



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA E  
INTRATESTICULAR DE P-CLOROANFETAMINA  
SOBRE LA SECRECIÓN DE TESTOSTERONA Y LA  
ESPERMATOGÉNESIS. LA RATA COMO MODELO  
DE ESTUDIO.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

P R E S E N T A

MANUEL BERNARDO GARCÍA CURIEL

DIRECTORA: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR



MÉXICO, D. F.

Marzo de 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



## ÍNDICE

RESUMEN.....	i
INTRODUCCIÓN.....	1
Serotonina.....	1
Anfetaminas.....	4
Aparato Reproductor del Macho.....	6
Esteroidogénesis.....	10
Espermatogénesis.....	13
Espermatozoide.....	20
Anormalidades del Espermatozoide.....	21
Apoptosis.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODO.....	26
Administración Sistémica e Intratesticular del Fármaco.....	26
Autopsia de los Animales.....	27
Cuantificación de Serotonina y su Metabolito por HPLC.....	27
Evaluación de la Espermatogénesis.....	30
Evaluación de la Estructura del Testículo.....	31
Evaluación de Apoptosis por Túnel.....	31
Cuantificación de Testosterona.....	31
Análisis Estadístico.....	31



---

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>1).-Efecto de la Administración Sistémica de p-cloroanfetamina.....</b>	<b>34</b>
1.1.- Concentración de Serotonina y del Ácido 5-hidroxiindolacético.....	34
1.2.- Evaluación de la Espermatogénesis.....	41
1.3.- Concentración de Testosterona en Suero.....	44
1.4.- Apoptosis en el Testículo.....	46
<b>2).- Efecto de la Administración Intratesticular de p-Cloroanfetamina.....</b>	<b>48</b>
2.1.- Concentración de Serotonina y del Ácido 5-Hidroxiindolacético.....	48
2.2.- Evaluación de la Espermatogénesis.....	48
2.3.- Concentración de Testosterona en Suero.....	56
2.4.- Apoptosis en el Testículo.....	56
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>



## RESUMEN

La serotonina es una amina que se encuentra en diferentes regiones del cerebro, así como en las glándulas adrenales, el testículo y otros órganos periféricos. Este neurotransmisor participa en la regulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, hasta el momento no existen evidencias claras de que la amina actúe directamente en el testículo, la hipófisis y la glándula adrenal y como consecuencia regule la secreción de la testosterona en diferentes niveles del eje reproductivo Hipotálamo-Hipófisis-Gónada.

Por ello, en el presente estudio, nos interesa analizar los efectos de la administración por vía sistémica de la pCA, un inhibidor de la síntesis de serotonina, en el sistema serotoninérgico del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, espermatogénesis, en la concentración de testosterona en el suero y en el proceso de apoptosis en el testículo. Así mismo, evaluamos el efecto de la administración de la p-CA directamente en el testículo en los parámetros antes mencionados.

Para ello, se utilizaron ratas macho de 30 días de edad, a las cuales se le administró la pCA por vía sistémica en una dosis de 10 mg/kg de peso corporal cada 7 días y por vía intratesticular una única dosis de 10mg/kg de peso corporal. Otro grupo de animales recibió una dosis de solución salina al 0.9% (SS) y como grupo de comparación utilizamos animales sin tratamiento (TA). El sacrificio de los animales de los diferentes grupos experimentales se realizó a los 65 días de edad.

En el presente estudio se observaron diferencias significativas en la concentración de serotonina y su metabolito, entre el grupo TA y los animales inyectados con solución salina (SS) por lo que nuestro grupo de comparación para analizar los efectos de la pCA fueron los animales inyectados con solución salina. En comparación con el grupo SS, en los animales tratados con p-CA por vía sistémica se observó la disminución significativa en la concentración de serotonina y su metabolito en el hipotálamo medio, las glándulas adrenales, y los testículos. En el hipotálamo anterior únicamente disminuyó significativamente la concentración de serotonina y su metabolito no presentó ningún cambio significativo. En la hipófisis no se presentaron cambios en estos parámetros.

En comparación con el grupo SS, en los animales tratados con la amfetamina se observó la disminución significativa en el número, viabilidad y movilidad de los espermatozoides, así como un aumento significativo en las anomalías espermáticas y la presencia de células apoptóticas en los túbulos seminíferos. Mientras que la concentración de testosterona disminuyó pero esto no fue significativo.

En los animales en los que se realizó la inyección intratesticular de la p-CA, la concentración de 5-HT no se modificó, mientras que el metabolito disminuyó



significativamente en el testículo en donde se realizó la inyección intratesticular del fármaco.

La concentración de testosterona en el suero de los animales con inyección intratesticular del fármaco fue significativamente mayor que en los animales del grupo SS. Esto se acompañó de la disminución en el proceso de espermatogénesis (movilidad, número y viabilidad de los espermatozoides), así como el incremento en las formas anormalidades.

El proceso de apoptosis se incrementó significativamente en el compartimento basal y adluminal del epitelio seminífero

Los resultados nos permiten sugerir que la p-CA cuando se administra por vía sistémica actúa en el hipotálamo y en el testículo y disminuye la actividad del sistema serotoninérgico en estos órganos, lo que se refleja en el incremento en la muerte celular por apoptosis en el epitelio seminífero, y esto se traduce en la disminución de la espermatogénesis.



## INTRODUCCIÓN

### Serotonina

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT), es una amina biogénica que se le ha identificado en el sistema nervioso central, es producida por neuronas especializadas denominadas serotoninérgicas y en la glándula pineal. A la serotonina también se le encuentra en varios tejidos periféricos incluyendo las células enterocromafines de la mucosa gastrointestinal, las plaquetas, los mastocitos, el páncreas, el pulmón, timo, tiroides y el tracto urogenital de la hembra y el macho (Nolth, 1994; Walther y Bader, 2003; Tinajero, 1993).

Durante las dos últimas décadas ha habido un auge en las investigaciones sobre el papel de la serotonina en el sistema nervioso central, entre estas un número importante de publicaciones se han abocado al análisis del papel de la amina en la regulación neuroendocrina (Dinan, 1996).

La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido, triptófano. Este aminoácido es transportado desde la sangre al cerebro y es incorporado por las neuronas serotoninérgicas, en donde se lleva a cabo su hidroxilación por la acción de la enzima, triptófano hidroxilasa (TPH) y forma el 5-hidroxitriptofano, (5-HTP), paso limitante en la síntesis de serotonina. Este compuesto por acción de la enzima descarboxilasa se transforma en serotonina. La serotonina en exceso que se libera y no interactúa con su receptor en la hendidura presináptica, se une a una proteína transportadora llamada SERT, que se expresa tanto en las neuronas del sistema nervioso central, como en células en tejidos periféricos. La función de la SERT es transportar a la serotonina desde el compartimiento extracelular al interior, de esta manera la amina entra a la mitocondria de la neurona, en donde es metabolizada por la enzima monoamino oxidasa (MAO), para formar el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), principal metabolito de la serotonina (Figura 1) (Frazer, 1999; Iceta, 2008; Mendoza, 2008).

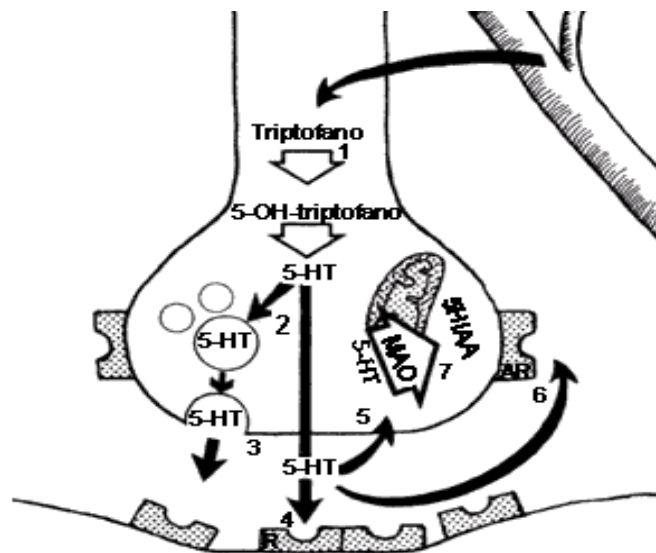
Se ha sugerido la existencia de dos sistemas serotoninérgicos, debido a que existen dos isoformas de la enzima limitante de la síntesis de serotonina, como lo son, la TPH<sub>1</sub> y la TPH<sub>2</sub>. La primera isoforma se encuentra principalmente en la glándula pineal y en diferentes tejidos periféricos como el timo, el bazo, el intestino y el ovario. La TPH<sub>2</sub> se encuentra solo en el cerebro (Walther y col., 2003).

En el sistema nervioso central las neuronas serotoninérgicas se agrupan en nueve paquetes, denominados del B1 consecuentemente hasta el B9 y en su conjunto constituyen el núcleo del rafé. Este núcleo se localiza en el cerebro y se divide en dorsal (NDR), medial (NMR) y del puente (NPR); la principal fuente de serotonina del hipotálamo



proviene de los somas de las células serotoninérgicas que se localizan en el NDR y NMR (Velasco, 2008; Walther y Bader, 1999).

Tanto el NDR como el NMR, se diferencian en algunos aspectos morfológicos, en las áreas del encéfalo que inervan y la trayectoria de sus axones, así como la susceptibilidad de las neuronas que conforman a cada uno de los núcleos a los agentes farmacológicos. Los axones serotoninérgicos del NMR, del tipo M, tienen un aspecto grueso con varicosidades esféricas grandes. Los axones del NDR, del tipo D, son finos y tienen varicosidades pleomórficas pequeñas. Los axones del NDR son más vulnerables a ciertos derivados de las anfetaminas como la p-CA en comparación de los que se originan en el NMR (Mamounas y Molliver, 1988; Mamounas y col., 1991; Frazer y Hensler, 1999).



**Figura 1. Sinapsis serotoninérgica. 1) Formación de la 5-hidroxitriptófano, 2) Acción de la descarboxilasa y almacenamiento de la serotonina (5-HT) recién formada, 3) Liberación de la serotonina, 4) Receptor en la célula postsináptica, 5) Recaptura del exceso de 5-HT, 6) Receptores para la recaptura automática de 5-HT, 7) Metabolismo de la 5-HT por acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO) y formación del metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (1).**

Por estudios farmacológicos y de inmunohistoquímica se ha caracterizado un complejo sistema de receptores con los que interactúa la serotonina y estos se identifican con las siglas 5-HT seguidas de un número arábigo. Se conocen siete tipos de ellos (5HT-1, 5HT-2, 5HT-3, 5HT-4, 5HT-5, 5HT-6, 5-HT-7). El receptor 5HT1 se subdivide en el, 1b, 1d, 1e y 1f; el receptor 5HT2 en 2a, 2b y 2c. Sin embargo, en diferentes estudios se ha propuesto la existencia de otros receptores, pero las pruebas farmacológicas no han sido suficientes para discernir entre las vías de señalización y funciones en los que están involucrados (Dinan, 1996; Hoyer y col., 2002).





Existen evidencias anatómicas que apoyan el hecho de que la serotonina participa en la modulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), las gonadotropinas [hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH)] y las funciones del testículo (Clarke y Pompolo, 2005).

También se sugiere que la serotonina actúa directamente en la hipófisis, en donde modula la secreción de las gonadotropinas. Por estudios de histofluorescencia se ha mostrado que en el lóbulo neural e intermedio de la hipófisis existen terminales nerviosas serotoninérgicas. También se ha identificado serotonina en los gonadotropos, lo cual apoya la idea de que la serotonina regula la secreción de FSH y LH (Vanhatalo y col., 1995; Saavedra y col., 1975).

La serotonina, además de regular las funciones del testículo por intermedio de la modulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, se sugiere que actúa directamente en el testículo. En el fluido intersticial del testículo de la rata adulta se ha identificado a la serotonina. La fuente de la amina para la gónada en el macho, son las plaquetas y los mastocitos, así como la que se sintetiza en las propias células de Leydig. También está presente en la cápsula testicular y el fluido intersticial. En la rata, otra de las fuentes de serotonina para el testículo es el nervio espermático superior, sin embargo un alto porcentaje de la amina es producida por las células de Leydig. (Campos y col., 1990; Aragón y col., 2005; Tinajero, 1993).

Collin y colaboradores. (1996), han demostrado que cuando se mantienen células de Leydig en cultivo se secreta serotonina al medio y que estas células poseen la maquinaria enzimática para la síntesis y el metabolismo de la amina. Además se sugiere que la serotonina actúa como regulador autócrino en este tipo celular y participa en la modulación de la secreción de testosterona por el testículo (Tinajero , 1993).

La síntesis de testosterona por el testículo es regulada por la LH y otros factores como la noradrenalina y la serotonina. En relación a esta última se ha mostrado que es un importante regulador de la función de las células de Leydig, dado que estimula la secreción del factor liberador de la corticotropina (CRF) y este a su vez inhibe la síntesis de testosterona. La acción de la serotonina se ejerce al unirse al receptor 5-HT<sub>2</sub>, que se encuentra en la membrana celular de las células de Leydig (Tinajero, 1993).

Shishkina y Dygalo (2000), mostraron que cuando a ratas macho de 30 ó 40 días de edad se les administra p-chlorofenilalanina (PCPA, un inhibidor de la síntesis de serotonina) no se modifica la concentración de testosterona a los 60 días. No obstante cuando se aplica el mismo tratamiento a los 40 ó 44 días de edad, disminuye la concentración de testosterona en plasma, el peso testicular y el de las vesículas seminales y el número de



espermatozoides. Por otra parte cuando se administra serotonina en ratas macho de 30, 32, 34, 36 ó 38 días de edad y el sacrificio de los animales se realiza al día 60, se observa el incremento en las concentraciones de testosterona en el suero, así como el peso de los órganos sexuales. Con base en este experimento se muestra cómo la serotonina está íntimamente ligada a la modulación de la secreción de testosterona.

Estudios previos realizados por Piescikowska y colaboradores. (1999), han mostrado que al aplicar Katanserina (un antagonista del receptor 5-HT<sub>2A</sub>) a ratas prepúberes, se afecta el funcionamiento de las células de Leydig o indirectamente al modular el flujo sanguíneo de la gónada y como resultado de esto disminuye la secreción de testosterona. Con base en estas evidencias se apoya la idea de que la serotonina ejerce un efecto inhibitorio en la síntesis de testosterona en la rata macho prepúber.

La serotonina también se le encuentra en otros componentes del aparato reproductor del macho, se ha mostrado, en la cabeza del epidídimo (Aguilar y col., 1995). El origen de la serotonina en el epidídimo aún es motivo de controversia. Korman y Penttila en 1968, y Anderson y colaboradores en 1977, observaron la presencia de la amina en los mastocitos y células epiteliales del epidídimo de la rata y zarigüeya, respectivamente. Las concentraciones de la serotonina, son más elevadas en la cabeza y más bajas en la cauda del epidídimo (Anderson y col., 1977). Por otro lado tanto las células musculares de las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan al epidídimo y los mastocitos expresan el receptor a la amina del tipo 5-HT<sub>1B</sub>. También por cromatografía de líquidos de alta resolución se identificó la presencia de la enzima triptófano-hidroxilasa (primera enzima que participa en la ruta de síntesis de serotonina) y se observó que la actividad de dicha enzima aumenta con la maduración sexual (Jiménez-Trejo y col., 2007). Con base en estas evidencias también es posible pensar que la serotonina es un factor que interviene en el funcionamiento del epidídimo.

### **Anfetaminas**

La clasificación de las anfetaminas incluye todas aquellas sustancias derivadas de la estructura de fenilisopropilamina. Cuando estas son ingeridas se distribuyen en todo el organismo y debido a que atraviesan la barrera hematoencefálica se acumulan en el cerebro. Las anfetaminas tienen la capacidad de actuar en diversas áreas del cerebro. Al parecer modifican la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisión, como el dopaminérgico, noradrenérgico y serotoninérgico. Cuando se consumen las anfetaminas, estas se distribuyen en los tejidos periféricos, su periodo de acción oscila entre las 8 y 13 horas, tiempo en el que se metaboliza aproximadamente el 45% de la dosis ingerida o administrada, por lo que se elimina por orina en su forma activa. También se acumulan en el sistema nervioso, en riñón y pulmón. (Nordahl y col., 2003; Urtilla, 2000).



Dentro de los derivados de las anfetaminas se encuentra la p-Cloroanfetamina (p-CA) que comparte propiedades farmacológicas con algunas de las anfetaminas psicotrópicas, como la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA). Se ha mostrado que en la rata y los primates ambas sustancias ejercen efectos neurotóxicos en las terminales serotoninérgicas (Smith y Reinard, 1992). En estudios previos se ha mostrado que en diferentes regiones del cerebro de la rata la p-CA disminuye el contenido de serotonina y su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético. Sus efectos tóxicos persisten por periodos largos de tiempo después de su administración. Además, bloquea la actividad de la enzima monoaminoxidasa (MAO), la cual se encarga de la inactivación y degradación de la serotonina (Jessel, 2000; Urtilla, 2000).

En estudios de inmunohistoquímica realizados por Mamounas y Molliver. (1988), se mostró que cuando se administra la p-Cloroanfetamina (p-CA) por vía sistémica ésta causa degeneración de las terminales de los axones de las neuronas serotoninérgicas que conforman el NDR, en contraste las células del NMR no presentan un daño significativo. Con base en estas evidencias se sugiere que las células del NDR son más vulnerables a la acción de la p-CA. Cuando a la rata se le administra p-CA por vía sistémica, se producen diferentes efectos en el sistema serotoninérgico, como la liberación de serotonina de la terminal serotoninérgica, lo que conduce a la disminución de la concentración de serotonina y de su metabolito el 5-HIAA en diferentes regiones del cerebro, también se inhibe la actividad de la TPH, enzima limitante en la síntesis de serotonina (Sanders-Bush y col., 1972, Fuller y Snoddy., 1974, Steranka y col., 1978). Estos efectos se acompañan de la degeneración de los axones serotoninérgicos, lo que significa una reducción en la innervación serotoninérgica en diferentes regiones del cerebro (Berger y col., 1992).

Resultados obtenidos por Berger y col., (1992), sugieren que cuando la anfetamina se administra por vía sistémica se induce la formación de un metabolito tóxico a partir de una sustancia endógena fuera del cerebro. Una posible opción es que sea la serotonina misma, debido a que la amina que se libera en grandes cantidades como resultado de la acción de la p-CA puede ser transformada en metabolitos neurotóxicos tales como la 5,6-dihidroxitriptamina o la 5,7-dihidroxitriptamina, los que se detectan en el cerebro después de la administración de la anfetamina (Commins y col., 1987).

Se sugiere que estas anfetaminas también actúan directamente en el testículo, en relación a esto se ha mostrado que cuando se mantiene en cultivo una línea celular proveniente del testículo de ratón disminuye la síntesis de testosterona, debido a que posiblemente se modifica la actividad de los complejos enzimáticos que participan en la esteroidogénesis, particularmente en la síntesis de testosterona (Tsai y col., 1996).



## Aparato Reproductor del Macho

El aparato reproductor del macho está constituido por los testículos, los epidídimos, los conductos deferentes y las glándulas sexuales anexas (las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales). Los testículos son órganos ovoides pares que están dentro del escroto fuera de la cavidad abdominal, suspendidos de los cordones espermáticos y adheridos al escroto por los ligamentos escrotales (Figura 2) (Ross y col., 2006).

Las funciones del testículo son la formación de los espermatozoides y la secreción de hormonas, de las cuales la más importante es la testosterona. Es por esto que los testículos son considerados como los órganos primarios del aparato reproductor, ya que mediante la liberación de la testosterona, regula el funcionamiento de órganos sexuales secundarios. La arteria testicular es la que se encarga de irrigar al testículo, la cual desciende junto con el conjunto deferente. El sistema venoso que lo drena es el plexo venoso pampiniforme, este arteria junto con el sistema venoso regula la temperatura testicular (aproximadamente 36°C) (Gartner y Hiatt, 2008; Reyes y col., 1991; Sharpe, 1994).

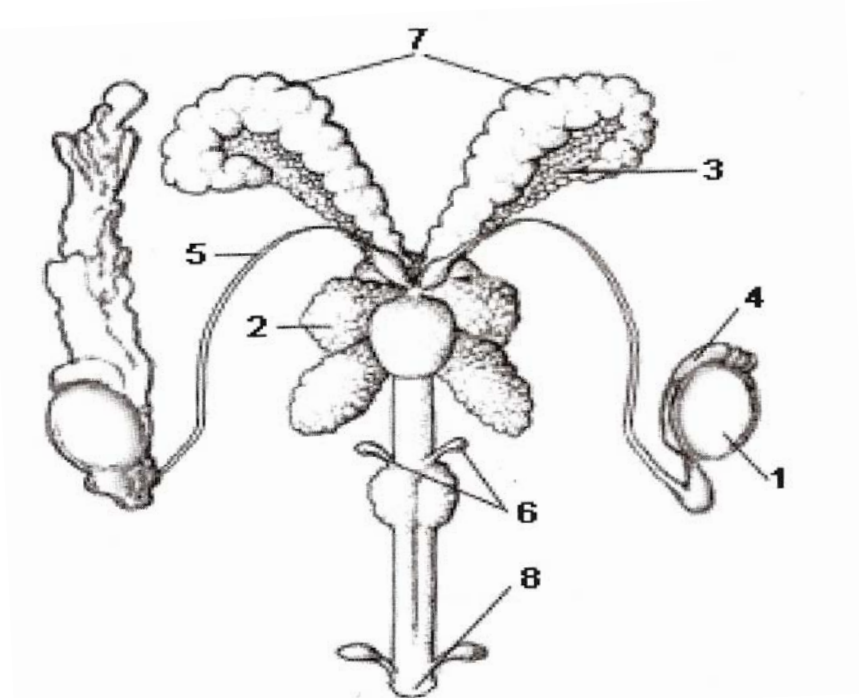
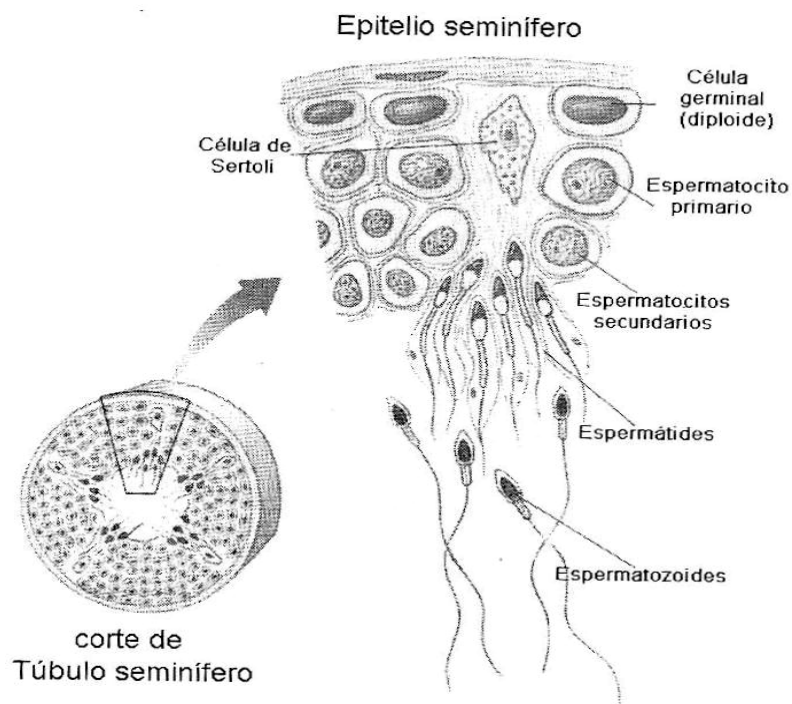


Figura 2. Esquema donde se muestran los distintos componentes del aparato reproductor de la rata macho. 1) Testículo, 2) Próstata, 3) Glándula coagulante, 4) Epidídimo, 5) Conducto deferente, 6) Glándulas bulbouretrales, 7) Vesículas seminales, 8) Pene (Modificado de Hedrich, 2004).



Además de la irrigación que recibe el testículo, al órgano le llega inervación que transcurre por el nervio espermático y que comunica a la gónada con estructuras del encéfalo. Por inmunohistoquímica y por medio de la inyección intratesticular del virus de la pseudorabia (PRV), que es un marcador retrogrado, se mostró la presencia de este virus en la médula espinal, el núcleo dorsal del raquídeo, el núcleo paraventricular de hipotálamo (PVN), la amígdala central entre otras estructuras (Lee y col., 2002; Gerendai y col., 2000; Astone-Jones y Card., 2000). Con base en esto se sugiere que esta comunicación neural que existe entre el cerebro, particularmente el hipotálamo y el testículo posiblemente es un factor regulador de la secreción de testosterona.

Desde el punto de vista anatómico y funcional, el testículo se puede dividir en dos compartimientos: el compartimiento del túbulo seminífero, formado principalmente por tres tipos celulares: las células de Sertoli, las células germinales que están en un proceso constante de proliferación y diferenciación y las células mioides peritubulares que delimitan al túbulo seminífero. (Figura 3) El segundo es el compartimiento intersticial, en el que se localizan las células de Leydig, responsables de la producción de andrógenos (Norman y col., 1997; Reyes y col., 1991).



**Figura 3.** Esquema que representa el corte transversal de un túbulo seminífero y los diferentes tipos celulares presentes dentro de este (Modificado de Raven, 2005).



Cada túbulo tiene una forma contorneada debido a su longitud y se pliega sobre sí mismo, uno de sus extremos está cerca del mediastino testicular este segmento del túbulo seminífero recibe el nombre de túbulo recto que se continua en la rete testis, está a su vez se une al epidídimo por los conductos eferentes (Figura 4) (Ross y col., 2006).

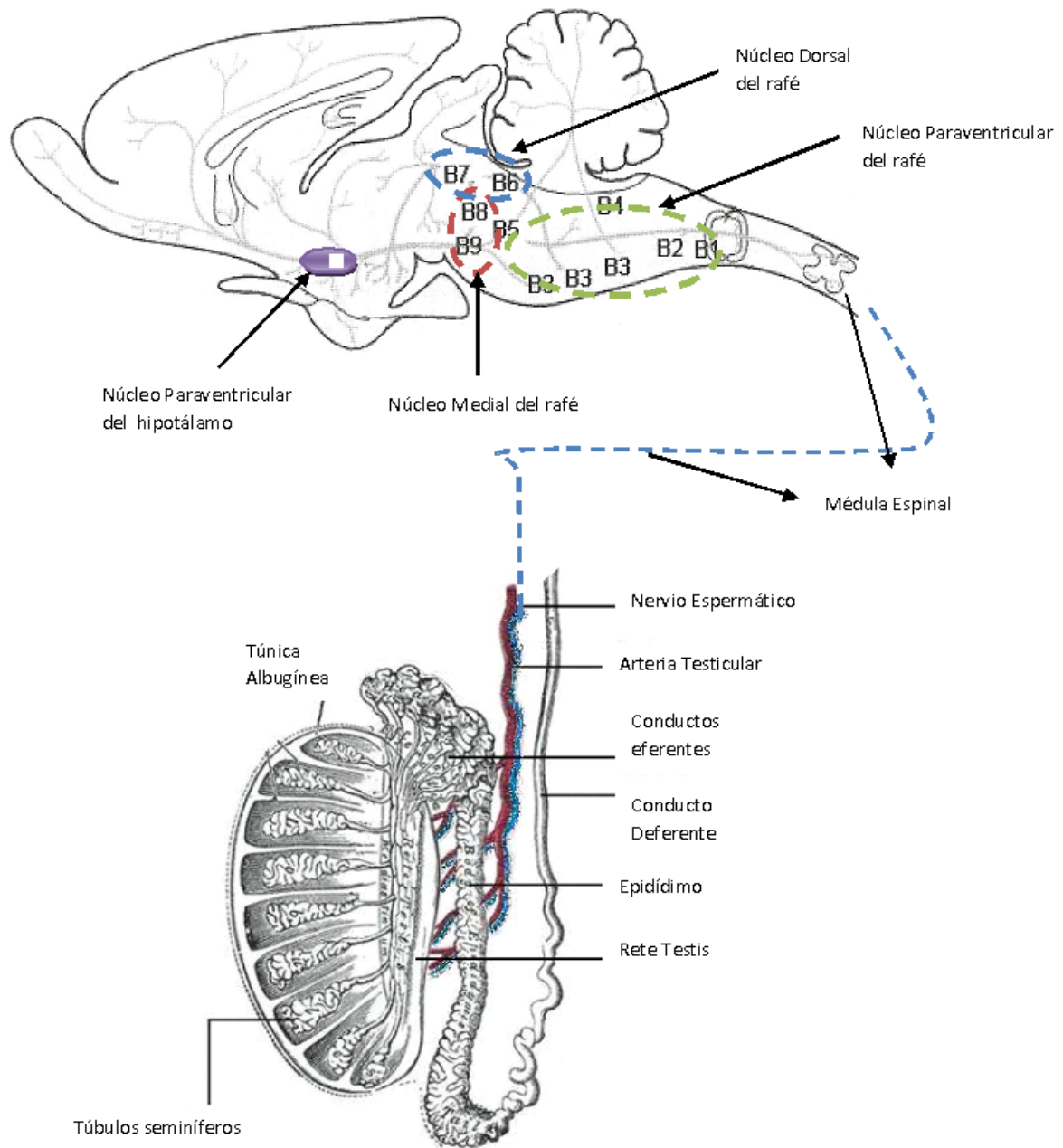
El epidídimo se continúa con el conducto deferente, el papel del epidídimo es importante en la fisiología del macho, ya que en él los espermatozoides son concentrados y, a medida que son transportados en su interior van experimentando la maduración espermática. Finalmente, una vez que los espermatozoides alcanzan la región distal del epidídimo son almacenados por un tiempo variable hasta el momento de ser eyaculados (Córdova, 2003).

El epidídimo es un órgano extratesticular de forma tubular característico del aparato reproductivo de los mamíferos machos. Este está dividido en 3 compartimientos: la cabeza, el cuerpo y la parte caudal o cola, y además se han descrito más divisiones basadas en la distribución de los tipos de células del epitelio dependientes de los animales en estudio (Jiménez-Trejo y col., 2007).

Resultados obtenidos por Robaire y Hermo., (1988) han demostrado que las células del epitelio del epidídimo ajustan la composición del fluido luminal absorbiendo, secretando y removiendo una variedad de elementos para crear un ambiente favorable para la maduración del espermatozoide.

Las células de Sertoli se conectan entre sí por uniones especializadas de su citoplasma que forman la barrera hematotesticular, la cual divide al túbulo seminífero en dos compartimientos, el basal y adluminal (Wagner, 2008). El compartimiento basal está formado principalmente por células de Sertoli, espermatogonias y espermátocitos primarios. En el compartimiento adluminal, se encuentran los espermátocitos secundarios, espermátides y los espermatozoides (Cheng, 2002).

Las funciones que cumplen las células de Sertoli dentro del testículo son múltiples y muy variadas entre ellas están: soporte físico y nutrición de las células germinales, que se encuentran aisladas del riego sanguíneo por las uniones entre las células de sostén; fagocitosis de cuerpos residuales eliminados por los espermatozoides en la etapa de maduración; secreción del líquido de transporte de los espermatozoides; secreción de la proteína unidora de andrógenos (ABP) necesaria para concentrar la testosterona en el túbulo seminífero, donde una concentración elevada de esta hormona es esencial en la maduración del espermatozoide; estimula la producción de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la inhibina, que actúa de manera inhibitoria sobre la secreción de la FSH y estimula la producción de la activina que actúa en la hipófisis (Audesirk y col., 2003; Paulsen, 1991; Setchell, 1978).



**Figura 4.**Esquema representativo de las partes del testículo; así como de la comunicación entre el cerebro de la rata y el testículo.





La importancia de la barrera hematotesticular radica en el aislamiento de los espermatozoides y otras células en estadios tempranos de la espermatogénesis creando un microambiente privilegiado, evita la liberación de antígenos e impide la entrada de anticuerpos o de células del sistema inmunológico que puedan ocasionar el desarrollo de oligospermia o azoospermia, a su vez provee los nutrientes, factores de diferenciación, y mitógenos, que protegen a las células germinales (Reyes y col., 1991; Yan y col., 2008).

Las células mioideas peritubulares forman una capa que circunda al túbulo seminífero y tienen una doble función: son las responsables de que el túbulo se contraiga y están relacionadas con el transporte metabólico (Gondos, 1990., Ham y col., 1985).

### **Esteroidogénesis**

En los vertebrados las hormonas esteroides son sintetizadas en varios tejidos endócrinos, como son: las gónadas, las adrenales y la placenta. Además de estos tejidos hay muchos sitios extraglandulares donde la síntesis de esteroides puede tener un efecto en la función celular. Estos sitios extraglandulares incluyen al cerebro, el tejido adiposo, la piel, los huesos y numerosos tejidos en el feto (Hinshelwood, 1999).

El colesterol es la molécula a partir de la cual todas las hormonas esteroides son sintetizadas. En la célula esteroidogénica el colesterol tiene dos orígenes: se forma en la propia célula de Leydig a partir del acetato o es captado en la sangre por el receptor de las lipoproteínas, que son las que intervienen en el transporte del colesterol circundante. El colesterol es esterificado y almacenado en gotas de lípidos (Hinshelwood, 1999).

Las células de Leydig sintetizan y secretan hormonas esteroides, como los andrógenos y los estrógenos. La testosterona y la androstenediona son los principales andrógenos producidos por el testículo. La cantidad de testosterona que se sintetiza es mayor comparada con las otras hormonas, por ello, se le considera el andrógeno testicular (Tresguerres, 1999., Saez, 1994).

Las células de Leydig, también tienen la capacidad de sintetizar el colesterol a partir de acetil-CoA o lo obtienen del plasma, a partir de las proteínas de baja densidad (LDL), que se encuentran en circulación y bajo un proceso de endocitosis se incorporan al citoplasma de la célula, los ésteres de colesterol pueden almacenarse en gotas de lípidos o convertirse en colesterol libre que se utiliza en la síntesis. El colesterol es transportado desde la cara externa de la mitocondria a la superficie interna de la misma por la proteína reguladora de la esteroidogénesis, y ahí se lleva a cabo la transformación del colesterol a pregnenolona. La pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa al retículo endoplasmático liso, donde se completa la esteroidogénesis (Tresguerres, 1999).





La síntesis de hormonas esteroides por las células de Leydig requiere una secuencia de eventos para convertir el colesterol en varias clases de esteroides. El citocromo P450<sub>SCC</sub> es una enzima mitocondrial, la cual cataliza la primera cadena de colesterol para producir pregnenolona. La síntesis de testosterona requiere de la acción de la enzima citocrómica P450<sub>C17</sub>, la cual va a formar, 17OH-pregnenolona, esta se divide por la acción de la C17-20 para formar la Dihidroepiandosterona (DHEA), la cual por acción de la 17-ketoreductasa se transforma en andostrenediol y finalmente por acción de la 3β-DHΔ<sup>4,5</sup>-isomerasa este se convierte en testosterona (Figura 5) (Tsai y col., 1996).

En modelos *in vitro* Tsai y colaboradores., (1997), demostraron que muchos componentes de la esteroidogénesis disminuyen como resultado de la acción directa o indirecta de las anfetaminas, entre estos componentes se encuentran enzimas que requieren para la síntesis de testosterona en la célula de Leydig.

Además de la regulación de la secreción de testosterona por la LH, es posible que la comunicación neural que existe entre el cerebro y el testículo también participe en la regulación de las funciones del testículo. En relación a esto Selvage y colaboradores. (2003), mostraron que cuando se inyecta un agonista del receptor β-adrenérgico, el isoproterenol directamente en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), disminuye la respuesta de las células de Leydig a la LH, lo que se refleja en la menor producción de testosterona. Así mismo, proponen que esta vía de comunicación involucra a las células del PVN que envían proyecciones que inervan a un grupo de células noradrenérgicas, el paquete A5, las que establecen comunicación con la médula y esta con los testículos.

Vinson y colaboradores (2002), mostraron en un estudio *in vitro*, que la glándula adrenal de la rata tiene la capacidad de sintetizar la testosterona, debido a que cuando se mantuvieron en cultivo células de la corteza adrenal y al medio le agregaron un precursor de este andrógeno, la progesterona marcada con carbono 14, observaron que se incrementó la síntesis de testosterona en un 4% y de corticosteroides en 1%. Con base en estas evidencias los autores sugieren que la concentración de testosterona presente en el suero es producida en parte por la glándula adrenal. Así mismo, algunos sistemas de neurotransmisión también participan en la regulación de las funciones de esta glándula. Se ha mostrado por medio del análisis de inmunohistoquímica la presencia de la MAO y del metabolito de la serotonina (5-HIAA) en la corteza suprarrenal (Lefebvre y col., 1996; Contesse y col., 2000). Lefebvre y colaboradores 1998, mostraron que la serotonina actúa de forma parácrina en las células cromafines de la glándula adrenal de varias especies de mamíferos, como la rata y el humano, en donde por medio de modelos *in vitro* han observado que la serotonina estimula la secreción de mineralocorticoides y glucocorticoides como la aldosterona.

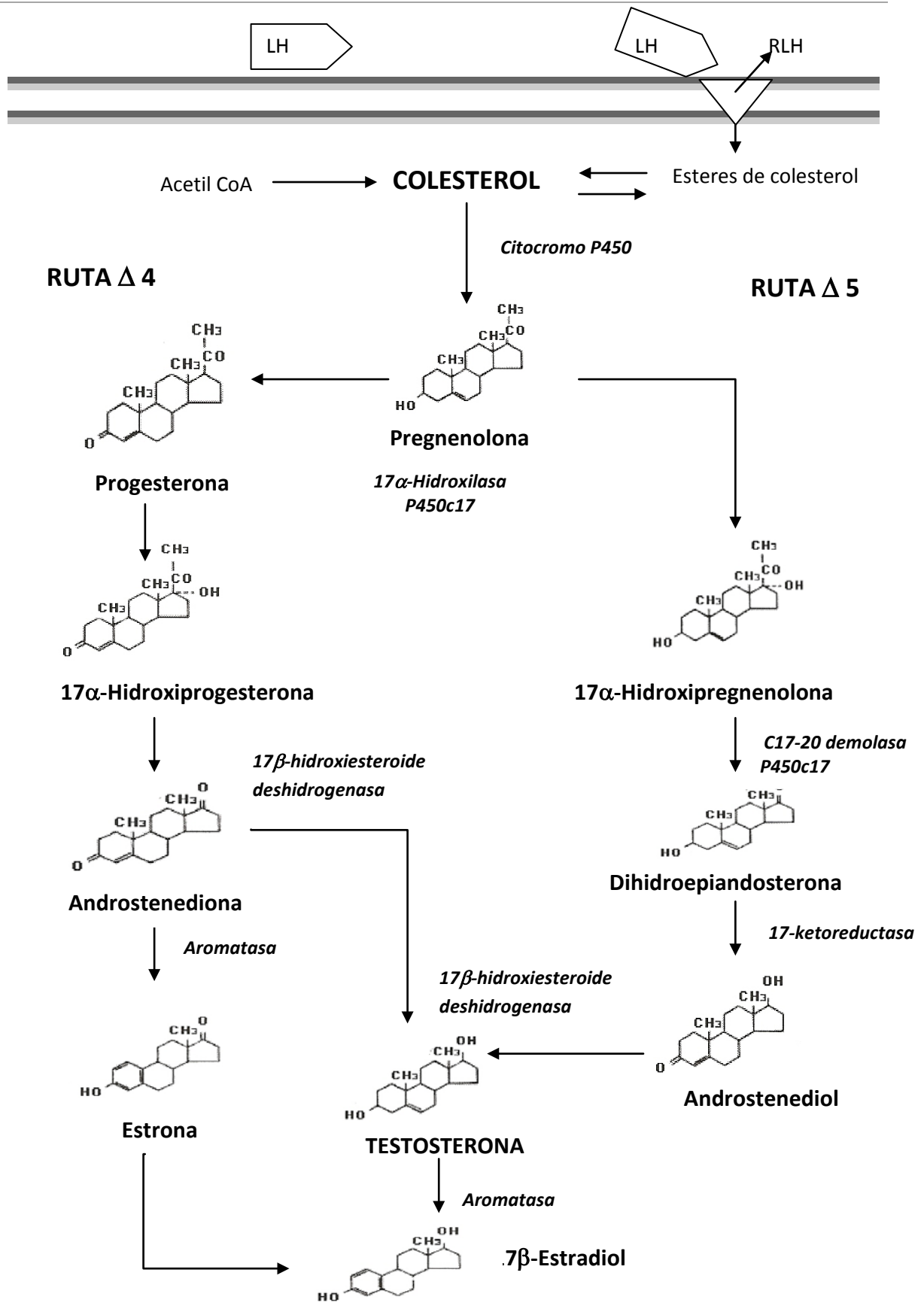


Figura 5. Representación esquemática de la esteroidogénesis; hormona Luteinizante (LH), receptor de la Hormona Luteinizante (RLH), coenzima A (CoA), (Modificado de Krester, 1994).



## Espermatogénesis

La espermatogénesis es la secuencia de eventos citológicos mediante los cuales las células germinales inmaduras (espermatogonias) se transforman en células germinales maduras (espermatozoides) (Tresguerres, 1999). Este proceso se divide en tres etapas:

- Espermatogénica: Renovación de las células madre por el proceso de mitosis.
- Espermacitogénesis: Reducción del número de cromosomas por meiosis.
- Espermiogénesis: Transformación de la espermatíde redonda en un espermatozoide (Kretser y col., 1994).

La espermatogénesis se inicia con el incremento y diferenciación de las espermatogonias que dan origen a los espermatocitos primarios, que son células diploides grandes que entran en meiosis. Al término de la meiosis I, cada espermatocito primario da origen a dos espermatocitos secundarios haploides los que se dividen durante la meiosis II y generan dos espermatídes redondas, de modo que el producto final son cuatro espermatídes por cada espermatocito primario. Las espermatídes redondas presentan cambios estructurales que las llevan a adquirir la forma característica del espermatozoide (Figura 6) (Geneser, 2000; Ross y col., 2006).

Durante la espermiogénesis, las espermatídes presentan cambios morfológicos y funcionales encaminados al desarrollo de una célula con las características que le permitan llevar a cabo la fertilización del óvulo. Estos cambios morfológicos ocurren simultáneamente durante la transformación de la espermatíde a espermatozoide, donde el material nuclear se compacta y forma la cabeza del espermatozoide; alrededor de la envoltura nuclear se forma el gránulo arosómico, a partir del aparato de Golgi, éste gránulo posteriormente se transforma en el acrosoma, que rodea la parte anterior de la cabeza del espermatozoide; los centriolos se reorganizan e inician el armado de nueve dobletes de microtúbulos periféricos y los dos centrales que dan origen al axonema de la cola del espermatozoide, que en su conjunto constituyen el flagelo, tras el inicio de la formación de los microtúbulos, los centriolos regresan a la cercanía del núcleo para contribuir a la formación del cuello del espermatozoide en desarrollo. En la pieza media las mitocondrias se unen en una espiral formando la vaina mitocondrial (Geneser, 2000; Ross y col., 2006).

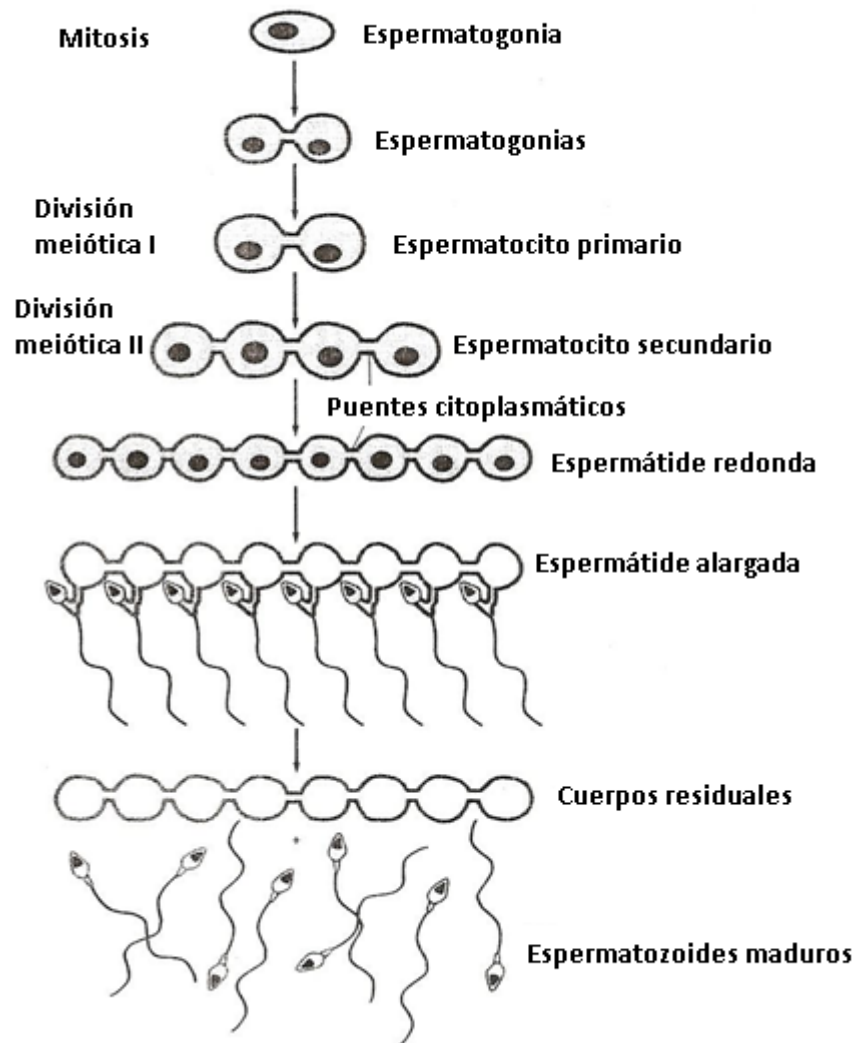
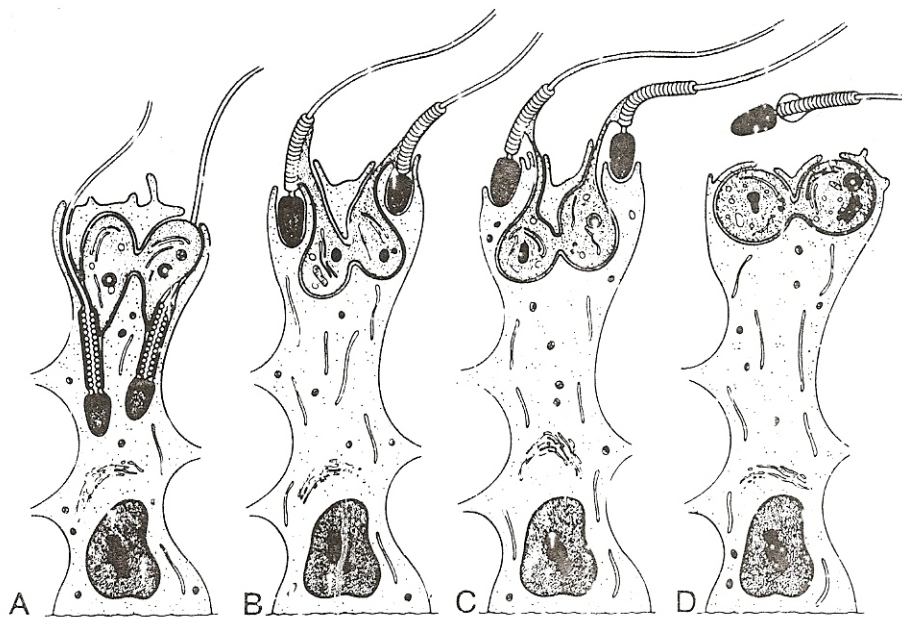


Figura 6. Esquema del proceso de espermatogénesis detallando los pasos de diferenciación celular dentro del túbulo seminífero. La progenie en maduración de una misma espermatogonia permanece conectada entre sí por medio de puentes citoplasmáticos, durante su diferenciación hasta espermatozoides primarios (Alberts 2006).

Las espermátides alargadas se liberan en el proceso de espermiación, el cual involucra la eliminación del citoplasma residual, lo que da origen a los cuerpos residuales, que son fagocitados y reutilizados por las células de Sertoli y por último los espermatozoides liberados pasan a la luz del túbulo seminífero y son conducidos al epidídimo, donde continua el proceso de maduración (Figura 7) (Ross y col., 2006; Meistrich, 1993).



**Figura 7. Esquema de la espermiación. A) Representación del citoplasma flagelar; B) Desprendimiento del citoplasma flagelar; C) Desplazamiento hacia la luz del túbulo seminífero; D) Desprendimiento del espermatozoide (Modificado de Fawcett, 1990).**

Una vez formado el espermatozoide, viaja al epidídimo para madurar funcionalmente, este proceso es conocido como capacitación. Las células epiteliales del epidídimo fagocitan cualquier corpúsculo residual no eliminado por las células de Sertoli. El epidídimo secreta un pequeño volumen de líquido seminal y la mayor parte del líquido que no es absorbido por los conductillos eferentes se reabsorbe en la porción proximal del epidídimo. Durante el pasaje de los espermatozoides por el epidídimo, los espermatozoides también adquieren movilidad y la capacidad para fertilizar al óvulo, esta maduración también depende de los andrógenos (Ross y col., 2006; Geneser, 2000).

Cuando el espermatozoide se encuentra en la cabeza del epidídimo, en la membrana plasmática del espermatozoide se producen cambios en la composición de lípidos, glucoproteínas, proteínas y carbohidratos, se forman puentes disulfuro entre las fibras externas y fibras de la vaina. Diferentes proteínas participan en la maduración de los espermatozoides entre las que se encuentra la glutamina peroxidasa (GPX5),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa (CGT), inmobilina, sulfato glucoproteína 2 (SGP-2) que se sintetizan en la pieza inicial y en la región media del epidídimo se secretan proteína 2D6, factor de crecimiento nervioso ( $\beta$ -NGF), que ayudan a la maduración del espermatozoide de la rata y del ratón, durante este proceso estas células adquieren un movimiento progresivo, considerado como el camino funcional que presenta el espermatozoide (Cooper, 1999; Eddy y O'Brien, 1994).



En estos cambios se completa el proceso de condensación nuclear, los espermatozoides pierden la gota citoplasmática, la carga de la superficie externa de la membrana se torna más negativa y en la morfología del acrosoma ocurren cambios ligeros (Johnson y Everitt, 1980).

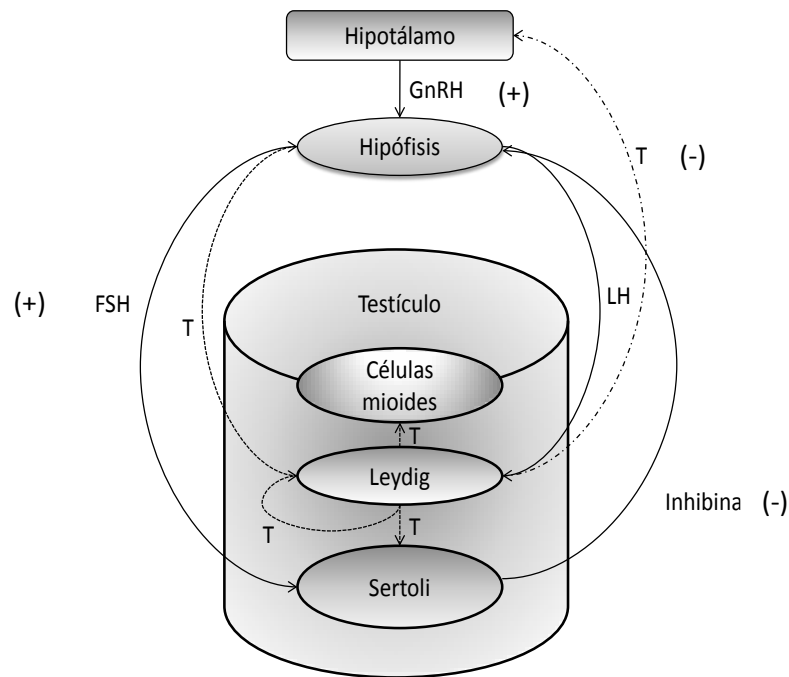
Además de las proteínas involucradas en la maduración del espermatozoide, existen evidencias experimentales que sugieren la presencia de un sistema serotoninérgico en la cabeza del epidídimo de rata, específicamente en los mastocitos, células epiteliales y neuroendocrinas del epidídimo, que posiblemente participan en la maduración de los espermatozoides (Jiménez-Trejo y col., 2007; Leung y col., 1999). Sin embargo, hasta el momento se desconoce en qué evento de la maduración participa la serotonina.

De la pieza terminal del epidídimo los espermatozoides, son transportados a los conductos deferentes donde se almacenan la mayoría de ellos. Estos conductos se orientan hacia la base de la próstata, donde se estrecha hasta convertirse en un túbulo muy delgado, que se une con el conducto excretor de la vesícula seminal para formar el conducto eyaculador que desemboca en la porción prostática de la uretra, la cual conduce hacia la punta del pene (Audesirk y col., 2003; Geneser, 2000).

La espermatogénesis en los mamíferos requiere de la acción de una gran variedad de péptidos y hormonas esteroides, cada una de estas juega un papel importante en el funcionamiento del epitelio seminífero. Estos mensajeros hormonales son necesarios no solo para la regulación del desarrollo de las células germinales en el macho, sino también para la proliferación y función de varios tipos de células somáticas necesarias para el desarrollo del testículo. Entre éstas se encuentran las células de Leydig ubicadas en la zona intersticial de la gónada, su principal función es la producción de testosterona. Las células mioideas que rodean al túbulo seminífero y proporcionan soporte físico y ayudan a la contracción del túbulo para la liberación de espermatozoides.

Las células de Sertoli actúan directamente con la proliferación y diferenciación de las células germinales, crean un ambiente óptimo de soporte físico y nutricional para el desarrollo de este tipo de células. Cada uno de estos tipos celulares es objetivo de una o muchas hormonas necesarias para una alta fertilidad del macho (Sharpe, 1994; Maekawa et al., 1996; Holdcraft y Braun, 2004).

El hipotálamo bajo la acción de la GnRH estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas por la hipófisis (FSH, LH), las que son esenciales en el mantenimiento de las funciones del testículo (Levy y col., 2006).



**Figura 8. Regulación Hormonal de la espermatogénesis. Mayoría de las hormonas que participan y pueden tener efectos tanto positivos como negativos, ya sea en el nivel de activación de los receptores / o desensibilización través de la activación y represión de los objetivos descendentes; hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), testosterona (T), hormona luteinizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH), estimula (+), inhibe (-) (Modificado de Holdcraft y Braun, 2004).**

En las células de Sertoli se encuentran presentes receptores de membrana para la FSH y receptores citoplasmáticos y nucleares para andrógenos. La FSH aumenta en las células de Sertoli la síntesis de la proteína unidora de andrógenos, la cual es necesaria para mantener una concentración elevada de testosterona en el epitelio seminífero. De igual forma las células de Sertoli secretan inhibina que viaja por la sangre a la hipófisis, donde inhibe la secreción de FSH, proceso llamado de retroalimentación negativa (Figura 8) (Griswold, 1998; Jones, 1997; Fawcett, 1990).

Al parecer se requiere de la testosterona y la FSH para que se establezca la comunicación entre las espermátides y las células de Sertoli. Entre ambas hay estructuras proteínicas del citoesqueleto, como la actina y vinculina, encargadas de anclar las espermátides con la célula de Sertoli para que se lleve a cabo el intercambio metabólico entre estas células (Weinbauer y Nieshlag, 1993).



McLachlan y colaboradores., (1996) proponen que la testosterona tiene un papel importante en la diferenciación de la espermatogonia a espermatocito, pero el principal papel que propusieron es que la testosterona participa en la transformación de espermátide redonda a alargada.

La importancia de la testosterona y FSH es innegable, por lo que se ofrece un análisis de su interacción dentro de la espermatogénesis. La FSH también está involucrada en el aumento de espermatogonias y la maduración de los espermatocitos, incluyendo la meiosis. Un papel esencial de la testosterona es la maduración de la espermátide, ya que es evidente que dosis altas de FSH son incapaces de completar este paso vital. Sin embargo muchos reportes sugieren que la FSH y la testosterona actúan de forma cooperativa y está comprobado que una concentración menor de T o FSH es igual de eficaz en su objetivo aunque la otra esté presente en mayor cantidad (Bartlett y col., 1989, Sinha-Hikim y Swerdloff, 1994). Esta investigación ha dado lugar a la especulación de que las dos tengan un post-receptor común en sus vías de acción (Figura 9) (Russel y col. 1994)

La cooperación de la FSH y la testosterona es esencial para que la espermatogénesis se lleve a cabo. En primer término son necesarias para asegurar la asociación de Sertoli con las funciones de la célula germinal. La FSH induce la distribución en la célula de las proteínas estructurales, f-actina y vinculina en ratones a los cuales se les extrajo la hipófisis. Estas proteínas estructurales ayudan a determinar la capacidad de las células de Sertoli para anclar a las espermátides bajo la influencia de la testosterona. En pruebas *in vitro* se poya la idea del papel que juega la FSH como intermediario para la realización del anclaje de la espermátide (Cameron y Muffly, 1991). Efectos similares sobre el citoesqueleto por acción de la FSH son cruciales en otros procesos de interacción entre las células de Sertoli y las células germinales (McLachlan y col., 1996). En segundo lugar, a nivel del receptor, la FSH se puede correlacionar con la testosterona mediante la estimulación de la síntesis de receptores de andrógenos (AR), basados en estudios *in vitro* en los que a causa de la FSH se obtiene un aumento en los AR duplicando o hasta triplicando la cantidad de estos. La aplicación de FSH en ratas en las que se extrajo la hipófisis promovió el efecto de la testosterona sobre la espermiogénesis y se asocio con una mayor concentración de la proteína unidora de andrógenos en el testículo y el epidídimo y a través de este mecanismo se sugirió por lo tanto que la FSH juega un papel en la facilitar el transporte y localización de la testosterona dentro de las células de Sertoli. (McLachlan y col., 1996).



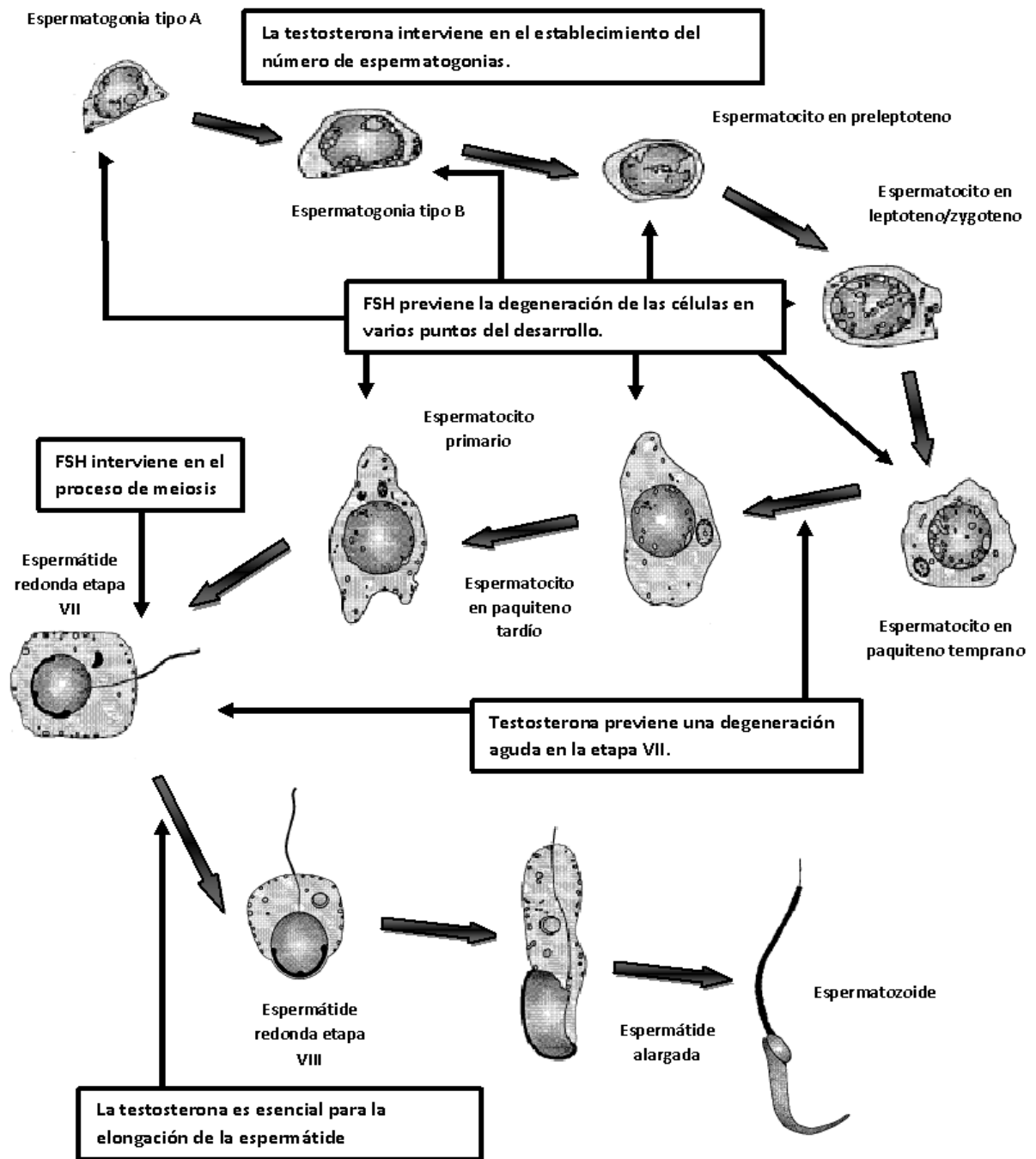


Figura 9. Efecto de la testosterona y de la FSH en el proceso de la espermatogénesis en la rata adulta. Referencias más relevantes en el proceso (Modificado de McLachlan y col., 1996)



## Espermatozoide

El espermatozoide es el producto final del proceso de espermatogénesis que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos. Está compuesto de una cabeza, una porción central y una cola. Dentro de la cabeza se encuentra el material nuclear y gránulos densos que se conocen con el nombre de acrosoma, los cuales se desarrollan a partir del aparato de golgi y contienen enzimas (hialuronidasa y proteínas) que facilitan que el espermatozoide penetre al óvulo secundario. La pieza media está formada por numerosas mitocondrias donde se lleva a cabo el metabolismo que proporciona energía para el movimiento (Audesirk y col., 2003; Ross y col., 2004).

El flagelo impulsa al espermatozoide a través de un medio acuoso, lo que le permite llegar al óvulo y lograr la fertilización. Está compuesto por un axonema central formado por dos microtúbulos centrales rodeado por 9 pares de de microtúbulos, éstos a su vez están envueltos por una vaina de fibras densas que se extienden desde la cabeza hasta cerca de la pieza media, la pieza principal, contiene la vaina fibrosa que rodea las fibras densas externas; por último la pieza terminal solo está formada por el axonema. El movimiento del flagelo está impulsado por la proteína dineína, que utiliza la energía de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP), lo que permite el movimiento de los pares de microtúbulos, provocando el movimiento del flagelo (Eddy y O'brien, 1994; Eddy, 2006; Geneser, 2000)

En su mayoría los espermatozoides de los mamíferos cumplen de forma general con las características antes mencionadas, aunque existen algunas diferencias específicas como lo son el tamaño y forma de la cabeza, así como la longitud del flagelo (Eddy 2006).

Los espermatozoides recién liberados son transportados de los túbulos seminíferos hasta los túbulos rectos. Los túbulos rectos llegan a una red de conductos en el testículo llamada rete testis. Posteriormente los espermatozoides se expulsan fuera de los testículos pasando por los conductillos eferentes y finalmente llegan a la parte proximal del epidídimo llamada cabeza en donde se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides, después se transportan hacia el segmento terminal donde quedan almacenados (Comhaire, 1993; Ross y col., 2004).

Uno de los factores que influyen negativamente sobre la espermatogénesis son las deficiencias nutrimentales y el daño químico provocado por agentes externos (Barrios, 2002). En la rata la carencia total de vitamina E induce la perdida completa e irreversible de espermatogonias. Otro factor que es limitante dentro de la generación de espermatozoides es la temperatura, en los mamíferos se presenta un descenso de los testículos hacia el escroto durante el periodo fetal o a principios de la vida post-natal. Esto implica que los testículos se encuentren fuera de la cavidad abdominal, esto les permite que permanezcan a una temperatura menor con respecto a dicha cavidad. Para



lograr esta condición existen por ahora dos mecanismos conocidos, el primero es la acción refrigerante que proporciona la presencia de una gran cantidad de glándulas sudoríparas localizadas en la pared del escroto; el segundo mecanismo, se debe a la acción del plexo vascular que actúa como sistema de contracorriente vascular y venosa altamente eficiente para ayudar a disminuir la temperatura de los testículos (Ruiz, 1988).

### ***Anormalidades presentes en la morfología del espermatozoide.***

Durante el desarrollo de los espermatozoides se presentan algunas alteraciones en su funcionamiento y en la estructura, estas últimas se denominan anomalías espermáticas las cuales han sido clasificadas en primarias y secundarias según el origen de cada una. Las anomalías primarias son aquellas que se han generado dentro del testículo y se deben a fallas en la espermatogénesis. Estos efectos incluyen: Espermatozoides con escaso desarrollo, defectos en la cabeza del espermatozoide, entre ellos: protuberancia acrosómica, cabeza plana, cabeza delgada, ausencia de la cabeza. La mayoría de los defectos de la cola del espermatozoide también son considerados como defectos primarios, entre ellos se mencionan el doblez en la pieza media, la presencia de la gota citoplasmática proximal, cola enrollada o doblada y colas accesorias (Figura 10) (Barrios, 2002; Chenowett, 1997).

Las anomalías secundarias son aquellas originadas dentro del epidídimo; entre ellas se encuentran: cabeza ancha, membrana del acrosoma separada o incompleta, gota citoplasmática distal, colas enrolladas en la porción terminal (Barrios, 2002).

Algunos de los defectos espermáticos no se pueden definir exactamente como primarios o secundarios según sea el caso, ya que la gota citoplasmática distal y las cabezas sueltas pueden ser defectos originados durante la espermatogénesis (primarios), o como una alteración en la función del epidídimo (secundarios) (Chenowett, 1997); estos procesos pueden ser alterados por factores como la temperatura escrotal, infecciones, toxinas y drogas (Nelson, 2002).

### **Apoptosis**

La muerte celular puede ocurrir por dos vías diferentes, un proceso pasivo que conduce a la necrosis o muerte patológica y un proceso activo denominado apoptosis (Frago y col., 2001; Ramírez y col., 1999), este último proceso es una forma de muerte celular programada, que se caracteriza por una serie de cambios que culminan con el deterioro de la célula y su posterior fagocitosis (Sinha-Hikim y Swederloff, 1999).

La muerte celular por apoptosis es el principal proceso que regula el número de células de cualquier tejido. Es esencial en el desarrollo de los diferentes órganos y para el mantenimiento de la homeostasis. La apoptosis es un proceso en el cual la célula participa de forma activa y ésta misma se puede dividir en dos fases: en un primer



estadio, los mediadores génicos y bioquímicos intracelulares se activan para intentar reparar los daños celulares; si este mecanismo falla, se inicia el proceso de muerte celular y se entra en la fase de ejecución, en donde las células presentan alteraciones estructurales que conducen a la muerte (Ramírez y col., 1999). Este proceso implica una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que incluyen la condensación de la cromatina nuclear, disminución y desintegración del núcleo, compactación del citoplasma y de los organelos con excepción de las mitocondrias y los ribosomas, fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN), alteraciones en el citoesqueleto, formación de fragmentos de núcleo cubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos) estos últimos son fagocitados (Sinha-Hikim y Swederloff, 1999; Frago y col., 2001; Webb y col., 1997).

La fase de inicio de la apoptosis está mediada por una familia de proteasas con residuos cisteína denominadas caspasas asociadas a la fragmentación del ADN. Algunas caspasas son iniciadoras y otras ejecutoras del proceso catalítico, actuado sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN (Sinha-Hikim y Swederloff, 1999; Ramírez y col., 1999).

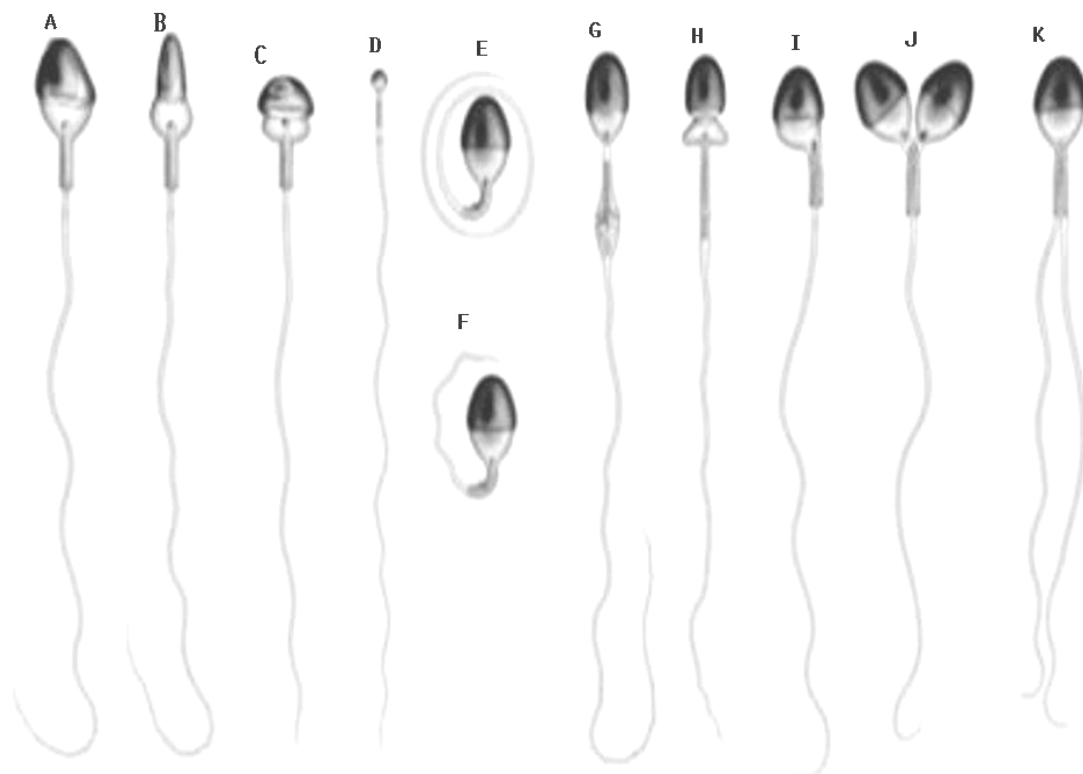
El proceso de apoptosis es regulado por diversos factores, entre los que se encuentran las proteínas de la familia Bcl-2. Estas proteínas se localizan en la membrana mitocondrial, en el retículo endoplasmático y en la membrana nuclear. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intramembranal; entre ellas el citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo protéico denominado "apoptosoma", que activa directamente a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena la fragmentación del ADN (Sinha-Hikim y Swederloff, 1999; Rodríguez y col., 1997). La expresión de otra proteína intracelular, la Bcl-xl, también relacionada con la familia Bcl-2, se encuentra asociada con la sobrevivencia celular; mientras que otras proteínas como los son la Bax, Bac y Bad, pueden inducir la muerte celular (Wooldverige y col., 1999).

Durante el inicio de la espermatogénesis en la etapa prepuberal, se produce una temprana oleada de muerte de células germinales por apoptosis, proceso que probablemente está encaminado a eliminar las células germinales anormales con la finalidad de mantener una relación óptima entre el número de células germinales maduras y las células de Sertoli; el resultado de este proceso es la eliminación de hasta un 75% de las células en la primera oleada de la espermatogénesis, las cuales son eliminadas durante la maduración de los túbulos seminíferos (Rodríguez y col., 1997; Walczak-Jedrzejowska y col., 2007). En el testículo de la rata se ha mostrado que la apoptosis ocurre regularmente en las espermatogonias del tipo A2, A3 y A4, mientras que en los espermátocitos secundarios, así como en las espermátides se presenta ocasionalmente (Wooldverige y col., 1999).



Se ha mostrado que la testosterona, las gonadotropinas así como algunos factores de crecimiento y las citocinas inhiben el inicio de la apoptosis. Algunas hormonas tiroideas, la progesterona y factores de crecimiento, inducen la muerte celular programada (Kiess y Gallaher, 1998). En estudios realizados a ratas inmaduras durante la etapa de proliferación de las células de Sertoli, han mostrado que cuando se administra estradiol se inhibe la maduración de las células de Sertoli, se estimula la apoptosis de estas células y las células germinales, mientras que el tratamiento con testosterona tiene un efecto nulo. Cuando se administra la testosterona y el estradiol juntos se induce la apoptosis en las células germinales (Walczak-Jedrzejowska y col., 2007).

Cuando a ratas macho se le inyecta el sulfonato de etano dimetano, producto químico que degenera las células de Leydig, como consecuencia se produce la disminución en la cantidad de andrógenos testiculares, se incrementa el número de núcleos picnóticos y vacuolas citoplasmáticas (ambos indicadores de degeneración celular) en las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero, especialmente sufren más daño los espermatocitos en paquiteno y las espermátides (McLachlan y col., 1996).



**Figura 10.** Esquema representativo de algunas de las anomalías morfológicas presentes en los espermatozoides de humano. A) Espermatozoide normal; B) Cabeza alargada; C) Cabeza plana; D) Sin cabeza; E) Cola enrollada; F) Doblez en la cola y pieza media; G) Gota citoplasmática en pieza media; H) Gota de citoplasma en la cabeza; I) Pieza media no desviada; J) Doble cabeza; K) Doble flagelo (2).



## JUSTIFICACIÓN

Con base en la información reportada en la bibliografía se ha mostrado que la serotonina participa en la modulación de las funciones del testículo vía la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas. Así mismo, se ha mostrado que en el testículo se sintetiza la amina, la cual posiblemente participa en la modulación de la esteroidogénesis. También, se ha reportado que cuando se administra por vía sistémica la p-CA disminuye la síntesis de serotonina en el hipotálamo y esto se acompaña de la disminución en la espermatogénesis. El efecto de la anfetamina posiblemente es el resultado de que se modificó la secreción de gonadotropinas. Sin embargo, la información reportada hasta el momento sobre el efecto de esta anfetamina en las funciones del testículo es escasa, y se desconoce si la p-CA actúa directamente en el testículo modulando su funcionamiento. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la inyección sistémica e intratesticular de la p-CA en la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético en el testículo, de testosterona en el suero y en la estructura del testículo de la rata macho prepúber.



## **HIPÓTESIS**

La serotonina es una amina que se encuentra en el testículo y ejerce un efecto estimulante en la regulación de sus funciones. Así mismo, se ha mostrado que la p-CA inhibe la síntesis de serotonina, por ello la inyección de este fármaco por vía sistémica o directamente en el testículo de ratas macho prepúberes, inducirá la disminución en la espermatogénesis y la secreción de testosterona y modificará la estructura de la gónada.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto de inhibición de la síntesis de serotonina inducida por la inyección sistémica o intratesticular de p-CA en la espermatogénesis, en la secreción de testosterona y en la estructura del testículo en la rata macho prepúber.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Analizar el efecto de la inyección sistémica de p-CA en la síntesis de serotonina y de su metabolito en el hipotálamo, la hipófisis y la glándula adrenal.

Analizar el efecto de la inyección sistémica e intratesticular de p-CA en la síntesis de serotonina y de su metabolito en el testículo.

Analizar el efecto de la inyección sistémica e intratesticular de la p-CA en la espermatogénesis (número de espermatozoides, movilidad, viabilidad).

Analizar el efecto de la inyección sistémica e intratesticular de la p-CA en la concentración de testosterona en el suero de la rata macho prepúber.

Analizar el efecto de la inyección sistémica e intratesticular de la p-CA en la estructura del testículo de la rata macho prepúber.

Analizar el efecto de la inyección sistémica e intratesticular de la p-CA en el proceso de apoptosis del testículo.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho de 30 días de edad, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de iluminación (14 hrs luz y 10 hrs oscuridad), con acceso a la madre desde el nacimiento hasta el destete y posteriormente al agua y alimento durante las 24 hrs. Los animales se dividieron al azar en diferentes grupos experimentales

### ***1).-Efecto de la administración sistémica de p-Cloroanfetamina***

A un grupo de animales de 30 días de edad se les realizó la inyección de solución salina (0.9 %) por vía intraperitoneal; un segundo grupo de animales se les administro p-CA (10 mg/kg de p.c.)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por la misma vía. Como grupo de comparación se utilizaron animales de la misma edad sin tratamiento (testigo absoluto). La administración de solución salina o p-CA se continuó hasta que los animales cumplieron 65 días de edad, momento en el que se realizó el sacrificio de los animales.

### ***2).-Efecto de la administración intratesticular de p-Cloroanfetamina***

A tres grupos de animales de 30 días se les administraron 20  $\mu$ l de solución salina en el testículo izquierdo, derecho o ambos (Inyección intratesticular de solución salina); a otros tres grupos se le practicó la inyección intratesticular de p-CA (10 mg/kg de peso corporal disueltos en 20  $\mu$ l de solución salina) en el testículo izquierdo, derecho o en ambos (inyección intratesticular de fármaco). Los animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron a los 65 días de edad.

### ***Inyección Intratesticular.***

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corporal) (Anestesal, Smith Kline Norden de México), el que se inyectó por vía intraperitoneal. Se limpió la piel con jabón antiséptico, se realizó una incisión de la piel que recubre a la gónada (escroto), se introdujo en el tejido testicular una aguja de (30G, 22mm) conectada a una jeringa Hamilton de 250  $\mu$ l, acoplada a una bomba de microinyección (MCA/100 Bionalitycal Systems, USA) y se procedió a inyectar 20  $\mu$ l de vehículo (solución salina) o p-CA, posteriormente se retiró la aguja y se realizó la sutura de la piel del escroto. La velocidad de inyección fue de 20  $\mu$ l/min.





### ***Autopsia de los animales.***

Las ratas se sacrificaron por decapitación a los 65 días de edad. En ese momento se realizó la disección de los conductos deferentes y se colectó el paquete espermático de ambos, el cual se colocó en solución tirodes para la posterior evaluación de los diferentes parámetros de la espermatogénesis. En ese momento se realizó la extracción del cerebro para la disección del hipotálamo anterior y medio siguiendo las coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson (1982). También se realizó la extracción de la hipófisis y de las adrenales, así como de los dos testículos, de estos últimos se obtuvo una biopsia de cada uno a la altura de la unión de la gónada y el epidídimo. Todas las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la posterior cuantificación de serotonina y el 5-HIAA por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión. El tejido testicular restante se colocó en solución fijadora de Bowin ó Paraformaldehído para el posterior análisis de la estructura del testículo.

### ***Cuantificación de 5-HT por Cromatografía de líquidos de Alta Resolución.***

Las biopsias de testículo, las adrenales, el hipotálamo anterior (HA) y medio (HM) se pesaron y homogenizaron en 300  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico (0.1N) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en frío y la hipófisis en 150  $\mu\text{l}$ . Las muestras se centrifugaron a 12,000 r.p.m. a una temperatura controlada de  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. El sobrenadante se filtró con membranas de celulosa de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore Bedford, MA, USA) y el filtrado se inyectó al sistema de cromatografía para la cuantificación de serotonina y de su metabolito. Del total del filtrado que se inyectó, únicamente 20  $\mu\text{l}$  entran al sistema de cromatografía para su análisis y el sobrante es eliminado automáticamente por el equipo. El sistema de cromatografía fue calibrado con el método de estándar externo, para la cual se prepararon soluciones estándar de serotonina y 5-HIAA en una concentración de 0.1, 0.5 y 1.0  $\eta\text{g}$  y se realizó una curva. La serotonina y su metabolito se identifican por los tiempos de retención y el sistema de cromatografía emplea el área bajo los picos de los diferentes estándares para el cálculo de la concentración del neurotransmisor. Los datos se expresaron en  $\eta\text{g}$  de neurotransmisor por mg de tejido.

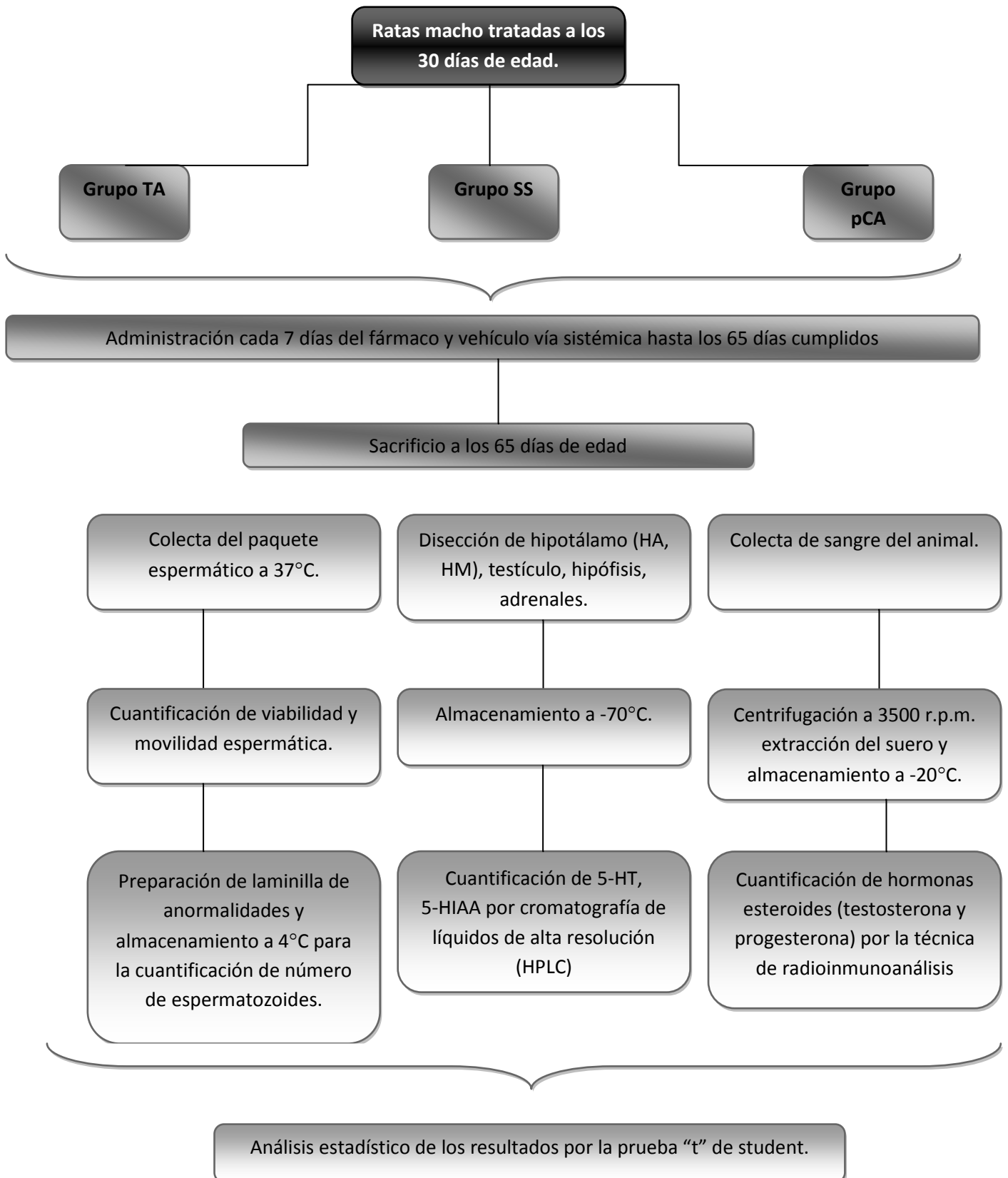


Figura11. Diagrama de flujo del método que se siguió en la administración vía sistémica de la p-cloroanfetamina, así como sus diferentes evaluaciones.

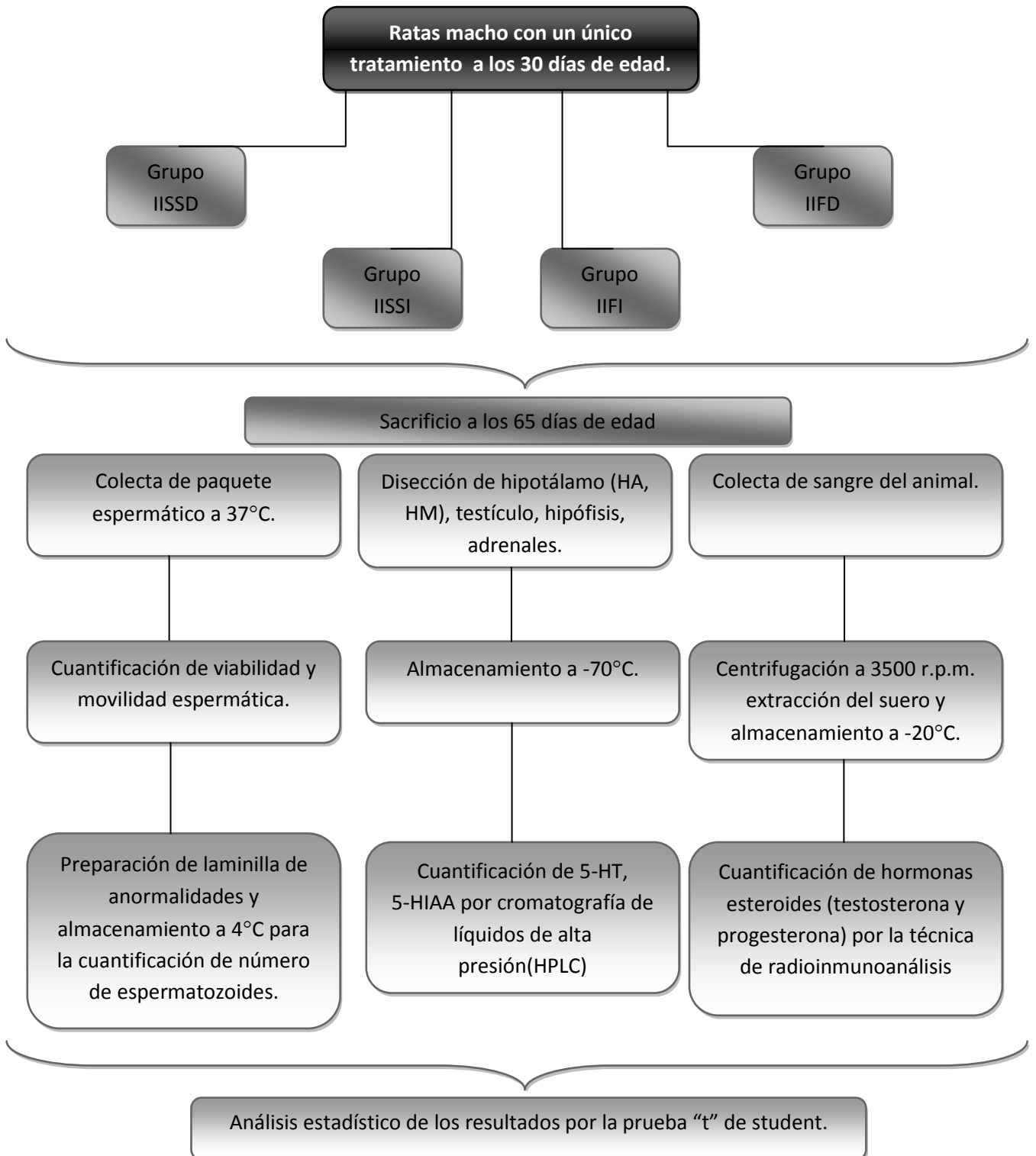


Figura 12. Diagrama de flujo del método que se siguió en la administración intratesticular de la p-cloroanfetamina, así como las diferentes evaluaciones. Inyección intratesticular de solución salina derecha (IISD), inyección intratesticular de solución salina izquierda (IISI), inyección intratesticular de fármaco derecho (IIFD) e inyección intratesticular de fármaco izquierdo (IIFI).



### ***Evaluación de la espermatogénesis.***

Se colocó un baño maría a 37°C con dos horas de anticipación antes del sacrificio, con la finalidad de evitar alguna fluctuación de temperatura y evitamos el shock térmico para los espermatozoides. En el baño se colocó un tubo ependorff por cada animal, con 500 µL de solución Tirodes (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en el cuál se depositó el paquete espermático y 2 portaobjetos y cubreobjetos por animal a sacrificar. Se realizaron las siguientes evaluaciones:

- **Número.** De la solución del paquete espermático, se tomó una alícuota de 15 µl, la cual se colocó en una cámara de Neubauer y con ayuda de un microscopio óptico se contó el número de espermatozoides a un aumento de 10X en cinco cuadrantes, el del centro y los extremos (Figura 14).
- **Viabilidad.** Se tomaron 20 µl de solución espermática y se le agregaron los fluorocromos, Ioduro de Propidio y SYBR-14 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). De esta solución se tomó una alícuota de 10 microlitros y se colocó en un portaobjetos. Con ayuda de un microscopio de fluorescencia se contaron 100 espermatozoides y los que se tiñeron de rojo nos indicó que las células son inviables y las de color verde células viables.
- **Movilidad.** Se tomaron 20 µl de la solución espermática, y con ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 10x, se contó el número de espermatozoides que presentaran movimiento progresivo (rectilíneo u ondulante) y aquellos que no lo presentaron. En total se contaron 100 células por animal.
- **Anormalidades.** Se colocaron 10 µl de la solución espermática en un extremo del portaobjetos rotulado y se realizó un barrido (Figura 13), la muestra se dejó secar y después se tiñó con la técnica de Hematoxilina-Eosina. Posteriormente se realizó la identificación de formas anormales de espermatozoides con ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 10X. Las anomalías evaluadas fueron en la cabeza (sin cabeza, cabeza plana, cabeza de alfiler y cabeza doble), la pieza media (pieza media doblada, gota de citoplasma) y en el flagelo (flagelo corto, doblado y enroscado).



### ***Evaluación de la Estructura del Testículo***

En el día del sacrificio, los testículos se fijaron en paraformaldehído al 4%, posteriormente se deshidrataron e incluyeron en parafina, se realizaron cortes con un grosor de 5 micras que se montaron en portaobjetos preparados con Poli-L lisina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para su posterior tinción por el método de hematoxilina-eosina-PAS. De cada testículo se contaron 100 túbulos y se determinó la etapa del ciclo del epitelio seminífero, así como si el arreglo del epitelio era normal (túbulos normales) o normales (túbulos anormales).

### ***Evaluación de apoptosis por Túnel.***

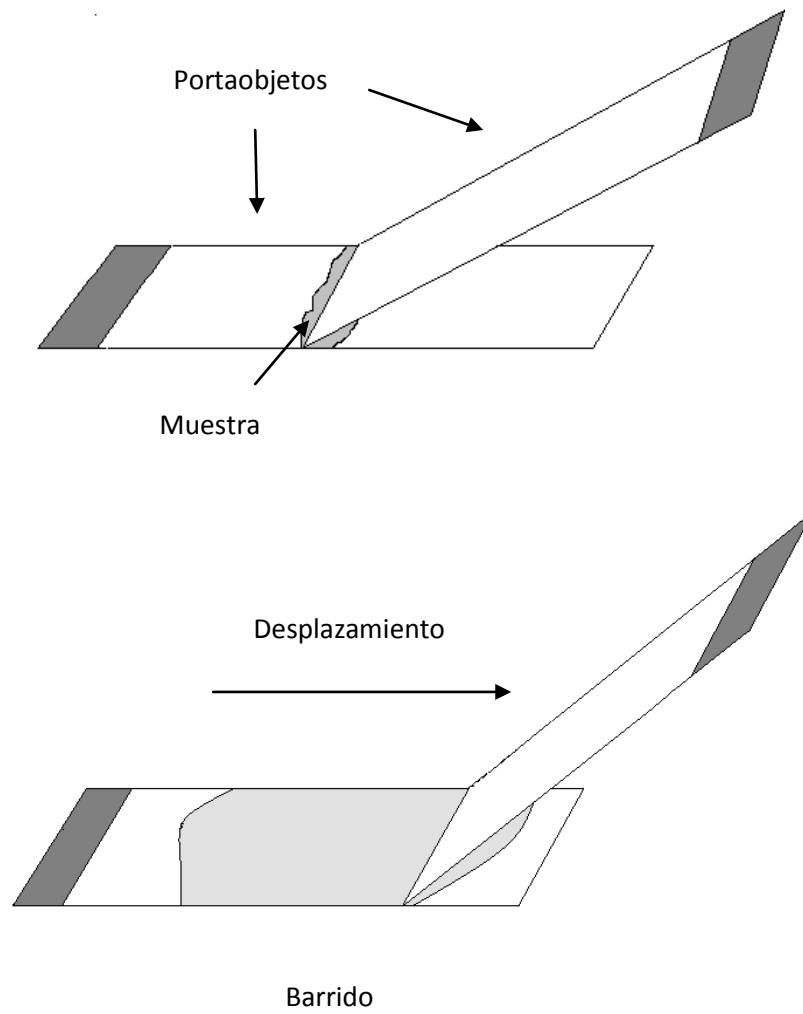
Los testículos procesados como en la sección anterior se tiñeron por la técnica de Túnel. En 50 túbulos se contó el número de células en apoptosis en el compartimiento basal y abdominal de cada túbulo. Uno de los eventos bioquímicos finales del proceso de apoptosis es la fragmentación del ADN (Sinha-Hikim y Swederloff, 1999) y mediante esta técnica las células germinales en apoptosis se tiñen de color café.

### ***Cuantificación de testosterona.***

La cuantificación de la testosterona en el suero de los animales de los diferentes grupos experimentales se realizó por medio de la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, para lo cual se utilizó un kit comercializado por Coat-A-Count (USA). La concentración de la hormona se expresó en  $\eta\text{g /ml}$  de suero.

### ***Análisis estadístico.***

Los resultados de concentración de serotonina, su metabolito, de testosterona, así como evaluaciones de la espermatogénesis fueron analizados por la prueba "t" de Student; considerando como significativas todas aquellas diferencias en las que la probabilidad sea igual o menor a 0.05.



**Figura 13. Ilustración en la que se representa el barrido de la muestra de paquete espermático para el posterior análisis de las anomalías presentes en los espermatozoides.**



### Cámara de Neubauer.

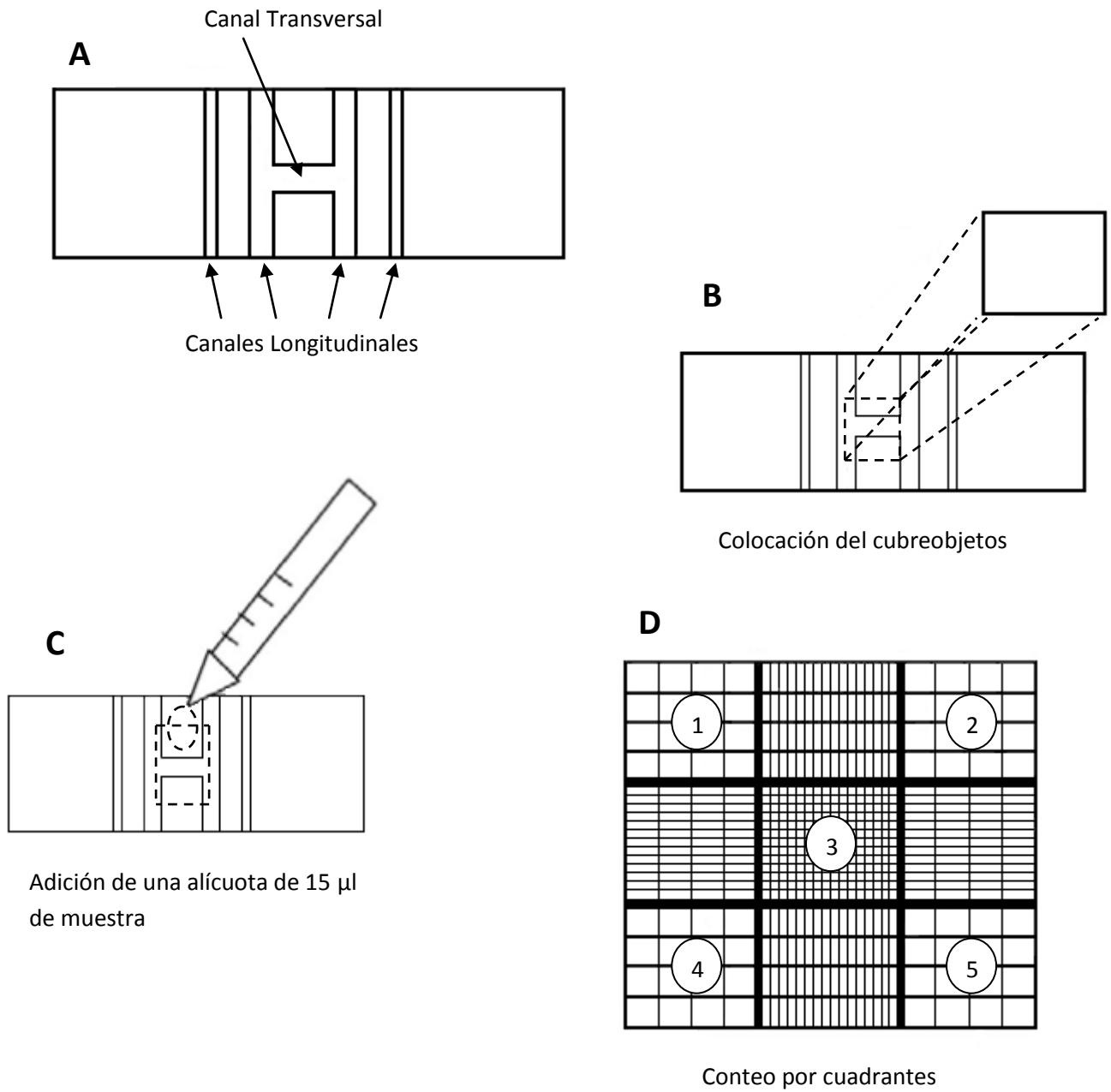


Figura 14. Ilustración que representa el uso de la cámara de Neubauer para la determinación de número de espermatozoides; A) Cámara de Neubauer y sus componentes, B) Preparación de la cámara, C) Colocación de la muestra, D) Conteo por cuadrantes.



## RESULTADOS

### 1).-Efecto de la administración sistémica de p-cloroanfetamina

#### 1.1.-Concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético.

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en los animales que recibieron solución salina, la concentración de serotonina se incrementó significativamente y la del metabolito disminuyó (cuadro 1). En la hipófisis se observó la disminución significativa en la concentración de serotonina y del metabolito y en el testículo este comportamiento se observó en la concentración de serotonina. En la glándula adrenal no se presentaron cambios en estos parámetros (cuadro2).

**Cuadro 1.-Concentración (media  $\pm$  e.e.m.) de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo anterior y medio de ratas testigo (TA) y tratadas con solución salina (SS) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.**

Estructura /Grupo	5-HT (ng/mg de tejido)	5-HIAA (ng/mg de tejido)	5-HIAA/5-HT
Hipotálamo Anterior			
TA	0.75 $\pm$ 0.08	2.78 $\pm$ 0.29	0.28 $\pm$ 0.02
SS	1.48 $\pm$ 0.03 *	1.38 $\pm$ 0.18 *	0.41 $\pm$ 0.05
Hipotálamo Medio			
TA	0.80 $\pm$ 0.11	2.75 $\pm$ 0.33	0.32 + 0.05
SS	1.00 $\pm$ 0.17	2.13 $\pm$ 0.34	0.58 + 0.10

\* p< 0.05 vs. grupo TA (prueba "t" de Student).

**Cuadro 2.-Concentración (media  $\pm$  e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en la hipófisis, testículo y adrenal de ratas testigo (TA) y tratados con solución salina (SS) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.**

Estructura/Grupo	5-HT (ng/mg de tejido)	5-HIAA (ng/mg de tejido)
Hipófisis		
TA	0.529 $\pm$ 0.052	0.68 $\pm$ 0.19
SS	0.278 $\pm$ 0.04*	0.29 $\pm$ 0.06*
Testículo		
TA	0.05 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.02
SS	0.13 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01*
Adrenal		
TA	1.61 $\pm$ 0.22	0.04 $\pm$ 0.01
SS	1.57 $\pm$ 0.07	0.7 $\pm$ 0.01

\* p< 0.05 vs. grupo TA (prueba "t" de Student).





En el grupo de animales tratados con solución salina no se modificó el número de espermatozoides móviles y viables, así como las formas normales de este tipo de células (cuadro 2).

**Cuadro 3.-Promedio de espermatozoides móviles, viables y anormalidades de ratas testigo (TA) y tratadas con solución salina (SS) a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días.**

Grupo	Espermatozoides Móviles	Espermatozoides Inmóviles
TA	48.7 ± 4.29	64.7 ± 6.05
SS	64.1 ± 3.55	33.3 ± 3.4
	Espermatozoides Viables	Espermatozoides Inviabiles
TA	50.8 ± 7.11	66.2 ± 8.63
SS	65.3 ± 3.61	36.1 ± 3.7
	Espermatozoides Normales	Espermatozoides Anormales
TA	72.5 ± 2.7	45.7 ± 4.7
SS	65.2 ± 1.24	45.6 ± 2.11

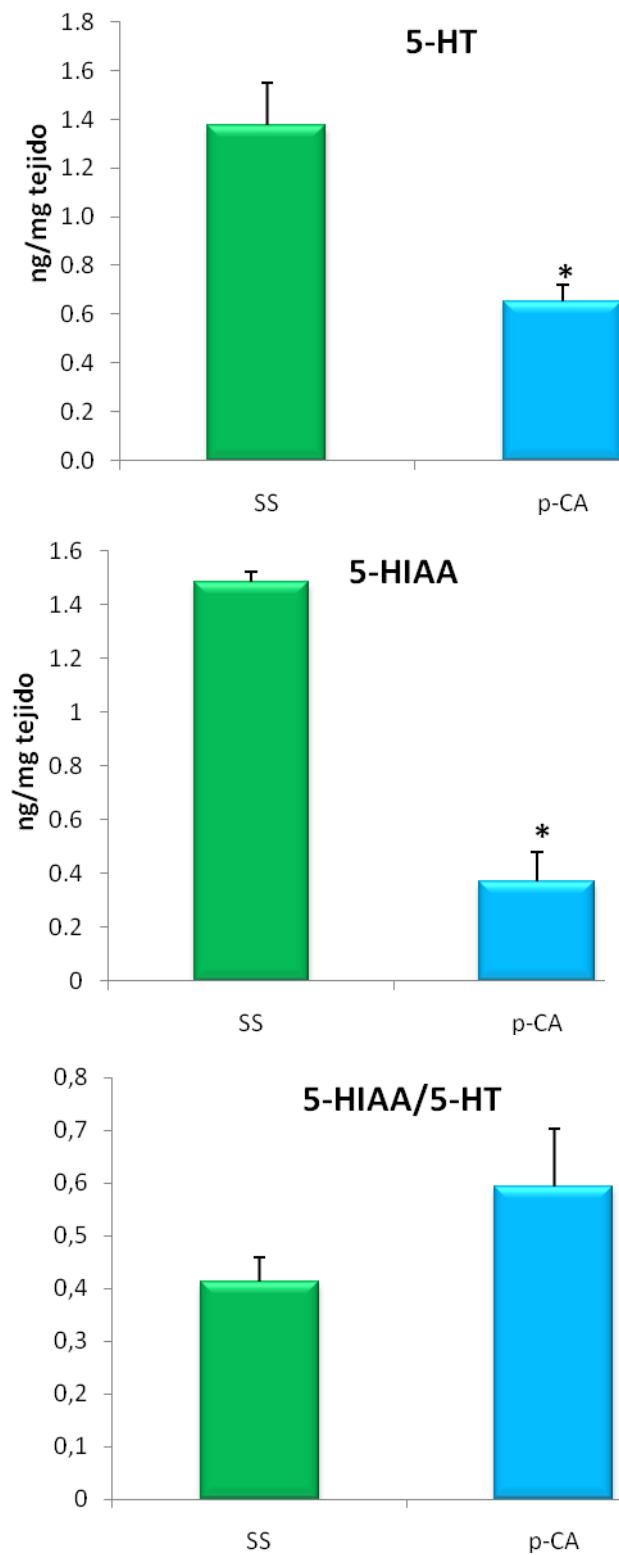
\* p<0.05 vs grupo TA (prueba "t" de Student).

Debido a que la administración de solución salina modificó algunos de los parámetros evaluados, para realizar el análisis de los efectos de la administración de pCA se utilizó como grupo de comparación a aquellos que recibieron solución salina.

En los animales que se inyectaron con pCA disminuyó significativamente la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior, no se modificó la del 5-HIAA y la relación 5-HIAA/5-HT se incrementó en comparación con el grupo que recibió solución salina (Figura 15). En el hipotálamo medio, también se observó la disminución significativa en la concentración de 5-HT y el aumento en la concentración de 5-HIAA y en la relación 5-HIAA/5-HT (Figura 16).

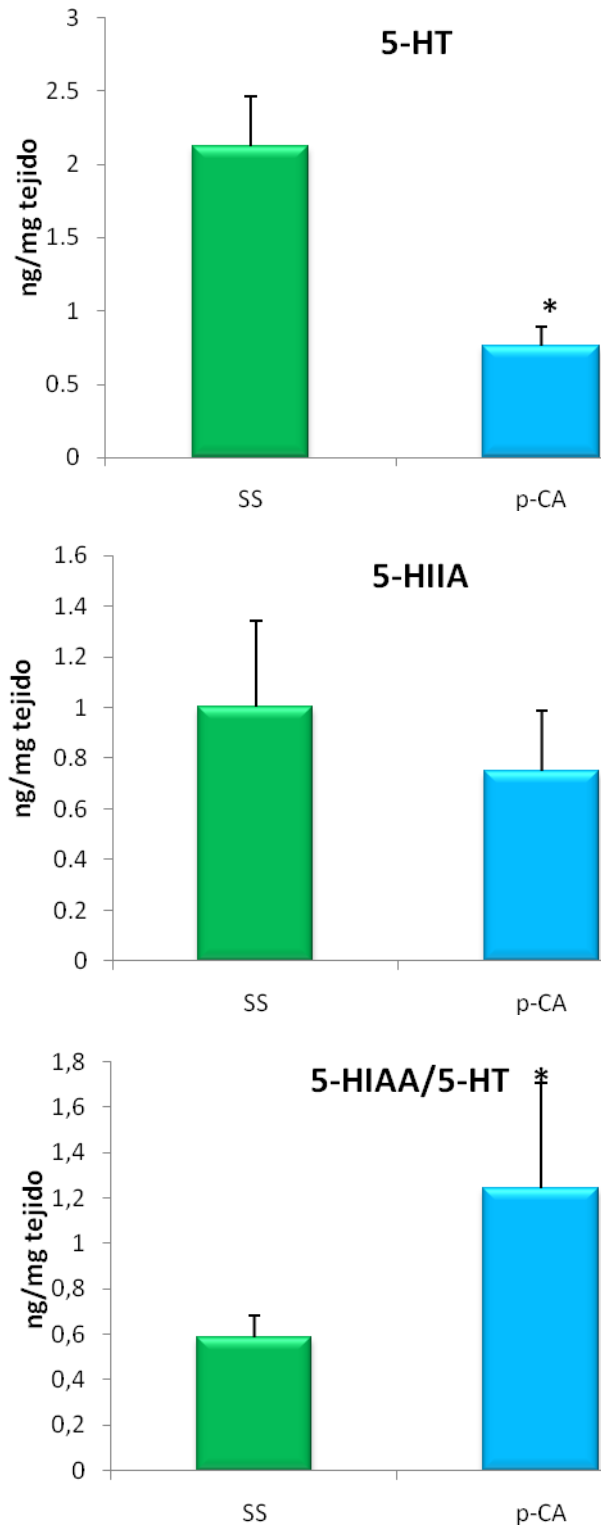
En la hipófisis de los animales que se inyectó la pCA se observó el aumento significativo en las concentraciones de serotonina, del 5-HIAA y en la relación 5-HIAA/5-HT en comparación con el grupo tratado con solución salina (Figura 17).

En comparación con el grupo de animales que recibieron solución salina, en el testículo de los que se inyectaron con pCA se observó la disminución significativa en las concentraciones de serotonina y del 5-HIAA (Figura 18) y en las glándulas adrenales se observó un comportamiento inverso (Figura 19).



\*  $p < 0.05$  vs. grupo SS (prueba "t" de Student).

**Figura 15.** Concentración de serotonina, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo anterior de ratas macho tratadas con solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



\*  $p < 0.05$  vs. grupo SS (prueba "t" de Student).

Figura 16. Concentración de serotonina, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo medio de ratas macho tratadas con solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

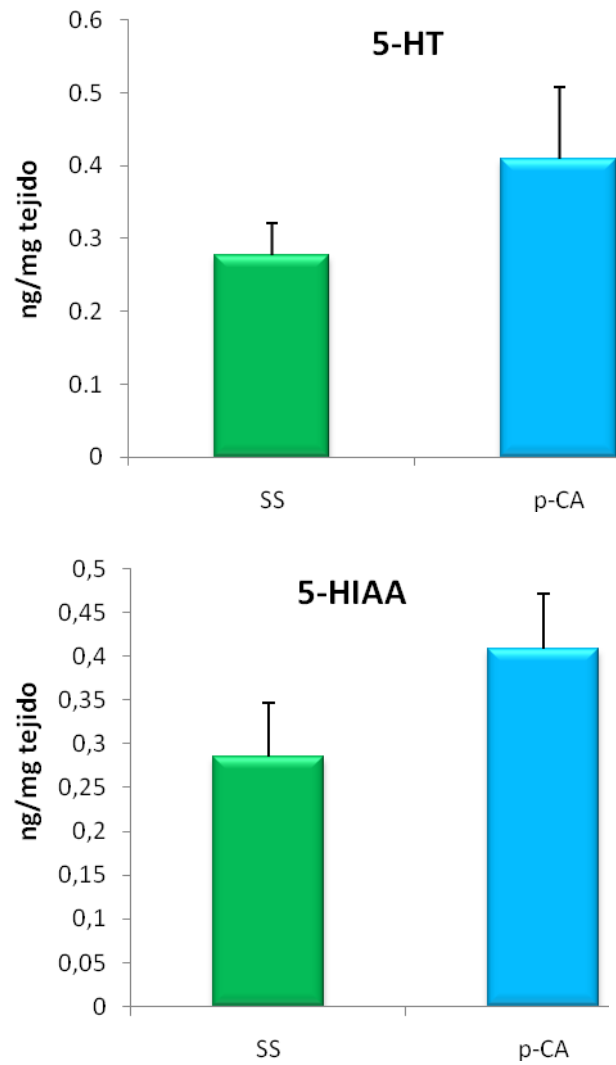
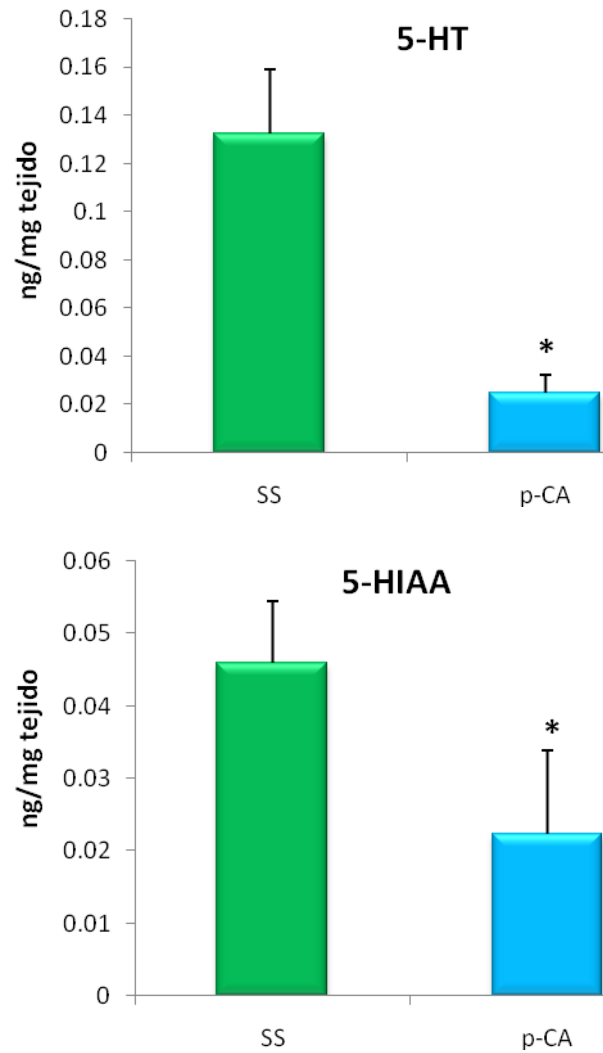
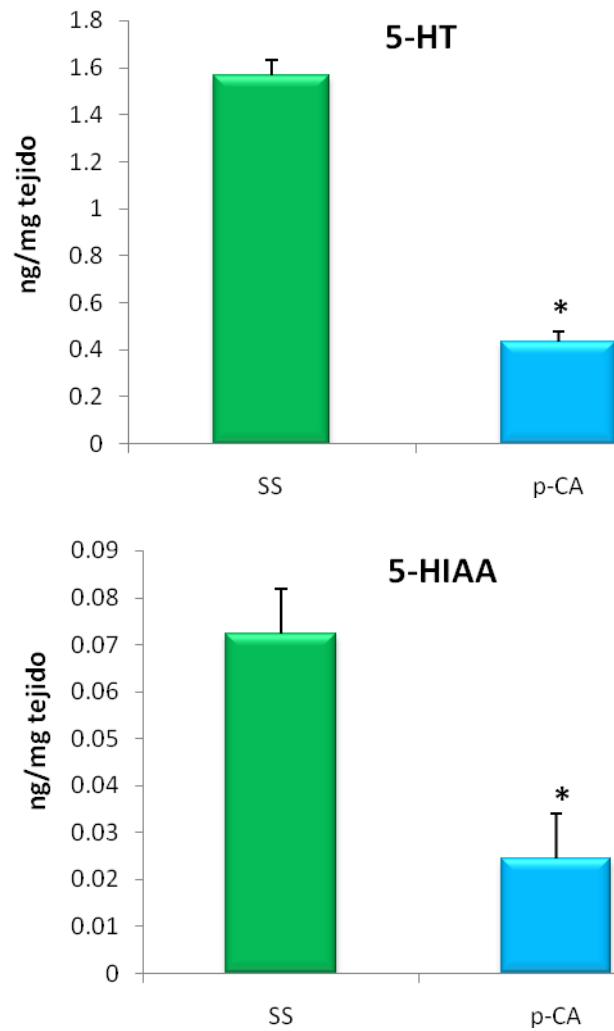


Figura 17. Concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en la hipófisis de ratas macho tratadas con solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificada a los 65 días.



\*  $p < 0.05$  vs. grupo SS (prueba "t" de Student).

**Figura 18.** Relación de la concentración de serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en los testículos de ratas macho tratadas con solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



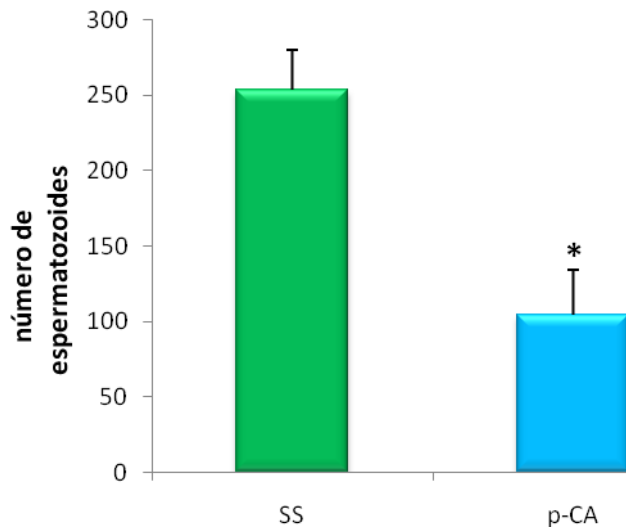
\*  $p < 0.05$  vs. grupo SS (prueba "t" de Student).

Figura 19. Relación de la concentración de serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en las glándulas adrenales de ratas macho tratadas con solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



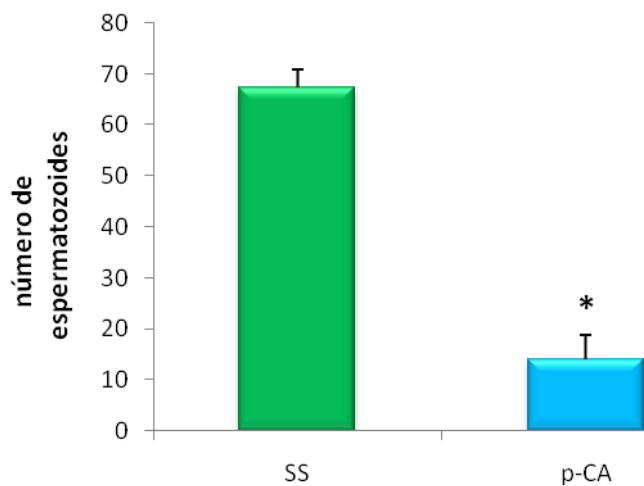
## 1.2.- Evaluación de la espermatogénesis

En los animales inyectados con la pCA se observó la disminución estadísticamente significativa en el número de espermatozoides, así como en la movilidad y viabilidad en comparación con el grupo de animales que recibieron solución salina (Figura 20, 21 y 22). En los animales en los que se administró la pCA se observó el incremento estadísticamente significativo en el número de formas anormales de espermatozoides (Figura 23).



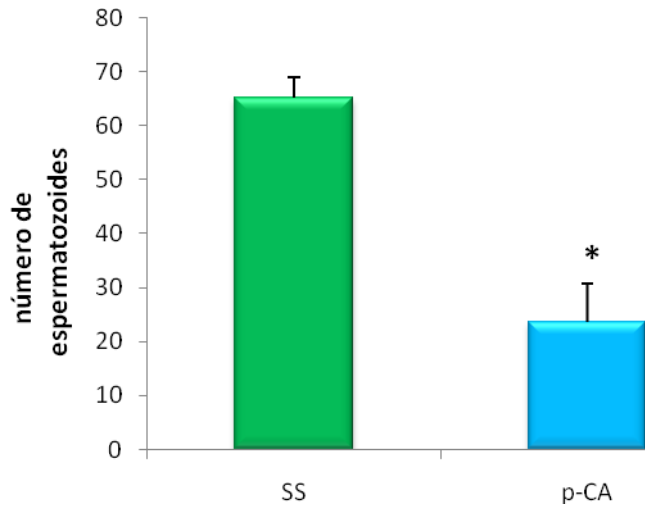
\*  $p < 0.05$  vs. grupo SS (prueba "t" de Student).

Figura 20. Número de espermatozoides presentes en el conducto deferente de los animales tratados con solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



\*  $p < 0.05$  vs. grupo SS (prueba "t" de Student).

Figura 21. Número de espermatozoides móviles en los animales tratados con solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



\*  $p < 0.05$  vs. grupo SS (prueba "t" de Student).

Figura 22. Número de espermatozoides viables en los animales tratados con solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

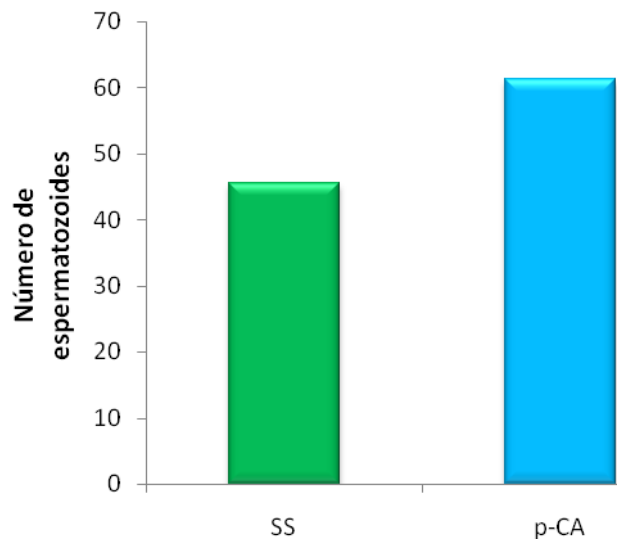


Figura 23. Número de espermatozoides con anomalías observados en ratas tratados con solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días.





En comparación con el grupo de animales que se les administró solución salina, en el grupo que se inyectó con la pCA, la anomalía más representativa que se observó en los espermatozoides son cabeza plana y de alfiler, gota en las pieza media, espermatozoides sin cabeza, con el flagelo enroscado y el flagelo doblado (Figura 24 y 25).

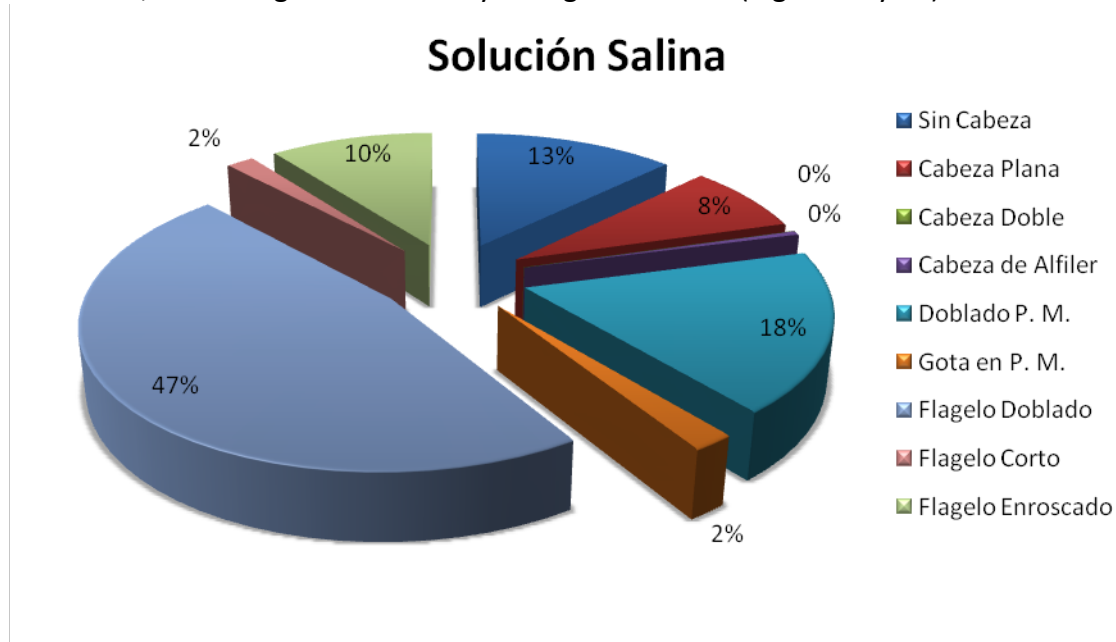


Figura 24. Porcentaje de anomalías observadas en ratas macho tratadas con solución salina (SS) a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días.

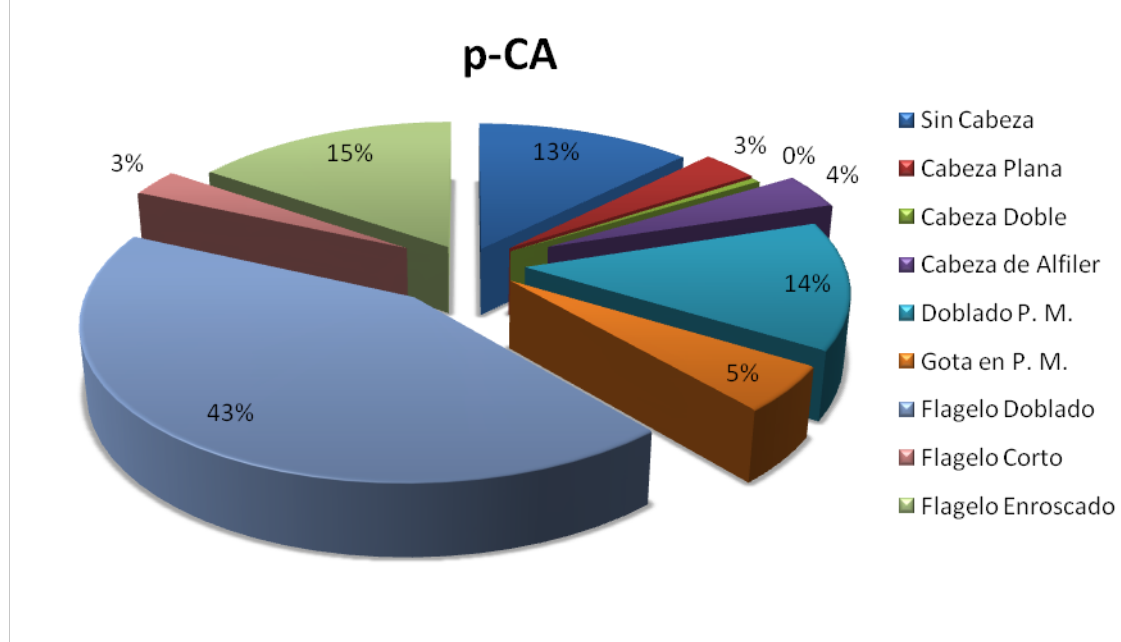


Figura 25. Porcentaje de anomalías observadas en ratas macho tratadas con p-Cloroanfetamina (pCA) a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días.



### 1.3.- Concentración de testosterona en suero.

En comparación con el grupo tratado con SS, el los animales inyectados con la pCA, la concentración de testosterona no se modificó significativamente (figura 26).

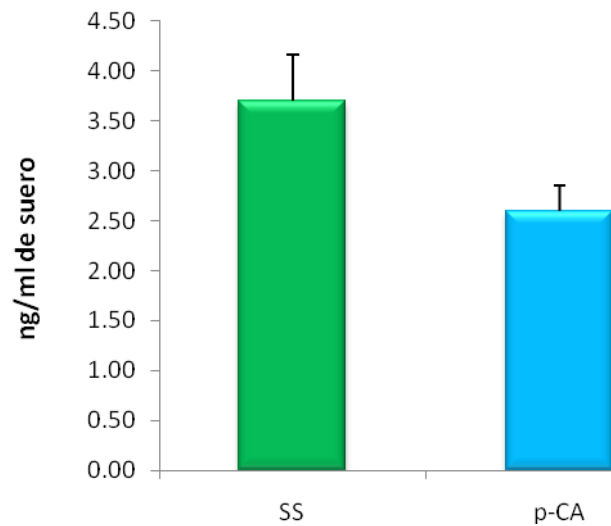
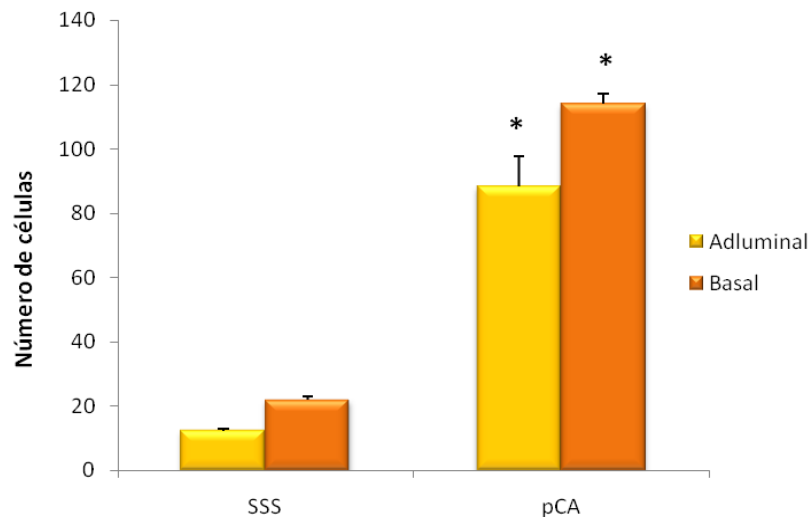


Figura 26. Concentración (media  $\pm$  e.e.m.) de testosterona en el suero de las ratas macho tratadas con solución salina (SS) y p-Cloroanfetamina (p-CA) a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días.



#### 1.4.- Apoptosis en el testículo.

En comparación con el grupo de animales tratados con solución salina en los inyectados con pCA se observó el incremento significativo en el número de células en apoptosis tanto en el compartimiento basal como en el compartimiento abdominal (Figura 27). En las fotomicrografías (Figura 28 A y C) se representan cortes histológicos de animales tratados con solución salina en donde se observa un arreglo normal del epitelio del túbulo seminífero y el número de células en apoptosis es bajo. Mientras que, en los que se administró la pCA se observa el incremento en la apoptosis en las espermatogonias y en los espermatoцитos primarios (compartimiento basal. (Figuras 28 By D).



\*  $p < 0.05$  vs. grupo SS (prueba "t" de Student).

Figura 27. Número de células en apoptosis cuantificadas en los túbulos seminíferos de animales tratados con solución salina o p-Cloroanfetamina a los 30 días y sacrificadas a los 65 días.

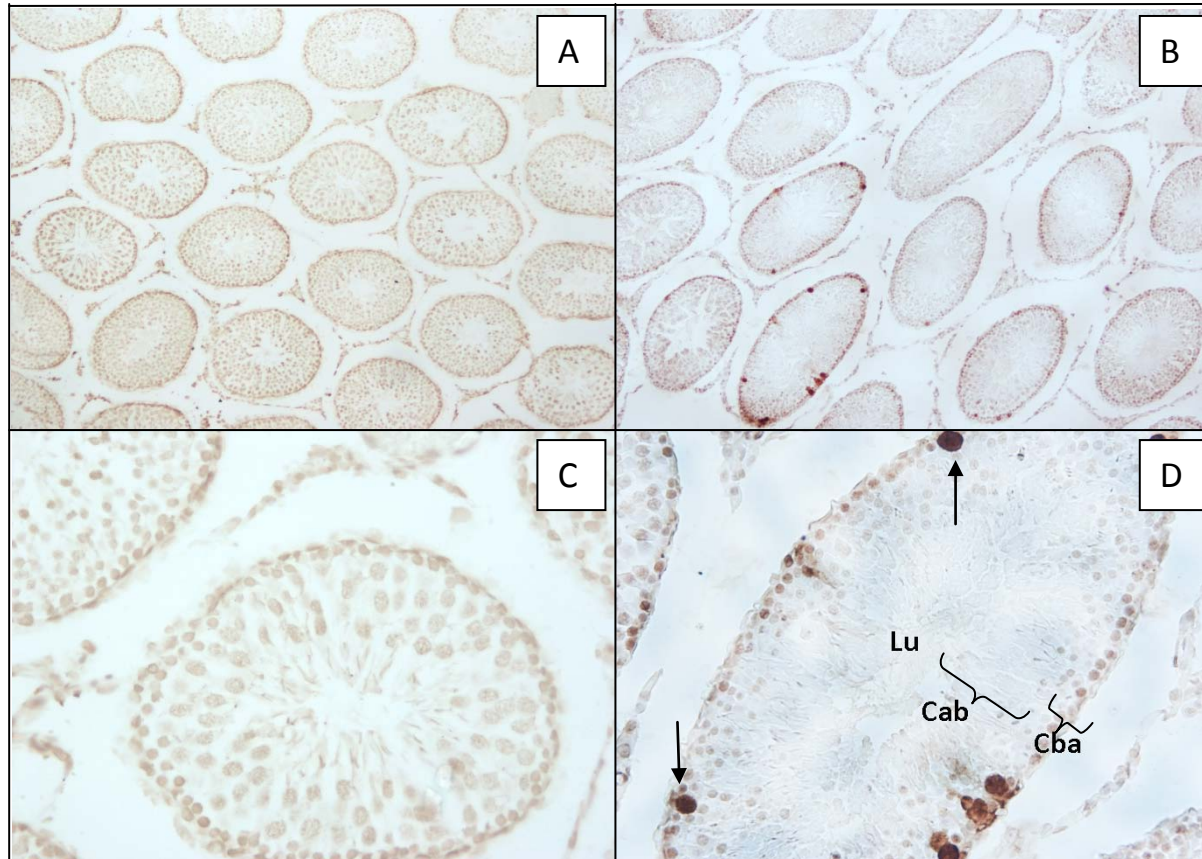


Figura 28. Fotomicrografías de cortes histológicos del testículo de rata a los 65 días de edad con un grosor de 5 micras. A) Túbulo seminífero normal de un animal sin tratamiento (TA) a 10X; B) Túbulo seminífero normal de un animal con inyección de vehículo (SS) a 10x; C) Túbulo seminífero normal de un animal con inyección de fármaco donde se observan varias células en apoptosis; D) Túbulo seminífero normal de un animal sin tratamiento (TA) a 40X; E) Túbulo seminífero normal de un animal con inyección de vehículo (SS) a 40X; F) Túbulo seminífero normal de un animal con inyección de fármaco se observa claramente el proceso de apoptosis en la lámina basal del túbulo. Luz del túbulo (Lu), compartimiento abdominal (Cab), compartimiento basal (Cba).



Cuadro 4 A y B. Resumen de los resultados observados en los animales que recibieron p-Cloroanfetamina por vía sistémica en el día 30 y sacrificados a los 65 días de edad. No significativo (NS).

Cuadro A/Parámetros.	5-HT	5-HIAA
<b>Hipotálamo</b> Anterior	↓	=
Medio	↓	↓
Hipófisis	=	=
Testículo	↓	↓
Adrenal	↓	↓

Cuadro B/Parámetros	Evaluaciones en testículo
<b>Espermatogénesis</b>	
Número	↓
Viabilidad	↓
Movilidad	↓
Formas anormales	↑
Compartimiento basal	↑
<b>Apoptosis</b> Compartimiento abdominal	↑
Testosterona sistémica	NS =



## **2).-Efecto de la administración intratesticular de p-cloroanfetamina**

### **2.1.- Concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético.**

La inyección intratesticular de solución salina o pCA no modificó la concentración de serotonina en el testículo contralateral a la inyección. En comparación con el grupo de inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo, en los que la inyección se realizó en el testículo derecho, la concentración de la amina en ambos testículos se incrementó significativamente (figura 29).

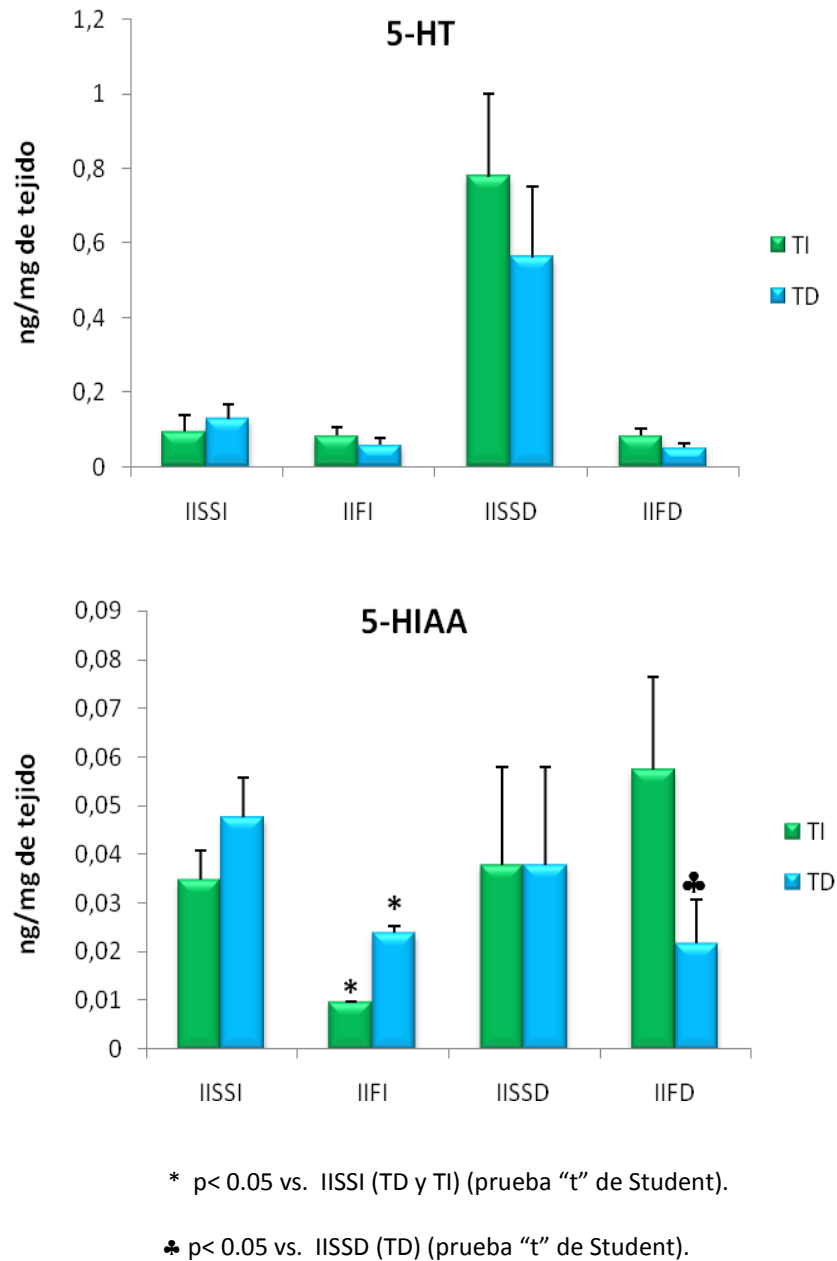
La concentración del 5-HIAA no se modificó en el testículo contralateral a la inyección de solución salina. Mientras que, en los que se inyectó el fármaco la concentración de este metabolito se incrementó significativamente en el testículo contralateral al que recibió la inyección de la pCA (figura 29).

### **2.2 Evaluación de la espermatogénesis**

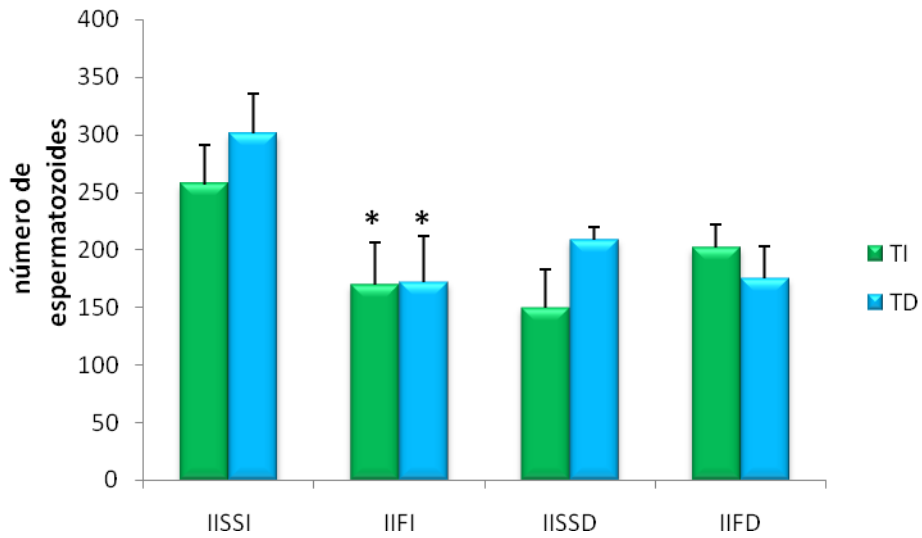
En los animales con inyección de solución salina en el testículo izquierdo o fármaco en el testículo izquierdo o derecho no se modificó el número de espermatozoides en el conducto deferente ipsilateral al testículo que recibió la inyección en comparación con el conducto deferente contralateral. Mientras que, en los que se administró la solución salina en el testículo derecho, el número de espermatozoide en el conducto deferente ipsilateral a la inyección se incrementó (figura 30). En los animales con inyección de pCA en el testículo izquierdo, el número de espermatozoides en ambos conductos deferentes fue menor significativamente, en comparación con respectivo grupo con solución salina (figura 30). Un comportamiento similar se observó en el número de espermatozoides viables (figura 31) y móviles (figura 32).

Cuando se realizó el análisis de las anomalías en los espermatozoides, se observó que en los animales con inyección intratesticular de solución salina tanto izquierda como derecha se observó un mayor porcentaje de espermatozoides normales que anormales. Mientras que en los que en los animales que se realizó la inyección intratesticular de la pCA, se incrementó el porcentaje de espermatozoides anormales en el testículo donde se realizó la inyección del fármaco (figura 33).

Las anomalías más representativas en los animales con inyección intratesticular de solución salina derecha e izquierda son el flagelo doblado y doblados en la pieza media (Figura 34, 35, 36 y 37), por otra parte las anomalías dominantes en los animales con inyección intratesticular de fármaco derecha e izquierda son cabeza plana, cabeza de alfiler y sin cabeza y en una menor cantidad las anomalías en cola y pieza media (Figura 38, 39, 40, 41).

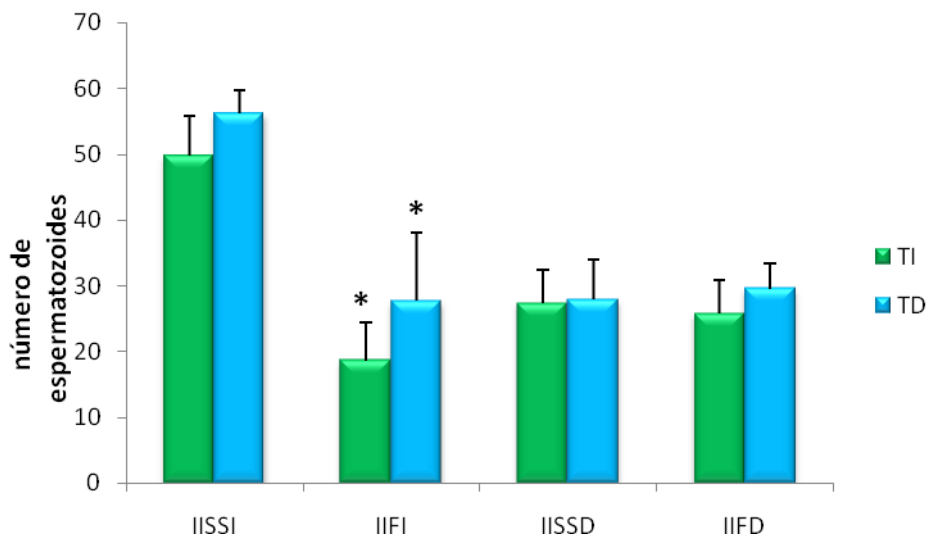


**Figura 29.** Concentración del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en los testículos de ratas macho con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo (IISSI), en el testículo derecho (IISSD), o con p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo(IIFI) o derecho (IIFD) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



\*  $p < 0.05$  vs. ISSI (TI y TD) (prueba "t" de Student).

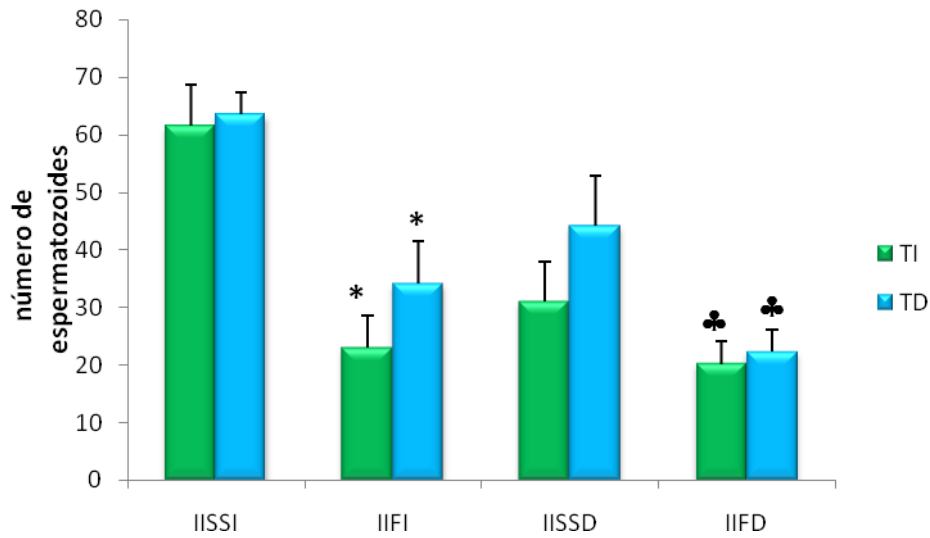
**Figura 30.** Número de espermatozoides en los conductos deferentes de los animales con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo (ISSI), en el testículo derecho (IISSD), o con p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo (IIFI) o derecho (IIFD) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



\*  $p < 0.05$  vs. ISSI (TI y TD) (prueba "t" de Student).

**Figura 31.** Número de espermatozoides viables en el conducto deferente de animales con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo (ISSI), en el derecho (IISSD), o con p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo (IIFI) o derecho (IIFD) a los 30 días de edad y sacrificados a los 65 días.





\*  $p < 0.05$  vs IISSI (TI y TD) (prueba "t" de Student).

♣  $p < 0.05$  vs. IISSD (TI yTD) (prueba "t" de Student).

Figura 32. Número de espermatozoides móviles en los animales con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo (IISSI), en el testículo derecho (IISSD), o con p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo (IIFI) o derecho (IIFD) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

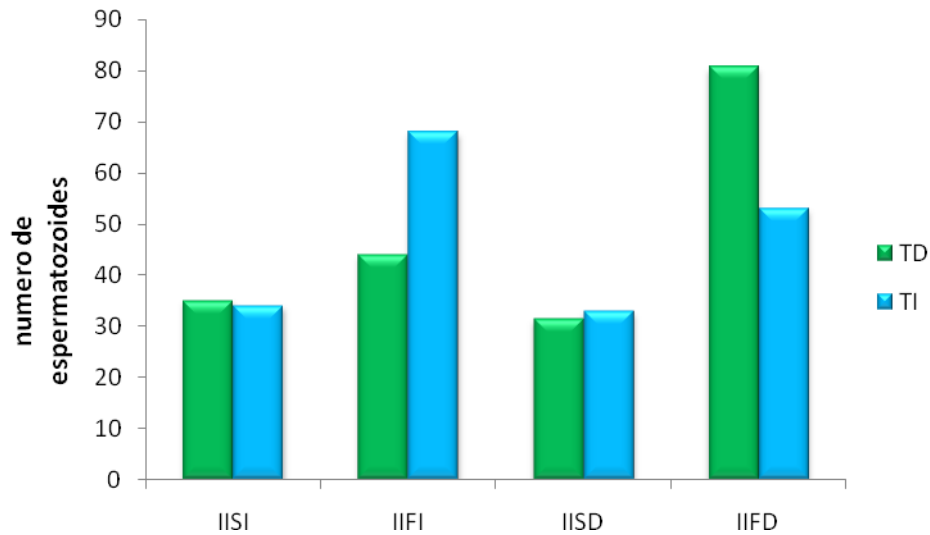


Figura 33. Representación gráfica del número de espermatozoides anormales presentes en cada testículo de la rata macho tratada con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo (IISI), en el testículo derecho (IISD), o con p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo (IIFI) o derecho (IIFD) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

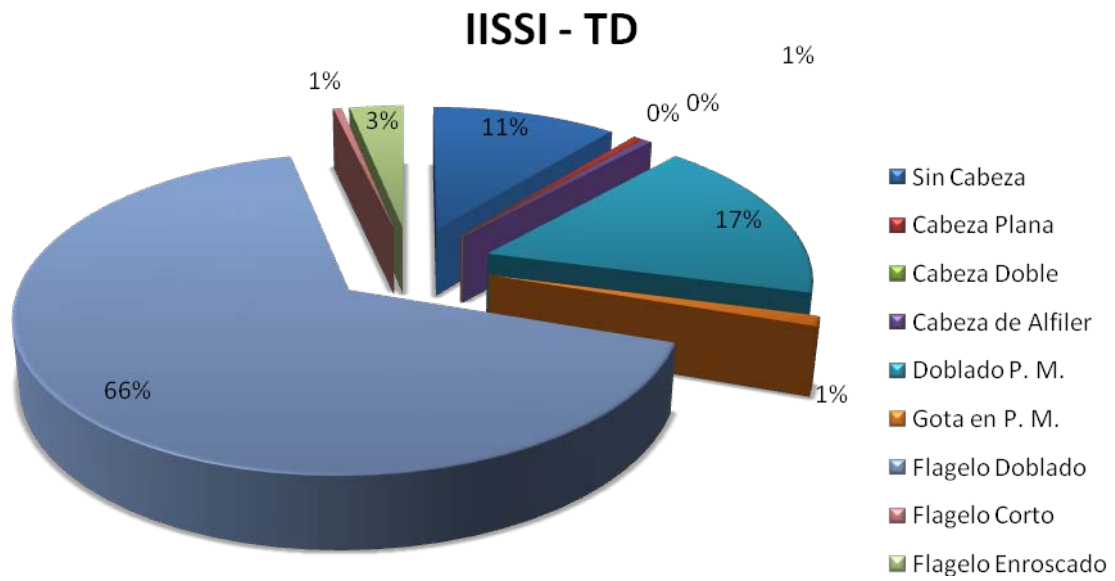


Figura 34. Porcentaje de anomalías observadas en el testículo derecho de ratas macho tratadas con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo (IISSI) a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.

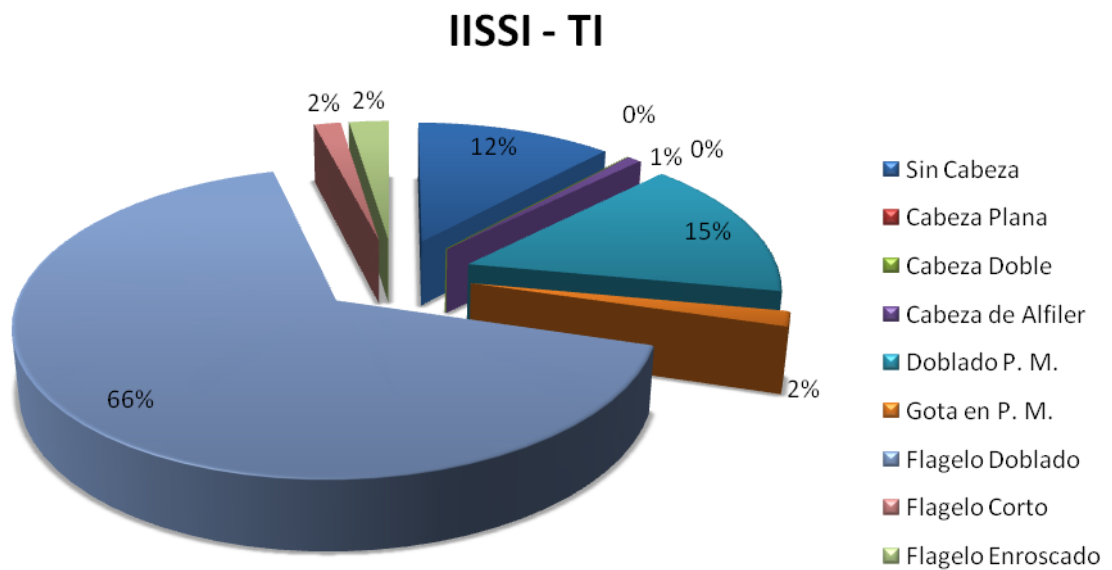


Figura 35. Porcentaje de anomalías observadas en el testículo izquierdo de ratas macho tratadas con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo (IISSI) a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.

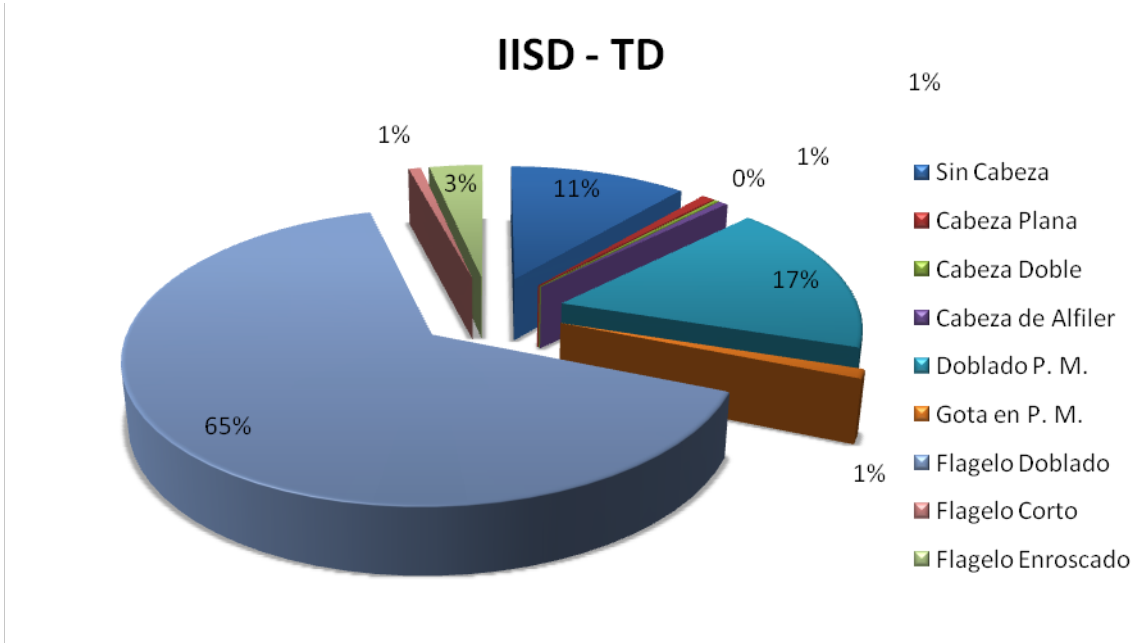


Figura 36. Porcentaje de anomalías observadas en el testículo derecho de ratas macho tratadas con inyección intratesticular de solución salina en el testículo derecho (IISD) a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.

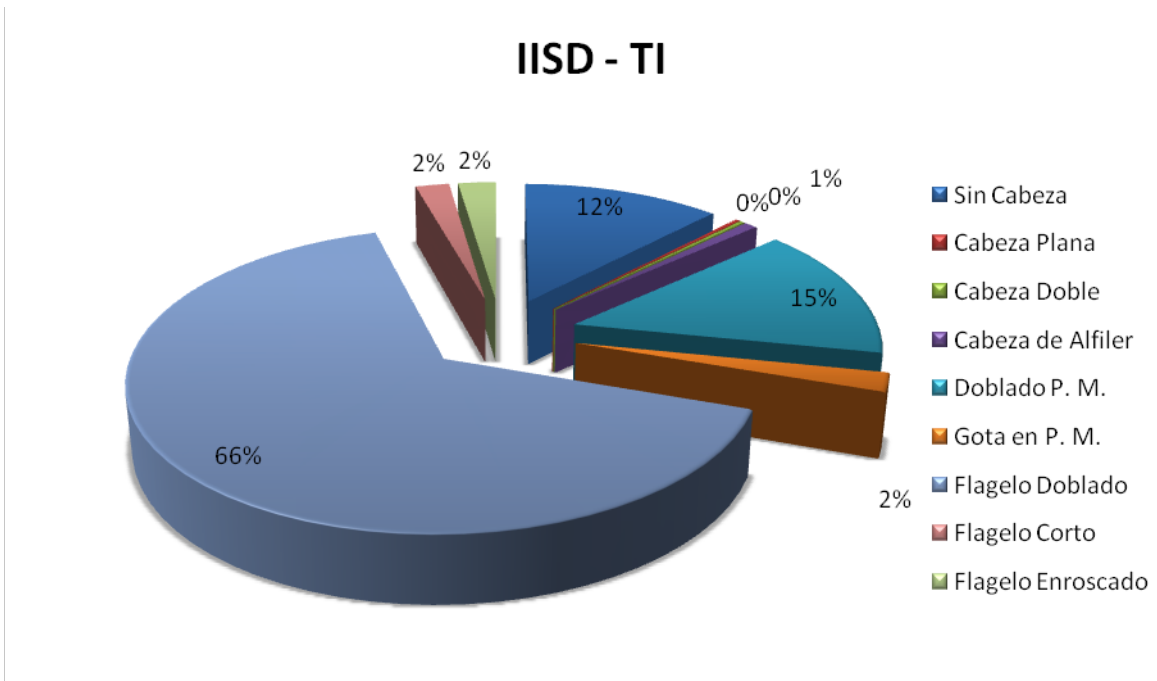


Figura 37. Porcentaje de anomalías observadas en el testículo izquierdo de ratas macho tratadas con inyección intratesticular de solución salina en el testículo derecho (IISD) a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.



### IIFI - TD

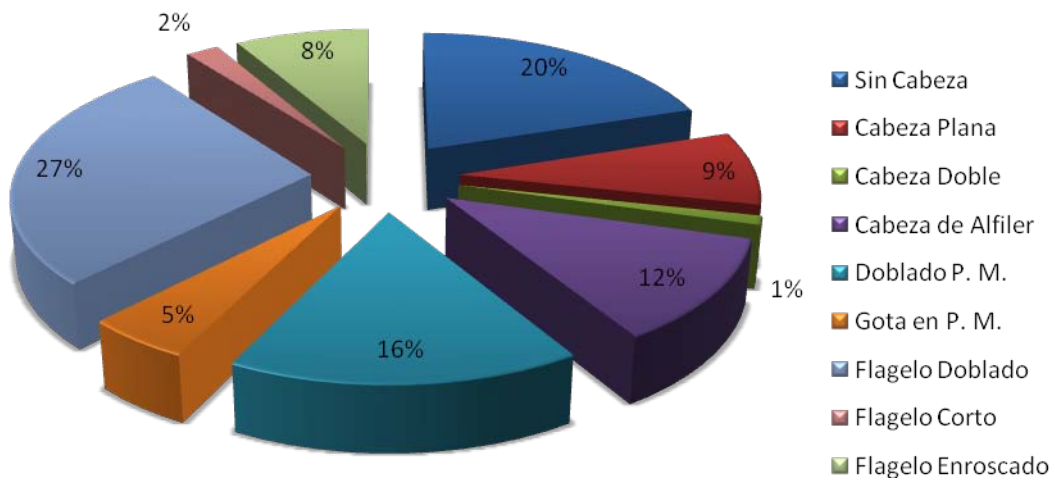


Figura 38. Porcentaje de anomalías observadas en el testículo derecho de ratas macho tratadas con inyección intratesticular de p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.

### IIFI - TI

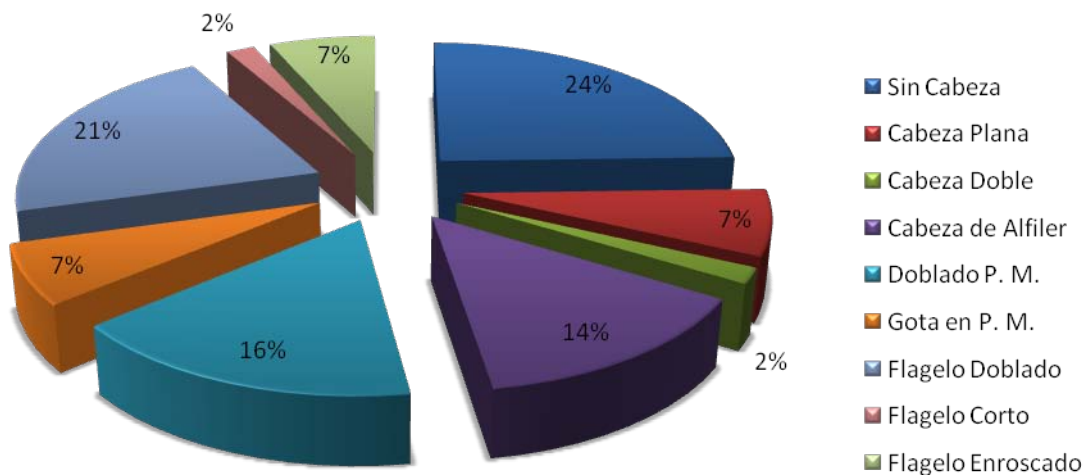


Figura 39. Porcentaje de anomalías observadas en el testículo izquierdo de ratas macho tratadas con inyección intratesticular de p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.

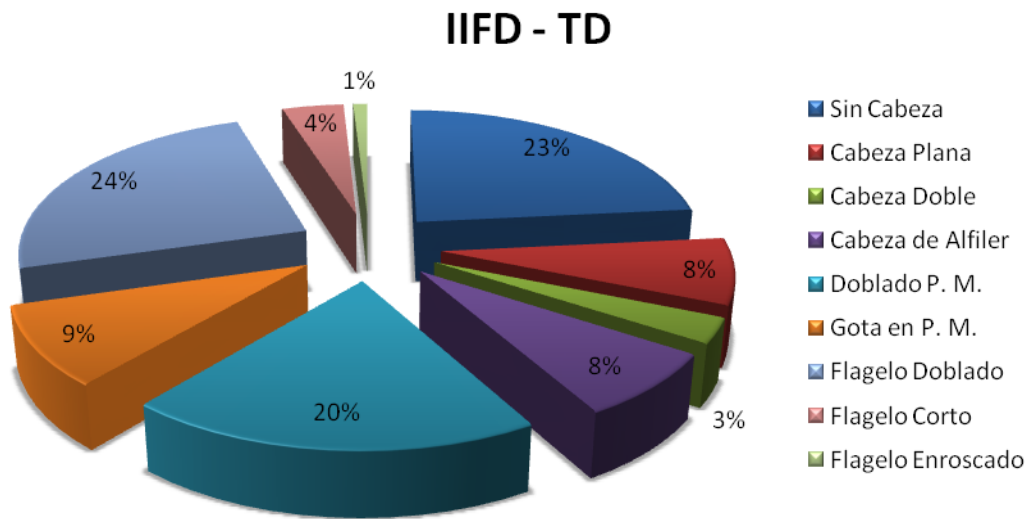


Figura 40. Porcentaje de anomalías observadas en el testículo derecho de ratas macho tratadas con inyección intratesticular de p-Cloroanfetamina en el testículo derecho a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.

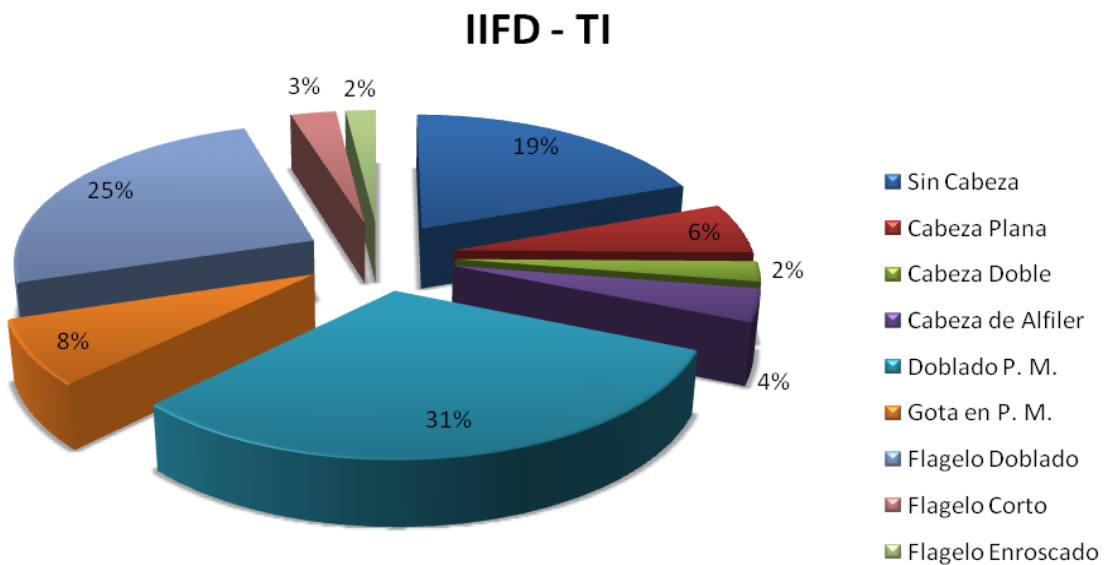
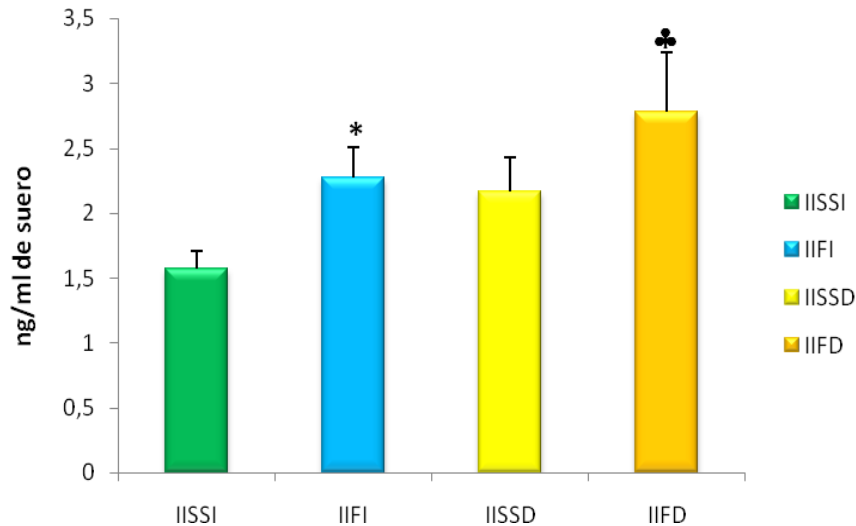


Figura 41. Porcentaje de anomalías observadas en el testículo izquierdo de ratas macho tratadas con inyección intratesticular de p-Cloroanfetamina en el testículo derecho a partir del día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.



### 2.3.- Concentración de testosterona en suero.

En comparación con el grupo de animales con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo, en los que la inyección se realizó en el testículo derecho, no se modificó significativamente la concentración de testosterona. Mientras que en los que se realizó la inyección de la pCA se observó la tendencia al incremento en la concentración de este andrógeno en comparación con su respectivo grupo de inyección salina (Figura 42).



\*  $p < 0.05$  vs. animal tratado con el vehículo (prueba "t" de Student).

♣  $p < 0.05$  vs. animal tratado con el vehículo (prueba "t" de Student).

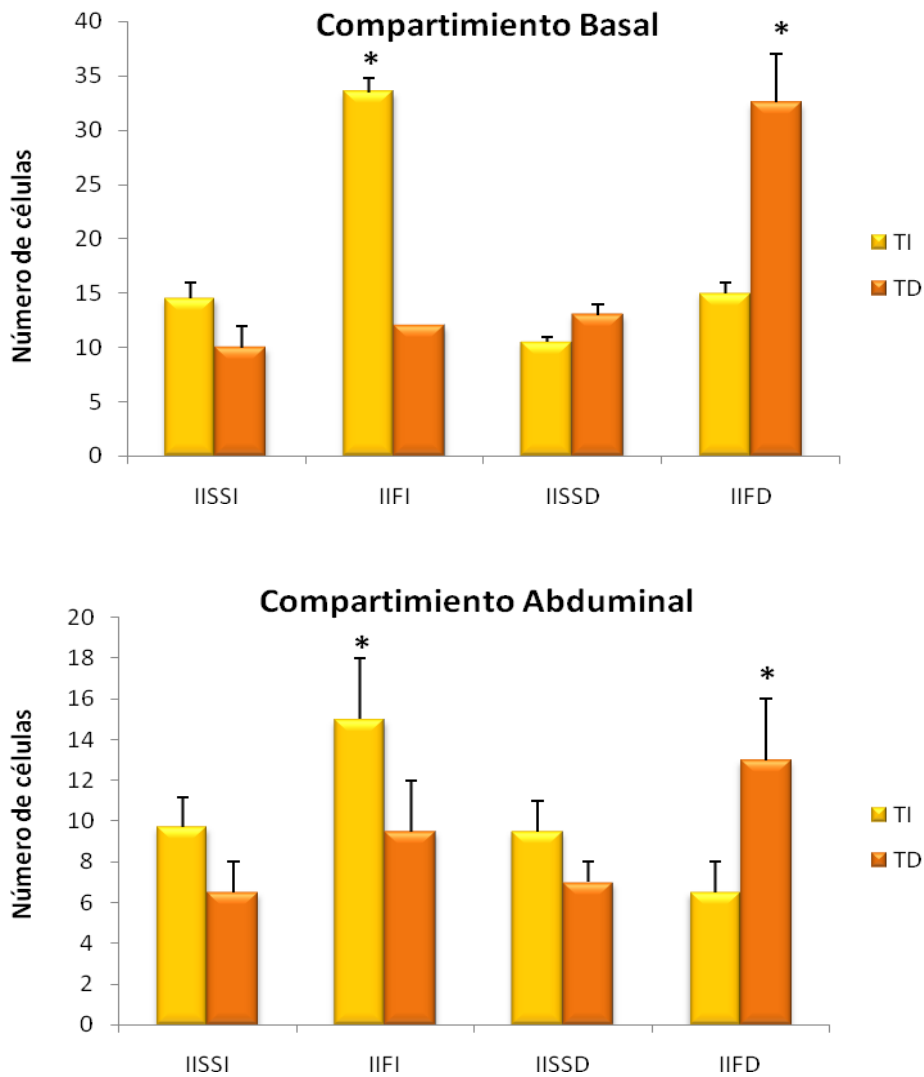
**Figura 42.** Concentración (media  $\pm$  e.e.m.) de testosterona en el suero de las ratas macho tratadas con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo (IISSI) o en el testículo derecho (IISSD), de p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo (IIFI) o en el testículo derecho (IIFD) en el día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.

### 2.4.- Apoptosis en el testículo

El número de células apoptóticas en el compartimiento basal y abdominal de los testículos contralaterales a la inyección de solución salina o fármaco no presentaron cambios significativos. Mientras que, en los testículos en los que se inyectó el fármaco, el número de células en apoptosis en ambos compartimientos se incrementó significativamente en relación a los testículos que se les inyectó la solución salina (Figura 43). En las fotomicrografías (44 A, B, C y D) se presentan cortes histológicos de testículos de animales con inyección intratesticular de solución salina o fármaco en el testículo en el testículo derecho, en donde se observa que en el que se administró solución salina no se presentan células en apoptosis y en el testículo donde se inyectó la p-CA se aprecia el incremento en la apoptosis en los espermatocitos y espermátides.



Un comportamiento similar se observa en las fotomicrografías (46 A, B, C y D) donde se presentan cortes histológicos de testículos con inyección intratesticular de solución salina o fármaco en el testículo izquierdo en donde se observa que en el que se administró solución salina no se presentan células en apoptosis y en el testículo donde se inyectó la p-CA se aprecia el incremento en la apoptosis en las espermatogonias y los espermatocitos. En los testículos contralaterales a la inyección de solución salina o fármaco no se presentaron células en apoptosis (Figura 45 A, B, C, D y Figura 47 A, B, C, D).



\*  $p < 0.05$  vs. testículo ipsilateral a la inyección (prueba "t" de Student).

**Figura 43.** Número de células en apoptosis cuantificadas en el compartimiento basal y abdominal de los túbulos seminíferos en los animales con inyección intratesticular de solución salina en el testículo izquierdo (IISSI) o derecho (IISSD), y con p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo (IIFI) o derecho (IIFD) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.



Cuadro 5). Resumen de los resultados observados en los animales que se les inyectó en el testículo izquierdo (IISI) o derecho (IISD) solución salina o p-Cloroanfetamina en el testículo izquierdo (IIFI) o derecho (IIFD) en el día 30 y sacrificados a los 65 días de edad.

Parámetros	IISI		IIFI		IISD		IIFD	
	TI	TD	TI	TD	TI	TD	TI	TD
5-HT	=	=	=	=	↑	↑	=	=
5-HIAA	=	=	↓	↓	=	=	=	↓
<b>Espermatogénesis</b>								
Número	=	=	↓	↓	=	=	=	=
Movilidad	=	=	↓	↓	=	=	↓	↓
Viabilidad	=	=	↓	↓	=	=	=	=
Formas anormales	=	=	↑	↑	=	=	↑	↑
Compartimiento basal	=	=	↑	=	=	=	=	↑
<b>Apoptosis</b>								
Compartimiento Abdominal	=	=	↑	=	=	=	=	↑
Testosterona sistémica	=		↑		=		↑	





## DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron en el presente estudio nos permiten sugerir que el sistema serotoninérgico actúa directamente y de forma estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan las funciones del testículo, como la espermatogénesis. El hecho de que en los animales que se administró la p-CA, se observara la disminución en las concentraciones de serotonina en el hipotálamo y en el testículo, así como de la espermatogénesis, apoya esta interpretación.

La disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior y medio de los animales a los que se les inyectó la p-cloroanfetamina de forma sistémica coincide con lo reportado en estudios previos (Aragón y col., 2005, Shishkina y Dygalo, 2000). En los animales que se trataron con la p-CA, es posible que se modificaran algunos de los parámetros de la neurotransmisión serotoninérgica, lo cual se reflejó en la menor concentración de serotonina cuantificada en el hipotálamo de estos animales. Esta interpretación se basa en las evidencias en las que se muestra que cuando se administra por vía sistémica la p-CA, esta tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y a corto plazo (primeras 4 horas posteriores a su administración) conduce a la liberación de serotonina de la terminal serotoninérgica en diferentes regiones del cerebro y posteriormente inhibe la actividad de la triptófano hidroxilasa, enzima que cataliza la transformación del triptófano en 5-hidroxitriptófano, el cuál es un paso limitante para la producción de serotonina (Sanders-Bush y col., 1972, Fuller y Snoddy., 1974; Sanders-Bush y col., 1975; Serkerke y col., 1975; Steranka y col., 1978).

Se sugiere que el efecto de la administración de una única dosis de p-CA se mantiene hasta por 196 horas después del tratamiento y posteriormente se inicia la recuperación del sistema. También se ha mostrado que la p-CA provoca degeneración de las terminales de las neuronas encargadas de la producción de la serotonina (Serkerke y col., 1975; Sanders-Bush y col., 1975). En nuestro estudio la administración de la anfetamina se inició a partir del día 30 y se continuó cada 8 días por 35 días, lo que nos permitió asegurar el efecto sostenido de la anfetamina y evitar la recuperación de la síntesis de serotonina.

La fuente principal de serotonina del hipotálamo son los núcleos dorsal y medial del raquídeo (Walther y Bader, 1999). Las células del núcleo medial del raquídeo son más resistentes a los efectos de las anfetaminas en comparación con las del núcleo dorsal del raquídeo (Mamounas y Molliver, 1988; Mamounas y col., 1991; Frazer y Hensler, 1999). También se ha mostrado que cuando se administra la anfetamina por vía sistémica el número de neuronas serotoninérgicas en el núcleo dorsal del raquídeo disminuye hasta en un 77%, mientras que en el núcleo medial del raquídeo no se presentan cambios significativos (Mamounas y Molliver, 1988). Conjuntamente estas evidencias de bibliografía nos permiten explicar el por qué en los animales a los que se les administró la p-CA por vía



sistémica no se eliminará completamente la concentración de serotonina en el hipotálamo, ya que la amina proviene de las neuronas que conforman el NMR.

La disminución de la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior y medio se acompañó de la disminución en el metabolito de la misma, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). La serotonina que se une a la proteína transportadora (SERT), atraviesa la membrana de la neurona presináptica y se transporta a la mitocondria, en donde bajo la acción de la enzima MAO se metaboliza y forma el 5-HIAA (Frazer, 1999; Iceta, 2008; Mendoza, 2008). También se ha mostrado que la actividad de la MAO es disminuida por la p-CA (Jessel, 2000; Urtilla, 2000). Con base en nuestros resultados y lo reportado en bibliografía es posible que la menor concentración del 5-HIAA observada en el hipotálamo de los animales inyectados con la p-CA, sea el resultado de la menor actividad de la MAO. Otra posibilidad es que la disminución en la concentración de la 5-HIAA sea el resultado de la caída de serotonina que es el sustrato de esta reacción.

En la hipófisis de los animales a los que se les administró la p-CA no se modificó la concentración de serotonina ni del 5-HIAA. Es posible que la falta de cambios en la síntesis de la amine se asocien a la isoforma de la triptófano hidroxilasa presente en la hipófisis. En relación a esto se ha mostrado que el lóbulo anterior de la hipófisis se lleva a cabo la transformación del triptófano en serotonina, como resultado de la acción de la enzima triptófano hidroxilasa (Saavedra y col., 1975), de la que existen dos isoformas, la TPH2 presente principalmente en el cerebro y la TPH1 en la glándula pineal e hipófisis. Esta última tiene mayor afinidad por el triptófano y con una actividad enzimática mayor (Nakamura y Hasegawa, 2007).

Otra de las fuentes de serotonina de la hipófisis es la que se origina de fibras nerviosas que entran a la glándula junto con los vasos sanguíneos, hasta el momento es desconocido el origen de la que llega a la adenohipófisis, (Westlund y Childs, 1982). Sin embargo, es posible que la fuente de esta inervación sea el núcleo medial del rafé, cuyas neuronas son más resistentes a los efectos de las anfetaminas (Mamounas y Molliver, 1988), lo que se reflejo en la falta de cambios en la concentración de serotonina en la hipófisis de los animales que se inyectaron con la p-CA. La posibilidad de que las fibras que inervan a la hipófisis se originan en el núcleo del rafé, se basa en las evidencias que muestran que existen fibras serotoninérgicas que se originan en el rafé magnus y que establecen contacto con las células endocrinas del lóbulo intermedio de la hipófisis (Saland, 2001).

Cuando la p-CA se administra por vía sistémica, posiblemente actúa en órganos periféricos como el testículo y la adrenal. Se ha sugerido que el testículo es un órgano blanco de la p-CA (Aragón y col., 2005), y la disminución en la concentración de serotonina observada en el testículo de los animales con inyección sistémica de p-CA apoyan esta idea. Las fuentes de serotonina en el testículo que se han identificado hasta



el momento son las plaquetas, los mastocitos y las propias células de Leydig que tienen la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de la amina (Campos y col., 1990; Tinajero, 1993). Con base en estas evidencias se propone que la caída en la concentración de la serotonina en el testículo es el resultado de la inhibición de la enzima triptofano hidroxilasa por la p-CA.

La disminución de la concentración de serotonina en el testículo se acompañó de un efecto similar en el del metabolito, el 5-HIAA. Este evento posiblemente se asocie a la menor concentración de la amina, que es sustrato a partir del cual se forma este metabolito. Otra posible explicación a la disminución en la concentración del 5-HIAA en el testículo de los animales que se trataron con la p-CA por vía sistémica, posiblemente se asocie a la disminución en la actividad de la MAO, enzima que participa en la transformación de la serotonina en el 5-HIAA (Frazer, 1999). La inhibición de la actividad de la MAO por la p-CA se ha reportado que se produce en diferentes regiones del cerebro (Iceta, 2008; Mendoza, 2008).

Pocos estudios se han realizado sobre el efecto de las anfetaminas en la síntesis de serotonina en las glándulas adrenales, pero con base en lo reportado en bibliografía sobre los efectos que tiene este fármaco en el cerebro y testículo entre otros órganos, es posible que la p-CA disminuya la síntesis y metabolismo de la serotonina, al actuar directamente en la glándula adrenal. Lo anterior se basa en la disminución en la concentración de serotonina y del 5-HIAA observada en esta glándula en los animales tratados con la p-CA. La posibilidad de que en la glándula adrenal se lleven a cabo estos eventos se apoya en estudios previos, en los que se ha reportado la presencia de la serotonina, de su metabolito y de la MAO en la glándula adrenal (Capaldo y col., 2003; Lefebvre y col., 2001).

El mecanismo preciso de acción de la serotonina en la gónada del macho no se ha establecido. Tinajero y colaboradores (1993) sugieren que la serotonina producida por las células de Leydig ejerce una acción autocrina y modulan la esteroidogénesis. En nuestro estudio observamos que la disminución en la concentración de serotonina en el testículo de los animales a los que se les administró la p-CA no se acompañó de la disminución significativa en la concentración de testosterona en el suero. Hecho que nos llevaría a proponer que la serotonina en la gónada no participa en la regulación de la secreción de testosterona. Sin embargo, en resultados previos del laboratorio mostramos que cuando se aplica una sola dosis de p-CA a ratas de 30 días de edad, la concentración de este andrógeno disminuye a las 48 horas posteriores al tratamiento, efecto que se mantiene hasta por 144 horas (Pérez y col., 2006; Leyva y col., 2007). Por lo que es posible pensar que el efecto de la serotonina en la regulación de la esteroidogénesis testicular es dependiente de la edad.



Las discrepancias en lo reportado por nosotros previamente y lo observado por Pérez y colaboradores (2006), es que se realizaron las evaluaciones de testosterona en edades diferentes, en este último se analizaron en la etapa juvenil de la rata (32 a 36 días) y en el presente estudio en el inicio de la maduración sexual (65 días de edad). La idea de que la serotonina participa de manera diferencial en la esteroidogénesis del testículo, se basa en los estudios *in vivo* con animales adultos o *in vitro* en donde se mostró que la serotonina inhibe la esteroidogénesis (Ellis y col., 1972; Kalla 1979; Tinajero y col., 1972; Csaba y col., 1998). Mientras que, en la rata prepúber la administración intratesticular de serotonina la estimula (Csaba y col., 1998).

La disminución en la concentración de serotonina observada en los animales a los que se les administró la pCA por vía sistémica se acompañó de la disminución de algunos de los parámetros de la espermatogénesis (número, movilidad y viabilidad de los espermatozoides). Se ha mostrado que tanto la LH, FSH y testosterona son hormonas esenciales para el mantenimiento de este proceso (Levy y col., 2006). En nuestro estudio estos cambios en la espermatogénesis no se correlacionan con la disminución en concentración de testosterona, hormona que se ha mostrado participa en el desarrollo de las espermatogonias y los espermatozoides, además mantiene la supervivencia de las células germinales principalmente en la etapa VII del desarrollo del epitelio seminífero y favorece la elongación de las espermátides (McLachlan y colaboradores., 1996, Bartlett y col., 1989, Sinha-Hikim y Swerdloff, 1994). Con base en restos estudios parecería que la disminución en el número de espermatozoides observado en los animales tratados con p-CA no tendría una explicación. Sin embargo, previamente mostramos que cuando se administra una sola dosis de p-CA a ratas macho de 30 días de edad, este andrógeno disminuye a partir de las 48 horas y sus efectos se mantienen hasta las 168 horas (etapa Juvenil) (Pérez y col., 2006; Leyva y col., 2007). Etapa en la cual, la disminución en la concentración de testosterona se acompañó de la degeneración de las células germinales principalmente espermatogonias y espermatozoides, efecto que posiblemente se mantuvo hasta los 65 días de edad y se reflejó en la disminución en el número de espermatozoides durante la primera oleada de la espermatogénesis observada en este estudio.

En apoyo a esta idea mostramos que la aplicación de una única dosis de p-CA a ratas macho de 30 días de edad, induce la degeneración del epitelio germinal y se incrementa la muerte celular por apoptosis a partir de las 48 horas posteriores al tratamiento (Pérez y col., 2006).

En los animales con inyección sistémica de p-CA observamos que la movilidad y la viabilidad del espermatozoide disminuyeron, es decir, muchos de los espermatozoides posiblemente presentaban daño en la membrana y en el flagelo, este último evento se reflejó en el incremento en el número de espermatozoides sin movimiento. El daño en la membrana posiblemente puede deberse a la baja concentración de testosterona, ya que



esta es esencial para la elongación, y formación de la membrana del espermatozoide, las deficiencias en el flagelo se pueden deber a una espermatogénesis defectuosa o también al haber una concentración baja de serotonina esto propicio un mal funcionamiento del epidídimo el cual es esencial para que el espermatozoide madure y adquiera un movimiento progresivo.

EL movimiento del espermatozoide puede ser alterado por el ambiente en que se desarrolla, esta capacidad de movimiento la adquiere durante su tránsito por el epidídimo (Comhaire, 1993). Tsai y colaboradores (1996), demostraron que cuando a la rata se le administra una anfetamina por vía sistémica, la concentración de la testosterona intratesticular disminuye y la del AMP cíclico se incrementaba, mensajero que es una fuente de energía para los espermatozoides y fundamental para que desarrollen el movimiento progresivo. Con base en estos estudios podríamos suponer que en los animales que recibieron la p-CA, la testosterona intratesticular disminuyó y la concentración de AMP cíclico fue suficiente para que los espermatozoides presentaran movimiento. Sin embargo, en nuestro estudio se observó un efecto opuesto, debido a que disminuyó el número de espermatozoides con movimiento, lo que generó que se presentara daño en la formación del flagelo durante la espermiogénesis, proceso que es regulado por la testosterona.

También se ha sugerido que durante el tránsito del espermatozoide en el epidídimo, la membrana del flagelo se estabiliza. Durante éste tiempo se forman enlaces disulfuro entre las cadenas laterales de cisteína, esto es, oxidación de los grupos sulfhidrilo (SH) a enlaces disulfuro (SS), lo que confiere rigidez al flagelo (Seligman y Shalgi, 1991). Se ha observado que después de la disminución en la concentración de testosterona, resultado de la castración o la inyección de un antiandrógeno en ratas macho, se inhibe la oxidación de los grupos SH, lo que reduce la estabilidad de la membrana del flagelo del espermatozoide. Con base en las evidencias antes presentadas, se sugiere que la ligera disminución en la concentración de testosterona que se observó en los animales inyectados con p-CA por vía sistémica, modificó la función de uno de sus órganos blanco, el epidídimo, lo cual se reflejó en la disminución del número de espermatozoides móviles.

Otra posible explicación a los cambios observados en la espermatogénesis y en la estructura del testículo en los animales que se les administró la p-CA por vía sistémica, es que se modificó alguna vía de comunicación neural. En relación a esto se ha mostrado que las funciones del testículo son reguladas por factores endócrinos y por el sistema nervioso. En la rata adulta la denervación testicular inhibe la secreción de testosterona y la espermatogénesis (Zhu y col., 2002; Chow y col., 2000). Mientras que, la sección del cordón espinal disminuye la fertilidad en el hombre (Linsenmeyer y Perakash, 1991).



Es posible que la p-CA que se administró por vía sistémica, llegó al cerebro y al disminuir la actividad del sistema serotoninérgico que se origina en el NDR e inerva a diferentes núcleos del hipotálamo, como el paraventricular modificó la vía de comunicación que se ha propuesto existe entre este núcleo, el cordón espinal, el nervio espermático y los testículos (Gerendai y col., 2000; Selvage y Rivier, 2003).

Con base en los resultados obtenidos en los animales que se les administró la p-CA por vía sistémica y lo reportado en la bibliografía, es posible que los efectos de la anfetamina sobre la espermatogénesis sea el resultado de que se modificó una vía de comunicación neural entre el cerebro y el testículo, o que el fármaco actuó directamente en el testículo. Con la finalidad de comprobar la última idea se administró directamente la p-CA en la gónada.

Pocos estudios se han realizado sobre los efectos de la inyección intratesticular de fármacos en mamíferos. Sin embargo, la posibilidad de que un inhibidor del sistema serotoninérgico, la p-CA, actúe directamente en el testículo modulando sus funciones se basa en las evidencias que muestran que en el testículo existe serotonina, cuyo origen es la que se sintetiza directamente en las células de Leydig o la que se almacena en las plaquetas o los mastocitos (Tinajero y col., 1993, Campos y col., 1990).

El hecho de que en el testículo en los que se realizó la inyección de p-CA no se modificara la concentración de serotonina, permitiría pensar que la anfetamina no actúa en el testículo, sin embargo es posible que la falta de cambios en la concentración de la amina sean el resultado de que otras de las fuentes de serotonina para el testículo son las plaquetas, los mastocitos y la propia inervación que recibe el órgano (Nolth, 1994; Walther y Bader, 2003; Selvage y col., 2003; Banczerowski y col., 200; ), los que posiblemente aportaron la amina durante el tiempo de acción de la anfetamina.

Independientemente de que no se modificó la concentración de serotonina en el testículo en el que se inyectó la anfetamina, el metabolismo de la amina si disminuyó, debido que se observó una menor concentración del metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). En un estudio previo realizado por Frungieri y colaboradores (1999), muestran la presencia del 5-HIAA en el testículo del hámster y también se ha identificado en el testículo de rata a la enzima, MAO, responsable de catalizar la formación del 5-HIAA a partir de la serotonina. Con base en estas evidencias se propone que en la célula de Leydig se lleva a cabo el metabolismo de la serotonina por una vía similar a la neural. Por lo que es posible que la p-CA actúe de la misma forma que en las células serotoninérgicas, inhibiendo la activación de la MAO (Frazer, 1998).

La falta de cambios en la síntesis de serotonina observado en el testículo izquierdo o derecho en el que se inyectó la p-CA, se acompañó del ligero incremento en la



concentración de testosterona en el suero. Estos resultados no coinciden con lo reportado previamente por Tsai y col., (1996), quienes mostraron que cuando se administra la Anfetamina por vía sistémica disminuye la concentración de testosterona intratesticular. La discrepancia entre nuestros resultados y lo reportado por Tsai y col., (1996), posiblemente se asocia a que en nuestro estudio la evaluación de la concentración de testosterona se realizó en el suero y el incremento de este andrógeno sea el reflejo de que se presentó una hipertrofia funcional en el testículo contralateral al que recibió la inyección de la p-CA. En apoyo a esta idea se ha mostrado que cuando se elimina o daña uno de los testículos (órganos pares), esto resulta en el desarrollo de una hipertrofia compensadora (Paul y col., 2006). Este proceso es el resultado del incremento en el tamaño y número de células germinales, así como el tamaño de las células de Sertoli (Lunstra y col., 2003; Putra y Blackshaw 1982).

Conjuntamente con base en las evidencias antes mencionadas y nuestros resultados es posible sugerir que el testículo contralateral a la inyección, aumentó su funcionamiento y como consecuencia la producción de testosterona y por tanto tenemos ese aumento significativo en la concentración del andrógeno. La posibilidad de que en el testículo contralateral a la inyección se incrementó la secreción de testosterona se apoya en las evidencias que muestran que cuando en la rata se realiza la hemicastración, quince días después de la cirugía se presenta el desarrollo del tejido intersticial con hipertrofia de las células de Leydig y aumenta el retículo endoplásmico liso, lo que se acompaña del aumento en la producción de testosterona (Agee y col., 1988).

El ligero incremento en la concentración de testosterona en el suero de estos animales se acompañó de la disminución de la espermatogénesis (número de espermatozoides, movilidad y viabilidad). Los cambios en la espermatogénesis en los animales con inyección intratesticular de p-CA no se correlacionan con el incremento en la concentración de testosterona, ya que esta hormona se encuentra en concentraciones suficientes para mantener este proceso, ya que se ha mostrado que este andrógeno es esencial para la transformación de la espermátide en espermatozoide (Jiménez-Trejo y col., 2007; Leung y col., 1999).

Shiskina y Dygalo (2000), mostraron que en la rata, la inhibición en la síntesis de serotonina inducida por la administración de la p-CA a partir de los 30 a 40 días de edad se acompaña de la disminución en la concentración de testosterona, pero en el día 60 se presenta la recuperación del sistema y la concentración de testosterona retorna a los valores normales. Con base en esto, es posible que en nuestro estudio, en los días cercanos a la inyección de la p-CA la concentración de testosterona haya disminuido, lo que generó el daño en el epitelio seminífero del testículo en el que se inyectó la Anfetamina, efecto que se reflejó en la disminución de la espermatogénesis.





El hecho de que en el testículo que recibió la inyección de la p-CA se incrementara el porcentaje de anormalidades, básicamente en la cabeza de los espermatozoides, puede deberse a la disminución en la concentración de testosterona en los días cercanos a la inyección. En el testículo en el que se administró la anfetamina además de que disminuyó el número de espermatozoides, es posible que la elongación de la espermátide y la compactación del núcleo también se alteraran, lo que se reflejó en la disminución de espermatozoides móviles y el incremento de anormalidades en la cabeza del espermatozoide, ya que en esta etapa interviene la testosterona de forma activa. Esta idea concuerda con lo reportado por McLachlan y colaboradores (1996), quienes han mostrado que una de las principales funciones de la testosterona es la elongación de la espermátide, así como en la compactación del núcleo.

Tomando en consideración las diferencias en la respuesta del testículo izquierdo y derecho a la administración de la p-CA, se puede sugerir que existe asimetría en los mecanismos de regulación de los órganos periféricos, como el testículo, tal y como se ha sugerido que existe en el ovario o en el sistema nervioso central (Gerendai y Halász, 1997). Los resultados del presente estudio también nos permiten sugerir que el testículo izquierdo es más sensible para reaccionar a la inhibición del sistema serotoninérgico de la gónada, dado que cuando se inyecta la anfetamina en este órgano disminuyeron los diferentes parámetros de la espermatogénesis (número, movilidad y viabilidad), mientras que cuando el tratamiento se realizó en el derecho únicamente disminuyó el número de espermatozoides.

Se ha mostrado que en los mamíferos existe asimetría en el peso del testículo, en roedores por ejemplo, el testículo derecho es más grande que el izquierdo (Yu, 1998). También existen estudios que indican que existe una asimétrica funcional en estos órganos. La capacidad de secreción de testosterona es mayor en el testículo derecho que en el izquierdo (Frankel y col., 1989). La respuesta a la administración de LH es mayor la del testículo derecho que el izquierdo. Las evidencias antes mencionadas soportan la idea de que la capacidad funcional del testículo izquierdo es menor que la del derecho, lo cual posiblemente lo hace más susceptible a presentar daño, como el inducido por la p-CA en nuestro estudio, lo cual se reflejó en el mayor daño a la espermatogénesis. En apoyo a esta idea se ha mostrado que cuando se realiza la inyección intratesticular bilateral de ketanserina, antagonista de los receptores a serotonina del tipo 5-HT<sub>2</sub>; disminuye la secreción de testosterona y este efecto es más marcado en la izquierdo que en la derecha (Csaba y col., 1998).





## CONCLUSIONES

- La p-CA es un neurotóxico selectivo que inhibe al sistema serotoninérgico del hipotálamo, adrenal y testículo de la rata prepúber.
- La p-CA no afecta el sistema serotoninérgico de la hipófisis de la rata macho prepúber.
- El sistema serotoninérgico del testículo participa de manera estimulante en la regulación de la espermatogénesis en la rata prepúber.
- El sistema serotoninérgico del hipotálamo parece no participar en la regulación de la secreción de testosterona e la rata macho prepúber.
- La p-CA actúa directamente en el testículo y modifica la actividad del sistema serotoninérgico en la rata prepúber.
- El sistema serotoninérgico del testículo parece ser esencial en la modulación de la espermatogénesis en la rata prepúber.
- La inhibición de la actividad del sistema serotoninérgico induce el daño en el epitelio seminífero como resultado de la muerte celular por apoptosis.
- La administración de p-CA provoca un daño diferencial en el funcionamiento del testículo izquierdo y derecho, particularmente en la espermatogénesis.
- El testículo izquierdo es más susceptible al daño inducido por la p-CA.



## BIBLIOGRAFÍA

- Agee J., Parsa C., Huntrakoon M. (1988). *Morphologic response of rat Leydig cells to hemicastration*. **Archives of Andrology**, 20 (1): 1-9.
- Aguilar R., Anton F., Bellido C., Aguilar E., Gaytan F. (1995). *Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat*. **Journal of Endocrinology**, 46: 15-21.
- Alberts B., Bray D., (2006) *Introducción a la biología celular*. 2ª ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España. pp. 1117-1119.
- Anderson ME., Paparo AA. (1977). *Paraformaldehyde-induced fluorescence in the epididymis of Didelphis marsupialis*. **Anatomical Record**, 187: 524.
- Aragón MA., Ayala ME., Marín M., Avilés A., Matsumara PD., Dominguez R. (2005). *Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development*. **Reproduction**, 129: 717-727.
- Aston-Jones G., Card JP. (2000) *Use of pseudorabies virus to delineate multisynaptic circuits in brain: Opportunities and limitations*. **Journal of Neuroscience Research**, 103: 51-61.
- Audesirk T., Cabell L., Kern M., Audesirk G., (2003). *Beta-estradiol influences defferentiation of hippocampal neurons in vitro through an estrogen receptor-mediated process*. **Neuroscience**, 121(4): 927-934.
- Barrios DR. (2002). *Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem*. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. pp. 1-13.
- Bartlett PC., Kirk J., Coe P., Marteniuk JP., Nather EG. (1987). *Descriptive epidemiology of anestrus in Michigan holstein friesland cattle*. **Theriogenology**, 27: 459-476.
- Banczerowski P., Csaba Z., Csermus V, Gerendai I. (2000). *The effect of callostomy on the testicular steroidogenesis in hemiorchidectomized rats: A pituitary independent regulatory mechanism*. **Brain Research Bulletin**, 53:227-232.



- Beardsley A., O'Donnell L. (2003) *Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats*. **Biology of Reproduction**, 68: 1299-1307.
- Berger UV., Grzanna R., Molliver ME., (1992). *The Neurotoxic Effects of p-chloroamphetamine in rat brain are blocked by prior depletion of serotonin*. **Brain Research**, 578: 177-185.
- Boyer A., Hermo L., Paquet M., Robaire B., Boerboom D. (2008). *Seminiferous tubule degeneration and infertility in mice with sustained activation of WNT/CTNNB1 signaling in sertoli cells*. **Biology of Reproduction**, 79(3): 475-85.
- Cameron DF., Muffly KE. (1991). *Hormonal regulation of spermatid binding*. **Journal of Cell Science**, 100(3): 623–633.
- Campos MB., Vitale ML., Calandra RS., Chiochio SR. (1990). *Serotonergic innervation of the rat testis*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88: 475-479.
- Chandolia RK., Weinbauer GF., Fingscheidt U., Bartlett JM., Nieschlag E. (1991). *Effects of fluotamide on testicular involution induced by and antagonist of gonadotrophin-releasing hormone and on stimulation of spermatogenesis by follicle-stimulating hormone in rats*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 92(2): 313-323.
- Cheng CY., Mruk DD. (2002) *Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development*. **Physiological Reviews**, 82: 825-874.
- Chenoweth P. (1997). *Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull*. En: Youngquist: *Current therapy in large animal theriogenology*. Saunders, 1er. Edición. pp. 127.
- Chow SH., Giglio W., Anesetti R., Ottenweller JE., Pogach LM., Huang HF. (2000). *The effects of testicular denervation on spermatogenesis in the Sprague-Dawley rat*. **Neuroendocrinology**, 72(1): 37-45.
- Clarke JI., Pompolo S. (2005). *Syntesis and secretion of GnRH*. **Animal Reproduction Science**, 88: 29-55.



- Collin O., Damber JE., Berg A. (1996). *5-Hidroxytryptamine a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 106: 17-22.
- Comhaire F., Schoonjans F., Vermeulen L., De Clercq N. (1994) *Methodological aspects of sperm morphology evaluation: comparison between strict and liberal criteria*. *Fertility and Sterility*. **Toxicology Research**, 62: 857-861
- Commins DL., Axt KJ., Vosmer G., Seiden LS. (1987). *Endogenously para-chloroamphetamine*. **Brain Research**, 419: 253-261.
- Contesse V., Lefebvre H., Lenglet S., Kuhn JM., Delarue C., Vaudry H. (2000). *Role of 5-HT in the regulation of the brain-pituitary-adrenal axis: effects of 5-HT on adrenocortical cells*. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 78(12):967-83.
- Cooper T. (1999). Epididymis. En: E. Knobil y DJ Neilled. *Encyclopedia of reproduction*. Volumen 2. Academic Press. San Diego, California, EUA. pp.1-12.
- Cordova A. (2003). *Fisiología Dinámica*. Editorial Masson. Barcelona. pp. 175-178.
- Csaba Zs., Csernus V., Gerendai I. (1998). *Intratesticular serotonin effects in steroidogenesis in rat testis*. **Journal of Neuroendocrinology**, 10: 371-376
- Dinan TG. (1994). *Glucocorticoids and the genesis of depressive illness: a psychobiological model*. **Journal of Psychiatry**, 164: 365-371.
- Eddy EM., DA O'Brien. (1994). *The spermatozoa*. En Knobil E. y J.D Neil (Eds). **The Physiology of the Reproduction**. Raven press. New York, EUA. pp. 29-77.
- Eddy EM. (2006). *Male germ cell gen expresión*. **Recent Progress in Hormone Research**, 57: 103-128.
- Ellis LG., Jaussi AW., Baptista MH., Unry RL (1972). *Correlation of age changes in monoamine oxidase activity and androgen synthesis by rat testicular and teased preparation in vitro*. **Endocrinology**, 1610-1618.
- Fawcett DW. (1990). *Tratado de Histología*. Edición 11. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México D. F. pp. 802-854.



- Frazer A., Hensler JG. (1999). *Serotonin*. En: Basic Neurochemistry molecular, cellular and medical aspect. GJ. Siegel, BW. Agronoff, RW. Alvers, PB. Molinogf (Eds.). Raven Press. New York. pp.283-306.
- Fuller RW., Snoddy HH. (1974). *Long-term effects of 4-chloamphetamine on brain 5-hidroxyindole metabolism in rats*. **Neuropharmacology**, 13: 85-90.
- Fungieri MB., Gonzalez-Calvar SI., Rubio M., Ozu M., Lustig L., Calandra SR., (1999). *Serotonin in golden hamster testes: Testicular levels, inmunolocalization and role during sexual developement and photoperiodic regresion-recrudescence transition*. **Neuroendocrinology**, 69: 199-308.
- Garner DL, Johnson LA. (1995). *Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide*. **Biology of Reproduction**, 53(2): 276-84.
- Gartner LP., Hiatt JL. (2008). Atlas de histología. Edición 2. Mc Graw Hill. México. pp. 306-323.
- Geneser F. (2000). *Histología*. Edición 3. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp.638-663.
- Gerendai I., Csaba Z., Vokó Z., Csemus V. (1995). *Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions*. **Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology**, 53: 299-305.
- Gerandai I., Halász B. (1997). *Neuroendocrine asymmetry*. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 18: 354-381.
- Gerendai I., Toth IE., Boldogkoi Z., Medveczky I., Halasz B. (2000). *Central nervous system structures labeled from the testis using the transsynaptic viral tracing technique*. **Journal of Endocrinology**, 12: 1087-1095.
- Gondos B., Kogan SJ. (1990). *Testicular Developement during Puberty. En: Control of the Onset of Puberty*. M.M Grumbach, PC. Siconenko, ML. Albert Williams (Eds). USA. pp. 180-212.
- Griswold MD. (1998). *The central role of the Sertoli cells in the spermatogenesis*. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 9: 411-416.



- Ham AW., Cormack DH., (1985) *Tratado de Histología*. Edición 8. Editorial Interamericana. México, D. F. pp. 985-990.
- Heckert LL., Griswold MD., (2002). *The expression of the FSH receptor in Spermatogenesis*. **Progress in Hormone Research**, 57: 129-148.
- Hedrich D., Dolan K., Zurhold H., Van Beek I., Kimber J. (2004). *Drug consumption facilities: and update science 2000*. **Drug and Alcohol Review**, 22: 227-233.
- Hinshelwood MM. (1999). *Steroidogenesis Overview*. En: Encyclopedia of reproduction. (Eds) E. Knobil, J. Neill. Vol 4. Academic Press, New York, pp: 644-653.
- Holdcraft RW., Braun RE. (2004). *Hormonal regulation of the spermatogenesis*. **Journal of Andrology**, 27(6):335-342.
- Hoyer D., Hannon JP., Martin GR. (2002). *Molecular, pharmacological functional diversity of 5-HT receptors*. *Pharmacology*. **Biochemistry and Behavior**, 71: 533-554.
- Iceta ER. (2008) *Caracterización del transportador de serotonina humano en células CACO-2*. Depto. de Farmacología y Fisiología. Facultad de Veterinaria Unidad de Fisiología, Universidad de Zaragoza. (TESIS DE DOCTORADO).
- Jessel TM. (2000). Principios de neurociencia. Edit. Mc Graw Hill Interamericana, México. pp. 239-253.
- Jiménez-Trejo F., Tapia-Rodríguez M., Queiroz DB., Padilla P., Avellar MC., Manzano PR., Manjares-Gutierrez G., Gutierrez-Ospina G. (2007). *Serotonin concentration, synthesis, cell origin, and targets in the rat caput epididymus during sexual maturation and variations associated with adult mating status: Morphological and biochemical studies*. **Journal of Andrology**, 28 (1): 136-149.
- Jones ER. (1997). Human reproductive biology. 2ª edición. Academic Press, Inc. USA, pp. 95-101.
- Johnson M., Everitt B. (1980). Essential reproduction. Edición 1. Blackwell Scientific Publications. pp. 33.
- Kalla NR. (1979). *Demonstration of direct effect of serotonin on rat Leydig cells*. **Andrología**, 4: 459-462.



- Kiess W., Gallagher B. (1998). *Hormonal control of programmed cell death/apoptosis*. **European Journal of Endocrinology**, 138(5): 482-491.
- Kormano M., Penttila A. (1968). *Distribution of endogenous and administered 5-hydroxytryptamine in the rat testis and epididymis*. **Annales Medicinae Experimentals et Biologiae Fenniae**, 46: 468-473.
- Krester DM., Kerr JB. (1994). *The Cytology of the Testis*. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill, (Eds). Raven Press. New York, USA. pp. 1621-1682.
- Lee S., Miselis R., River C. (2002). *Anatomical and fuctional evidence for a neural hypothalamic-testicular pathway that this independent of the pituitary*. **Endocrinology**, 143: 4447-4454.
- Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Hamel C, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H, Kuhn JM.(1996). *Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal gland*. **Endocrinology Research**, 22(4): 851-863.
- Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, Kuhn JM (1998). *Serotonergic regulation of adrenocortical function*. **Hormonal Metabolism Research**. 30: 398-403.
- Leung PS, Wong TP, Sernia C. (1999). *Angiotensinogen expression by rat epididymis: evidence for an intrinsic, angiotensin-generating system*. **Molecular Cell Endocrinology**, 155: 115-22.
- Levy MN., Koeppen BM., Stanton BA. (2006). *Fisiología*. Edición 5. Edit. El Sevier Mosby. Madrid, España. pp. 387-415.
- Leyva Y, Gallegos E, Pérez J, Velázquez DE, Ayala ME, Domínguez R. *Efecto del bloqueo del sistema serotoninérgico en la secreción de hormona luteinizante y testosterona en la rata macho prepúber*. C-147. L Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Puebla Puebla, México. 9 al 13 de septiembre del 2007.
- Linsenmeyer TA., Perakash I. (1991). *Infertility in men with spinal cord injury*. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, 72: 747-754.



- Lunstra DD., Wise TH., Ford JJ. (2003). *Sertoli cells in the boars testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages*. **Biology of Reproduction**, 68: 140-150.
- Maekawa M., Toyama Y., Yuasa S. (2003). *Ectoplasmic specializations in the Sertoli cell: new vistas based on genetic defects and testicular toxicology*. **Anatomical Science International**, 78: 1-16.
- Mamounas LA., Molliver ME. (1987). *Dual serotonergic projection to forebrain have separate origins in the dorsal and median raphe nuclei: Retrograde transport after selective axonal ablation by p-chloroamphetamine (PCA)*. **Society for Neuroscience**, Abstract. 13:907.
- Mamounas LA., Molliver ME. (1988). *Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: Axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to the neurotoxin p-Chloroamphetamine (p-CA)*. **Experimental Neurology**, 102: 23-36.
- Mamounas LA., Mullen CA., O'Hearn E., Molliver ME. (1991) *Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: Morphological distinct 5-HT axon terminal exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives*. **Journal of Comparative Neurology**, 314(3): 558-86.
- McLachlan RI., Wreford NG., O'Donnell L., De Krester DM., Robertson DM. (1996). *The endocrine regulation of the spermatogenesis: independent roles of the testosterone and FSH*. **Journal of the Endocrinology**, 148: 1-9.
- Mendoza C., Iceta R., Mathews N. (2008). *Melatonin inhibits serotonin transporter activity in intestinal epithelial cells*. **Journal of Pineal Research**, 48: 332-339.
- Mestrich LM. (1993). *Nuclear Morphogenesis during Spermiogenesis*. En: *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. D. Krester (Ed). Academic Press, INC. USA. pp. 67-97.
- Nakamura K., Hasegawa H. (2007). *Developmental role of tryptophan hydroxylase in the nervous system*. **Molecular Neurobiology**, 35 (1): 45-54.
- Nolth, J. (1994). *El Cerebro Humano, introducción a la anatomía funcional*. Edición 3. Editorial Mosby/Doyma. pp. 418-420.





- Nordahl TE, Salo R, Leamon M (2003): *Neuropsychological effects of chronic methamphetamine use on neurotransmitters and cognition: a review*. **Journal of Neuropsychiatry**, 15: 317–325.
- Norman WA., Litwack G. (1997). *Hormonas*. Edición 2. Academic Press, New York. pp. 341-360.
- Paul MJ., Park JH., Horton TH., Alvarez MI., Burke MK., Place NJ., Zucker I. (2006). *Photoperiodic regulation of compensatory Testicular hypertrophy in hamsters*. **Biology of Reproduction**, 75: 261-269.
- Paulsen DF. (1991). *Histología básica*. Manual moderno. México. D.F. pp. 446- 455.
- Paxinos G., Watson C. (1982). *The Rat Brain in the Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Australia. pp.39-46.
- Pérez-cañedo J, Monroy-Moreno J, Chavira-Ramírez R, Aragón-Martínez A, Ayala-Escobar ME, Domínguez-Casalá R. *Papel de la serotonina (5-HT) en el proceso de esteroidogénesis de la rata macho prepúber*. C279. XLIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Querétaro Qro. México, del 4 al 8 de septiembre del 2006.
- Pieścikowska I., Klein P., Lukaszuk A., Górska-Rafińska L., Balcerek M., Ludwiczak H. (1999). *Katanserin, an antagonist of 5-HT<sub>2A</sub> receptor of serotonin, inhibits testosterone secretion by rat Leydig cells in vitro*. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, 37(3): 223-224.
- Putra DK., Blackshaw AW. (1982). *Morphometric studies of compensatory testicular hypertrophy in the rat after hemicastration*. **Australian Journal of Biological Science**, 35; 287-293.
- Ramírez CR., Carracedo AL., Moreno AC., Guerra PF. (1999). *Apoptosis y enfermedad*. **Alergología e Inmunología Clínica**, 14(6): 367-374.
- Reyes FE., Martínez ZR., Luna MM., Chavarría ME. (1991). *La bioquímica de la Función testicular del Túbulo Seminífero*. En: Tópicos selectos de Biología de la Reproducción. R. Domínguez (Ed.). UNAM-Porrúa. México, D.F. pp. 193-230.
- Robaire B. y L. Hermo. (1992). *Regulation of epididymal epithelial cell functions*. **Biology of Reproduction**, 52: 226-236.



- Rodríguez I, K Araki, K Khatib, JC Martinou, P Vassalli. (1997). *Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2*. **Developmental Biology**, 184 (1):115-21.
- Ross HM., Kaye IG., Pawlina W. (2006). *Histología, Testo y Atlas a color con Biología Celular y Molecular*. Ed. Médica Panamericana. Edición 4. Buenos Aires, Argentina. pp. 854-871.
- Ruiz A. (1988). *The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination*. **Fertility and Sterility**, 68:171-183.
- Russell LD. Sinha Hikim AP., Ettlin RA., Clegg ED. (1994) *Histological and histopathological evaluation of the testes*. Ed. Cache River Press. USA. pp: 63-120.
- Saez J. (1994). *Leydig cells: Endocrine, paracrine and autocrine regulation*. **Endocrinology Reviews**, 15:574-626.
- Saavedra JM., Palkovits M., Kiser JS., Brownstein M., Zivin JA. (1975) *Distributions of biogenic amines and related enzymes in the rat pituitary gland*. **Journal of Neurochemistry**, 25:257.
- Saland LC. (2001). *The mammalian pituitary intermediate lobe: an update on innervation and regulation*. **Brain Research Bulletin**, 54, 587-593.
- Sanders-Bush E., Bushing J., Sulser F. (1972). *Long-Term Effects of p-Chloroamphetamine on Tryptophan Hydroxylase Activity and on the Levels of 5-Hydroxytryptamine and 5-Hydroxyindolacetic Acid in Brain*. **European Journal of Pharmacology**, 20: 385-388.
- Sanders-Bush E., Bushing J., Sulser F. (1975). *Long-Term effects of p-Chloroamphetamine and related drugs on central serotonergic mechanisms*. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 192(1): 33-41.
- Seligman J., Shalgi R. (1991). *Protein thiols in the spermatozoa and epididymal fluid on rats*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 93(2): 399-408.



- Seligman J., Shalgi R., Oschry Y., Kosower NS. (1991). *Sperm analysis by flow cytometry using the fluorescent thiol labeling agent monobromobimane*. **Molecular Reproduction and Development**, 29(3): 276-281
- Selvage DJ., River C. (2003) *Importance of the paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway between the brain and the testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary*. **Endocrinology**, 144(2):594-598.
- Selvage D., Lee SY., Parsons LH., Seo DD., River C. (2003). *A hypothalamic-testicular neural pathway is influenced by brain catecholamines, but not testicular blood flow*. **Endocrinology**, 18:1210-1241.
- Setchell BP. (1978) *The mammalian testes*. Cornell University Press. New York, pp: 439-450.
- Sharpe MR. (1994). *Regulation of spermatogenesis*. En *The physiology of reproduction*. (Eds) E. Knobil, J. Neill. Raven Press, New York pp: 1363-1434.
- Shishkina GT., Dygalo NN. (2000). *Role of the Serotonergic System in the Acceleration of Sexual Maturation in Wild Norway Rats Selected for Reduced Aggressiveness Toward Humans*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 125: 45-51.
- Silva PF, Gadella BM. (2006). *Detection of damage in mammalian sperm cells*. **Theriogenology**, 65(5):958-78.
- Sinha-Hikim AP, Swerdloff RS. (1999). *Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis*. **Reviews of Reproduction**, 4(1):38-47.
- Sprague JE., Michael PJ., Christopher JS., Nichols DE. (1996). *Studies on the mechanism of p-chloroamphetamine neurotoxicity*. **Biochemical Pharmacology**, 52:1271-1277.
- Steranka LR., Sanders-Bush E. (1978). *Long-term reduction of brain serotonin by p-chloroamphetamine: Effects of inducers and inhibitors of drug metabolism*. **Journal of Pharmacology**, 206:406-467.
- Thoreux-Manlay A., Le Guascogne C., Segretain D., Jegou B., Pinon Cataillade G. (1995). *Lead affects steroidogenesis in rat Leydig cells in vivo and in vitro*. **Toxicology**, 103 (1): 53-62.



- Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca RD., Dufau LM. (1993). *Serotonin secretion from rat Leydig cells*. **Endocrinology**, 6:3026-3029.
- Tresguerres JF. (1999). *Fisiología Humana*. Ed. Mc Graw-Hill. Madrid, España. pp. 1033-1047.
- Tsai SC., Chiao YC., Lu CC., Doong ML., Chen YH., Shih HC., Liaw SW., Wang PS. (1996). *Inhibition by amphetamine of testosterone secretion through a mechanism involving an increase of cyclic AMP production in rat testis*. **British Journal of Pharmacology**, 118: 984-988.
- Tsai SC., Chen JJ., Chiao YC., Lu CC., Lin H., Yeh JY., Lo MJ., Kau MM., Wang SW., Wang PS. (1997) *The role of cyclic AMP production, calcium channel activations and enzyme activities in the inhibition of testosterone secretion by amphetamine*. **British Journal of Pharmacology**, 122: 949-955.
- Urtilla P. (2000). *Pharmacological Aspect of Amphetamines*. **ARS Pharmaceutica**, 41: 67-77.
- Vanhatalo S., Sionilla S., Kaartien K., Back N. (1995). *Colocalization of dopamine and serotonin in the rat pituitary gland in the nuclei innervating*. **Brain Research**, 669: 275-284.
- Velasco SC., Pérez MI., González BI. (2008). *A prefrontal serotonergic denervation induces increase in the destiny of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in adult rat prefrontal cortex*. **Neurochemistry Research**, 33:2350-2357.
- Vinson GP., Bell BG., Withehouse BJ. (2002). *Production of testosterone and corticosteroids by the rat adrenal gland incubated in vitro and the effects of stimulation with ACTH, LH and FSH*. **Journal of Steroid Biochemistry**, 7: 407-411.
- Wagner SM., Wajner MS., Maia AL. (2008). *The role of thyroid hormone in testicular development and function*. **Journal of Endocrinology**, 199: 351-365.
- Walczak-Jedrzejowska R, Slowikowska-Hilczek J, Marchlewsk K, Oszukowska E, Kula K. (2007). *During seminiferous tubule maturation testosterone and synergistic action of FSH with estradiol support germ cell survival while estradiol alone has pro-apoptotic effect*. **Histochemistry Cytobiology**, 45 Suppl 1: 59-64.



- Walther DJ., Bader M. (1999). *Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells*. **Brain Research Moleculars**, 68: 55-63.
- Walther DJ., Bader M. (2003). *A unique central tryptophan hydroxylase isoform*. **Biochemical Pharmacology**, 66: 1673-1680.
- Webb PR., Scheel-Toellner D., Wang K., Enriquez NV., Pilling D., Salmon M., Lord JM. (2001). *Cytokine-mediated inhibition of apoptosis in non-transformed T cells and neutrophils can be dissociated from protein kinase B activation*. **European Journal of Immunology**, 32: 486-493.
- Weinbauer FG., Nieschlag E. (1993). *Hormonal control of spermatogenesis*. En: *Molecular biology of the male reproductive system*. (Ed) De Krester D. Academic Press, Inc. USA. pp: 99-142.
- Westlund KN., Childs GV. (1982). *Localization of serotonin fibers in the rat adenohypophysis*. **Endocrinology**, 111: 1761-1763.
- Woolveridge I., de Boer-Brouwer M., Taylor FM., Teerds KJ., Wu F., Morris DI. (1999). *Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: Changes in apoptosis-related genes*. **Biology of Reproduction**, 60:461-470.
- Yan HH., Mruk DD., Cheng SY. (2008). *Junction restructuring and spermatogenesis: The biology, Regulation, and implication in male contraceptive development*. **Current Topics in Development Biology**, 80: 57-92.
- Yu ZH. (1998). *Asymmetrical testicular weights in mammals, birds, reptiles and amphibia*. **International Journal of Andrology**, 21(1): 53-55.
- Zhu BC., Palmada MN., Aguado LI., Cavicchia JC. (2002). *Administration of acetylcholine to the spermatogenic nerve plexus inhibits testosterone secretion in an in vitro isolated rat testis nerve plexus system*. **International Journal of Andrology**, 25: 134-138.