (Campos *et al.*, 1990; Tinajero *et al.*, 1993). También se expresan receptores a serotonina (5-HT1B, 2A, y 3A) y proteínas encargadas de su transporte [el SERT y transportador vesicular de monoaminas (VMAT1)], (Jiménez-Trejo *et al.*, 2021).

La presencia de dichos marcadores, indican un sistema serotoninérgico local en los testículos de la rata. Además de la síntesis de serotonina intratesticular, otras fuentes de la amina son la inervación serotoninérgica que transcurre por los NES y NEI; así como la que se encuentra almacenada y es liberada en el espacio intersticial por los mastocitos y plaquetas (Tinajero *et al.*, 1993; Csaba *et al.*, 1998). El NES es una fuente importante de serotonina del testículo, debido a que cuando se secciona, disminuye la concentración de serotonina en la cápsula testicular y el espacio intersticial (Campos *et al.*, 1990).

La concentración de serotonina en el testículo varía durante el desarrollo, en la rata es mayor en el nacimiento y disminuye en la etapa adulta (Campos *et al.*, 1990). En relación con esto, en ratas prepúberes la administración de serotonina estimula la producción de testosterona, participa en la modulación de la espermatogénesis y el tamaño testicular; mientras que en ratas adultas causa atrofia testicular e inhibición en la síntesis de testosterona (Figura 8) (Tinajero *et al.*, 1992; Dufau *et al.*, 1993; Csaba, *et al.*, 1998).

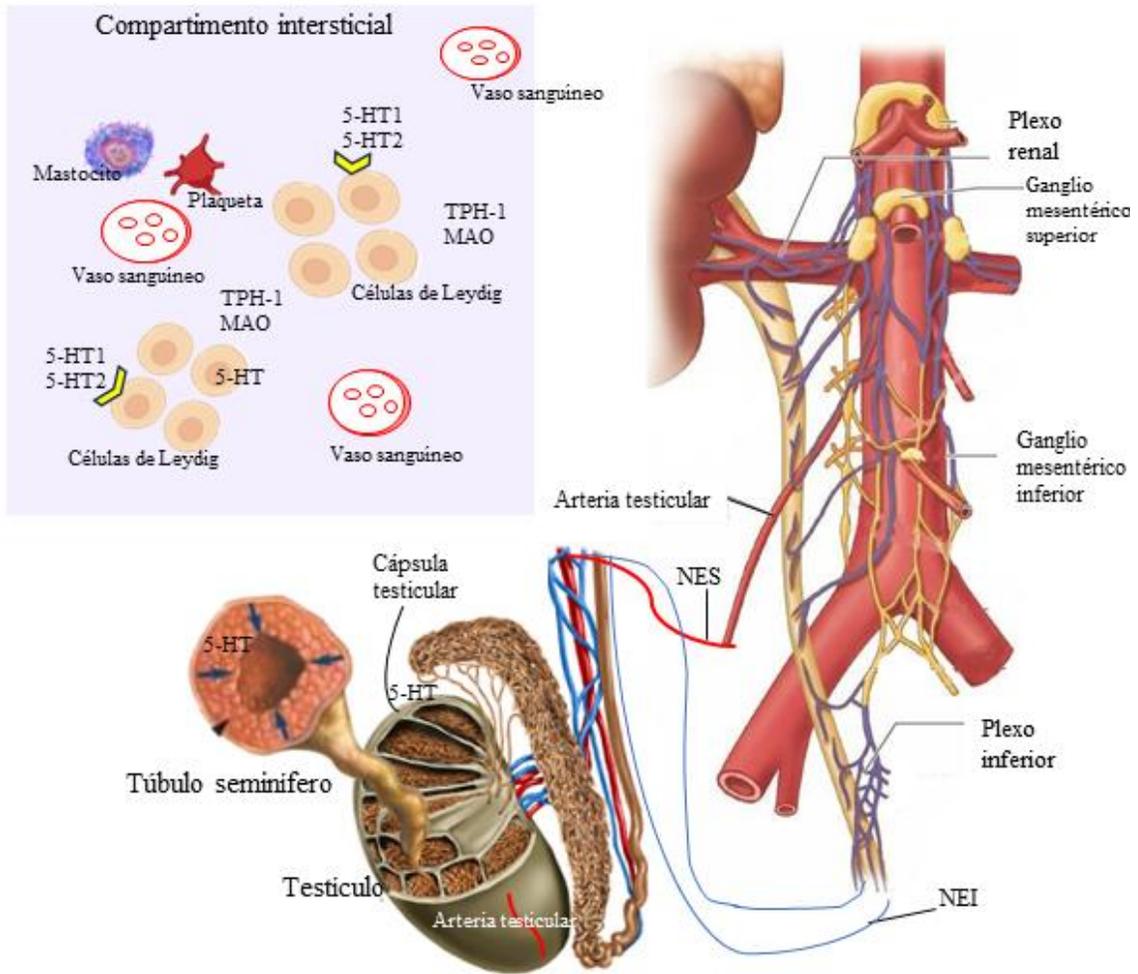


Figura 8. Componentes del sistema serotoninérgico en el testículo. Serotonina (**5-HT**), nervio espermático superior (**NES**), nervio espermático inferior (**NEI**), triptófano hidroxilasa 1 (**TPH-1**), receptores a serotonina (**5-HT1** y **5-HT2**), monoamina oxidasa (**MAO**). (Campos *et al.*, 1990 ; Dufau *et al.*, 1993 ; Tinajero *et al.*, 1993 ; Frungieri *et al.*, 2002).

Anfetaminas y p-Cloroanfetamina (pCA)

Las anfetaminas y sus derivados modifican la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión, entre ellos el serotoninérgico (Schenk & Highgate., 2021). Son sustancias estimulantes, a nivel mundial ocupan el segundo lugar de consumo y son catalogadas como drogas ilícitas. Derivan de la efedrina, descubierta por Barger y Dale en 1910, y sintetizada por primera vez en 1927 por el químico, G. A. Alles.

En 1935 se introdujo en el mercado la forma comercial: Benzedrine, por Smith, Kline y French; como tratamiento para la narcolepsia, depresión leve, y mal comportamiento. Desde 1937, hasta la fecha se receta a niños, jóvenes y adultos con trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) (Heal *et al.*, 2013; Siefried *et al.*, 2020).

Entre los derivados sintéticos de la anfetamina, se encuentra la droga recreativa el 3,4-metilendioxitimetanfetamina (MDMA), conocida como éxtasis, Adam, XTC o Molly. En 1985 fue clasificada como ilegal (incluida en la Lista I del Convenio de las Naciones Unidas sobre Sustancias Sicotrópicas) por tener "alto potencial de abuso y ningún valor médico" (Simmler & Liechti., 2018; Pantoni & Anagnostaras., 2019). En ratas causa neurotoxicidad, pérdida neuronal y reducciones significativas en los marcadores bioquímicos de la actividad serotoninérgica, cuyos efectos pueden durar meses o años (Papaseit *et al.*, 2020; Capela & Carvalho., 2022).

El MDMA, al igual que su derivado, la p-Cloroanfetamina (pCA) son neurotóxicos selectivos del sistema serotoninérgico. El mecanismo por el cual inducen sus efectos tóxicos es por la formación de metabolitos como la 5,6 dihidroxitriptamina (5,6-DHT), p-cloronorefedrina y 3,4-dimetoxianfetamina que activan la formación de radicales libres, generando estrés oxidativo y daño a las membranas plasmáticas de neuronas serotoninérgicas (Figura 9) (Colado *et al.*, 1997).

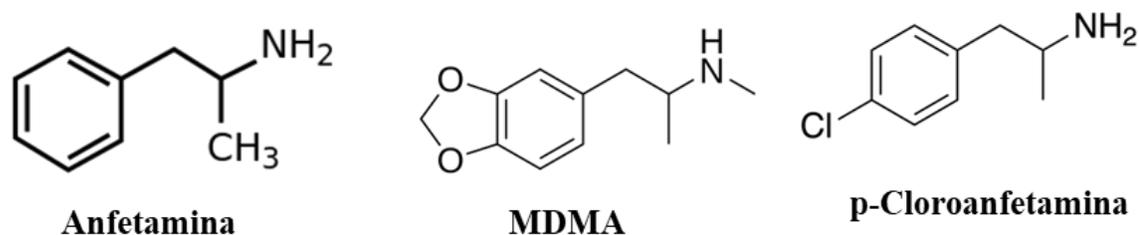


Figura 9. Estructura química de la Anfetamina, MDMA y p-Cloroanfetamina (Tomado y modificado de Reiff *et al.*, 2020).

Anfetaminas, pCA y SERT

La SERT es una proteína blanco de los derivados de las anfetaminas, como el MDMA y la pCA; así como de múltiples fármacos de uso terapéutico que incluyen inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN) y antidepresivos tricíclicos (ATC) (Wang *et al.*, 2013).

La pCA disminuye la presencia del SERT y modula su actividad. Este derivado de las anfetaminas se une al SERT, lo que causa la liberación de serotonina a la hendidura sináptica, y por ende el bloqueo de su recaptura. En consecuencia, la serotonina se une por más tiempo a los receptores presinápticos y postsinápticos (Coleman *et al.*, 2019; Tsai *et al.*, 2022).

La administración de pCA en ratas causa efectos a corto y largo plazo. En las primeras 24 h aumentan la liberación de serotonina en la terminal presináptica. (Sanders-Bush & Steranka., 1978). A largo plazo provoca la reducción y degeneración de los somas, axones y terminales serotoninérgicos; disminuye la actividad de TPH y la inhibición de MAO, lo que conduce a la reducción de su síntesis y metabolismo (Figura 10) (Colorado *et al.*, 1999).

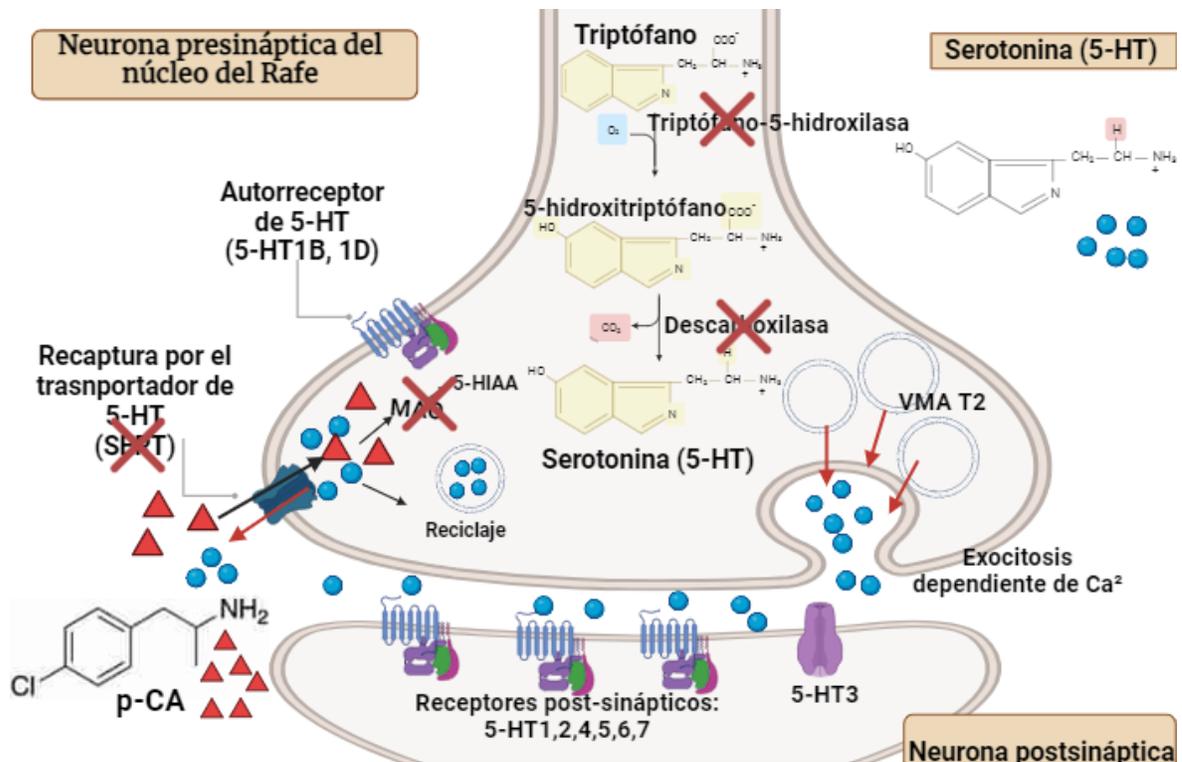


Figura 10. Acción de la pCA en el sistema serotoninérgico. La administración de pCA (Δ) en ratas causa efectos a corto y largo plazo. En las primeras 24 h aumentan la liberación de serotonina en la terminal presináptica (\downarrow). A largo plazo provoca la reducción y degeneración de los somas, axones y terminales serotoninérgicos; disminuye la actividad de TPH y la inhibición de MAO, lo que conduce a la reducción de su síntesis y metabolismo (\times)

Anfetaminas, pCA y testículo

La pCA modifica las funciones reproductivas del macho debido a su acción en el sistema serotoninérgico del SNC y en los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La microinyección con la neurotoxina selectiva del sistema serotoninérgico; 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) a ratas de 30 días de edad; provoca la disminución de serotonina en el hipotálamo, de FSH sérica y la desregulación el ciclo espermatogonial (Díaz-Ramos *et al.*, 2018). Aunado a esto, la interrupción continua de la síntesis de serotonina por la inyección intraperitoneal de 10 mg/kg de pCA en ratas; desde los 30 y hasta los 45 o 65 días de edad, provoca la disminución en el número de células germinales y aumento de apoptosis en estas células, anomalías morfológicas en espermatozoides, además de inducir

daño en los túbulos seminíferos; y reducir las concentraciones de serotonina en el hipotálamo anterior y medio (Aragón *et al.*, 2005). Estas evidencias llevaron a proponer que el sistema serotoninérgico del hipotálamo es esencial en la regulación de las funciones testiculares.

Además de la alteración en la espermatogénesis, la exposición a anfetaminas también modifica la función de las células de Leydig *in vitro*, ocasionando la disminución de la secreción de testosterona; esto se debe a que se modifica la vía del AMPc y disminuye la actividad de las enzimas esteroides (17α -hidroxilasa, 3β -HSD y 17β -HSD) (Tsai *et al.*, 1997; Díaz-Ramos *et al.*, 2018).

Planteamiento del problema

En el testículo, la esteroidogénesis y la espermatogénesis son reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis, vía la producción de la GnRH y de las gonadotropinas, respectivamente. Este eje y la gónada son regulados por la serotonina que estimula la secreción de testosterona, esencial en el mantenimiento de la estructura del testículo. Actualmente se desconoce si la serotonina modula a las enzimas que regulan la esteroidogénesis testicular. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la inhibición del sistema serotoninérgico, inducido por la administración de la p-Cloroanfetamina (pCA) en la concentración sérica de progesterona y testosterona, en la presencia de la proteína SERT y en las enzimas esteroides 17α -hidroxilasa y 17β -HSD, utilizando como modelo de estudio a la rata macho de 30 días; edad que se correlaciona con la etapa de pubertad en humanos. Actualmente se consumen los derivados de las anfetaminas como drogas recreacionales, a edades cada vez más tempranas, que va desde los 12 años en adelante.

Pregunta de investigación

¿La pCA modifica la esteroidogénesis en el testículo de la rata prepúber vía la inhibición de la presencia de la proteína SERT y de las enzimas 17α -hidroxilasa y 17β -HSD?

Hipótesis

La serotonina es esencial en la esteroidogénesis testicular, por ello, la inhibición de este sistema inducirá la desregulación de la presencia de la proteína SERT, de las enzimas esteroidogénicas 17α -hidroxilasa, y 17β -HSD3 lo que resultará en la disminución de la síntesis de progesterona y testosterona.

Objetivo general

Analizar el efecto de la administración de pCA en la concentración sérica de progesterona y testosterona y en la presencia de la proteína SERT, las enzimas 17α -hidroxilasa y 17β -HSD en el testículo de la rata macho prepúber.

Objetivo particular

Identificar las regiones del compartimento intersticial de la rata prepúber donde se expresa la proteína SERT y de las enzimas 17α -hidroxilasa y 17β -HSD.

Evaluar y analizar la presencia de la SERT y de las enzimas 17α -hidroxilasa y 17β -HSD en el testículo de la rata prepúber tratada con pCA.

Cuantificar las concentraciones de progesterona y testosterona de la rata macho prepúber tratada con pCA.

Material y métodos

Se utilizaron ratas macho prepúber de la cepa CII-ZV de 30 días de edad, mantenidas en condiciones controladas de iluminación, (14 h luz/10 h oscuridad), y temperatura (22 ± 2 °C); con acceso al alimento y agua *ad libitum*, se destetaron a los 21 o 22 días de vida. Las ratas se asignaron al azar en tres grupos (n=8); 1) grupo sin tratamiento o testigo absoluto (TA); 2) grupo tratado con solución salina (NaCl) al 0.9% como vehículo (Vh); y 3) grupo tratado con p-Cloroanfetamina (pCA) (10 mg/Kg de peso corporal Merck-Sigma Aldrich St. Louis, USA) disuelta en solución salina (NaCl) al 0.9%. La dosis de pCA que se utilizó fue con base en lo reportado por (Sanders-Brush *et al.*, 1975). Se administró por vía intraperitoneal una dosis única de solución salina o pCA. El trabajo experimental se realizó bajo la Norma Oficial Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999).

Tres animales de los diferentes grupos experimentales se autopsiaron a las 120 h (35 días de edad) por anestesia con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso corporal, Smith Kline Norden of México, Monterrey, NL) y se realizó la perfusión. Se extrajeron los testículos en los que se identificó por inmunohistoquímica las proteínas, SERT, 17 α -hidroxilasa y 17 β -HSD. Cinco animales de los diferentes grupos experimentales se autopsiaron por decapitación a las 48 o 120 h postratamiento (32 o 35 días de edad), para la obtención de sangre en donde se realizó la cuantificación de progesterona y testosterona, así como los testículos para la evaluación por Western blot de las proteínas arriba indicadas (Figura 11).

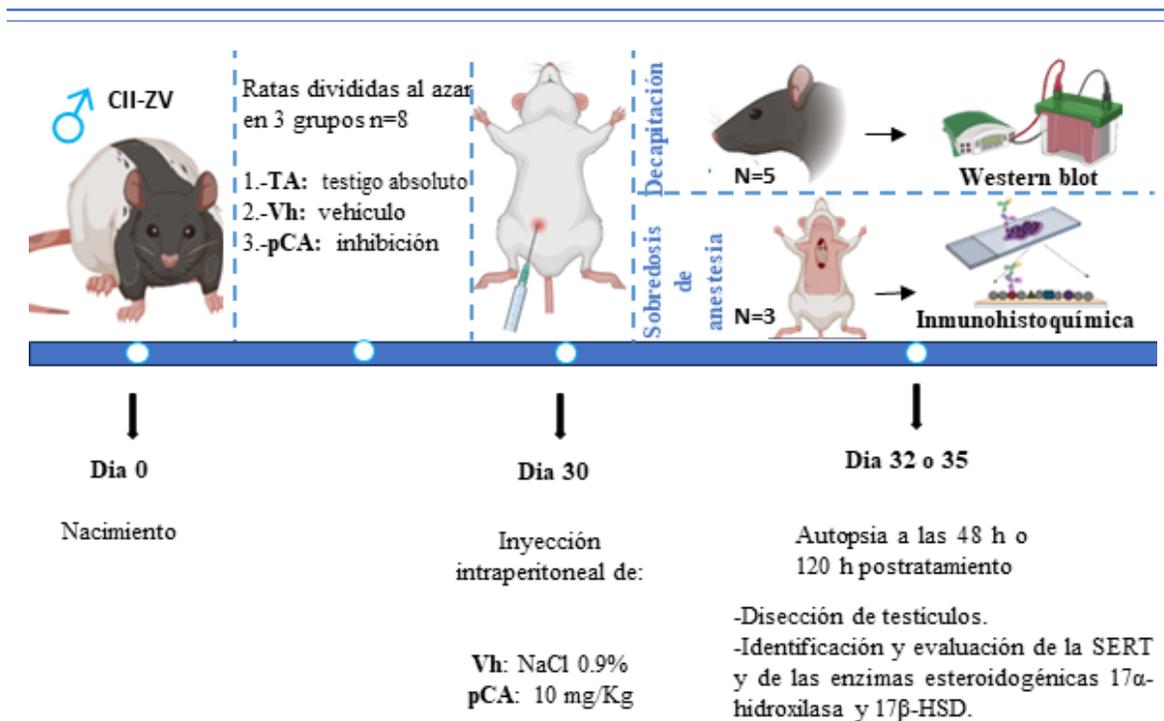


Figura 11. Etapas del diseño experimental.

Perfusión

El animal anestesiado con pentobarbital sódico se colocó en una tabla de cirugía boca arriba, se cortó la piel y músculo a la altura de la caja torácica. Posteriormente se exteriorizó el corazón y se introdujo en el ventrículo izquierdo una aguja conectada a una bomba de perfusión de flujo variable (Mini-pump variable flow, control company, USA). Inicialmente se perfundieron 150 mL de solución salina al 0.9 % y posteriormente 150 mL de paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato de sodio, pH 7.4 (Merck -Sigma Aldrich St. Louis, USA). El flujo de perfusión de ambas soluciones fue de 8 mL/min. Concluida la perfusión, se extrajo y disecó ambos testículos (Figura 12). Se postfijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% por 48 h; posteriormente se colocaron en sacarosa al 15% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (JT Baker, México) por 48 h a 4°C, y finalmente en alcohol 70% (JT Baker, México) hasta su inclusión en bloques de Paraplast® (Leica Biosystems, IL, USA) (Figura 13 A).

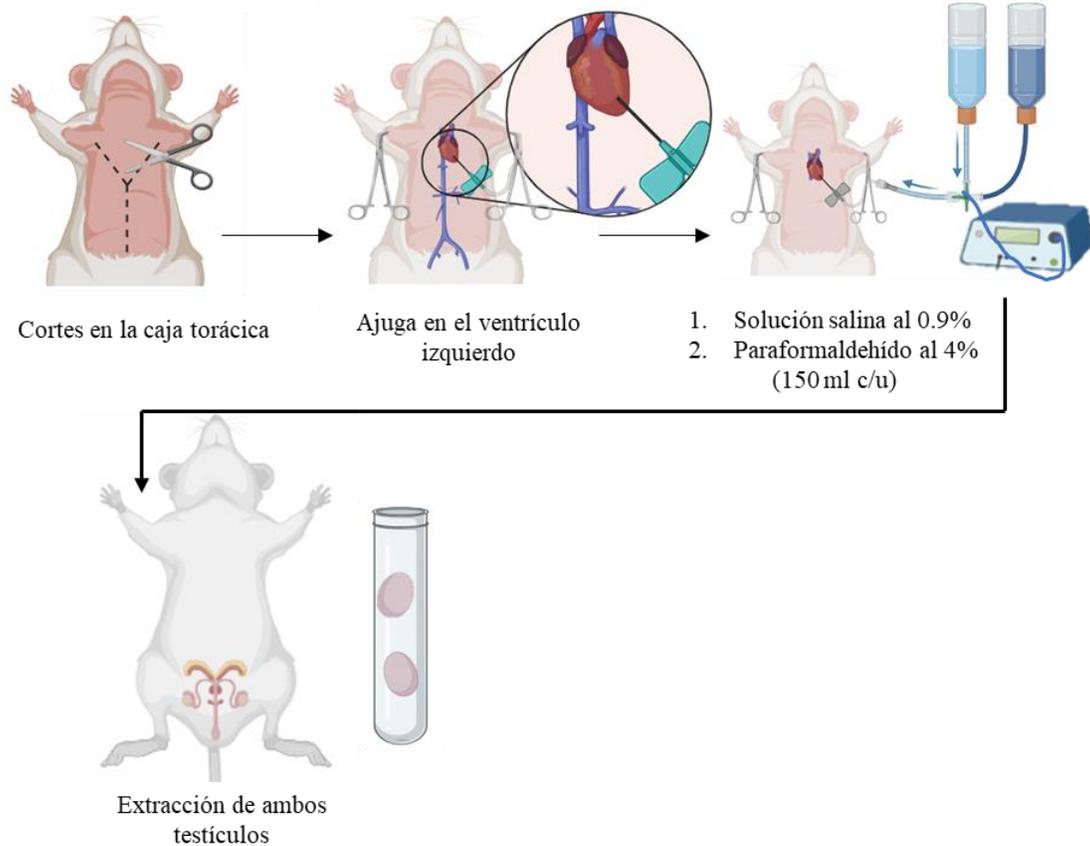


Figura 12. Perfusión.

Inclusión y cortes histológicos

Los testículos izquierdos almacenados en alcohol al 70% (JT Baker, México) pasaron por un proceso de deshidratación en alcoholes de porcentaje creciente (80%, 96%, 100%) durante 2 horas cada uno. Posteriormente, en Alcohol-Xilol concentración 1:1 durante 2 h, seguido de Xilol puro durante 4 min. Se incluyeron en bloques de Paraplast® (Leica Biosystems, IL, USA). Se realizaron cortes histológicos de 7 μm de grosor con un microtomo deslizante (820 Spenser Microtome American Optical, USA). Se tomaron 2 pares de cortes, el primero de la parte central y el otro a 100 μm aproximadamente. Los cortes se colocaron en un portaobjetos cargado previamente con poli- L-lisina (Sigma-Aldrich, USA) (Figura 13 B).

Inmunohistoquímica

Todos los portaobjetos montados se desparafinaron con Xilol, pasaron por alcoholes de graduación decreciente por 5 minutos en cada cambio y finalmente en agua destilada. Se recuperó el antígeno y se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0.3% (JT Baker, México). Se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes a 4° C: SERT (AB272912, abcam, Cambridge, Inglaterra); 17 α -hidroxilasa (AB231914, abcam, Cambridge, Inglaterra); 17 β -HSD (AB97975, abcam, Cambridge, Inglaterra) (Figura 13 C).

Posteriormente con el anticuerpo secundario: Antirabyt (7074S, Santa Cruz, Cellsignaling Technology, USA) o Antimouse (7076S, Santa Cruz, Cellsignaling Technology, USA) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se revelaron con diaminobencidina (DAB) y las células que expresaron las enzimas se tiñeron de color marrón. Enseguida se realizó la tinción con hematoxilina de Harris. Finalmente se montaron las preparaciones con PermOUNT (Sigma-Aldrich, USA) y se cubrieron con un cubreobjetos (Figura 13 C).

Evaluación de células de Leydig

Para realizar el análisis del tejido intersticial, se tomaron 5 fotomicrografías a un aumento de 200x con una cámara móvil de 12 megapíxeles (iPhone SE, A1723), adaptada a un microscopio con contraste de fases (NIKON OPTIPHOT-2, CA, USA). Las fotografías se tomaron de las regiones central, dos laterales y dos apicales de cada corte. De cada fotografía se seleccionaron al azar 5 áreas de tejido intersticial, por lo tanto, se analizaron 25 áreas por corte. En total fueron 100 áreas de tejido intersticial por testículo (Figura 13 D). Utilizando el software ImageJ, (Versión 1.53b, National Institute of Health Bethesda, Maryland, USA) se delimitaron las áreas de tejido intersticial de 3x3 micras y se procedió a identificar las células de Leydig positivas y negativas a la proteína, teñidas en color marrón o azul, respectivamente.

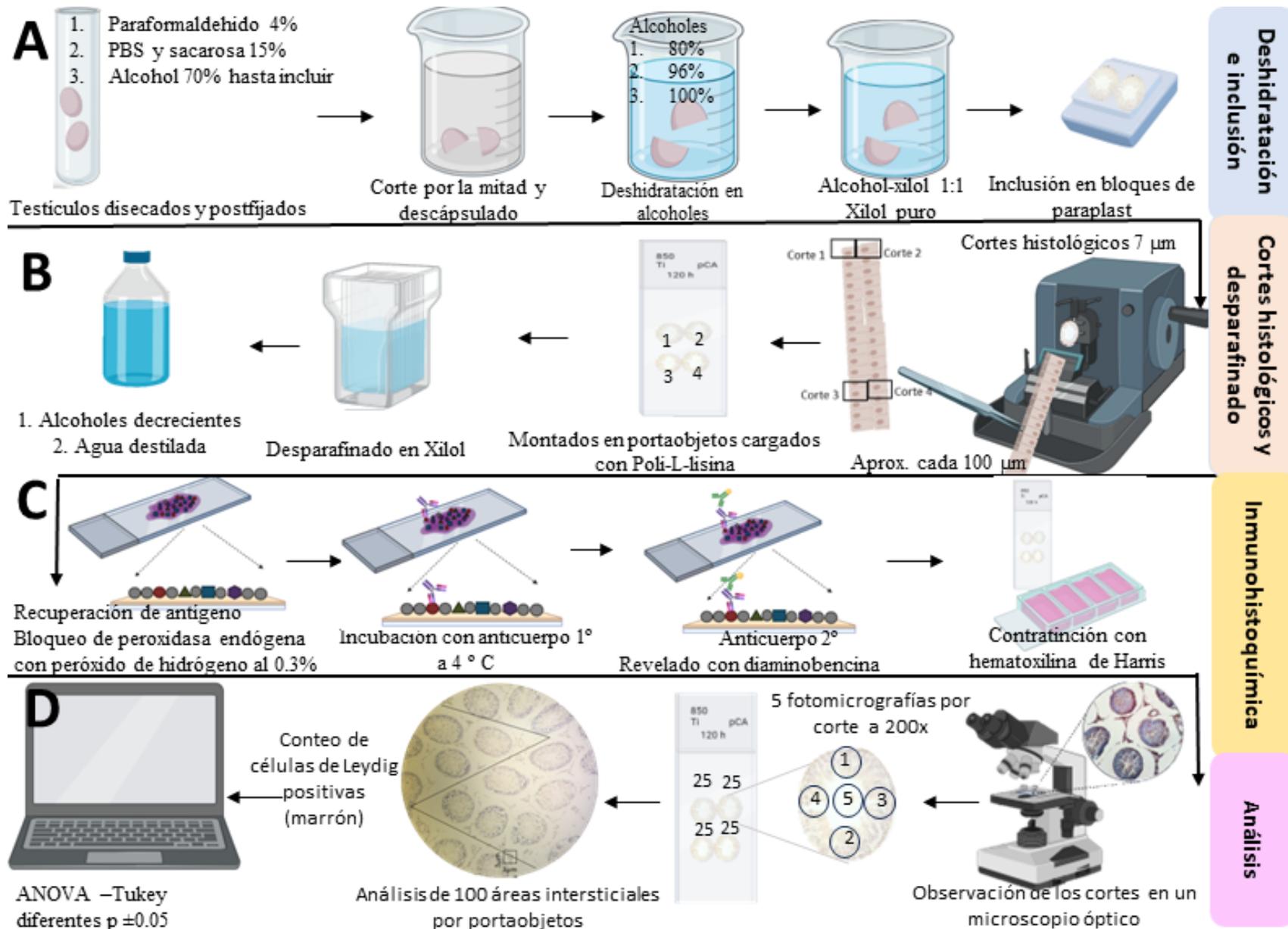


Figura 13. Procedimiento realizado para los animales perfundidos.

Autopsia

Los animales se autopsiaron por decapitación, y se colectó la sangre del tronco, se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min en una centrifuga (Solbat C-40). Se colectó el suero que se almacenó a -20°C hasta la cuantificación de las concentraciones de hormonas esteroides por radioinmunoensayo. Se realizó la extracción y disección de los testículos y posteriormente se almacenaron en tubos eppendorf a -70°C , para realizar la cuantificación de la presencia de las proteínas, SERT, 17α -hidroxilasa y 17β -HSD por western blot.

Cuantificación de proteínas

A los testículos derechos almacenados a -70°C se les agregó 1 ml de buffer de lisis (RIPA, Merck-Sigma Aldrich, MO, USA) por cada 100 mg de tejido testicular. Se homogeneizaron con ayuda de un sonicador (MSD, serie: PG1353) se centrifugaron a 10.000 rpm por 20 min a una temperatura de $4-5^{\circ}\text{C}$ en una centrifuga (SIGMA Laborzentrifugen am Harz, Germany, mod. 78554) y se colectó el sobrenadante. Se realizaron diluciones para la curva patrón con BSA del Kit (Pierce BCA protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA) en un microplato. Se pipetearon 25 μl de cada estándar y muestra desconocida por duplicado en cada pocillo y se agregaron 200 μl de reactivo de trabajo (WR) del Kit (Pierce BCA protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA) a cada pocillo.

El microplato se cubrió e incubó a 37° por 30 min. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 545 nm en un lector de Elisa (Awareness technology INC). Se restó la absorbancia medida en el estándar blanco a todos los demás estándares y a las muestras problema. Se realizó una curva estándar con las lecturas corregidas y a partir de esta curva se determinó la concentración de proteína de cada muestra problema (Figura 14 A).

Electroforesis

Se preparó la cámara para electroforesis vertical (Mini PROTEAN® Tetra Cell BIO RAD, USA) con buffer de corrida. Se prepararon alícuotas de 20 μ l (6 μ l de proteína de cada muestra de testículo; 5 μ l de Buffer de carga y 9 μ l de agua MiliQ); las alícuotas se colocaron en cada uno de los pozos o ranuras del gel de poliacrilamida prefabricado 4-20% (MP TGX, BIORAD, Hércules, CA) y se corrió a 100 V durante 1.15 h (Figura 14 B).

Electrotransferencia

Se cortó la membrana de nitrocelulosa 0.2 μ m (BIO-RAD, Alemania), se formó el sándwich de transferencia de la siguiente manera: primeramente, se colocó una esponja, seguido de dos papeles filtro, el gel de poliacrilamida con las muestras, la membrana de nitrocelulosa 0.2 μ m (BIO-RAD, Alemania) y finalmente dos papeles filtro y una esponja. Se colocó 1 L de buffer de transferencia 1X (72.05 g de Glicina, JT Baker; 15.14 g TRIS base, Sigma–Aldrich Merck, St. Louis, MO, USA;) y el sándwich en la cámara de transferencia (Mini Trans-Blot®. BIO RAD, USA). La transferencia se realizó a 500 mA durante 2 horas en frío (Figura 14 B).

Inmunodetección

Se bloqueó la membrana en Buffer TBS 1X (SIGMA, ST. Louis, MO, USA) con 5% de leche (4 ml) a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. Al finalizar se lavó dos veces con Buffer TBS 1x (SIGMA, ST. Louis, MO, USA) durante 5 min cada uno. Se diluyó el anticuerpo primario correspondiente: SERT (AB272912, abcam, Cambridge, Inglaterra); 17 α -hidroxilasa (AB231914, abcam, Cambridge, Inglaterra); 17 β -HSD (AB97975, abcam, Cambridge, Inglaterra) en Buffer TBS 1x (SIGMA, ST. Louis, MO, USA) con 1% de leche, para posteriormente incubar la membrana en agitación durante toda la noche a 4°C en frío.

La membrana se lavó tres veces durante 5 min cada uno en TBS con 0.1% tween-20; el cuarto lavado se realizó con TBS 1X (SIGMA, ST. Louis, MO, USA) durante 10 min. Todos los lavados se llevaron a cabo en agitación y en frío. Posteriormente, se diluyó el anticuerpo secundario: Antirabbit (7074S, Santa Cruz, Cellsignaling Technology, USA) o Antimouse (7076S, Santa Cruz, Cellsignaling Technology, USA) en TBS con 1% de leche y se incubó por 2 horas (Figura 14 C).

Revelado

La membrana se reveló con el Kit (Westernsure Premium Chemilum Substrate, Licor, USA) aplicándolo directamente sobre la membrana durante 1 minuto. Se colocó la membrana boca abajo en un Cdigit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA). Las imágenes adquiridas se analizaron con el software Image Studio Lite 5.3.2 (Licor Lincoln NE, USA) (Figura 14 C).

Cuantificación de hormonas esteroides

La concentración de progesterona y testosterona en el suero se cuantificó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, con kits, TKPG-1 y TKTT-2, respectivamente (Coat-A-Count, Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA). La concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/mL. Los coeficientes de variación interensayo fueron 4.3 % y 7.8 % para progesterona y 4.0 % y 7.7 % para testosterona (Figura 14 D).

Análisis estadístico

El número de células de Leydig positivas a la SERT, 17 α -hidroxilasa, y 17 β -HSD, así como la presencia de las proteínas arriba indicadas y las concentraciones séricas de progesterona y testosterona se analizaron por ANOVA seguida de la prueba de Tukey. Los resultados se consideraron diferentes significativamente, cuando el valor de p sea igual o menor a 0.05.

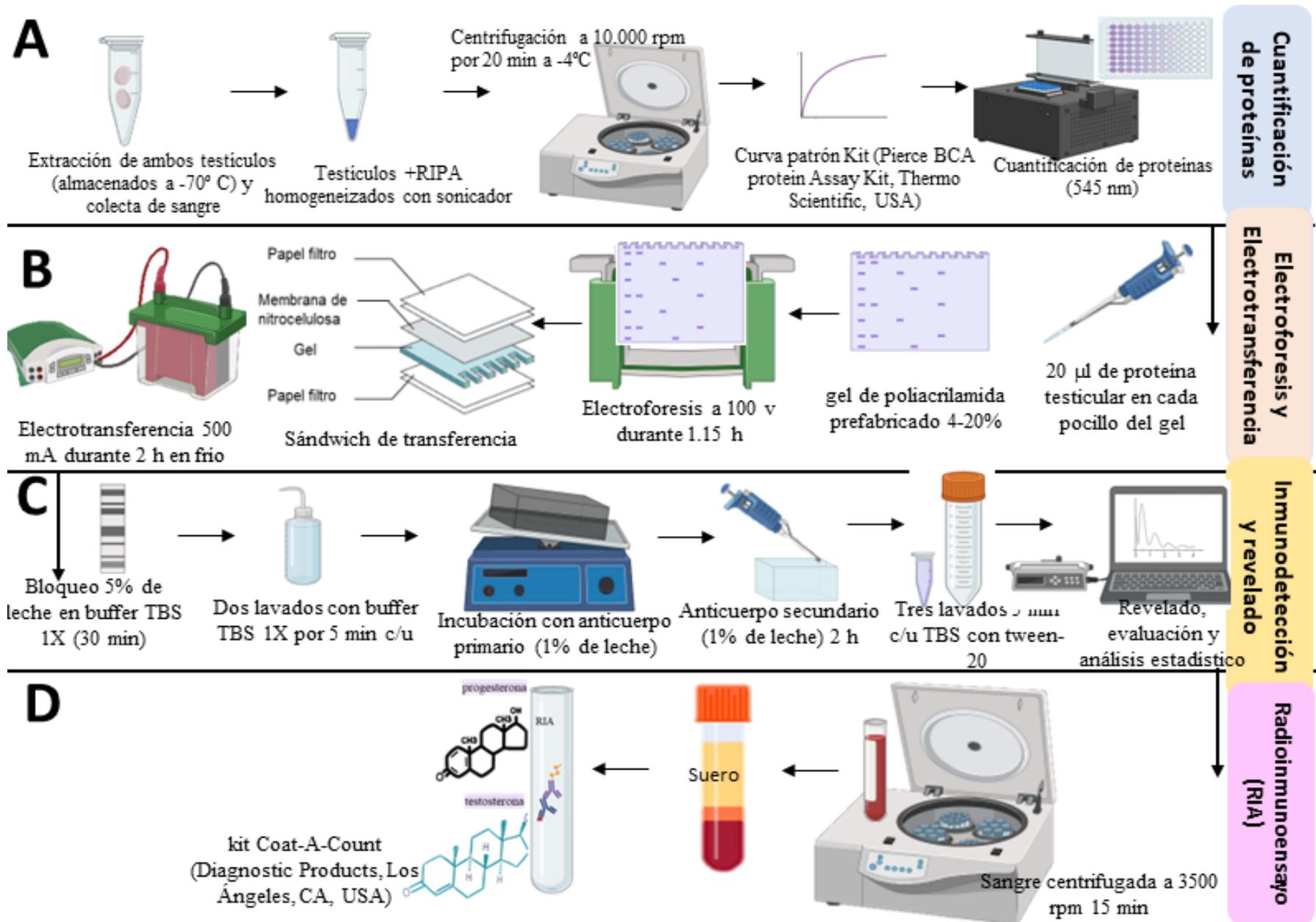


Figura 14. Procedimiento realizado para los animales terminados por decapitación.

Resultados

Proteína transportadora de serotonina (SERT)

En los testículos de los animales TA autopsiados a los 35 días de edad se observó inmunoreactividad para la proteína SERT en los vasos sanguíneos y en la mayoría de las células de Leydig, en algunas de estas células no se identificó la marca para la proteína (Figura 15, A y B). En los animales inyectados con Vh (Figura 15, C y D) o con pCA (Figura 15, E y F), la inmunoreactividad para la proteína se identificó en los mismos elementos celulares del testículo que el grupo TA.

Cuando se realizó el conteo de las células de Leydig inmunorreactivas al SERT por área de tejido intersticial a las 120 h postratamiento (35 días de edad), se observó que en los animales que se inyectaron con Vh el número de células de Leydig disminuyó significativamente en comparación con el grupo TA. En los que se trataron con pCA, el número de células de Leydig positivas a la proteína se incrementó en comparación con el grupo con Vh y fue menor que en los animales TA (Figura 16).

En la figura 17 se presentan los resultados de la presencia de la proteína SERT, evaluada por Western Blot. En comparación con los animales TA. Los animales que se les inyectó Vh no se modificó la presencia de la proteína. Mientras los que recibieron pCA, se observó una menor presencia de esta proteína a las 48 h postratamiento y el aumento a las 120 h. Sin ser estadísticamente significativos.

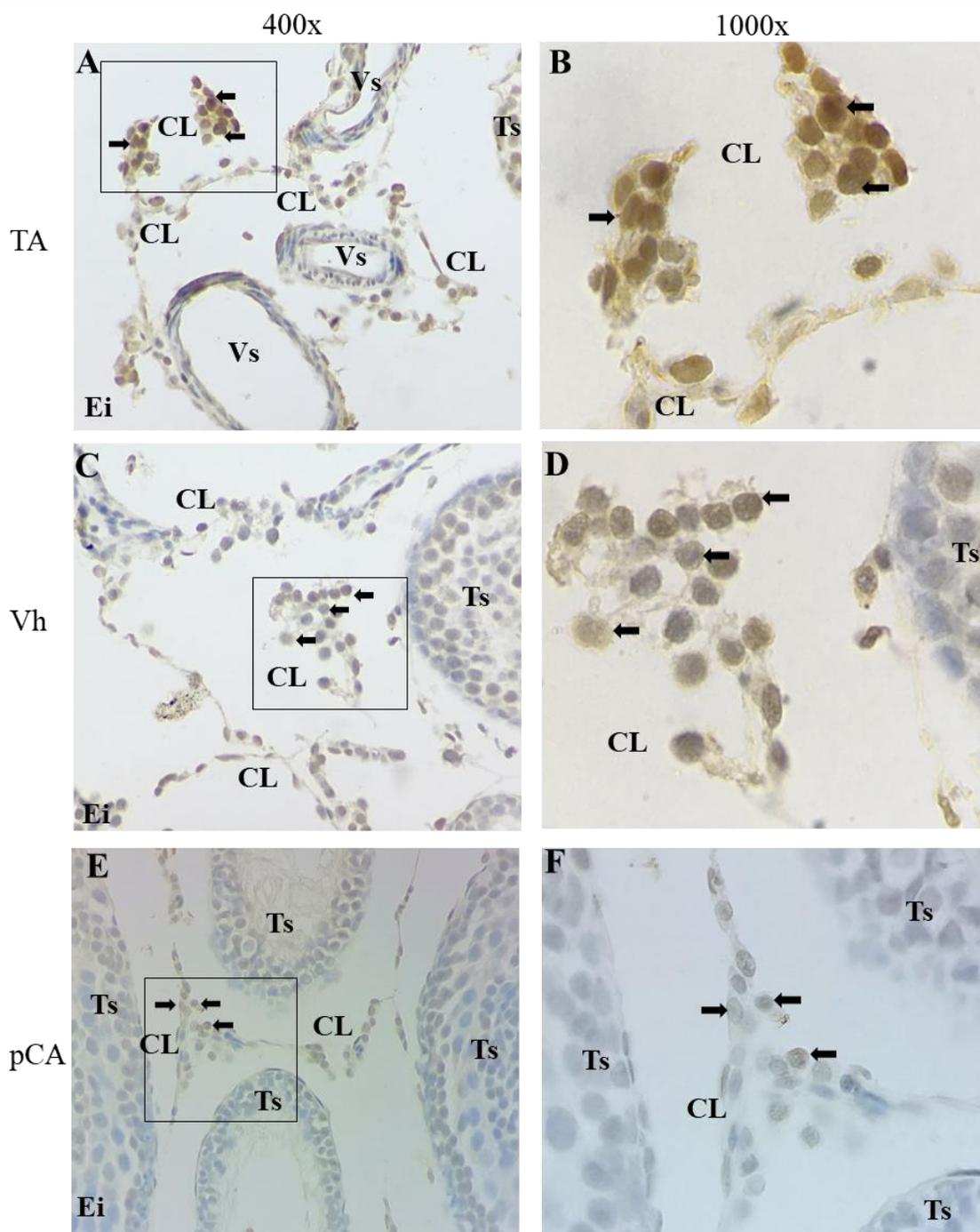


Figura 15. Fotomicrografías de cortes de testículo de ratas testigo absoluto (TA) (A y B), tratadas con solución salina (Vh) (C y D) o con p-Cloroanfetamina (pCA) (E y F) en el día 30 de edad y autopsiadas a las 120 h postratamiento (35 días de edad). Se muestra inmunoreactividad para la proteína transportadora de serotonina (SERT) (flechas) en: células de Leydig (CL). Aumento 400x (A, C, E); Aumento 1000x (B, D y E). VS: vaso sanguíneo, Ts: túbulo seminífero, Ei: Espacio intersticial.

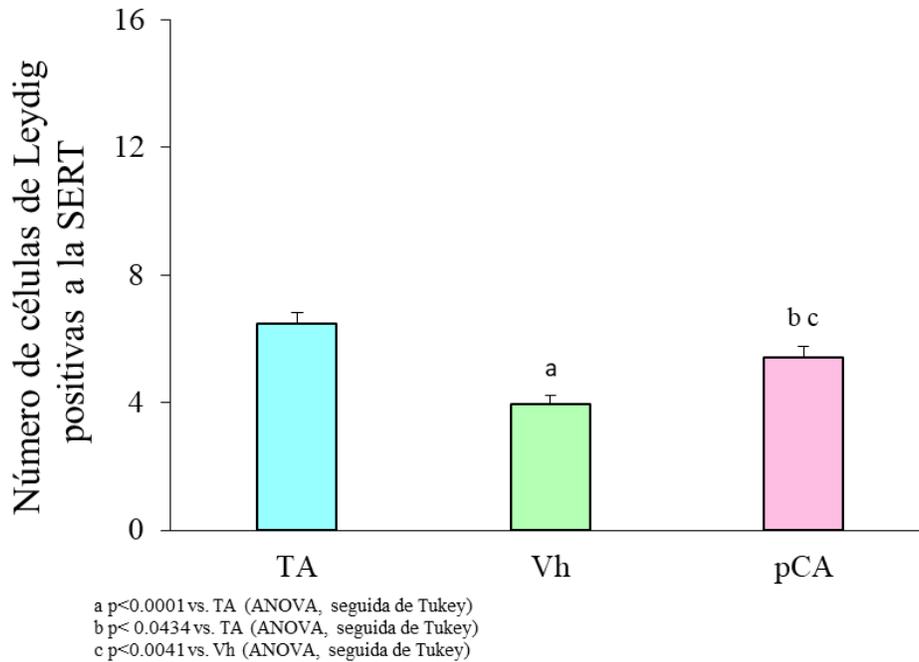


Figura 16. Media \pm e.e.m. del número de células de Leydig positivas a la proteína transportadora de serotonina (SERT) por área, en ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y autopsiadas a las 120 h postratamiento (35 días de edad).

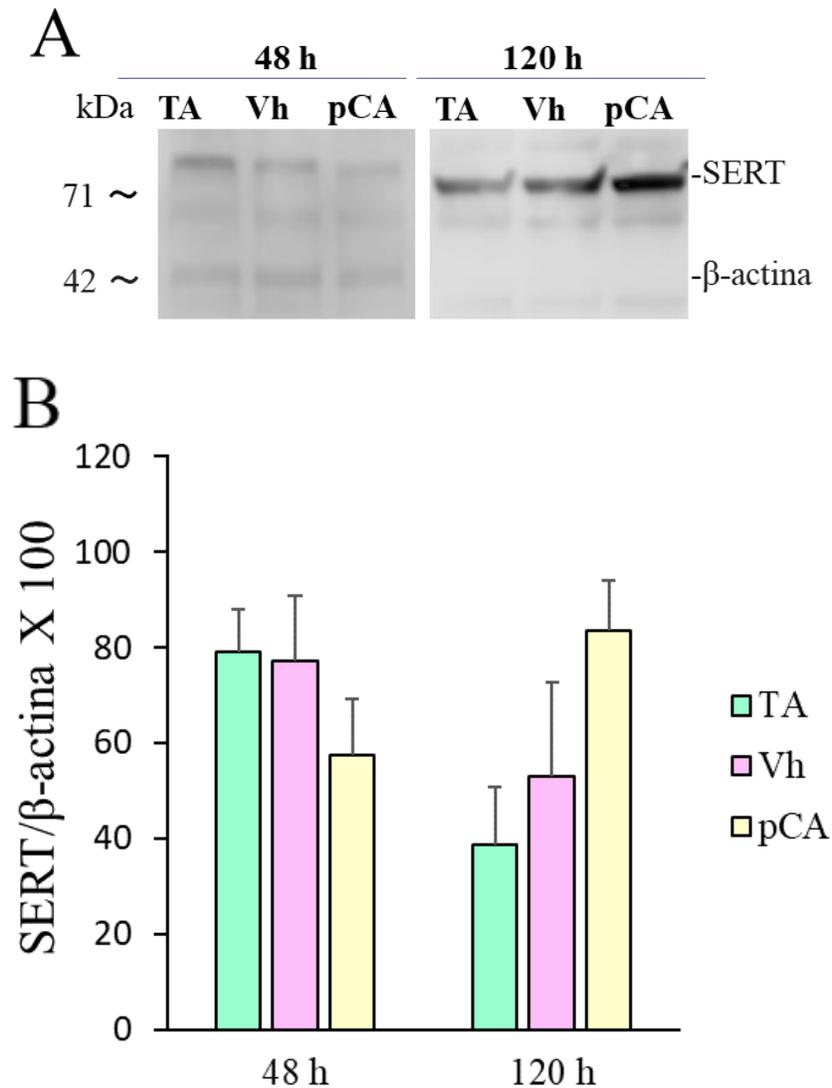


Figura 17. Presencia de la proteína transportadora de serotonina (SERT) en el testículo (A y B), de ratas macho testigo absoluto (TA), con inyección de solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y autopsiadas a las 48 o 120 h postratamiento (32 o 35 días de edad). (A) Membrana representativa de un Western Blot de la evaluación de la proteína SERT; (B). Presencia de la proteína SERT normalizada con β-actina.

17 α -hidroxilasa

En los animales TA y autopsiados a los 35 días de edad, no se identificó marca positiva a la proteína, 17 α -hidroxilasa, en el túbulo seminífero, mientras que, en el tejido intersticial, la marca a la proteína se identifica en células de Leydig (Figura 18, A y B). Así mismo, en los animales que se inyectaron con Vh (Figura 18 C y D) o con pCA (Figura 18 E y F), la inmunoreactividad a la 17 α -hidroxilasa se identificó en las células de Leydig.

En comparación con los animales TA, a los que se trató con Vh, el número de células positivas a la proteína 17 α -hidroxilasa disminuyó significativamente. En los animales que se trataron con pCA, el número de células inmunoreactivas a la proteína fue menor en comparación con los animales TA o con Vh a las 120 horas postratamiento (35 días de edad) (Figura 19).

En el análisis de la presencia de la proteína, 17 α -hidroxilasa, se observó que esta proteína disminuyó en los animales tratados con Vh o con pCA, tanto a las 48 h como a las 120 h, en comparación con el grupo de animales TA, sin ser estadísticamente significativa (Figura 20).

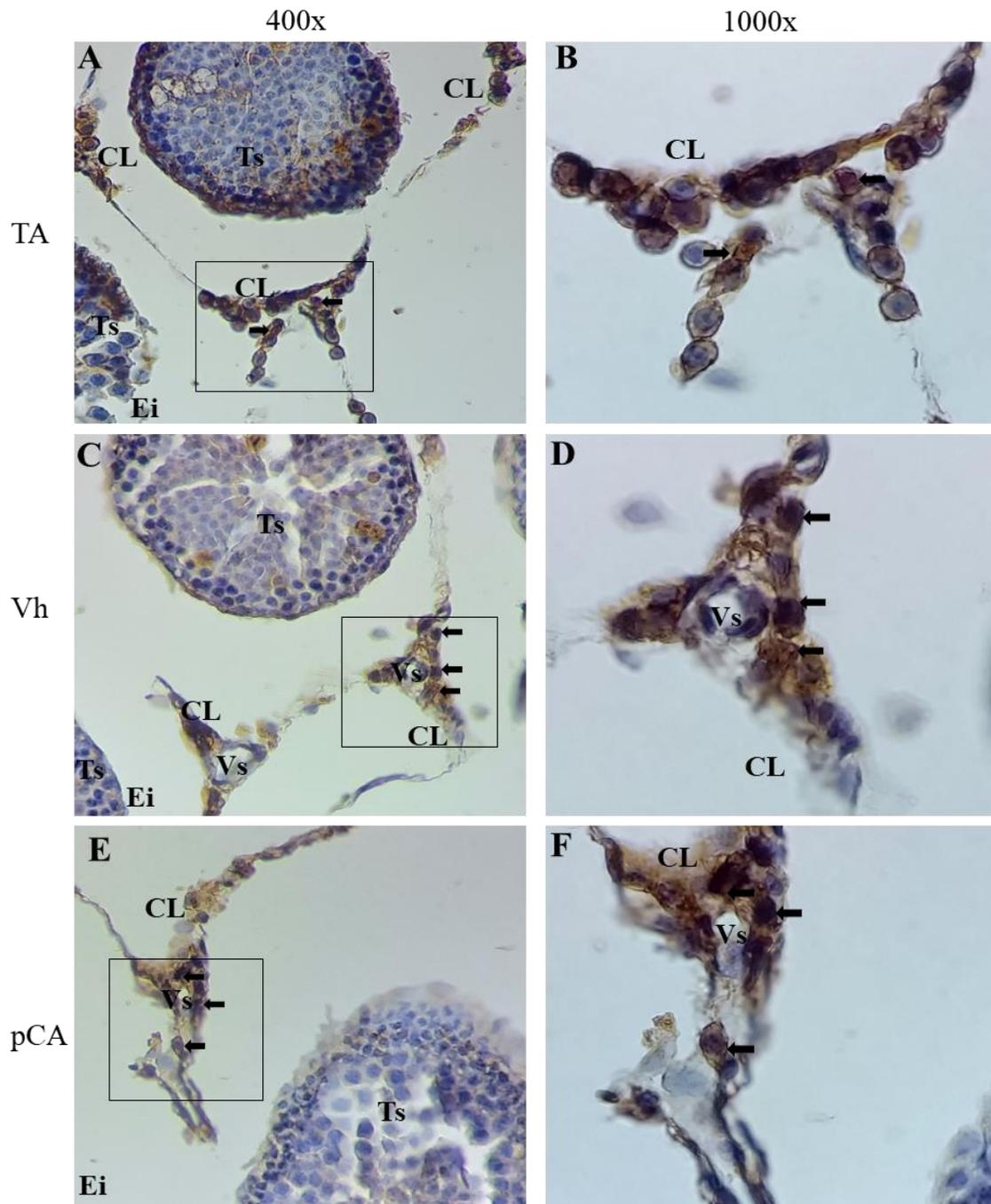


Figura 18. Fotomicrografías de cortes de testículo de ratas testigo absoluto (TA) (A y B), inyectadas con solución salina (Vh) (C y D) o con p-Cloroanfetamina (pCA) (E y F) en el día 30 de edad y autopsiados a las 120 h postratamiento (35 días de edad). Se muestra inmunoreactividad para la 17α -hidroxilasa (flechas) en: células de Leydig (CL). Aumento 400x (A, C, E); Aumento 1000x (B, D y E). VS: vaso sanguíneo, Ts: túbulo seminífero, Ei: Espacio intersticial.

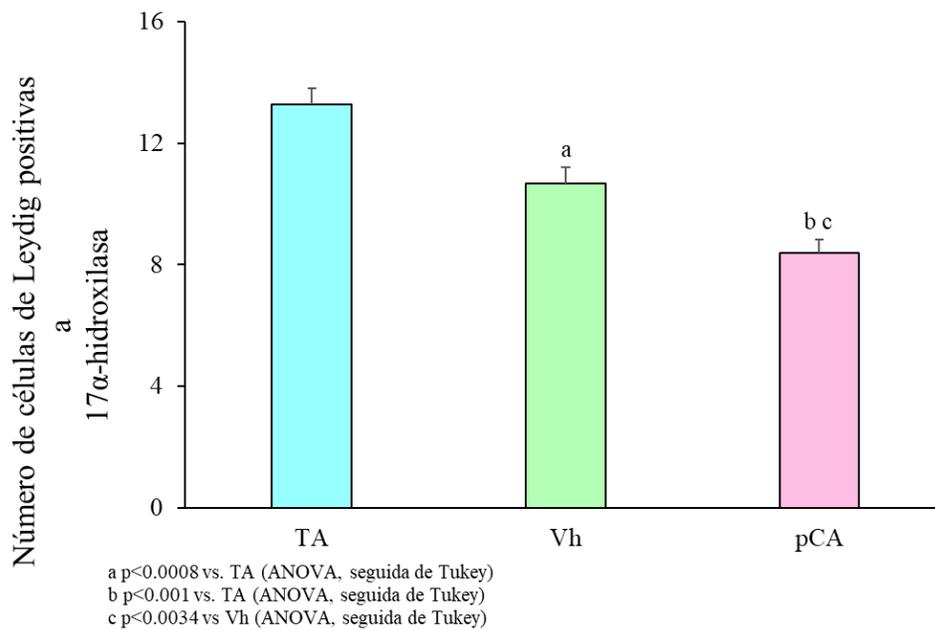


Figura 19. Media \pm e.e.m. del número de células de Leydig positivas a 17 α -hidroxilasa por área, en ratas macho testigo absoluto (TA), con inyección de solución salina (Vh) o con p-Chloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y autopsiadas a los 120 h postratamiento (35 días de edad).

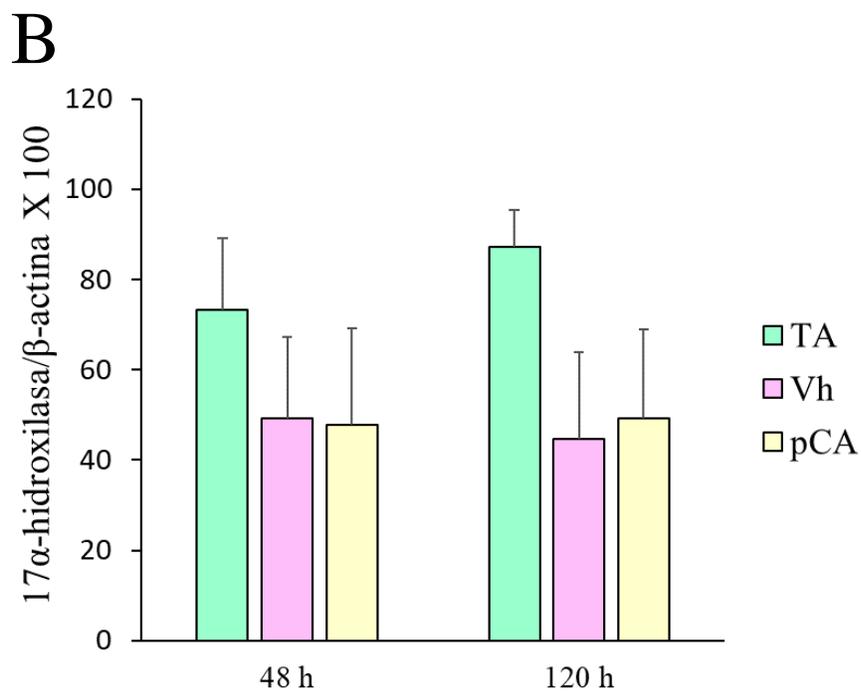
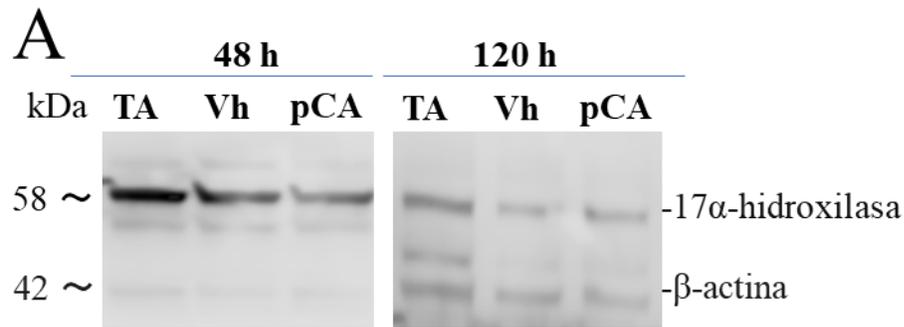


Figura 20. Presencia de la proteína 17 α -hidroxilasa en el testículo (A y B), de ratas macho testigo absoluto (TA), con inyección de solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y autopsiadas a las 48 o 120 h postratamiento (32 o 35 días de edad). (A) Membrana representativa de un Western Blot de la evaluación de la proteína 17 α -hidroxilasa; (B). Presencia de la proteína 17 α -hidroxilasa normalizada con β -actina.

17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD)

En el compartimiento intersticial del testículo de los animales TA y autopsiados a los 35 días de edad se identificaron células inmunorreactivas a la proteína 17 β -HSD, en el endotelio de los vasos sanguíneos y células de Leydig (Figura 21, A y B). La identificación de esta proteína fue similar en los animales con Vh (Figura 21 C y D) o con pCA (Figura 21 E y F). En los tres grupos (TA, Vh, pCA) se identificaron células de Leydig inmunorreactivas a la enzima 17 β -HSD, sin embargo, no todas las células de Leydig presentaron marca positiva a dicha proteína.

En los animales que se inyectaron con Vh y autopsiados las 120 h postratamiento no se modificó el número de células positivas a la proteína, 17 β -HSD, en comparación con el grupo TA. En los animales que se les inyectó pCA, el número de células positivas a la proteína disminuyó significativamente en relación con los animales TA o con Vh (Figura 22).

En comparación con el grupo de animales TA, en los que se inyectaron con Vh no se modificó la presencia de la proteína 17 β -HSD, mientras que los que se inyectaron con pCA, este mismo comportamiento se observó a las 48 h y a las 120 h disminuyó (Figura 23).

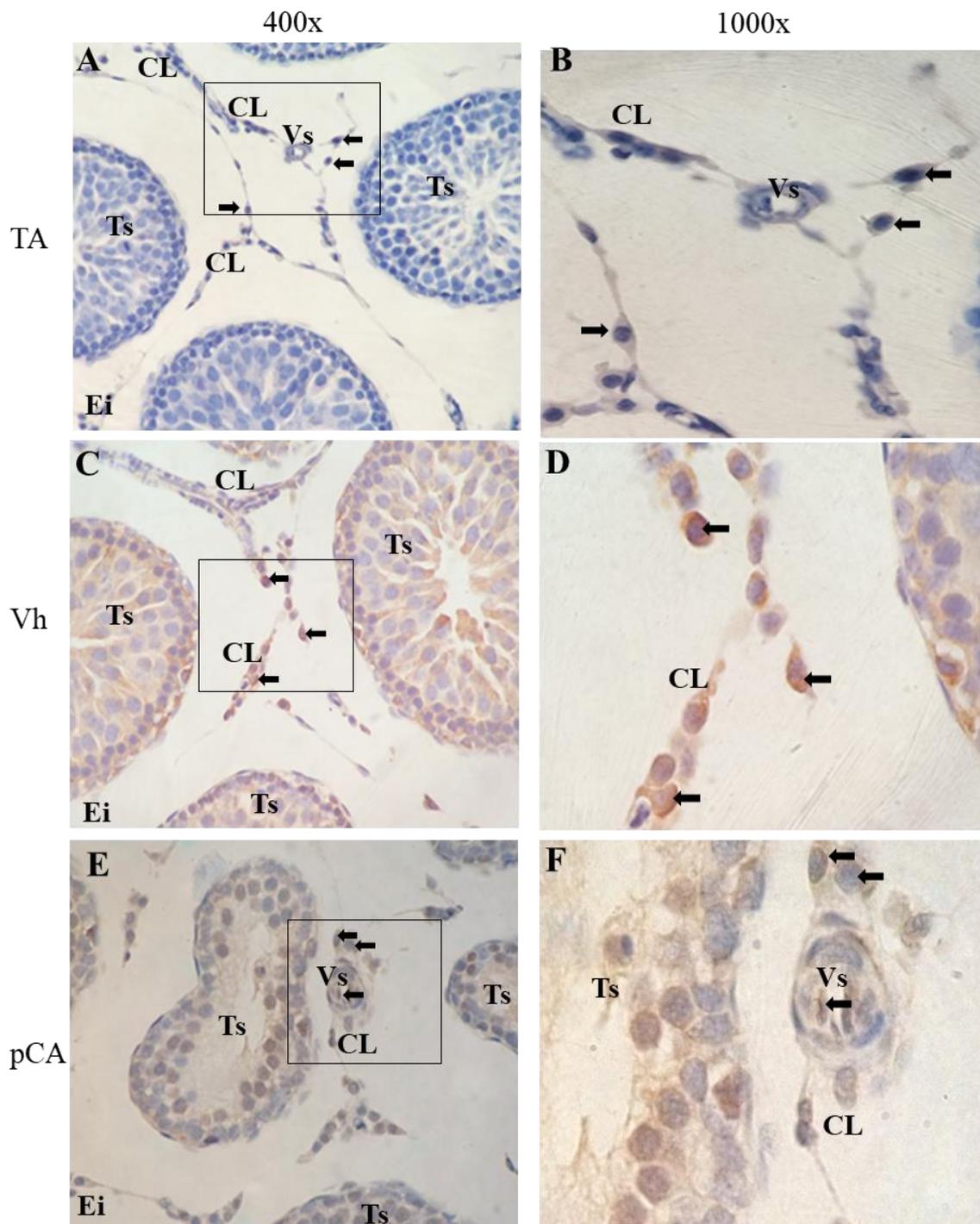


Figura 21. Fotomicrografías de cortes de testículo de ratas testigo absoluto (TA)(A y B), tratadas con solución salina (Vh)(C y D) o con p-Cloroanfetamina (pCA)(E y F) en el día 30 de edad y autopsiados a las 120 h postratamiento (35 días de edad). Se muestra inmunoreactividad para la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) (flechas) en: células de Leydig (CL). Aumento 400x (A, C, E); Aumento 1000x (B, D y E). VS: vaso sanguíneo, Ts: túbulo seminífero, Ei: Espacio intersticial.

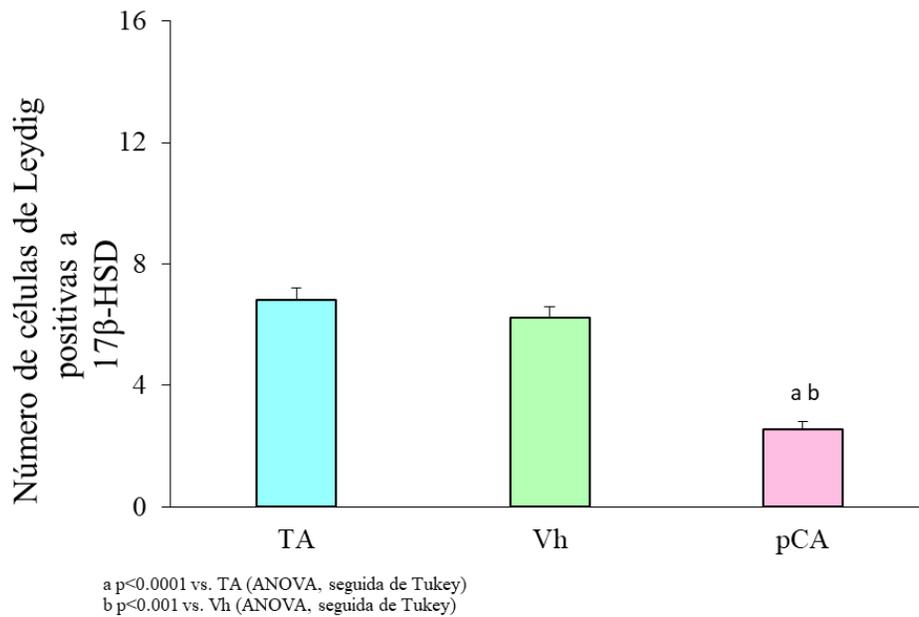


Figura 22. Media \pm e.e.m. del número de células de Leydig positivas a 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) por área, en ratas macho testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y autopsiadas a los 120 h postratamiento (35 días de edad).

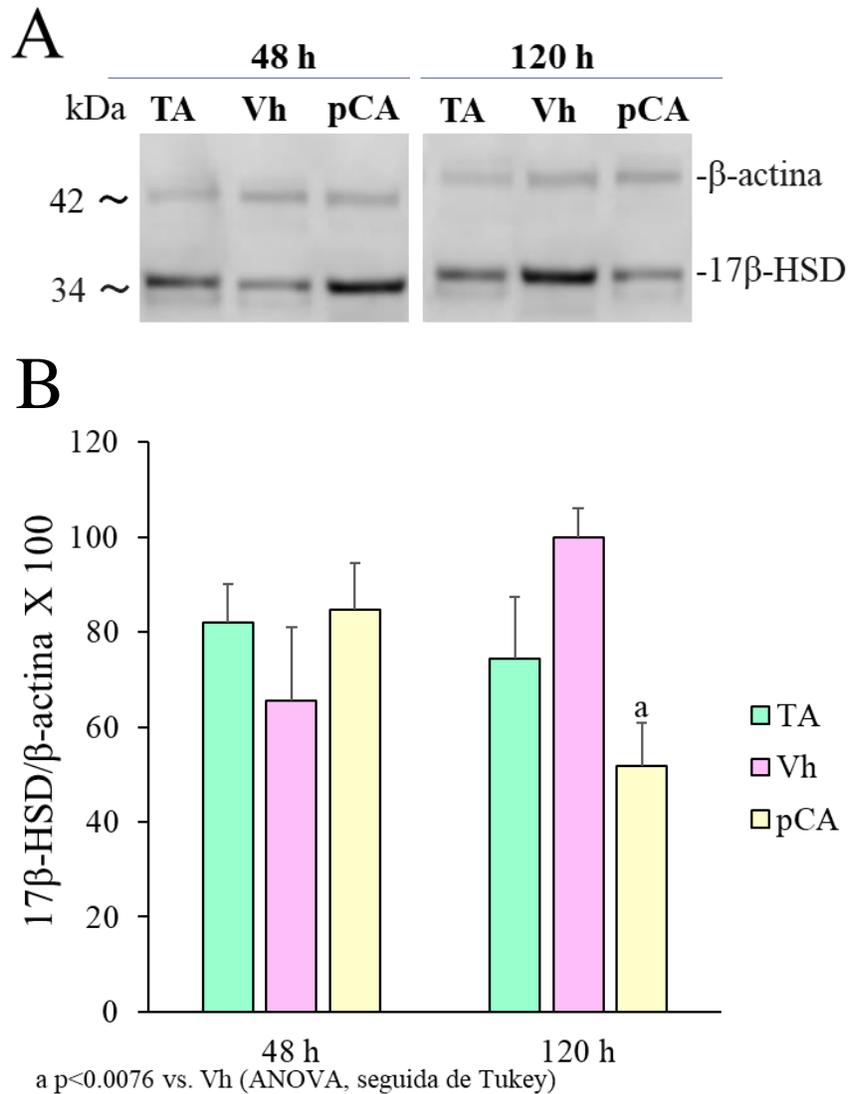


Figura 23. Presencia de la proteína 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD) en el testículo (A y B), de ratas macho testigo absoluto (TA), con inyección de solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y autopsiadas a las 48 o 120 h postratamiento (32 o 35 días de edad). (A) Membrana representativa de un Western Blot de la evaluación de la proteína 17β-HSD; (B). Presencia de la proteína 17β-HSD normalizada con β-actina

Hormonas esteroides

La concentración de progesterona en el suero de los animales tratados con Vh, no se modificó cuando los animales fueron autopsiados a las 48 o 120 horas postratamiento. En los animales que se les inyectó pCA y autopsiados a las 48 h, la concentración de progesterona disminuyó significativamente en comparación con el grupo de animales con Vh, a las 120 h se observó este mismo comportamiento en comparación con el grupo TA (Figura 24).

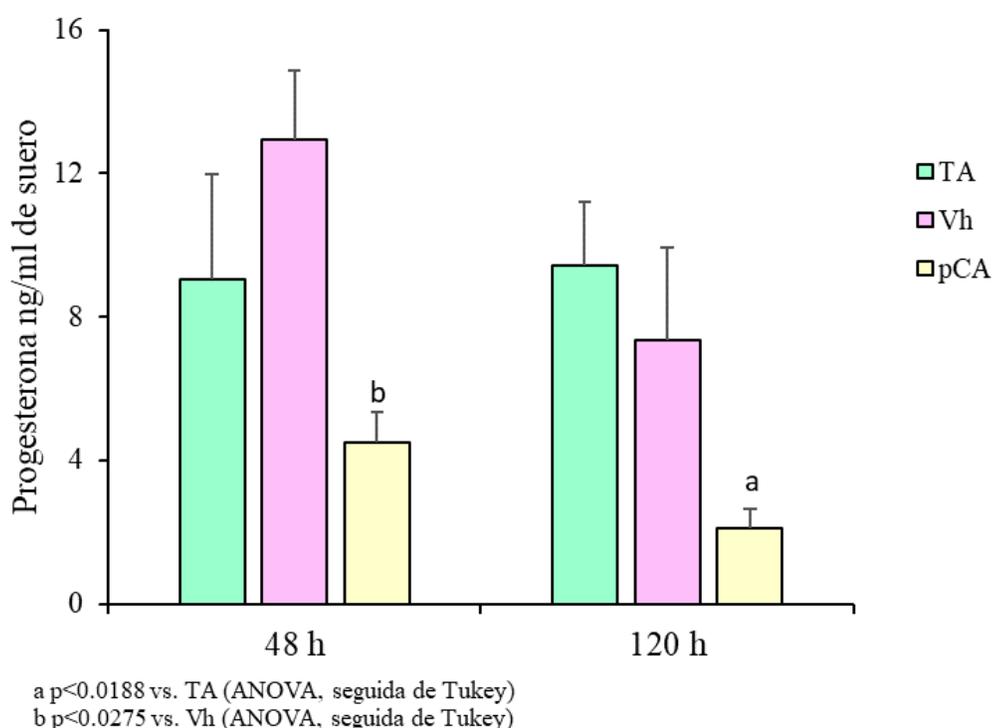


Figura 24. Media \pm e.e.m. de la cuantificación de progesterona sérica, en ratas macho testigo absoluto (TA), con inyección de solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y autopsiados a las 48 o 120 h postratamiento (32 o 35 días de edad).

En comparación con los animales TA, en los que se les inyectó Vh, la concentración de testosterona no se modificó a las 48 h o 120 h postratamiento. Este mismo comportamiento se observó en los animales que recibieron pCA y autopsiados a las 48 h. Mientras que, en los tratados con pCA y autopsiados 120 h después del tratamiento, la concentración de la hormona fue menor, en comparación con los animales tratados con Vh o TA (Figura 25).

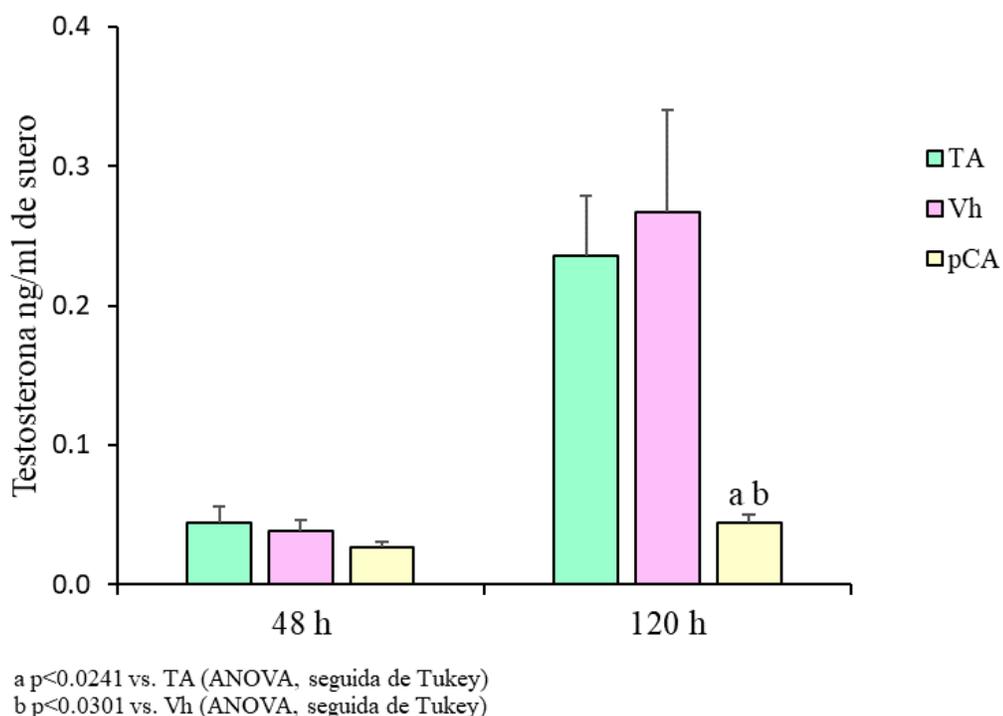


Figura 25. Media \pm e.e.m. de la concentración de testosterona, en suero de ratas macho testigo absoluto (TA), con inyección de solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y autopsiados a las 48 o 120 h postratamiento (32 o 35 días de edad).

Discusión de resultados

Los resultados del presente estudio muestran que la inhibición del sistema serotoninérgico inducido por la administración de la pCA disminuye la presencia de las proteínas SERT, 17 α -hidroxilasa y 17 β -HSD en el testículo, así como la producción de hormonas esteroides. El hecho de que en los animales tratados con pCA disminuyera el número de células de Leydig inmunorreactivas a las proteínas arriba indicadas, de progesterona y testosterona en el suero, apoyan esta interpretación.

La idea de que en los animales que se les administró pCA se inhibe al sistema serotoninérgico del hipotálamo se sustenta en las evidencias que muestran que la administración del derivado de la anfetamina a la rata macho de 30 días disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo (Rivas *et al.*, 2022) y en el testículo (Villar., 2011). El efecto inhibitorio de la pCA en el sistema serotoninérgico es el resultado de: 1. la inhibición de la enzima TPH, limitante en la síntesis de serotonina (Sanders-Brush *et al.*, 1975) (Figura 26); 2. degeneración de las neuronas serotoninérgicas que inervan el hipotálamo y cuyos somas se ubican en los NDR y NMR (McQuade & Sharp., 1995). El efecto de la pCA se ha mostrado cuando a ratas macho adultos son inyectados con 10 mg/kg y disminuye la síntesis de serotonina en el cerebro, efecto que se observa a partir de las 48 h y se mantienen hasta por 30 días (Sanders-Brush *et al.*, 1975). La pCA también induce alteraciones morfológicas y degeneración de las terminales serotoninérgicas como resultado de la formación del metabolito 5-6-Dihidroxitriptamina (5-6-DHT), neurotóxico de las neuronas serotoninérgicas, (Commins *et al.*, 1987); que, se introduce a la neurona vía el SERT, se autooxida y activa la formación de radicales libres como resultado de la degeneración de los metabolitos catecol y quinonas de la pCA (Colado *et al.*, 1997) generando estrés oxidativo, daño membranal y neurotoxicidad, (O'Shea *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2001).

Además del efecto de la pCA en el hipotálamo, es posible que, en los animales inyectados con este derivado de las anfetaminas, se provocara la desregulación de la síntesis de serotonina en el testículo (Figura 26), debido a que en este órgano se expresa la TPH, enzima

limitante en la síntesis de serotonina (Tinajero et al., 1993). También es posible que se afecte el aporte de serotonina cuyo origen es el nervio espermático. Cuando se realiza la sección del nervio espermático superior, la concentración de serotonina disminuye en un 34 % (Campos et al., 1990). Conjuntamente estas evidencias sustentan que la pCA induce la desregulación del sistema serotoninérgico del testículo.

La SERT es el componente del sistema serotoninérgico, cuya función es regular la transmisión serotoninérgica debido a que la serotonina se le une, la recaptura en la neurona presináptica y termina la transmisión (Rudnick et al., 1992). En el SNC se le ha identificado en neuronas de tipo serotoninérgicas (Blakely et al., 1991).

En órganos periféricos como el testículo de la rata adulta se expresa en las células de Sertoli y de Leydig (Jiménez-Trejo et al., 2021), lo anterior coincide con lo observado en nuestro estudio, debido a que mediante inmunohistoquímica identificamos a esta proteína en la célula de Leydig de la rata de 35 días de edad. La función de la SERT es regular las concentraciones de serotonina en el SNC (Siegel et al., 2012) y en tejidos periféricos. Por ello, la identificación de la SERT en la gónada del macho indica que existe un sistema de liberación y recaptura de serotonina intratesticular.

La disminución en el número de células de Leydig inmunorreactivas al SERT que se observó en los animales que se les inyectó pCA, coincide con lo reportado en el SNC por Xie y col., (2006), quienes mencionan que el derivado de las anfetaminas, MDMA, induce la disminución en la densidad de las fibras inmunorreactivas al SERT en corteza cerebral e hipocampo. Este evento se acompañó de la disminución en la proteína SERT a las 48 h postratamiento, sin embargo, a las 120 h se observó el incremento en esta proteína. Este efecto posiblemente es el resultado de un mecanismo compensatorio secundario al efecto de inhibición en la presencia de esta proteína que se presentó a las 48 h.

Wang y colaboradores (2002), reportan que la pCA no modifica la presencia de la SERT evaluada por Western Blot en ninguna región del cerebro a diferentes tiempos, con excepción de la reducción del 30 % de esta proteína en el núcleo caudado dos días después de la administración de pCA. El que no se presentaran cambios significativos en la presencia de la SERT en el testículo de los animales que se les administró pCA, no implica que no se modificó la actividad de esta proteína, es posible que se modificarán los sitios de unión de la SERT y por lo tanto disminuyera su actividad, tal efecto negativo del MDMA (McGregor *et al.*, 2003) y de la pCA y en los sitios de unión de la SERT se presenta en el núcleo caudado a partir de los 2 días después del tratamiento y se mantiene hasta por dos semanas (Wang *et al.*, 2002).

En el macho, la testosterona regula el funcionamiento del sistema serotoninérgico, debido a que estimula la presencia de la proteína SERT y sus sitios de unión, de la proteína TPH y del receptor a serotonina 5-HT_{2A} (Fink *et al.*, 1999; Jovanovic *et al.*, 2015). Se ha mostrado que en los machos orquidectomizados, disminuye la concentración de testosterona y el RNAm que codifica para la síntesis de la proteína SERT en el núcleo dorsal del rafé (Herrera-Pérez *et al.*, 2013), así como los sitios de unión de la SERT en diferentes regiones del cerebro. Efectos que son revertidos por la administración de testosterona (Fink *et al.*, 1999; McQueen *et al.*, 1999). En el presente estudio se esperaba la disminución en la presencia de la proteína SERT en el testículo de los animales inyectados con pCA, debido a que en estos animales la concentración de testosterona disminuyó a partir de las 48 h y este efecto se mantuvo hasta las 120 h. Sin embargo, no observamos cambios significativos en la presencia de la proteína SERT en el testículo. Pero no podemos descartar que es el testículo de estos animales disminuyera la unión de la serotonina a la SERT.

En relación con la acción de la testosterona sobre la presencia de la SERT en el cerebro, Fink y colaboradores (1999), proponen que el efecto estimulante de la testosterona en la presencia de la SERT es el resultado de su aromatización a estrógenos. Además, mostraron que cuando

se realiza la castración, la concentración de testosterona y estradiol disminuyen significativamente, no se modifica la 5 α -dihidrotestosterona, y se incrementa el RNAm de la SERT y sus sitios de unión en el NDR. Este aumento en el RNAm de la SERT es el resultado de la acción de la 5 α -dihidrotestosterona, andrógeno que no puede ser aromatizado a estrógenos. Por ello, es posible que en los animales inyectados con pCA, a pesar de que disminuye testosterona, no se modificó la 5 α -dihidrotestosterona, andrógeno que predomina en la rata juvenil de 35 días de edad (Picut *et al.*, 2015), lo anterior ocasionó que aumentara la SERT en el testículo de los animales inyectados con pCA. En apoyo a esta idea, entre el día 20 a 40 de edad, en el testículo de la rata aumenta el RNAm de las enzimas 5 α -reductasa 1 y 2, responsables del aumento en la producción de la 5 α -dihidrotestosterona, en esta etapa del desarrollo del macho (Killian *et al.*, 2003).

Otra posibilidad es que la proteína del cerebro y de tejidos periféricos sean similares en su estructura y la síntesis de la proteína sea codificada por el mismo gen, como sucede con el SERT del cerebro y la de las plaquetas (Lesch *et al.*, 1993), sin embargo, su mecanismo de regulación sea diferente, lo que explicaría por qué en el testículo de los animales que se les inyectó pCA, no se modificó la presencia de esta proteína.

Por otra parte, en el presente estudio se observó inmunorreactividad para las enzimas, 17 α -hidroxilasa y 17 β -HSD, en las células de Leydig de la rata macho prepúber de 35 días de edad. Esto coincide con lo reportado por otros autores debido a que estas células son las únicas que expresan las enzimas encargadas de llevar a cabo la conversión de colesterol a testosterona, (Breed & Setchell., 2006; Tremblay., 2015) por ello se les considera el componente endocrino del testículo. Además, la enzima 17 α -hidroxilasa se encuentra exclusivamente en el retículo endoplásmico liso de las gónadas; por lo que se considera un marcador específico de las células de Leydig (Figura 27) (Zirkin *et al.*, 2018; Ge, *et al.*, 2021).

En los animales de los grupos TA o con inyección de Vh se observaron células de Leydig sin marca para las enzimas de la esteroidogénesis, 17 α -hidroxilasa y 17 β -HSD, esto posiblemente-

te se asocie a que en ratas existen dos poblaciones de células de Leydig: 1). fetales, que no tienen la capacidad de sintetizar testosterona y 2). adultas cuya capacidad de sintetizar testosterona está demostrada. Las primeras predominan en la etapa fetal y algunas de ellas persisten en la vida adulta. Las células fetales son reemplazadas por las adultas en las primeras semanas del desarrollo postnatal, y alcanzan su máxima transición durante la pubertad (Inoue *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2021). Durante esta etapa también se produce el aumento en la expresión de los receptores a la LH, hormona que activa a las enzimas de la esteroidogénesis que transforman el colesterol en testosterona (Griswold & Behringer., 2009; Zirkin *et al.*, 2018).

El menor número de células de Leydig inmunoreactivas a las enzimas 17α -hidroxilasa y 17β -HSD que se observó en los animales inyectados con pCA, posiblemente sea el resultado de la muerte de estas células por apoptosis. La pCA en la rata macho de 30 días de edad induce la muerte por apoptosis de las células germinales (Rivas *et al.*, 2022), por ello no se descarta que este proceso también se observe en las células de Leydig. Mobaraki y colaboradores (2018), mostraron que cuando en la rata macho adulta se le inyecta MDMA, cuya acción es similar a la pCA, se induce la muerte por apoptosis de las células de Leydig. La modificación en la presencia de las enzimas de la esteroidogénesis en el testículo de los animales que se les inyectó pCA, pueden ser el resultado de la desregulación del sistema serotoninérgico del hipotálamo o del testículo.

En el hipotálamo, la serotonina modula la secreción de la GnRH (Jennes *et al.*, 1982) y de la LH por la hipófisis. Cuando la LH se une a su receptor en las células de Leydig, activa la presencia de las enzimas esteroideas encargadas de la producción de testosterona, entre ellas 17α -hidroxilasa y 17β -HSD (Jin & Yang., 2014; Boron *et al.*, 2017). Por lo tanto, en los animales que se les inyectó la pCA, la disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo generó cambios en la secreción de GnRH y de LH, lo que modificó la presencia de las enzimas de la esteroidogénesis.

Se reporta que la disminución en la concentración endógena de LH, afecta la capacidad de las células de Leydig para producir testosterona (Ewing & Zirkin., 1983; Wing *et al.*, 1984). Además, en la rata macho hipofisectomizada, la supresión de la secreción de LH disminuye la presencia de las enzimas esteroideas (Purvis *et al.*, 1973; Keeney *et al.*, 1988).

Con relación a la idea de que la pCA actúa directamente en el testículo, es posible que la desregulación en la síntesis de serotonina intragonadal afectó la presencia de las enzimas de la esteroidogénesis. En relación con esta idea, Chen y colaboradores (2003), mostraron que en la línea celular MA-10 que proviene de células tumorales de Leydig de ratón, las anfetaminas potencian el efecto de la hormona gonadotrópica humana (Hcg) e incrementan la secreción de progesterona. Un efecto contrario se observó cuando en células de Leydig de ratas adultas mantenidas *in vitro* se le adiciona anfetamina, se inhibió la secreción de la testosterona (Tsai *et al.*, 1996). Este efecto inhibitorio de la anfetamina es el resultado de la disminución en la actividad de las enzimas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17 α -hidroxilasa/C17-C20 liasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que participan en la formación de testosterona en las células de Leydig (Tsai., 1997).

El menor número de células de Leydig con inmunoreactividad a las enzimas, 17 α -hidroxilasa y 17 β -HSD, se acompañó de la disminución en la concentración de testosterona en el suero de los animales inyectados con pCA. Esto se debe a que ambas enzimas son esenciales en la síntesis de testosterona, la 17 α -hidroxilasa regula la transformación de los esteroides precursores de los andrógenos, hidroxipregnenolona e hidroxiprogesterona; 17 β -HSD cataliza la transformación de androstenediona a testosterona (Poirier., 2003).

Además de los cambios en las enzimas antes mencionadas, es posible que la disminución en la producción de progesterona que se observó en los animales inyectados con pCA y autopsiados a las 48 h postratamiento, sea el resultado de la enzima, 3 β -HSD, enzima que no fue evaluada en el presente estudio pero que es esencial en la formación de progesterona a partir del colesterol (Zirkin *et al.*; 2018).

La importancia de esta enzima en la síntesis de progesterona y testosterona se sustenta en las evidencias que muestran que cuando el gen que codifica para la 3 β -HSD presenta mutaciones no se lleva a cabo la formación de progesterona a partir de pregnenolona y la producción de testosterona también se disminuye (Lutfallah *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2011). Así mismo Tsa y colaboradores (1997), mostraron que la anfetamina disminuye la actividad de la 3 β -HSD en células de Leydig mantenidas *in vitro*.

Conjuntamente los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la desregulación del sistema serotoninérgico del hipotálamo y del testículo impactan negativamente en la esteroidogénesis del testículo.

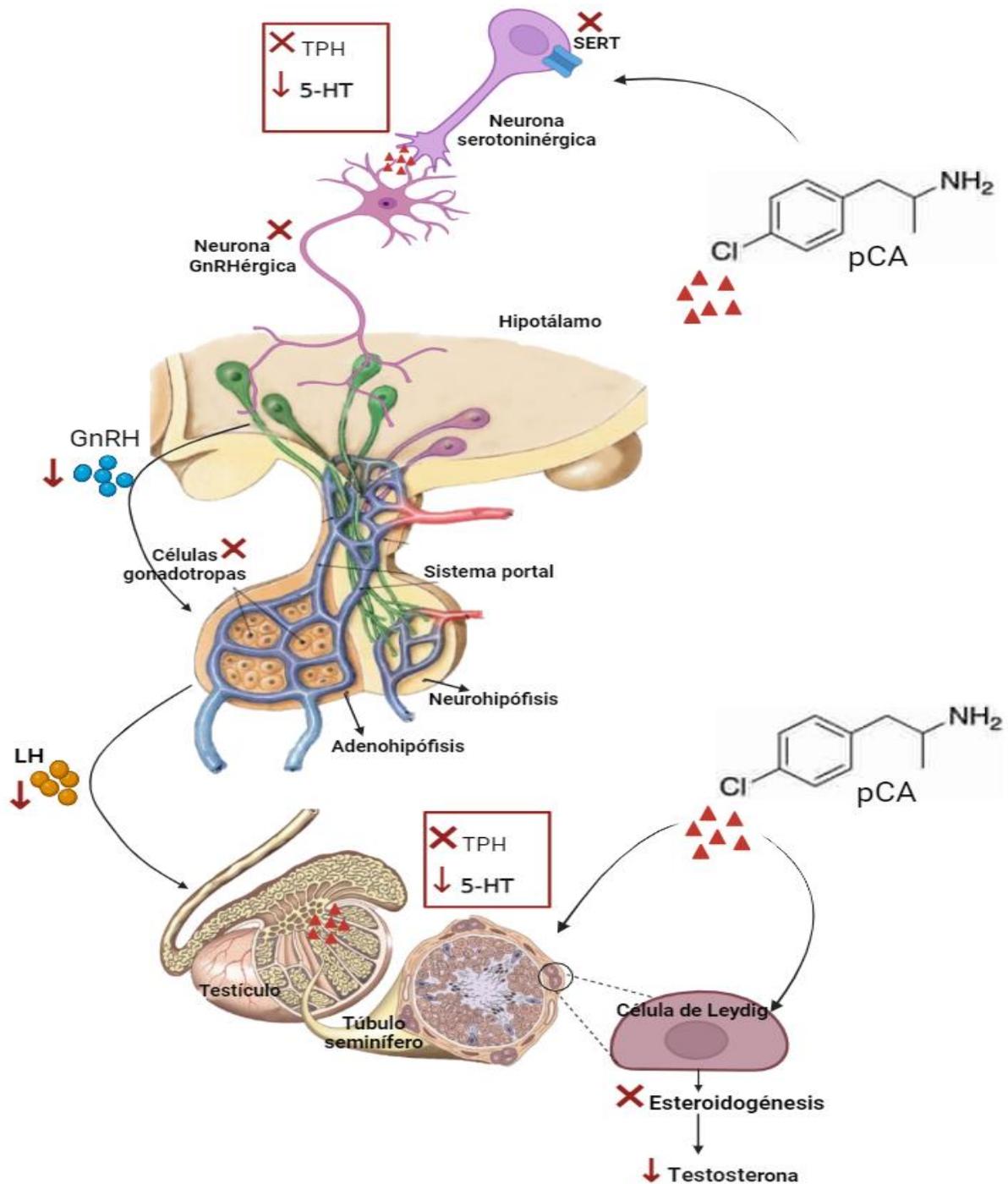


Figura 26. Posible mecanismo de acción de la pCA a nivel SNC y testicular. La pCA inhibe (X) la presencia del transportador de serotonina (SERT) de la enzima limitante de la síntesis de serotonina (TPH), la función de las neuronas GnRHérgicas y gonadotropas, provocando la disminución (↓) de Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona luteinizante (LH). Tomado y modificado de Guyton & Hall, 2011 de 7e12e9ce97aa0b9a1e55c46f86ca7aed.jpg (466×600) (pinimg.com) consultado el 02 marzo del 2023.

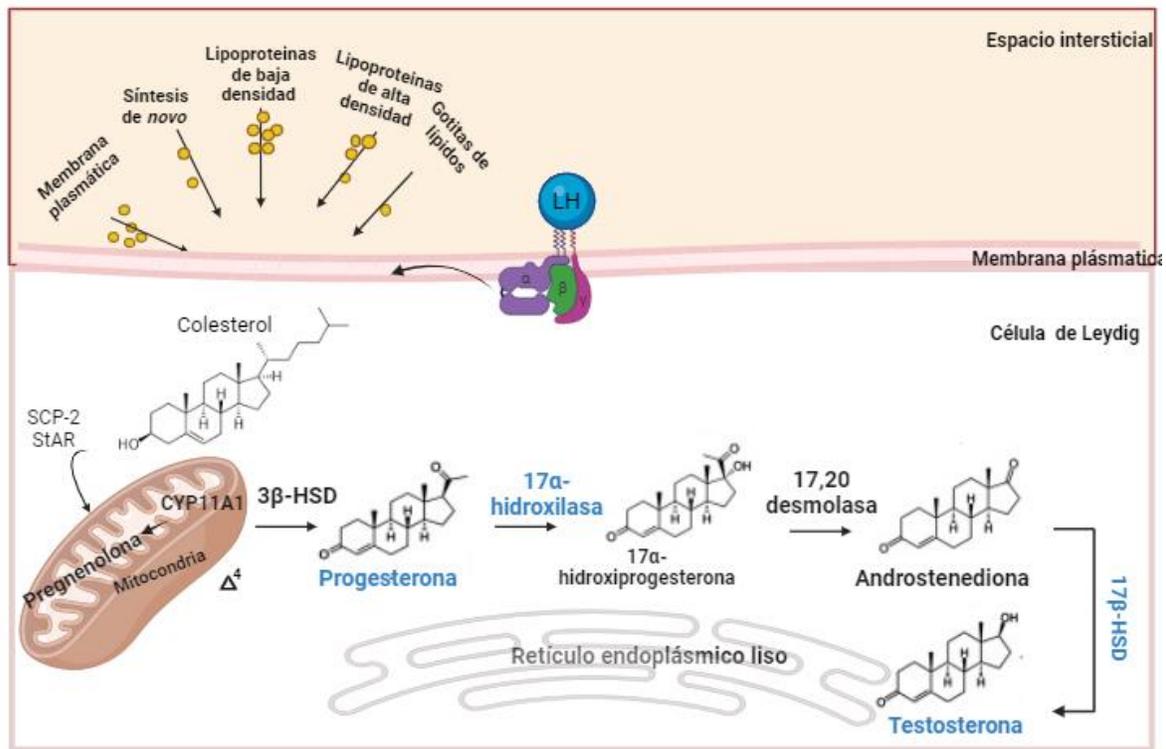


Figura 27. Ruta Δ^4 de la esteroidogénesis. La esteroidogénesis inicia cuando el ligando hormona luteinizante (LH) se une a su receptor específico en la membrana de las células de Leydig, se sintetizan las proteínas: Proteína transportadora de esteroides (SCP-2); proteína esteroidogénica reguladora aguda (STAR); enzima de escisión a la cadena lateral (CYP11A1); 17α -hidroxilasa; 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD); 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) que median la conversión de colesterol a testosterona. El presente estudio abordó el análisis y evaluación de la presencia de 17α -hidroxilasa y 17β -HSD y la cuantificación sérica de progesterona y testosterona (azul) (Tomado y modificado de Zirkin *et al.*, 2018).

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en este estudio proponemos que en la rata macho prepúber la pCA:

- 1.- Reduce el número de células de Leydig inmunorreactivas a la SERT y a las enzimas 17α -hidroxilasa y 17β -HSD.
- 2.- No modifica la presencia de las proteínas SERT y 17α -hidroxilasa en el testículo.
- 3.- Reduce la presencia de la proteína 17β -HSD en el testículo.
- 4.- Reduce la concentración de progesterona y testosterona en el suero.
- 5.- Induce desregulación del sistema serotoninérgico, y como consecuencia impacta negativamente la presencia de la enzima 17β -HSD en el testículo, y la esteroidogénesis gonadal, producción de progesterona y testosterona.

Literatura citada

- Adamczewska, D., Słowikowska-Hilczer, J., & Walczak-Jędrzejowska, R. (2022). The fate of Leydig cells in men with spermatogenic failure. *Life*, 12(4), 570-596. doi: 2443/10.3390/life12040570
- Aguilar, R., Antón, F., Bellido, C., Aguilar, E. & Gaytan, F. (1995). Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. *Journal of endocrinology*, 146(1), 15–21. doi: 10.1677/joe.0.1460015
- Aragón, A., Ayala, M. E., 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. doi: 2443/10.1530/rep.1.00598
- Bader, M. (2019). Inhibition of serotonin synthesis: a novel therapeutic paradigm. *Pharmacology & therapeutics*, 205, 107423-107458. doi: 2443/10.1016/j.pharmthera.2019.107423
- Berne & Levy, Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2018). *Fisiología*. Elsevier Health Sciences.
- Blakely, R. D., Berson, H. E., Freneau, R. T., Jr, Caron, M. G., Peek, M. M., Prince, H. K., & Bradley, C. C. (1991). Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature*, 354(6348), 66–70. doi: 2443/10.1038/354066a0
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2017). *Fisiología médica*, 3ª ed. España. Elsevier health sciences.
- Breed, W.G., & Setchell B.P. (2006). “Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract.” *Physiology of reproduction*. 3ª ed., 771–826.
- Campos, M. B., Vitale, M. L., Calandra, R. S., & Chiochio, S. R. (1990). Serotonergic innervation of the rat testis. *Journal of reproduction and fertility*, 88(2), 475–479. doi: 2443/10.1530/jrf.0.0880475
- Capela, J. P., & Carvalho, F. D. (2022). A review on the mitochondrial toxicity of "ecstasy" (3,4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA). *Current research in toxicology*, 3, 100075. doi: 2443/10.1016/j.crtox.2022.100075
- Cataldo, L. R., Cortés, V. A., Galgani, J. E., Olmos, P. R., & Santos, J. L. (2014). Role of peripheral serotonin in the insulin secretion and glucose homeostasis. *Nutrición hospitalaria*, 30(3), 498–508. doi:10.3305/nh.2014.30.3.7531
- Chen, L.Y., Huang Y.L., Liu M.Y., Leu S. F., & Huang B. M. (2003). Effects of amphetamine on steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Life sciences*, 72(17), 1983-1995. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00011-0
- Colado, M. I., O'Shea, E., Granados, R., Murray, T. K., & Green, A. R. (1997). In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Journal of pharmacology*, 121(5), 889–900. doi: 2443/10.1038/sj.bjp.0701213

-
- Coleman, J. A., Yang, D., Zhao, Z., Wen, P. C., Yoshioka, C., Tajkhorshid, E., & Gouaux, E. (2019). Serotonin transporter-ibogaine complexes illuminate mechanisms of inhibition and transport. *Nature*, 569(7754), 141–145. doi: 2443/10.1038/s41586-019-1135-1
- Commins, D. L., Axt, K. J., Vosmer, G., & Seiden, L. S. (1987). Endogenously produced 5,6-dihydroxytryptamine may mediate the neurotoxic effects of para-chloroamphetamine. *Brain research*, 419(1-2), 253–261. doi: 2443/10.1016/0006-8993(87)90591-9
- Commons, K. G. (2020). Dorsal raphe organization. *Journal of chemical neuroanatomy*, 110 (2020), 101868-101872. doi: 2443/10.1016/j.jchemneu.2020.101868
- Csaba, Z., Csernus, V., & Gerendai, I. (1998). Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis. *Journal neuroendocrinology*. 10(5), 371–376. doi:10.1046/j.1365-2826.1998.00217.x
- Díaz-Ramos, J., Flores-Flores, M., Ayala, M. E., & Aragón-Martínez, A. (2018). Impaired serotonin communication during juvenile development in rats diminishes adult sperm quality. *Systems biology in reproductive medicine*, 64(5), 340–347. doi:2443/10.1080/19396368.2018.1472825
- Dufau, M. L., Tinajero, J. C., & Fabbri, A. (1993). Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *Faseb*, 7(2), 299–307. doi:2443/10.1096/fasebj.7.2.8382638
- Ewing, L. L., & Zirkin, B. (1983). Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent progress in hormone research*, 39, 599–635. doi: 2443/10.1016/b978-0-12-571139-5.50019-7
- Fink, G., Sumner, B., Rosie, R., Wilson, H., & McQueen, J. (1999). Androgen actions on central serotonin neurotransmission: relevance for mood, mental state, and memory. *Behavioural brain research*, 105(1), 53–68. doi:2443/10.1016/s0166-4328(99)00082-0
- Folsom, L.J., Hjaige, M., Liu, J., Eugster, E.A., & Auchus, R.J., (2018). Germ cell neoplasia in situ complicating 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type deficiency. *Molecular and cell endocrinology*, 489, 3–8. doi.org/10.1016/j.mce.2018.11.014
- Frungieri, M. B., Zitta, K., Pignataro, O. P., Gonzalez-Calvar, S. I., & Calandra, R. S. (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. doi:2443/10.1159/000063682
- Ge, R. S., Li, X., & Wang, Y. (2021). Leydig cell and spermatogenesis. *Advances in experimental medicine and biology*, 1288, 111–129. doi:2443/10.1007/978-3-030-77779-1_6
- Gerendai, I., Banczerowski, P., & Halász, B. (2005). Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine*, 28(3), 309–318. doi: 2443/10.1385/ENDO:28:3:309
-

-
-
- Gómez-Chang, E., Fernando, L., & Martínez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 15(1), 24-36.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405888X2012000100003&lng=es&tlng=es.
- Göthert, M. (2013). Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part I. General background and discovery of serotonin as a basis for 5-HT receptor identification. *Pharmacology of reproduction*, 65(4), 771-86. doi: 10.1016/s1734-1140(13)71059-4
- Göthert, M., Bönisch, H., Malinowska, B., & Schlicker, E. (2020). Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part II. *Pharmacological reports*, 72(2), 271–284. doi:2443/10.1007/s43440-019-00047-4
- Griswold, S. L., & Behringer, R. R. (2009). Fetal Leydig cell origin and development. *Sexual development*, 3(1), 1–15. doi:2443/10.1159/000200077
- Guyton & Hall. (2011). Tratado de fisiología médica, 10^a edición. Elsevier España.
- Guzel, T. & Mirowska-Guzel, D. (2022). The role of serotonin neurotransmission in gastrointestinal tract and pharmacotherapy. *Molecules*, 27(5), 1680-1696. doi:2443/10.3390/molecules27051680
- Halpern, J. A., & Brannigan, R. E. (2019). Testosterone deficiency. *Journal of the american medical association*, 322(11), 1116. doi:2443/10.1001/jama.2019.9290
- Heal, D. J., Smith, S. L., Gosden, J., & Nutt, D. J. (2013). Amphetamine, past and present a pharmacological and clinical perspective. *Journal of psychopharmacology* 27(6), 479–496. doi:2443/10.1177/0269881113482532
- Heinrich, A., & DeFalco, T. (2020). Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology*, 8(4), 903–914. doi:2443/10.1111/andr.12703
- Herrera-Pérez, J. J., Fernández-Guasti, A., & Martínez-Mota, L. (2013). Brain SERT expression of male rats is reduced by aging and increased by testosterone restitution. *Journal of neuroscience*, 2013, 201909-201915. doi:2443/10.1155/2013/201909
- Huleihel, M., & Lunenfeld, E. (2004). Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Journal of andrology*, 6(3), 259–268.
- Inoue, M., Baba, T., & Morohashi, K. I. (2018). Recent progress in understanding the mechanisms of Leydig cell differentiation. *Molecular and cellular endocrinology*, 468, 39–46. doi: 2443/10.1016/j.mce.2017.12.013
- Jennes, L., Beckman, W. C., Stumpf, W. E., & Grzanna, R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenalinergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. *Experimental brain research*, 46(3), 331–338. doi:2443/10.1007/BF00238628
- Jiménez-Trejo, F., Coronado-Mares, I., Arriaga-Canon, C., Herrera, L. A., Roque-Ramírez, B., Chávez-Saldaña, M., Rojas-Castañeda, J., Cerbón, M., & Viguera-Villaseñor, R. M. (2021). Indolaminergic system in adult rat testes: evidence for a local serotonin system. *Frontiers in neuroanatomy*, 14(570058), 570058-570070. doi:2443/10.3389/fnana.2020.570058
-

-
-
- Jin, J. M., & Yang, W. X. (2014). Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*, 551(1), 15–25. doi: 2443/10.1016/j.gene.2014.08.048
- Jones, L. A., Sun, E. W., Martin, A. M., & Keating, D. J. (2020). The ever-changing roles of serotonin. *Journal of biochemistry & cell biology*, 125(2020), 105776-105781. doi: 2443/10.1016/j.biocel.2020.105776
- Jovanovic, H., Kocoska-Maras, L., Rådestad, A. F., Halldin, C., Borg, J., Hirschberg, A. L., & Nordström, A. L. (2015). Effects of estrogen and testosterone treatment on serotonin transporter binding in the brain of surgically postmenopausal women a PET study. *Neuroimage*, 106(2015), 47–54. doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.11.003
- Kanova, M., & Kohout, P. (2021). Serotonin-its synthesis and roles in the healthy and the critically III. *Journal of molecular sciences*, 22(9), 4837-4849. doi:2443/10.3390/ijms22094837
- Kazmi, S. H., & Can, A. S. (2022). Luteinizing hormone deficiency. *StatPearls Publishing*.
- Keeney, D. S., Mendis-Handagama, S. M., Zirkin, B. R., & Ewing, L. L. (1988). Effect of long-term deprivation of luteinizing hormone on Leydig cell volume, Leydig cell number, and steroidogenic capacity of the rat testis. *Endocrinology*, 123(6), 2906–2915. doi:2443/10.1210/endo-123-6-2906
- Killian, J., Pratis K., Clifton R. J., Stanton P. G., & Robertson D. M. (2003). 5 α -reductase isoenzymes 1 and 2 in the rat testis during postnatal development. *Biology of reproduction*, 68, 1711-1718. doi: 10.1095/biolreprod.102.009142
- Lei, Z. M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X., & Rao, C. V. (2001). Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Molecular endocrinology*, 15(1), 184–200. doi:2443/10.1210/mend.15.1.0586
- Lesch, K. P., Wolozin, B. L., Estler, H. C., Murphy, D. L., & Riederer, P. (1993). Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter. *Journal of neural transmission*. 91(1), 67–72. doi:2443/10.1007/BF01244919
- Losinno, A. D., Morales, A., Fernández, D., & Lopez, A. (2012). Peritubular myoid cells from rat seminiferous tubules contain actin and myosin filaments distributed in two independent layers. *Biology of reproduction*, 86 (5), 1–8. doi.10.1095/biolreprod.111.095158
- Lutfallah, C., Wang, W., Mason, J. I., Chang, Y. T., Haider, A., Rich, B., Castro-Magana, M., Copeland, K. C., David, R., & Pang, S. (2002). Newly proposed hormonal criteria via genotypic proof for type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(6), 2611–2622. doi:2443/10.1210/jcem.87.6.8615
- McGregor, I. S., Clemens, K. J., Van der Plasse, G., Li, K. M., Hunt, G. E., Chen, F., & Lawrence, A. J. (2003). Increased anxiety 3 months after brief exposure to MDMA ("Ecstasy") in rats: association with altered 5-HT transporter and receptor density. *Neuropsychopharmacology*, 28(8), 1472–1484. doi: 2443/10.1038/sj.npp.1300185
- McQuade, R., & Sharp, T. (1995). Release of cerebral 5-hydroxytryptamine evoked by electrical stimulation of the dorsal and median raphe nuclei: effect of a neurotoxic amphetamine. *Neuroscience*, 68(4), 1079–1088. doi:2443/10.1016/0306-4522(95)00214-4
-

-
-
- McQueen, J. K., Wilson H., Sumner B. E. H., & Fink G. (1999). Serotonin transporter (SERT) mRNA and binding site densities in male rat brain affected by sex steroids. *Investigación molecular del cerebro*, 63(2):241–247.
- Mercado, C. P., & Kilic, F. (2010). Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Molecular interventions*, 10(4), 231–241. doi:2443/10.1124/mi.10.4.6
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*, 32(1), 81–151. doi:2443/10.1210/er.2010-0013
- Mobaraki, F., Seghatoleslam, M., Fazel, A., & Ebrahimzadeh-Bideskan, A. (2018). Effect of MDMA (ecstasy) on apoptosis in adult rat testis. *Toxicology mechanisms and methods*, 28(3); 219–229. doi: 10.1080/15376516.2017.1388461
- O'Donnell, L., Smith, L. B., & Rebourcet, D. (2022). Sertoli cells as key drivers of testis function. *Seminars in cell & developmental biology*, 121, 2–9. doi: 2443/10.1016/j.semcd.2021.06.016
- O'Shaughnessy, P. J., Morris, I. D., Huhtaniemi, I., Baker, P. J., & Abel, M. H. (2009). Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Molecular and cellular endocrinology*, 306(1-2), 2–8. doi: 2443/10.1016/j.mce.2008.11.005
- O'Shea, E., Granados, R., Esteban, B., Colado, M. I., & Green, A. R. (1998). La relación entre el grado de neurodegeneración de las terminales nerviosas 5-HT del cerebro de rata y la dosis y frecuencia de administración de MDMA («éxtasis»). *Neurofarmacología*, 37(7), 919–926. doi:2443/10.1016/s0028-3908(98)00029-x
- Palombi, F., Salanova, M., Tarone, G., Farini, D., & Stefanini, M. (1992). Distribution of $\beta 1$ integrin subunit in rat seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, 47(6), 1173–1182. doi:2443/10.1095/biolreprod47.6.1173
- Pantoni, M. M., & Anagnostaras, S. G. (2019). Cognitive effects of MDMA in laboratory animals: a systematic review focusing on dose. *Pharmacological reviews*, 71(3), 413–449. doi: 2443/10.1124/pr.118.017087
- Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Torrens, M., Farré, A., Poyatos, L., Hladun, O., Sanvisens, A., Muga, R., & Farré, M. (2020). MDMA interactions with pharmaceuticals and drugs of abuse. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 16(5), 357–369. doi: 2443/10.1080/17425255.2020.1749262
- Payne, A. H., & Youngblood, G. L. (1995). Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of reproduction*, 52(2), 217–225. doi: 10.1095/biolreprod52.2.217
- Picut, C. A., Remick A. K., de Rijk E., Simons M. L., Stump D. G., & Parker G. A. (2015). Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicology pathology*, 43(3), 326–342. doi: 10.1177/0192623314547279.
- Poirier, D. (2003). Inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Current medicinal chemistry*, 10(6), 453–477. doi:2443/10.2174/0929867033368222
-

-
-
- Pourhamzeh, M., Moravej, F. G., Arabi, M., Shahriari, E., Mehrabi, S., Ward, R., Ahadi, R., & Joghataei, M. T. (2022). The roles of serotonin in neuropsychiatric disorders. *Cellular and molecular neurobiology*, 42(6), 1671–1692. doi: 2443/10.1007/s10571-021-01064-9
- Purvis, J. L., Canick, J. A., Latif, S. A., Rosenbaum, J. H., Hologgitas, J., & Menard, R. H. (1973). Lifetime of microsomal cytochrome P-450 and steroidogenic enzymes in rat testis as influenced by human chorionic gonadotrophin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 159(1), 39–49. doi: 2443/10.1016/0003-9861(73)90427-x
- Ramamoorthy, S., Bauman, A. L., Moore, K. R., Han, H., Yang-Feng, T., Chang, A. S., Ganapathy, V., & Blakely, R. D. (1993). Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Academy of sciences*, 90(6), 2542–2546. doi: 2443/10.1073/pnas.90.6.2542
- Reiff, C. M., Richman, E. E., Nemeroff, C. B., Carpenter, L. L., Widge, A. S., Rodriguez, C. I., Kalin, N. H., McDonald, W. M., & the work group on biomarkers and novel treatments, a division of the american psychiatric association council of research (2020). Psychedelics and psychedelic-assisted psychotherapy. *Journal of psychiatry*, 177(5), 391–410. doi:2443/10.1176/appi.ajp.2019.19010035
- Rivas, C., Flores, M., Pérez, J., Gallegos, E., Cárdenas, M., Ayala, M. E., & Aragón, A. (2022). Acute effects of para-chloroamphetamine on testosterone and markers of apoptosis in seminiferous epithelium of prepubertal male rats. *Systems biology in reproductive medicine*, 68(5-6), 396–406. doi: 2443/10.1080/19396368.2022.2116369
- Rouiller-Fabre, V., Lecref, L., Gautier, C., Saez, J. M., & Habert, R. (1998). Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology*, 139(6), 2926–2934. doi: 2443/10.1210/endo.139.6.6035
- Rudnick, G., & Clark, J. (1993). From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochimica et biophysica acta*, 1144(3), 249–263. doi: 2443/10.1016/0005-2728(93)90109-s
- Rudnick, G., & Wall, S. C. (1992). p-Chloroamphetamine induces serotonin release through serotonin transporters. *Biochemistry*, 31(29), 6710–6718. doi: 10.1021/bi00144a010
- Sanders-Bush, E., & Steranka, L. (1978). Immediate and long-term effects of p-chloroamphetamine on brain amine. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 305, 208–221. doi: 10.1111/j.1749-6632.1978.tb31525.x
- Sanders-Bush, E., Bushing, J. A., & Sulser, F. (1975). Long-term effects of p-chloroamphetamine and related drugs on central serotonergic mechanisms. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 192(1), 33–41.
- Santi, D., Crépieux, P., Reiter, E., Spaggiari, G., Brigante, G., Casarini, L., Rochira, V., & Simoni, M. (2020). Follicle-stimulating hormone (FSH) action on spermatogenesis: a focus on physiological and therapeutic roles. *Journal of clinical medicine*, 9(4), 1014–1041. doi: 2443/10.3390/jcm9041014
-

-
- Schenk, S., & Highgate, Q. (2021). Methylendioxyamfetamina (MDMA): Serotonérgico y dopaminérgico mecanismos relacionados con su uso y abuso. *Journal of neurochemistry*, 157(5), 1714–1724. doi: 2443/10.1111/jnc.15348
- Siefried, K. J., Acheson, L. S., Lintzeris, N., & Ezard, N. (2020). Tratamiento farmacológico de la dependencia de amfetamina/metamfetamina: una revisión sistemática. *CNS drugs*, 34(4), 337–365. doi: 2443/10.1007/s40263-020-00711-x
- Siegel, G. J., Albers, R. W., Price, D. L., & Brady, S. T. (2012). *Neuroquímica básica: principios de la neurobiología molecular, celular y médica*. 8ª ed. Academic Press.
- Simmler, L. D., & Liechti, M. E. (2018). Farmacología de las sustancias psicoactivas nuevas tipo MDMA y amfetamina. *Handbook of experimental pharmacology*, 252, 143–164. doi: 2443/10.1007/164_2018_113
- Ślifirski, G., Król, M., & Turło, J. (2021). 5-HT Receptores y el desarrollo de nuevos antidepresivos. *Journal of molecular sciences*, 22(16), 9015. doi: 2443/10.3390/ijms22169015
- Tinajero, J. C., Fabbri, A., & Dufau, M. L. (1992). Regulación de la secreción de factor liberador de corticotropina por las células de Leydig por serotonina. *Endocrinology*, 130(4), 1780–1788. doi: 2443/10.1210/endo.130.4.1312425
- Tremblay, J. J. (2015). Regulación molecular de la esteroidogénesis en las células endocrinas de Leydig. *Steroids*, 103, 3–10. doi: 2443/10.1016/j.steroids.2015.08.001
- Tresguerres, J. (2005). *Fisiología humana*, 3ª edición. McGraw-Hill Interamericana.
- Tsai, C. J., Chiu, C. H., Kuo, Y. Y., Huang, W. S., Yu, T. H., Flores, L. G., Yeh, S. H., & Ma, K. H. (2022). La amitriptilina acelera la recuperación de la unión de SERT en un modelo de ratón de 3,4-metildioxi amfetamina (MDMA) in vivo con 4-[¹⁸F]-ADAM PET Imaging. *Journal of molecular sciences*, 23(13), 7035–7050. doi:2443/10.3390/ijms23137035
- Tsai, S. C., Chen, J. J., Chiao, Y. C., Lu, C. C., Lin, H., Yeh, J. Y., Lo, M. J., Kau, M. M., Wang, S. W., & Wang, P. S. (1997). El papel de la producción de AMP cíclico, la activación de canales de calcio y las actividades enzimáticas en la inhibición de la secreción de testosterona por amfetamina. *Journal of pharmacology*, 122(5), 949–955. doi: 2443/10.1038/sj.bjp.0701463
- Tsai, S. C., Chiao, Y. C., Lu, C. C., Doong, M. L., Chen, Y. H., Shih, H. C., Liaw, C., Wang, S. W., & Wang, P. S. (1996). Inhibición por amfetamina de la secreción de testosterona a través de un mecanismo que implica un aumento de la producción de AMP cíclico en los testículos de la ratona. *Journal of pharmacology*, 118(4), 984–988. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15496.x
- Villar, J. I. Evaluación de la administración de p-cloroamfetamina y su efecto en la secreción de testosterona y estructura del testículo de la ratona macho prepúber. (2011). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. Tesisunam
- Wada, K., Hu, L., Mores, N., Navarro, C. E., Fuda, H., Krsmanovic, L. Z., & Catt, K. J. (2006). Los subtipos de receptores de serotonina (5-HT) median modos específicos de señalización inducida por 5-HT y regulación de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina en las neuronas. *Molecular endocrinology*, 20(1), 125–135. doi: 2443/10.1210/me.2005-0109
-

-
-
- Walker, C., Garza, S., Papadopoulos, V., & Culty, M. (2021). Impact of endocrine-disrupting chemicals on steroidogenesis and consequences on testicular function. *Molecular and cellular endocrinology*, 527, 111215-111227. doi.org/10.1016/j.mce.2021.111215
- Walther, D. J., & Bader, M. (2003) «A unique central tryptophan hydroxylase isoform». *Biochemistry pharmacological*. 66 (9), 1673-80. doi:10.1016/S0006-2952(03)00556-2
- Wang, H., Goehring, A., Wang, K. H., Penmatsa, A., Ressler, R., & Gouaux, E. (2013). Structural basis for action by diverse antidepressants on biogenic amine transporters. *Nature*, 503(7474), 141–145. doi: 2443/10.1038/nature12648
- Wang, L., Erlandsen, H., Haavik, J., Knappskog, P. M., & Stevens R. C. (2002). «Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin». *Biochemistry*, 41 (42), 12569-74. doi:10.1021/bi026561f
- William, R., Zadeh, K., Vekariya, R., Ge, Y., & Mohamadzadeh, M. (2021). Tryptophan metabolism and gut-brain homeostasis. *Journal of molecular sciences*, 22(6), 2973-2996. doi:2443/10.3390/ijms22062973
- Xie, T., Tong, L., McLane, M. W., Hatzidimitriou, G., Yuan, J., McCann, U., & Ricaurte, G. (2006). Loss of serotonin transporter protein after MDMA and other ring-substituted amphetamines. *Neuropsychopharmacology*, 31(12), 2639–2651. doi: 2443/10.1038/sj.npp.1301031
- Ye, L., Su, Z. J., & Ge, R. S. (2011). Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules*, 16(12), 9983–10001. doi:2443/10.3390/molecules16129983
- Yeung, A., Georgieva, M. G., Atanasov, A. G., & Tzvetkov, N. T. (2019). Monoamine Oxidases (MAOs) as privileged molecular targets in neuroscience: research literature analysis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 146-182. doi:10.3389/fnmol.2019.00143
- Yokonishi, T., McKey, J., Ide, S., & Capel, B. (2020). Sertoli cell ablation and replacement of the spermatogonial niche in mouse. *Nature communications*, 11(1), 40-51. doi: 2443/10.1038/s41467-019-13879-8
- Zirkin, B. R., & Vassilios P. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation, *Biology of reproduction*, 99(1), 101–111. doi.org/10.1093/biolre/iy059
- Zomer, H. D., & Reddi, P. P. (2020). Characterization of rodent Sertoli cell primary cultures. *Molecular reproduction and development*, 87(8) 857–870. doi:2443/10.1002/mrd.23402