



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA
P-CLOROANFETAMINA (pCA) EN LA ESTRUCTURA
DEL TESTÍCULO (CICLO DEL EPITELIO
SEMINÍFERO) EN LA RATA MACHO PREPÚBER.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

Karina Concepción Picazo Aguilar

Directora de Tesis: *Dra. María Elena Ayala Escobar.*



México D. f.

Noviembre del 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

***Efecto de la administración de la p-cloroanfetamina (pCA)
en la estructura del testículo (ciclo del epitelio
Seminífero) en la rata macho prepúber***

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta:

Karina Concepción Picazo Aguilar

Directora de Tesis:

Dra. María Elena Ayala Escobar

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

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

AGRADECIMIENTOS:

Muy especialmente a la Dra. María Elena Ayala Escobar, las palabras son insuficientes para expresarle mis agradecimientos por sus enseñanzas, paciencia, apoyo, comprensión, conocimientos, dedicación y pasión a su trabajo, las cuales hicieron posible la culminación de esta tesis.

A los miembros del jurado:

M.C. Raúl Zavala Chavero.

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. María Esther Cruz Beltran

Dra. Juana Monroy Moreno

Biól. Carlos Martínez Montoya

Por sus valiosa aportaciones al contribuir en la revisión y elaboración de esta Tesis.

A la Dra. Juana Monroy Moreno (Juanita), por sus enseñanzas, paciencia y por el tiempo que me brindo al resolver mis dudas, siempre con comprensión y gentileza.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda en esos días de trabajo pesado Gabriela, Marisol, Erik y a aquellos que me enseñaron Diana, Daniel, Eloir, especialmente a Jessica, por su paciencia y por regalarme valiosas fracciones de su tiempo al compartir con migo sus conocimientos.

Al personal del Bioterio de la FES-Zaragoza por su contribución en el cuidado de los animales.

A la UNAM por la educación y formación que recibí de ella para convertirme en un mejor profesionista, dándome recuerdos y conocimientos gratos.

Dedicatorias:

A mi papá y mamá

Pablo Octavio y María de la luz, por sus enormes esfuerzos, desvelos y sacrificios, para convertirnos a mis hermanos y a mí en mejores personas, cada logro, meta que realice y lleve a cabo en mi vida será un triunfo suyo, me han dado las mejores herencias del mundo su amor, cariño, valores y educación, esos enormes esfuerzos dan frutos y darán mayores gratificaciones para ustedes ya que si no fuera por sus esfuerzos y enseñanzas no estaría donde ahora estoy, me han enseñado a luchar por mis ideales y metas a nunca rendirme, a soñar con un sinfín de posibilidades que pueden ser alcanzadas, a nunca decir no se puede, o es imposible, a luchar por mis sueños aunque estos sean utopías para otros, a que en la vida lo que no te mata solo te hace más fuerte y a que puedo ser y hacer cualquier cosa que imagine. ***“Gracias”***.

A mis hermanos y hermanas

Javier, Luis, Claudia y Rocío, ya que son una parte importantísima en mi vida, su apoyo incondicional, enseñanzas, me han dado momentos gratos para recordar, me han alentado en las buenas y en las malas, ayudándome a no perder la esperanza y a esperar un mejor mañana ya que siempre están para tenderme una mano en los momentos difíciles, para alentarme aunque las cosas parezcan imposibles, regalándome una enorme sonrisa o haciéndome reír, gracias por compartir conmigo su forma de ser y de pensar, ya que de ustedes he aprendido mucho aunque no lo crean, les agradezco por todo ese apoyo y fortaleza que incluso la más pequeña de ustedes tiene y que los hará llegar tan lejos como se lo propongan. ***“Gracias”***.

A mis abuelos

María Concepción, Rafaela, Federico por las enormes esperanzas que tienen en nosotros, por su fe en que podremos alcanzar todos los objetivos que nos propongamos para lograr ser mejores cada día y tener una mayor capacidad de comprensión ante las situaciones que nos vienen en el futuro, al enseñarnos a avanzar sin tener que retroceder en el tiempo y dejar de mirar atrás dejando los errores, para así marcar un nuevo comienzo. ***“Gracias”***.

A mis tías y tíos

Guillermina (me enseñaste que siempre hay algo bello ó interesante en la vida por descubrir y explorar), Miguel Ángel (a observar el lado positivo de las cosas aunque parezca que lo tienen muy oculto), Lourdes (por enseñarme que un ser humano sin fe ó esperanza no es nada), Alfonso (por enseñarme que no importa los años siempre podemos enmendar nuestros errores), Adela (me enseñaste que si uno se propone metas en la vida todo es factible), Hilario (que el orgullo es un arma de doble filo, que no siempre es eficaz), Adriana (por enseñarme que a pesar de todas las adversidades que nos pone la vida siempre hay que ser fuerte y mantener la cabeza en alto), Basilisa (que la voluntad hace milagros a pesar del tamaño de las broncas) , Amada (que todo se puede solucionar con enorme paciencia), José (poner una sonrisa siempre), Alejandra (a ser ingenuo como un niño para ver ambos lados de las cosas), ***por toda su ayuda “GRACIAS”.***

A mis primos

Alfonso, Pablo, Mónica, Leonardo, Cecilia, Mickey, Ivonne, Gama, Jacqueline, Gaby, Wendolin, Andrea, Chuy, Lizi, Ramón, Diana, Jade, Anita, Narciso, Natalia, Javier y todos los demás si es que omití a alguien, gracias por sus enseñanzas, por el tiempo que han compartido conmigo, por los gratos recuerdos compartidos, recuerden que siempre hay algo nuevo en la vida que aprender y que no somos dioses ni sabios, que los errores cometidos pueden ser enmendados, ¡claro siempre y cuando tengamos la voluntad y coraje para enmendarlos!, que siempre hay que mirar atrás para no cometer los mismos errores dos veces “aunque hay algunos que no entendemos a menos que nos estampemos con ellos muchas veces”. ***Gracias.***

A mis amigos y compañeros

Jennyfer, Betzai, Anita, Diana, Janeth, Rocío, Humberto, José, Luz, Ericka, Jorge, Ana, Hugo, por alentarme y compartir con migo gratos recuerdos de choco aventuras que en un futuro serán anécdotas de viejitos, por enseñarme a ver un mundo de aventuras, por compartir con migo esos momentos de alegría, tristeza, Reflexión, por permitirme haberlos conocido y compartir con ustedes esos momentos que serán recuerdos gratos para mí. ***“Gracias”.***

ÍNDICE

	Págs.
Resumen.....	1
Introducción.....	3
Serotonina y Anfetamina.....	3
Aparato Reproductor del Macho.....	8
Función Testicular.....	11
Esteroidogénesis.....	12
Ciclo del epitelio seminífero.....	15
Apoptosis.....	20
Pubertad en la Rata.....	23
Serotonina y Funciones del testículo.....	25
Justificación.....	28
Hipótesis.....	29
Objetivo General.....	30
Objetivos Particulares.....	30
Materiales y Métodos.....	31
Grupos Experimentales.....	31
Sacrificio de Animales.....	31
Fijado e Inclusión de Testículos.....	31
Estudio Morfométrico del Testículo y Análisis del Ciclo del Epitelio Seminífero.....	32
Cuantificación de Gonadotropinas.....	32

Cuantificación de Hormonas Esteroides.....	32
Cuantificación de Serotonina y Acido 5-Hidroxiindolacético.....	33
Túnel.....	33
Análisis Estadístico los Resultados.....	34
Resultados.....	35
Serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético.....	35
Gonadotropinas y Hormonas Esteroides.....	35
Ciclo del Epitelio Seminífero.....	40
Análisis Histológico.....	50
Apoptosis.....	51
Discusión.....	59
Conclusiones.....	64
Bibliografía.....	65

RESUMEN

El sistema serotoninérgico desempeña una función esencial en el mantenimiento de la estructura del testículo, al secretar hormonas hipofisarias e hipotalámicas, como la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), modulando el funcionamiento del eje hipófisis-gónada, debido a que al ser transportado desde el hipotálamo a la adenohipófisis, estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas [hormona folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH)], esenciales para el funcionamiento del testículo y como consecuencia la actividad reproductiva del macho.

Con base en lo antes mencionado en el presente estudio se decidió analizar los efectos de la administración por vía intraperitoneal de 10mg/kg de la p-Cloroanfetamina (pCA), en la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético en el hipotálamo; en la concentración de progesterona, testosterona, estradiol y gonadotropinas; así como en la apoptosis, estructura del testículo y el desarrollo del ciclo del epitelio seminífero de la rata macho prepúber de 30 días de edad y sacrificadas a las 48, 96 ó 144 hrs.

Las concentraciones hipotalámicas de serotonina y del metabolito el 5-HIAA, disminuyeron significativamente en los animales tratados con pCA, en el hipotálamo anterior: [5-HT (48 hrs: 0.76 ± 0.2 , 1.32 ± 0.1 ; 96hrs: 0.48 ± 0.1 , 0.93 ± 0.04 ; 144hrs: 0.29 ± 0.1 , 0.83 ± 0.2 ng/mg, $p < 0.05$), 5-HIAA (48 hrs: 0.70 ± 0.2 , 1.18 ± 1.1 ; 96 hrs: 0.33 ± 0.08 , 0.59 ± 0.08 ; 144 hrs: 0.15 ± 0.04 , 0.46 ± 0.4 ng/mg, $p < 0.05$)]. Este mismo comportamiento se observó en el hipotálamo medio [5-HT (48hrs: 0.90 ± 0.3 , 1.45 ± 0.2 ; 96hrs: 0.38 ± 0.1 , 0.85 ± 0.1 ; 144hrs: 0.29 ± 0.1 , 0.83 ± 0.2 ng/mg, $P < 0.05$), 5-HIAA (0.79 ± 0.2 , 1.38 ± 0.3 ; 96hrs: 0.22 ± 0.09 , 0.45 ± 0.1 ; 144hrs: 0.33 ± 0.1 , 0.88 ± 0.2 , ng/mg, $p < 0.05$)].

No se observaron cambios en la concentración de FSH, en ninguno de los grupos estudiados, mientras que la concentración de LH se incrementó a las 48 y 96 hrs en los animales tratados con Vh, en los animales tratados con pCA la

concentración de esta hormona disminuyó a las 96 y 144 hrs. y la de testosterona disminuyó significativamente a las 48, 96 ó 144 hrs [48hrs: 0.05 ± 0.01 ; 96hrs: 0.03 ± 0.008 ; 144hrs: 0.25 ± 0.05 ng/ml, $p < 0.05$], en comparación con el grupo TA. La concentración de estradiol disminuyó únicamente en los animales sacrificados a las 96 y 144 hrs.

La disminución en la concentración de testosterona se acompañó de la interrupción del ciclo del epitelio seminífero y del aumento de células apoptóticas, en los animales sacrificados a los distintos tiempos postratamiento, lo que se tradujo en modificación de la distribución de los estadios del ciclo y por consiguiente la estructura y composición del testículo.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio es posible sugerir que la pCA inhibe la síntesis de serotonina, lo que se acompaña de la disminución en la secreción de LH y testosterona necesarias para el desarrollo normal de la espermatogénesis en la rata prepúber.

INTRODUCCIÓN

Serotonina y Anfetamina

La serotonina ó 5-hidroxitriptamina (5-HT), es un neurotransmisor que se sintetiza a partir del aminoácido triptófano. La enzima triptófano hidroxilasa introduce un OH al triptófano y forma el 5-hidroxitriptófano, el cual bajo la acción de la descarboxilasa se transforma en serotonina, que es liberada y actúa en sus células blanco al unirse a su receptor de membrana. Por estudios farmacológicos y de inmunohistoquímica se han identificado 7 receptores diferentes para esta amina, que se nombran con las siglas de la amina seguida de un número (5HT-1, 5HT-2, 5HT-3, 5HT-4, 5HT-5, 5HT-6 y 5HT-7). La serotonina que no se une a su receptor es recapturada por la neurona presináptica y bajo la acción de la enzima monoamino oxidasa se degrada y forma el ácido 5-hidroxiindolacético (***Igual, 1993; Frazer y Hensler, 1999***).

En el sistema nervioso central, la serotonina se sintetiza por un grupo de neuronas que constituyen el núcleo del rafé, que se localiza en el tronco cerebral, a partir de este núcleo se originan proyecciones que inervan diferentes áreas del encéfalo y las astas posteriores de la medula espinal. También es producida en tejidos periféricos, como las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y en algunos órganos del tracto reproductor tanto del macho (testículo y epidídimo) como de la hembra (ovarios) (***Gottfries, 1990; Igual, 1993***).

La serotonina ejerce funciones como mediador inflamatorio, en la vasoconstricción y dilatación vascular. También participa en la regulación de diferentes funciones fisiológicas, como micción, ritmo cardiaco, secreción y peristaltismo intestinal, balance energético, secreción pancreática, actividad nerviosa simpática, presión arterial y agregación plaquetaria. En el sistema nervioso central actúa como neurotransmisor e interviene en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos como el sueño-vigilia, el humor, la memoria, la agresión, el

apetito, el comportamiento sexual y la secreción de hormonas hipofisiarias e hipotalámicas, como la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (**Waeber y col., 1990; Aragón y col., 2005; Berger y col., 2009**). Este factor es un decapeptido que modula el funcionamiento del eje hipófisis-gónada, debido a que al ser transportado desde el hipotálamo a la adenohipófisis, estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas [hormona folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH)], esenciales en el funcionamiento del testículo y como consecuencia la actividad reproductiva del macho (**Casabiell, 2006; Feldman y Lee, 1985; Fink, 2000**).

Algunas plantas y hongos sintetizan sustancias alucinógenas, mientras que otras son producto de la síntesis química, entre estas se encuentran las anfetaminas. En diferentes culturas, estas sustancias fueron y son parte importante en los rituales y ceremonias religiosas. Los pueblos indígenas descubrieron sustancias de origen natural que al ser consumidas por los individuos tenían la propiedad de alterar su sentido del tiempo, la percepción sensorial y la organización racional del pensamiento. Algunas de estas sustancias se siguen consumiendo, sin embargo, en la mayoría de los casos ha cambiado totalmente la finalidad de su consumo (**Camí y Farre, 1996**).

Las anfetaminas se mantienen en una dualidad constante, debido a que se les considera fármacos y drogas. En la actualidad el consumo de dichas sustancias se ha incrementado y ha propiciado que se comercialicen en diferentes ámbitos. Los derivados de las anfetaminas comparten una estructura original, la *dextro-anfetamina*. Se sintetizaron por primera vez en 1887 por L. Edelano, en 1927 Alles G., se encargó de producirlas con fines comerciales e introducirlas en el mercado europeo. En 1932, una sustancia de este grupo, la efedrina, se utilizó como una alternativa para el tratamiento del asma, entre otros padecimientos y fue hasta 1933 que se describieron los efectos psicoestimulantes de las anfetaminas (**Utrilla, 2000; Camí y Farre, 1996**).

En 1936 las anfetaminas se prescribían clínicamente para mantener despiertos a pacientes, posteriormente se recomendaron contra el catarro, congestiones nasales, mareo y contra la depresión. En 1970 se planteó que el efecto estimulante de la dexedrina ayudaba a recuperar el optimismo, la agudeza mental y generaba una sensación de mayor energía y bienestar, así mismo se consideraba que incrementaba la capacidad y actividad para el trabajo. En la actualidad los psicólogos y los neurólogos utilizan drogas simpaticométricas de tipo anorexígenos, antipsicóticos, entactógenos para tratar los casos de narcolepsia (ataques intermitentes de sueño profundo), depresión, obesidad y en el desorden de hiperactividad con déficit de atención (ADHD) (**Escohotado, 1995; Scott y col., 2007; Berger y col., 2009**).

Dentro de la denominación anfetaminas se incluyen todas aquellas sustancias derivadas de la estructura Alpha-Metil-fenil-Etil-Amina. Se presentan variaciones en su estructura, lo que permite clasificarlas en dos grupos, de acuerdo al radical que se sustituya un grupo metilendioxo ó metoxi en el anillo de la anfetamina. En cuanto a las metilendioxianfetaminas, las más consumidas son la (\pm) 3,4-metilendioximetanfetamina (MDA), la (\pm) 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA, Extasis), la 3,4-metilendioxietilanfetamina (MDE, MDME), la efedrina, la fentermine, metanfetamina. Entre las metoxianfetaminas se encuentran la metoxianfetamina, dimetoxianfetamina o trimetoxianfetaminas, p-cloroanfetamina (pCA), y la dimetoximetanfetamina. Todas estas sustancias son consideradas como ilícitas que causan trastornos en el funcionamiento del sistema nervioso central, además presentan efectos deletéreos sobre procesos cognoscitivos tales como la memoria y atención (**Alexander y col., 2005; Camí y Farre, 1996; Colado y Lorenzo, 1995; Utrilla, 2000; Nordahl y col., 2003**).

Cuando se consumen las anfetaminas, estas se distribuyen en los tejidos periféricos, su periodo de acción comprende de 8 a 13 horas, tiempo en el que se metaboliza aproximadamente el 45% de la dosis administrada, por lo que se

elimina por orina en su forma activa. La eliminación se incrementa en función del pH de la orina, de tal forma que en un medio ácido se eleva la velocidad de eliminación hasta en un 80%, se acumulan en el sistema nervioso central, en riñón y pulmón. También atraviesan la barrera hematoencefálica en donde inducen la liberación de catecolaminas intracelulares almacenadas en la terminal, .Además, bloquea la actividad de la enzima monoamino oxidasa (MAO), la cual se encarga de la inactivación y degradación de la noradrenalina y serotonina. También se sugiere que pueden modificar la actividad de las enzimas que participan en la síntesis de la serotonina (**Jessel, 2000; Nordahl y col., 2003; Utrilla, 2000**).

Las investigaciones que en la actualidad se realizan sobre las anfetaminas se han impulsado porque cada día se incrementa el abuso que se hace de estas sustancias, tales como la 3,4-metilenodioximetanfetamina (*éxtasis*). El mecanismo de acción de las anfetaminas es complejo, debido a la analogía estructural que mantienen con los neurotransmisores (dopamina, serotonina, adrenalina y noradrenalina). Además, generan la estimulación prolongada en diferentes regiones del sistema nervioso central, involucradas en hambre, la saciedad, el sueño, el comportamiento y secreción de factores liberadores de las hormonas adenohipofisarias (**Utrilla, 2000**).

En la rata adulta, la administración intracerebral de éxtasis de forma aguda induce el daño reversible caracterizado por la liberación masiva y rápida de serotonina en la terminal serotoninérgica, evento que es de corta duración y se revierte completamente a las 24 horas de la administración. Mientras que los efectos a largo plazo son persistentes y se consideran neurotóxicos (**Colado, 2008**).

El efecto neurotóxico del éxtasis, se manifiesta por la disminución en la concentración de serotonina y su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético, así como inhibición de la proteína transportadora de la serotonina, la SERT y finalmente la disminución en la densidad de terminales o axones serotoninérgicos e incluso puede afectar el soma de la neurona. Esta droga, también inhibe la actividad

de la triptófano hidroxilasa, la enzima limitante de la síntesis de serotonina. Este efecto se detecta aun a las 2 semanas de la administración de una dosis única de éxtasis (**Colado, 2008; Roiser y col., 2007**).

En animales experimentales se ha mostrado que el éxtasis, en dosis similares a las usadas por el hombre, induce daño en las neuronas serotoninérgicas. Los animales que son tratados en forma crónica con esta sustancia presentan pérdida de diferentes marcadores del sistema serotoninérgico como son: disminución en la concentración de serotonina, del ácido 5-hidroxiindolácetico, así como de la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa y de la proteína transportadora de la serotonina durante su recaptura por la neurona presináptica (**Gerra y col., 2000; Utrilla, 2000**).

Debido a las limitaciones que existen para disponer libremente del éxtasis y desarrollar experimentos encaminados a analizar los efectos secundarios de la droga en la fisiología del individuo y en particular sobre la parte reproductiva, se ha utilizado la p-Cloroanfetamina (pCA), sustancia que tiene una estructura química y un mecanismo de acción similar al del éxtasis, ya que se han mostrado sus efectos neurotóxicos en neuronas serotoninérgicas de rata y primates (**Ricaurte y Mccann, 1992, Manzana y col., 2001**).

Cuando la pCA se administra por vía sistémica, esta atraviesa la barrera hematoencefálica y disminuye la concentración de serotonina en diferentes regiones del cerebro, como resultado de la inhibición de la actividad de la triptófano hidroxilasa, también inhibe la recaptura de serotonina y la actividad de la enzima monoamino oxidasa, la cual inactiva a la serotonina y como resultado forma el ácido 5-hidroxiindacético (5-HIAA) (**Ayala, 2009; Berger y col., 1992; Fuller, 1992; Sanders-Bush y col., 1975; Sekerke y col., 1975**).

Los efectos de la pCA se caracterizan por la liberación de serotonina durante las primeras 24 horas y a largo plazo induce degeneración de los axones de las neuronas serotoninérgicas, lo que ocasiona disminución de la inervación

serotoninérgica en la corteza cerebral y otras estructuras del cerebro anterior. Es probable que cuando la pCA se administra por vía sistémica, esta se metabolice en un compuesto tóxico fuera del cerebro, el cual viaja por sangre y al entrar al sistema nervioso central, induce el daño al sistema serotoninérgico (**Berger y col., 1992; Steranka y Sanders-Bush, 1975**).

Aparato Reproductor del Macho

En los mamíferos la madurez sexual inicia con la primera oleada de producción de espermatozoides. En ésta etapa se producen cambios importantes en la secreción de gonadotropinas entre otras hormonas que son esenciales para la actividad de las gónadas (**Ganong, 2004**).

En el macho las gónadas o testículos, son de forma ovoide, se encuentran fuera de la cavidad abdominal, en el interior de la bolsa escrotal. Durante el desarrollo fetal este órgano migra del abdomen hasta adquirir su posición final, fuera de la cavidad abdominal. Este desplazamiento es necesario en la formación de los espermatozoides que requiere una temperatura de 1 grado inferior a la corporal, lo que se logra por la ubicación de testículo fuera de la cavidad abdominal (**Gartner, 1995**).

El testículo está suspendido por el cordón espermático, por donde le llegan los vasos sanguíneos y la inervación, está rodeado por las siguientes capas: piel, músculo dartos (músculo liso y elástico que le confiere flexibilidad), la fascia espermática externa (fascia de recubrimiento del músculo oblicuo externo), músculo cremáster (fibras musculares del músculo transverso y el oblicuo del abdomen, permite ascender o descender el testículo para regular la temperatura de éste), fascia espermática interna (fascia transversalis) y la capa vaginal propia (el peritoneo con dos hojas, la parietal y la visceral) (**Ross, 2005**).

Internamente el testículo está compuesto por una capa albugínea (capa fibrosa externa de color blanco), la cual penetra en el testículo y forma tabiques que dividen

el testículo en unos 250 lóbulos en el humano y en algunos animales como los roedores no se observa esta tabicación. Cada uno de estos lóbulos contiene en su interior los túbulos seminíferos, encargados de la formación de los gametos masculinos o espermatozoides. Estos se encuentran rodeados por tejido conectivo laxo muy vascularizado e innervado. Fuera de los túbulos seminíferos se encuentra el tejido intersticial, conformado por vasos sanguíneos, tejido conectivo y células de Leydig (intersticiales) **(Fig.1) (Gartner y Hiatt, 2008)**.

Los túbulos seminíferos desembocan en túbulos rectos que forman la red testicular. Luego de esta red están de 10 a 20 túbulos cortos que se fusionan y se conectan con el epidídimo **(Weiss, 1988)**.

La arteria que irriga al testículo es la arteria testicular, que baja junto con el conducto deferente. El sistema venoso que lo drena es el plexo venoso pampiniforme. La arteria, venas y conducto deferente forman el cordón espermático que pasa por el conducto inguinal. El sistema venoso regula la temperatura testicular (la que debe estar alrededor de los 35°C) **(Weiss, 1988)**.

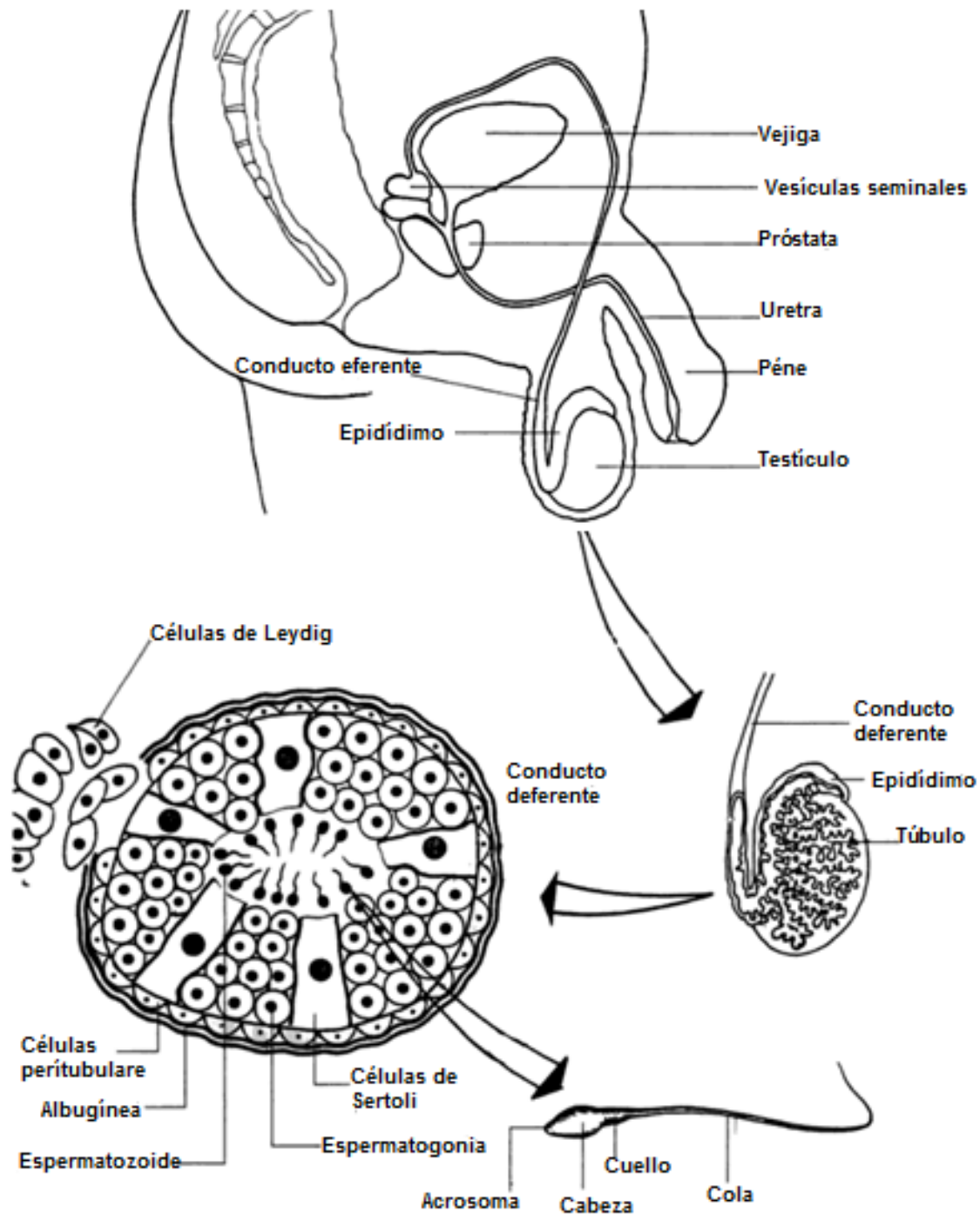


Fig.1. Arriba: esquema del aparato reproductor del macho. Abajo: esquema de la estructura del testículo y su comunicación con los conductos deferentes y la estructura de un túbulo seminífero. En la porción inferior se presenta un esquema del espermatozoide (Aguilar y col., 1997).

Los túbulos seminíferos se componen de epitelio seminífero grueso rodeado por tejido conectivo delgado, la túnica propia. Son túbulos contorneados rodeados por lechos capilares. La túnica propia se compone de haces entrelazados de colágeno I, con varias capas de fibroblastos. Internamente está conformado por el epitelio germinal (seminífero) que tiene varias capas con dos tipos de células (**Ross, 2005**).

- ❖ Células de Sertoli (células de sostén), proporcionan soporte, protegen y nutren a las células espermatógenas; fagocitan remanentes citoplásmicos de espermátides; secretan la proteína fijadora de andrógeno (ABP), hormonas (antimülleriana e inhibina) y un medio nutritivo (rico en fructosa). Conformando la barrera hematotesticular. Son cilíndricas, altas, con membranas plegadas.

- ❖ Células Espermatógenas que comprenden las espermatogonias, espermaticitos primarios y secundarios, así como la espermátide en sus diferentes etapas de diferenciación hacia espermatozoide.

Función Testicular

El testículo cumple dos funciones, la producción de espermatozoides y de hormonas como los andrógenos, que son esenciales en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del resto de los componentes del aparato reproductor del macho (**Fig.2**) (**Ross, 2005**).

La espermatogénesis es la secuencia de eventos que se producen en el túbulo seminífero y conducen a la transformación de las espermatogonias en espermatozoides y se divide en tres fases (**Ross, 2005**): 1). Espermatocitogénesis, diferenciación de las espermatogonias en espermaticitos primarios; 2). Meiosis, división reduccional por la que los espermaticitos primarios diploides reducen su complemento de cromosomas y forman espermátides haploides; 3). Espermiogénesis transformación de espermátides en espermatozoides.

Esteroidogénesis

El testículo de los mamíferos sintetiza diferentes hormonas y factores de crecimiento, entre los primeros se encuentran los andrógenos, principalmente testosterona. El sitio primario de síntesis de testosterona en el testículo, es la célula de Leydig. Este tipo celular se caracteriza por contener en su citoplasma abundante retículo endoplasmico liso, un prominente Aparato de Golgi, depósitos de lípidos y numerosos lisosomas todo esto, es un indicador de células con una alta capacidad de síntesis de andrógenos **(Tortora y Anagnostakos, 1984)**.

La biosíntesis de las hormonas esteroideas gonadales sigue una vía común: el colesterol es el compuesto inicial, sintetizado in situ a partir de acetil-coenzima A o captado de las lipoproteínas de baja densidad del plasma. La P-450 scc (20,22-desmolasa) cataliza la hidrólisis de su cadena lateral y es el paso limitante en la síntesis de progesterona, andrógenos y estrógenos. Dentro del testículo, una pequeña cantidad de testosterona experimenta una 5 α -reducción a dihidrotestosterona (DHT), un potente andrógeno, sin embargo, en los tejidos de destino se convierte de manera significativa de testosterona en DHT, reacción catalizada por la enzima 5 α -reductasa **(Levy y col., 2006; Gartner y Hiatt, 2008)**.

La regulación hormonal de la espermatogénesis y la esteroidogénesis es compleja y participan diferentes hormonas, generadas con interacciones endocrinas, paracrinas y autocrinas entre las células de Leydig, las peritubulares, las de Sertoli, las germinales, la hipófisis y el hipotálamo **(Levy y col., 2006)**.

El hipotálamo bajo la acción de la GnRH estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas por la hipófisis [hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH)], las que son esenciales en el mantenimiento de las funciones del testículo (espermatogénesis y esteroidogénesis) **(Levy y col., 2006; De Rooij y Russell., 2000)**. Ambas gonadotropinas son secretadas por los gonadotropos, localizados en la región lateral del lóbulo anterior de la hipófisis o adenohipófisis.

También existe una población de gonadotropos que sintetiza exclusivamente FSH y otra LH (**Tortora y Anagnostakos, 1984**). La GnRH actúa sobre receptores específicos de membrana, lo que activa cascadas de señalización intracelular que inicialmente inducen la liberación de las gonadotropinas previamente almacenadas, posteriormente se activan los complejos enzimáticos involucrados en la síntesis de estas hormonas. La acción de la GnRH sobre los gonadotropos es mediada por mecanismos dependientes de calcio/calmodulina (**Levy y col., 2006; Ross., 2005**).

En la rata la iniciación de la espermatogénesis es regulada por diferentes hormonas, como las gonadotropinas y testosterona. Durante la etapa fetal aumenta la secreción de FSH, LH y testosterona, que favorece la transformación de las células germinales primordiales en espermatogonias, las cuales se mantienen en reposo durante el tiempo que resta la gestación y durante los primeros días de vida. En esta etapa del desarrollo de la rata disminuye la secreción de las gonadotropinas, y se interrumpe la diferenciación de las células germinales primordiales a espermatogonias. En los días previos al inicio de la pubertad la secreción de FSH y LH aumenta y se activa la multiplicación y diferenciación de las espermatogonias. La FSH favorece la multiplicación mitótica de las espermatogonias, así como la división meiótica de los espermatocitos primarios, mientras que la LH estimula la secreción de testosterona por las células de Leydig, la cual evita la separación prematura de las espermátidas elongadas de las células de Sertoli y previene la degeneración de las espermátidas redondas (**Levy y col., 2006; Shennawy y col., 1998; Chemes y col. 1979; Sofikitis y col. 2008; Walczak-Jedrzejowska y col. 2007**).

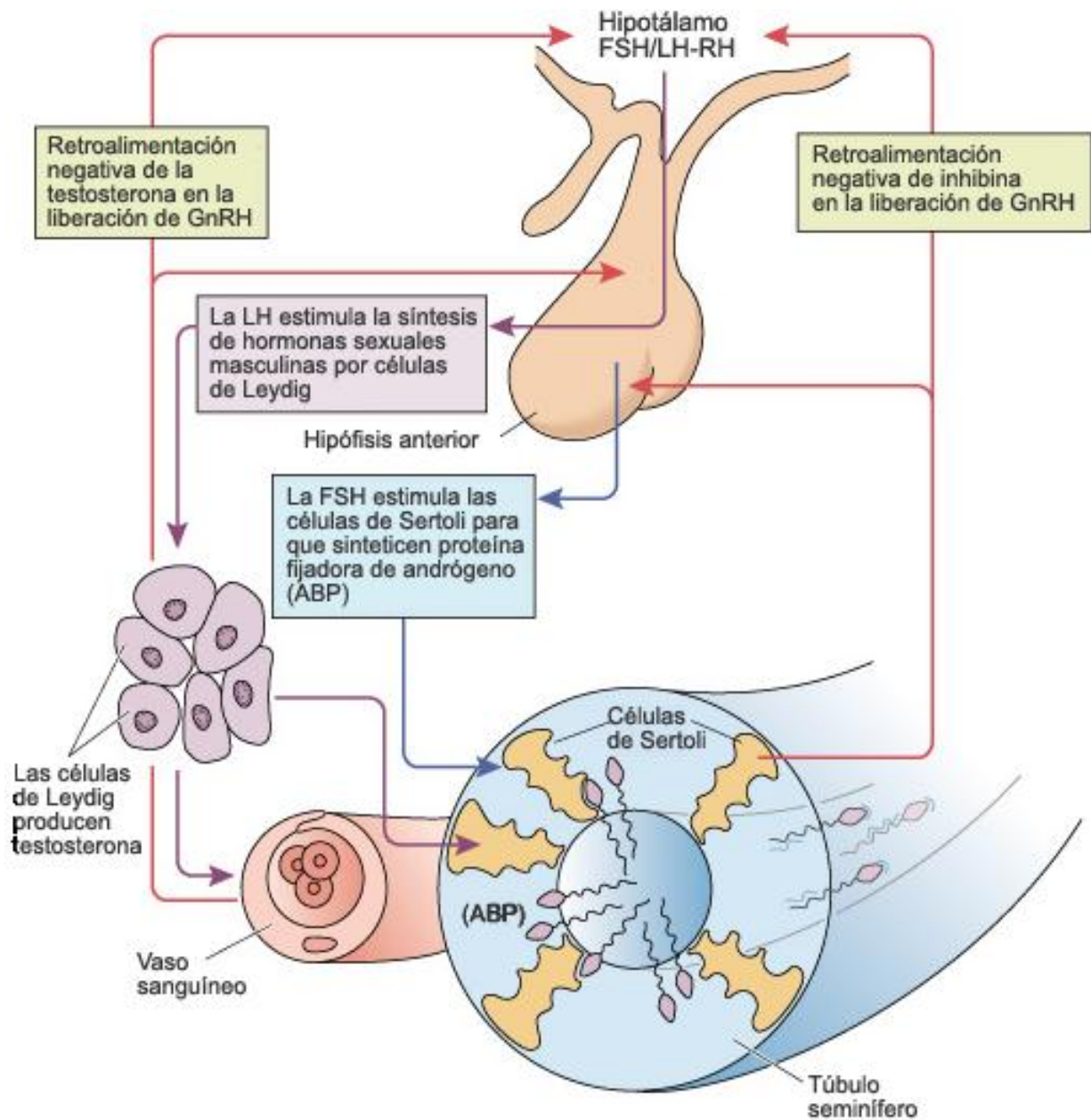


Fig.2. Esquema del control hormonal de la espermatogénesis. Hormona Estimulante del Folículo (FSH); hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH); hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH); proteína unidora de los andrógenos (ABP) (Gartner y Hiatt, 2008).

Ciclo del Epitelio Seminífero

En el túbulo seminífero se presentan cambios cíclicos en la estructura del epitelio, que recibe el nombre de ciclos del epitelio seminífero y consisten en agregados repetido de células germinales en distintos estadios del desarrollo, cada agregado está compuesto por grupos de células que se conectan unas con otras por puentes intercelulares, que forman un sincicio sincronizado que migra hacia la luz del túbulo seminífero como una unidad (**Gartner, 1995**).

La luz de cada túbulo esta revestida por un epitelio de varias capas celulares de espesor, en el túbulo seminífero las células de Sertoli establecen una barrera hematotesticular al formar uniones entre ellas y subdividir así al túbulo en el compartimiento adluminal y basal. El compartimiento basal contiene espermatogonias A (tanto claros como oscuros), espermatogonias B, las caras basales de las células de Sertoli (sus-tentaculares) y una capa de gametos masculinos en desarrollo. El compartimiento adluminal contiene las porciones apicales de las células de Sertoli, espermátocitos primarios, secundarios, espermátidas y espermatozoides (**Gartner, 1995; Levy y col., 2006**).

El epitelio seminífero presenta ciclos de 16 días, se requieren cuatro ciclos para completar la espermatogénesis, en el ratón doméstico se han descrito 14 estadios o asociaciones celulares de maduración del epitelio seminífero (espermatogénesis), cada estadio se caracteriza por una composición celular constante (**Oakberg, 1956; Russell y col., 1990; Clermont y Trott, 1969**). Esta clasificación está basada principalmente en los cambios morfológicos de las espermátidas durante los diferentes estadios de la espermiogénesis. Esta etapa se divide mediante un criterio morfológico en varios estadios de desarrollo, basados en la forma del acrosoma, de la cabeza de la espermátida y en el grado de condensación de la cromatina (**Willey y Clermont, 1963; Ross, 2005**).

Hay seis etapas del epitelio seminífero, que se repiten a distancias específicas en un corte de túbulo seminífero. La distancia entre dos etapas idénticas del epitelio

seminífero se denomina *onda del epitelio seminífero* y describen la distribución de los patrones de asociación celular (estadios) en toda la longitud del túbulo. En los roedores y mamíferos estudiados, cada estadio ocupa una longitud significativa del túbulo seminífero y los estadios parecen ocurrir secuencialmente a lo largo de todo el túbulo. En la rata hay alrededor de 12 ondas en cada túbulo, en un corte transversal de este, se aprecian los patrones de asociación celular (**Willey y Clermont, 1963; Ross, 2005**).

En los testículos de ratas, se requieren de cuatro ciclos del epitelio seminífero para la formación de espermatozoides, a partir de espermatogonias tipo A1. El primer ciclo consiste en la producción de espermatocitos en preleptoteno y de espermatogonias tipo A1, el segundo incluye, la transición de los espermatocitos preleptoteno a espermatocitos en paquitenio (etapa VII), el tercero, la formación de espermátidas a partir de este tipo celular y la cuarta, la maduración de espermátidas en espermatozoides. En la rata cada ciclo requiere de 12 a 13 días, todo el proceso dura 48 a 52 días, dependiendo de la cepa (**Vernon y col., 1975**).

Los estadios de la espermatogénesis se designan con números romanos y las fases de desarrollo de las espermátidas durante la espermiogénesis se designan con números arábigos (**Fig.3**).

Etapa I: Al observar al microscopio óptico, no se puede distinguir el sistema acrosómico; en este estadio se encuentran espermatocitos en paquitenio.

Etapa II-III: La etapa inicia con la formación de gránulos acrosómicos seguidos de la fusión de estos gránulos en una vesícula proacrosómica.

Etapa IV: La vesícula proacrosómica crece y se extiende sobre la superficie del núcleo.

Etapa V: El ángulo subtendido por el acrosoma se extiende a partir de 40° a un máximo de 90°.

Etapa VI: El ángulo subtendido por el acrosoma se extiende de 95 a un máximo de 120°, sigue habiendo espermátidas alargadas dentro de las proyecciones de células de Sertoli.

Etapa VII: Las espermátidas alargadas se mueven a la sección adluminal del epitelio seminífero y se alinean en el lumen; el ángulo subtendido por el acrosoma es mayor de 120°, los núcleos de las espermátidas no tienen contacto con la superficie de la célula.

Etapa VIII: Los núcleos de las espermátidas del paso 8 hacen el contacto con la membrana del plasma, pero su forma todavía no se tuerce de redondo o levemente de óvalo.

Etapa IX: El núcleo de la espermátida pasa de la forma redonda a ovoide.

Etapa X: La espermátida muestra un ángulo ventral, pero no se considera ningún ángulo dorsal todavía.

Etapa XI: La espermátida alargada muestra un ángulo dorsal; la cabeza de la espermátida exhibe una superficie dorsal suavemente curvada.

Etapa XII: La superficie dorsal de la cabeza de la espermátida tiene un aspecto doblado de la barra; la condensación de la cromatina no es completa, indicando que este proceso no ha alcanzado la cabeza caudal.

Etapa XIII: La condensación de la cromatina se empieza a completa, indicando que este proceso ha alcanzado la cabeza caudal, la etapa concluye antes de que se inicie la metafase en los espermátocitos en diploteno.

Etapa XIV: Esta se define por la presencia de la meiosis I, de los espermátocitos secundarios, o de cada una de las fases de la meiosis II.

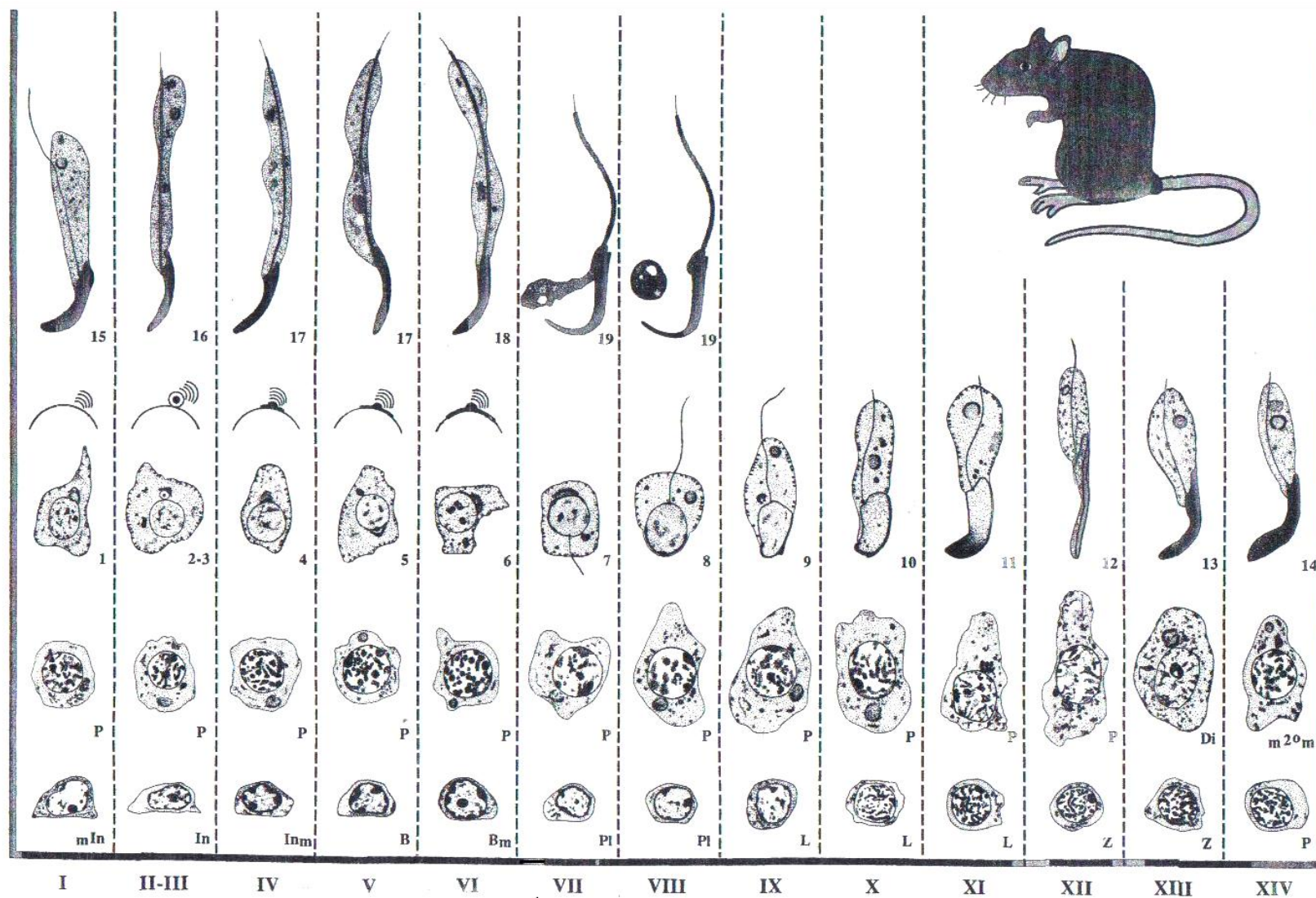


Fig.3. Estadios presentes en el ciclo del epitelio seminífero de la rata macho. Clermont Y., Trott M. (1969).

Entre los primeros estudios que se enfocaron al análisis de los cambios cíclicos que se presentan en el epitelio seminífero se encuentran los de **Oakberg en 1956**, quien evaluó en el ratón adulto el desarrollo de la espermatogénesis y la duración del ciclo del epitelio seminífero. Posteriormente también en ratas adultas, **Brokelmann (1963)**, estudio la estructura de las células germinales durante el ciclo del epitelio seminífero. Tiempo después, **Dym y Clermont (1970)**, describieron en la rata adulta la importancia de la proliferación de las espermatogonias en la reparación del epitelio seminífero cuando se induce daño por radiaciones.

Mahmoud y Lunenfeld en (2004), estudiaron los factores autocrinos y paracrinos que participan en la regulación de la espermatogénesis y contribuyeron al conocimiento de que la estructura del testículo y el ciclo del epitelio seminífero son regulados por las gonadotropinas y por los esteroides sexuales, como los andrógenos y estrógenos. La FSH y LH al actuar en el testículo estimulan la secreción de varios factores paracrinos que son esenciales en la proliferación celular y en la función esteroideoigénica de las células de Leydig (**Katzenellenboger, 1997; Moguilevsky y col., 1985**). En relación a esto se ha mostrado que cuando ratas inmaduras son tratadas desde el nacimiento hasta el día 32 con un antisuero contra FSH o contra LH y se sacrifican al día 33 de edad, se observa disminución en el diámetro del túbulo seminífero en ambos grupos. En el grupo de animales que recibieron el antisuero contra FSH también disminuye el número de espermatocitos y de espermátidas presentes en la etapa 7 y 8. En los animales que recibieron el antisuero contra la LH, la espermatogénesis se detiene antes de concluir la meiosis. En ambos grupos de animales disminuye la concentración de testosterona (**Chemes y col., 1979**).

Cuando a ratas macho adultos se les realiza la hipofisectomía se observa el arresto de la espermatogénesis y cuando se les administra FSH y LH este proceso se restaura. Estas gonadotropinas participan en la regulación de este proceso al actuar en puntos específicos de la espermatogénesis. Cuando a las ratas hipofisectomizadas se les administra LH se observa el desarrollo de las

espermatogonias hasta la etapa de espermatocitos en paquiteno, así como la elongación de las espermátidas hasta formar al espermatozoide. Mientras que, cuando se administra LH más FSH, la diferenciación prosigue hasta la formación de las espermátidas redondas (etapa VII) (**Vernon y col., 1975**).

La FSH además de ser esencial en el mantenimiento de la estructura del epitelio seminífero, también se ha mostrado que en la etapa fetal de la rata es importante en la multiplicación y diferenciación de las células de Sertoli. Al extraer los testículos de fetos de ratas de 16 ó 17 días de edad y se mantiene en cultivo, se observa por inmunohistoquímica que se incrementa la presencia de la proteína, citoqueratina, importante componente del citoesqueleto de la célula y que es esencial en la diferenciación de la célula de Sertoli (**Russell y col., 1998**).

La testosterona es otro factor importante en el mantenimiento de la estructura del testículo y en la espermatogénesis. Este andrógeno tiene un efecto bifásico, debido a que cuando se administra en ratas o ratones, puede estimular o inhibir los procesos antes mencionados, dependiendo de la dosis administrada. También se ha mostrado que cuando se inhibe la producción de testosterona en ratas macho adultas, el número de células germinales disminuye progresivamente (**Mclachlan y col., 2002**).

Apoptosis

Dos formas de muerte celular se presentan en las células, la necrosis y apoptosis, este último proceso es una forma de muerte celular programada, que se caracteriza por una serie de cambios que culmina con el deterioro de la célula y su posterior fagocitosis (**Sinha-Hikim y Swerdloff, 1999; Webb y col., 1997**).

La apoptosis o muerte celular programada es un evento que ocurre fisiológicamente. Es esencial en el desarrollo normal de los diferentes órganos y para el mantenimiento de la homeostasis. 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, alteraciones del citoesqueleto, fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN), formación de fragmentos de núcleo recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), estos últimos son fagocitados (***Sinha-Hikim y Swerdloff, 1999; Webb y col., 1997***).

La muerte de las células que no continúan su diferenciación es el resultado de la expresión de determinados genes que generan señales de muerte en estadios definidos de la diferenciación de las células en respuesta a estímulos fisiológicos determinados.

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteinil-aspartato proteasas (*caspasas*). Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN (***Sinha-Hikim y Swerdloff, 1999; Rodríguez y col., 1997***).

Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena la fragmentación de ADN (***Sinha-Hikim y Swerdloff, 1999; Rodríguez y col., 1997; Derradji y col., 2003***).

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres: la de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1 y otras); la familia de proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas proapoptóticas de tipo "BH3-only" (Bid, Bim, Bad y otras). Las proteínas tipo multidominio pueden producir el poro mitocondrial que permite la liberación del citocromo c. Las proteínas tipo *BH3-only*

activan a estas proteínas, y las antiapoptóticas inhiben la formación del poro. Estas proteínas son los reguladores más importantes del proceso de apoptosis (**Rodríguez y col., 1997; Sinha-Hikim y Swerdloff, 1999; Walczak-Jedrzejowska y col., 2007**).

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 adecuada entre el número de células germinales maduras y las células de Sertoli. Como resultado de este evento, hasta el 75% de las células de la espermatogénesis son eliminadas durante la maduración de los túbulos seminíferos (**Bartke, 1995; Billig y col., 1995; Rodríguez y col., 1997; Walczak-Jedrzejowska y col. 2007**). En los testículos de roedores, la apoptosis se detecta ya en el decimocuarto día del embrión (**Miethin, 1992; Jeyaraj y col., 2003**). Los espermatoцитos que no completan la meiosis son eliminados selectivamente por apoptosis, como por ejemplo los espermatoцитos con segmentos de cromosomas, en los que no se ha producido correctamente la sinapsis. También son eliminadas las espermatogonias dañadas y las espermátidas haploides (**Print y Loveland, 2000**).

El reconocimiento de las células no viables se produce gracias a mecanismos de control que regulan la calidad cromosómica de los gametos que se forman (**Eaker y col., 2001**). Las células germinales apoptóticas son transportadas al lumen del túbulo o bien fagocitadas por las células de Sertoli. Estas últimas juegan un papel importante tanto en el desarrollo del testículo como en su función, ya que secretan una serie de proteínas implicadas en la diferenciación, proliferación y metabolismo de las células germinales (**Griswold, 1988; Skinner, 1991; Jégou, 1993**).

La secreción combinada de FSH, LH y testosterona es esencial para la sobrevivencia de las células del epitelio seminífero, debido a que se considera como inhibidor de la apoptosis. Si disminuyen las concentraciones de estas hormonas, se favorece la muerte celular y como resultado se produce desbalance

en la espermatogénesis que se traducirá en una menor fertilidad (**Levy y col., 2006**).

En estudios realizados en ratas inmaduras durante la etapa que incluye multiplicación de las células de Sertoli, mostraron que cuando se administra el estradiol se inhibe la maduración de las células de Sertoli y se estimula la apoptosis de estas células y las germinales, mientras que el tratamiento con testosterona no tiene ningún efecto. Cuando se administran conjuntamente la testosterona y el estradiol se induce la apoptosis en las células germinales. El tratamiento conjunto de FSH con el estradiol acelera la diferenciación de las células de Sertoli e inhibe la apoptosis en las células germinales. Durante la maduración de los túbulos seminíferos, la administración combinada de testosterona y FSH mantienen la sobrevivencia celular (**Walczak-Jedrzejowska y col. 2007; Roosen-Runge, 1973**).

Pubertad en la Rata

La pubertad es la etapa entre la inmadurez y la madurez sexual, en la que ocurren una serie de cambios a nivel neuroendocrino y fenotípico, dando paso al inicio de la actividad reproductiva (**Ramaley., 1979**). Durante el inicio de la pubertad, la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH cambia de modo que la producción de LH supera la de FSH, tal hecho puede deberse al aumento de la síntesis y almacenamiento de LH en respuesta a la secreción pulsátil de GnRH, ya que esto favorece al mantenimiento de sus receptores y como consecuencia se incrementa la sensibilidad de las células de Leydig a la LH. (**Levy y col., 2006**).

La rata ha sido la especie en la que se han estudiado los procesos de maduración puberal. El signo externo que marca el inicio de la pubertad en la rata macho, es la separación balano-prepucial (45 días) (**Aguilar y col., 1997**). En la rata macho su desarrollo sexual se divide en función de parámetros morfológicos y fisiológicos, en cuatro fases: neonatal, infantil, juvenil y peripuberal (**Ojeda y Urbanski, 1994**).

La etapa juvenil comprende del día 21 al 35, al inicio de este periodo el andrógeno principal secretado por el testículo es el androstenediol, al día 30 se incrementan las concentraciones de testosterona y dihidrotestosterona, mientras que el androstenediol disminuye, la concentración de prolactina se incrementa al día 25, correlacionándose con el crecimiento y desarrollo del testículo, vesícula seminal y próstata. Durante esta etapa la concentración de FSH es mayor, ya que al parecer el incremento es necesario para el inicio de la espermatogénesis y la formación de receptores a LH en las células de Leydig, reflejándose en un aumento en la producción de testosterona. En el día 30 se incrementa la expresión de receptores a GnRH en la hipófisis (**Adam y Steiner, 1988**).

Además del incremento de la secreción de andrógenos, del desarrollo testicular y de los órganos sexuales secundarios, durante el desarrollo puberal en la rata macho se producen los siguientes fenómenos: *a) sustitución de la población fetal de células de Leydig por la población adulta; b) proliferación de las células de Sertoli; c) modificación del andrógeno secretado (el testículo secreta inicialmente compuestos 5- α reducidos y testosterona a partir del día 30; d) aumento de la sensibilidad testicular al LH debido al aumento de los receptores a esta hormona* [Cuadro1] (**Aguilar y col., 1997**).

Cuadro 1. Eventos que se presentan en los componentes del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo de la rata macho durante el desarrollo prepuberal (Aguilar y col., 1997).

CARACTERÍSTICA	EDAD
Aparición de la primera población células de Leydig	Día 10 fetal
Inicia la producción de testosterona	Día 14 fetal
Aparecen los receptor a LH	Día 14 fetal
Aparecen los receptor para FSH	Día 17 fetal
Aparecen los receptores para prolactina	Día 15 fetal
Aparición de la población adulta de células de Leydig	Día 15 postnatal
Diferenciación de las células de Sertoli	Hasta el día 15 postnatal
Desarrollo testicular	A partir del día 15 postnatal
Desarrollo prostático	A partir del día 15 postnatal
Inicia la espermatogénesis	Día 4 postnatal
Espermatozoides maduros	Día 40 postnatal
Feedback negativo gónadas-gonadotrofinas	Día 1-7 postnatal
Máxima sensibilidad hipofisaria a la GnRH	Día 30 postnatal
Cambio en el patrón de esteroidogénesis	Día 30 postnatal

Serotonina y Funciones del testículo

La serotonina ha fascinado y confundido a los científicos desde su descubrimiento, en 1948. Las funciones de esta sustancia han sido poco estudiadas hasta el último decenio, en el que se han desarrollado nuevas técnicas de estudio y potentes fármacos serotoninérgicos que han permitido comprender mejor su intervención en múltiples procesos fisiológicos (*Rapport y col., 1948*).

Existen diversas evidencias que apoyan la idea de que la serotonina participa en la modulación de las funciones del testículo. Posiblemente al regular la secreción de GnRH y como consecuencia de las gonadotropinas, o directamente en la gónada donde modula la producción de testosterona. Sin embargo, hasta el momento los resultados obtenidos al respecto son poco claros (**Becu-Villalobos y col., 1989; Tinajero y col., 1993; Shiskina y Dygalo, 2000; Aragón y col., 2005**).

El bloqueo del sistema serotoninérgico inducido por la administración de la p-clorofenilalanina (PCPA), inhibidor de la síntesis de serotonina, en animales de 40 y 44 días, disminuye el peso de los testículos, la concentración plasmática de testosterona y el número de espermatozoides. Mientras que la administración de 5-hidroxitriptofano, precursor de la síntesis de serotonina, incrementa la concentración de testosterona y el peso de los testículos a los 60 días de edad. Con base en estos resultados los autores sugieren que la serotonina es esencial en la regulación de las funciones del testículo (**Shishkina y Dygalo, 2000**).

En la rata macho de 30 días de edad la administración de p-cloroanfetamina por vía sistémica resulta en disminución de la espermatogénesis (movilidad, viabilidad y número de espermatozoides), así mismo se incrementan las formas anormales en los espermatozoides y disminuye la concentración de testosterona en el suero. Con base en estos resultados se concluye que en la rata macho prepúber el sistema serotoninérgico participa de forma estimulante en la modulación de la producción de espermatozoides y de la secreción de testosterona (**Aragón y col., 2005**).

También se ha mostrado que cuando a la rata macho adulta se le administran anfetaminas disminuye la secreción de testosterona sin que se modifique LH, hormona que al unirse a sus receptores de membrana en la célula de Leydig estimula la síntesis de este andrógeno (**Budziszewska y col., 1996; Archer, 1982**). Con base en estos resultados se propuso que la serotonina que es producida en el testículo también parece ser esencial para que se lleve a cabo la esteroidogénesis.

La administración de pCA, a ratas macho de 30 ó 40 y 44 días de edad, disminuye la concentración de 5-HT en el hipotálamo ocasionando la disminución de la concentración de testosterona en suero y la baja del peso en el testículo. Si paralelamente se administra 5-hidroxitriptofano (5-HTP) los eventos son invertidos. Con base en esto resultados los autores sugieren que la 5-HT modula de forma estimuladora al eje hipotálamo-hipófisis-testículo, al mismo tiempo que estimula la maduración sexual de la rata macho prepúber (**Aragón y col., 2005; Shishkina y Dygalo 2000**).

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se ha incrementado el uso de sustancias y fármacos como las anfetaminas que afectan al sistema serotoninérgico, sistema que ejerce una función importante en la regulación de la secreción de GnRH y de las gonadotropinas, hormonas que son esenciales en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del testículo. Entre estas sustancias se encuentra la p-cloroanfetamina (pCA), análogo de las anfetaminas, que en la rata macho prepúber inhibe la síntesis de serotonina y disminuye la concentración de la amina en diferentes regiones del encéfalo, como en el hipotálamo. Además disminuye la espermatogénesis (número, movilidad y viabilidad de los espermatozoides). Por ello, con la finalidad de analizar si los efectos que provoca la pCA en la espermatogénesis son el resultado de daño en el testículo, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de la pCA en la estructura del testículo (ciclo del epitelio seminífero) en la rata macho prepúber. Así mismo, se analizaron si los efectos del fármaco en la estructura del testículo, se correlacionan con cambios en la síntesis de serotonina en el hipotálamo y en la secreción de la FSH, LH y testosterona en el suero.

HIPÓTESIS

La serotonina es esencial en la modulación de la secreción de gonadotropinas (FSH y LH), hormonas que regulan la función del testículo y mantiene su estructura. Por ello, la inhibición de la síntesis de serotonina inducida por la administración de la p-cloroanfetamina en la rata macho prepúber se traducirá en la disminución de la concentración de FSH, LH y testosterona, y como consecuencia se inducirá degeneración de las células germinales, lo que se reflejará en la modificación del ciclo del epitelio seminífero.

OBJETIVOS GENERAL

Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina inducida por la administración de la p-cloroanfetamina, en el mantenimiento de la estructura del testículo (ciclo del epitelio seminífero) y en la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides en la rata macho prepúber.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la concentración de serotonina y de su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético en el hipotálamo de la rata macho prepúber tratada con p-cloroanfetamina.
- Analizar el efecto de la administración de la p-cloroanfetamina en la estructura del testículo, en el diámetro del túbulo seminífero y en el ciclo del epitelio seminífero en la rata macho prepúber.
- Analizar el efecto de la administración de la p-cloroanfetamina en el proceso de apoptosis en el testículo de la rata macho prepúber.
- Evaluar los efectos de la administración de la p-cloroanfetamina en la concentración de progesterona, androstenediona, testosterona, estradiol, FSH y LH en el suero de la rata macho prepúber.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos experimentales

Se utilizaron ratas macho de la cepa CII-ZV de 30 días de edad, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (14 hrs. luz/10 hrs. oscuridad). Al Cumplir los 30 días los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos experimentales: A un grupo se les administró una única dosis de 10 mg/ Kg de peso corporal por vía intraperitoneal de p-cloroanfetamina (*Sigma, chemical, Co., St. Lous, MO, EU*), disuelta en solución salina al 0.9% (grupo con *pCA*). A otro grupo de animales se le administró solución salina al 0.9 % por la misma vía que el grupo anterior (*grupo con Vh*). Como grupo de comparación se utilizaron animales sin tratamiento *TA*. Animales de los distintos grupos experimentales se sacrificaron a las 48, 96 ó 144 hrs, después de la administración de *Vh* o *pCA*.

Sacrificio de Animales

Los animales se sacrificaron por decapitación y se extrajo el cerebro el que se enjuagó en solución salina (0.9%) fría (4 °C), posteriormente se realizó la disección del hipotálamo anterior y medio. También se realizó la disección de ambos testículos y se colectó la sangre del tronco, la que se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, posteriormente se separó el suero y se almacenó a -20 °C para la posterior cuantificación de gonadotropinas y hormonas esteroides.

Fijado e Inclusión de Testículos

Los testículos se fijaron en paraformaldehído al 4%, posteriormente se deshidrataron, se incluyeron en parafina líquida y finalizado el periodo de inclusión se elaboraron bloques de parafina en los que se encontraba inmerso el testículo.

Se realizaron cortes transversales de testículo izquierdo a 5 µm de grosor mediante un micrótopo de rotación (*American Optical 820*). Se colocaron 4 cortes

por testículo en un portaobjetos preparado con poli-L-lisina para una mayor adherencia. Las secciones obtenidas fueron teñidas con la técnica de ácido periódico-Schiff (PAS), contrateñidas con hematoxilina y finalmente se montaron con “permount” para el análisis posterior del ciclo del epitelio seminífero.

Estudio Morfométrico del Testículo y Análisis del Ciclo del Epitelio Seminífero

Con ayuda de un ocular micrométrico adaptado a un microscopio óptico se realizó la medición de dos diámetros del túbulo seminífero, el mayor y perpendicular a este. Con estos dos valores se calculó el diámetro promedio mediante la siguiente relación: $(\text{Diámetro1} + \text{Diámetro2})/2$. Posteriormente se analizó el ciclo del epitelio seminífero en 100 túbulos por testículo siguiendo la metodología propuesta por ***Russell y col. (1990,1998)***.

Cuantificación de Gonadotropinas

La cuantificación de la concentración de FSH y LH en el suero se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo, con reactivos donados por el National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA) empleando los anticuerpos **NIAMDD-Rat-FSH-RP2** y **NIAMDD-RatA-LH-RP3**, los valores que se obtuvieron se expresaron en ng/ml.

Cuantificación de Hormonas Esteroides

La concentración de androstenediona, testosterona (T), progesterona (P4) y 17 β -Estradiol, en el suero se realizó por la técnica RIA de fase sólida, para lo cual se utilizaron kits Comerciales por Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA). Las concentraciones de androstenediona, progesterona y testosterona se expresaron en ng/ml y el 17 β -Estradiol en pg/ml.

Cuantificación de Serotonina y Acido 5-Hidroxiindolacético

Las muestras del hipotálamo anterior y medio, se pesaron y homogenizaron con 300 microlitros de ácido perclórico al 0.1 M, se centrifugaron a 12000 rpm a -4 °C durante 30 min., el sobrenadante se filtró en membrana de 0.45 µm y posteriormente se inyectaron 20 µl de este en el equipo de cromatografía de líquidos de alta presión, para determinar las concentraciones de serotonina y de su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético, los resultados se expresaron como ng/mg de tejido.

Túnel

Laminillas con cortes del testículo izquierdo de 5 µm de grosor se despanafiraron con xilol y se rehidrataron, posteriormente se trataron con 50 µl de proteinasa K, por 30 minutos en 37 °C, en una cámara húmeda, a cada una de las preparaciones se les agregó solución de bloqueo (Roche Diagnostic GmbH, Indianapolis IN, USA) por 20 minutos.

El tejido fue tratado con solución de permeabilización tritón (0.1% Tritón X-100, en 0.1% citrato de sodio) por 2 Min. Las preparaciones se trataron con una solución de DNAsa y de la enzima biotinylated 16-dUTP, utilizando kits Comerciales In situ cell Death Detection, POD (Roche Diagnostic GmbH, Indianapolis IN, USA) por 60 Min.

Después de cada paso el tejido fino fue aclarado tres veces, por 4 minutos cada vez. Fue incubado con el convertidor-POD por 30 minutos a 37 °C y tratado con diaminobenzidina y las células teñidas con un color café, fueron aquellas que se encontraban en apoptosis, finalmente el tejido fue deshidratado y montado con Permout para el análisis posterior del ciclo del epitelio seminífero y del proceso de apoptosis.

Análisis Estadístico de los Resultados

Para el análisis estadístico se utilizó el programa (*Graphpad Instant [Data set1.ISD]*). Las variables se expresaron como media \pm error estándar de la media. La concentración de serotonina y de su metabolito en el hipotálamo, de hormonas y del diámetro del túbulo seminífero, se analizaron por la prueba de ANOVA, seguida de Tukey. Cuando se compararon las medias de dos grupos experimentales se utilizó la prueba de “t” de Student. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias cuya “probabilidad” fue igual o menor de 0.05.

RESULTADOS

Serotonina y Ácido 5-hidroxiindolacético

En comparación con el grupo de animales testigo, los animales inyectados con solución salina (Vh), sacrificados a los diferentes tiempos, en el hipotálamo anterior no se modificó la concentración de serotonina y del 5-HIAA. La relación fue mayor [5-HIAA]/[5-HT] a las 144 hrs. En los animales que se les administró la pCA, la concentración de serotonina disminuyó significativamente a las 48, 96 y 144 horas postratamiento, en comparación con el grupo de animales testigo absoluto ó con Vh. La concentración del 5-HIAA fue menor en todos los tiempos estudiados, pero esta disminución fue significativa únicamente en los animales sacrificados a las 144 hrs. La relación [5-HIAA]/5-HT no se modificó significativamente en ninguno de los animales inyectados con la anfetamina (**Fig. 4**).

En el hipotálamo medio la concentración de serotonina, del 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] de los animales tratados con Vh y sacrificados a las 48 y 144 hrs. postratamiento no se modificó en relación con el grupo de animales TA, mientras que en los animales sacrificados a las 96 horas disminuyó la concentración del 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/5-HT. En todos los animales tratados con la pCA, la concentración de serotonina disminuyó significativamente. Mientras que, el 5-HIAA únicamente disminuyó a las 48 hrs y la relación [5-HIAA]/5-HT presentó este comportamiento en los animales sacrificados a las 48 ó 144 hrs. (**Fig.5**).

Gonadotropinas y Hormonas Esteroides

La concentración de FSH en el suero de los animales tratados con el Vh ó con la pCA no se modificó en ninguno de los tiempos estudiados, en relación con los animales testigo. En los animales inyectados con Vh, la concentración de LH se incremento a las 48 y 96 hrs. En comparación con los animales que recibieron el Vh, la pCA, disminuyó significativamente la concentración de LH a las 96 y 144hrs. (**Fig.6**).

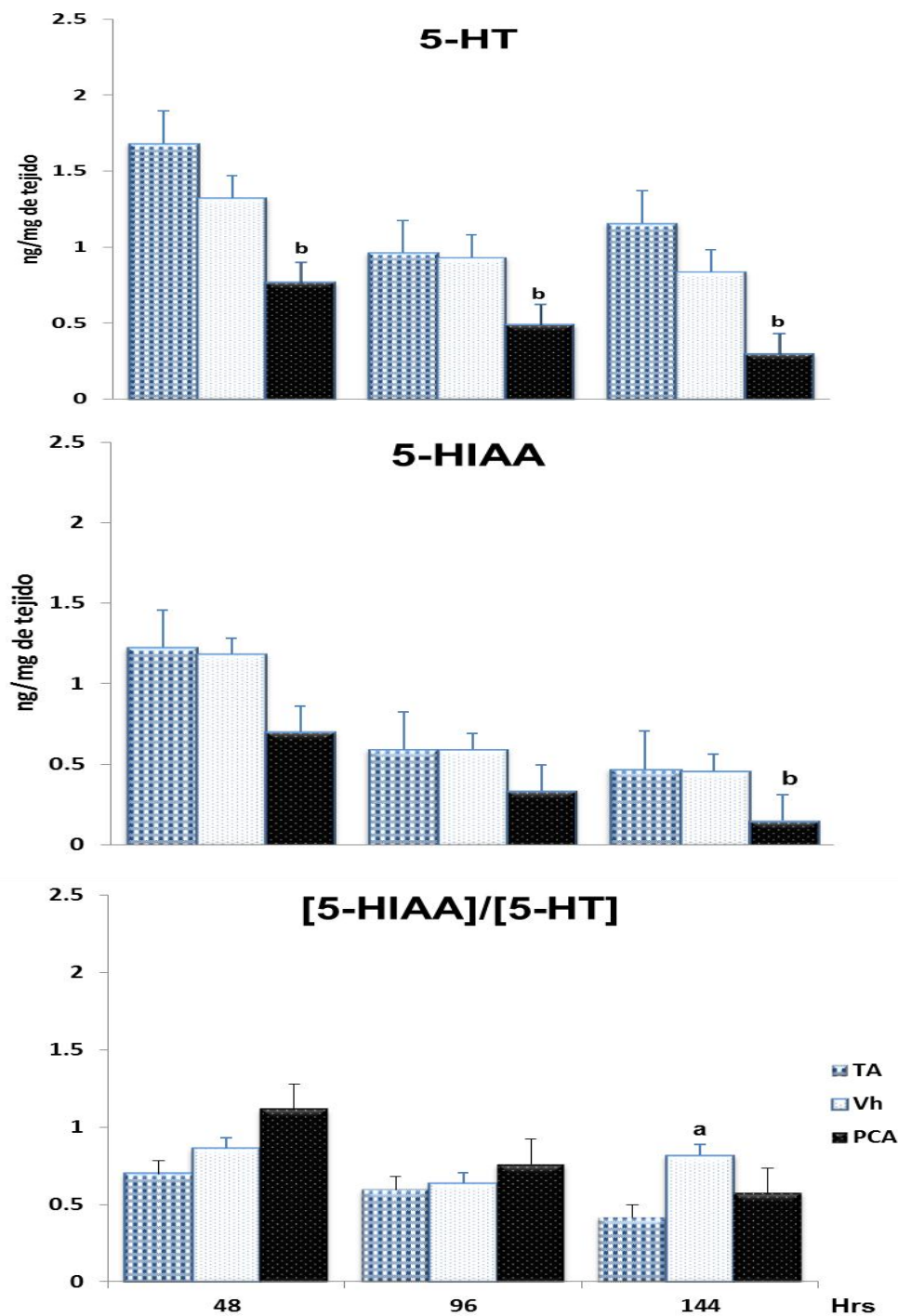


Figura 4. Concentración (Media \pm e.e.m.) de 5-HT, del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo anterior de ratas machos prepúberes testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) ó con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 48, 96 ó 144 horas después del tratamiento. *a* $p < 0.05$ vs. TA; *b* $p < 0.05$ vs. respectivo grupo Vh (ANOVA seguida de Tukey).

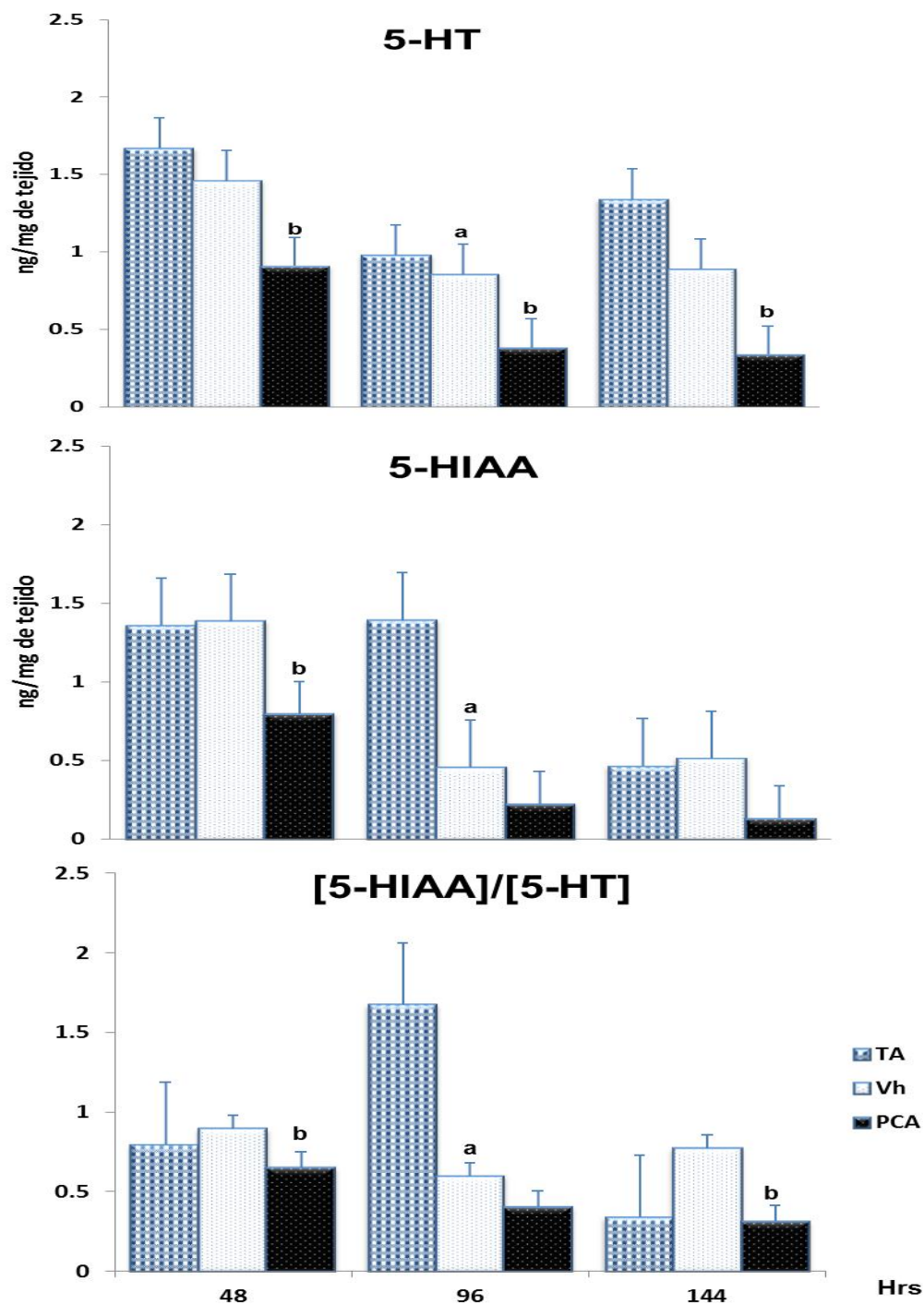


Figura 5. Concentración (Media \pm e.e.m.) de 5-HT, del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT], en el hipotálamo medio de ratas machos prepúberes testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 48, 96 ó 144 horas después del tratamiento. a $p < 0.05$ vs. TA; b $p < 0.05$ vs. respectivo grupo Vh (ANOVA seguida de Tukey).

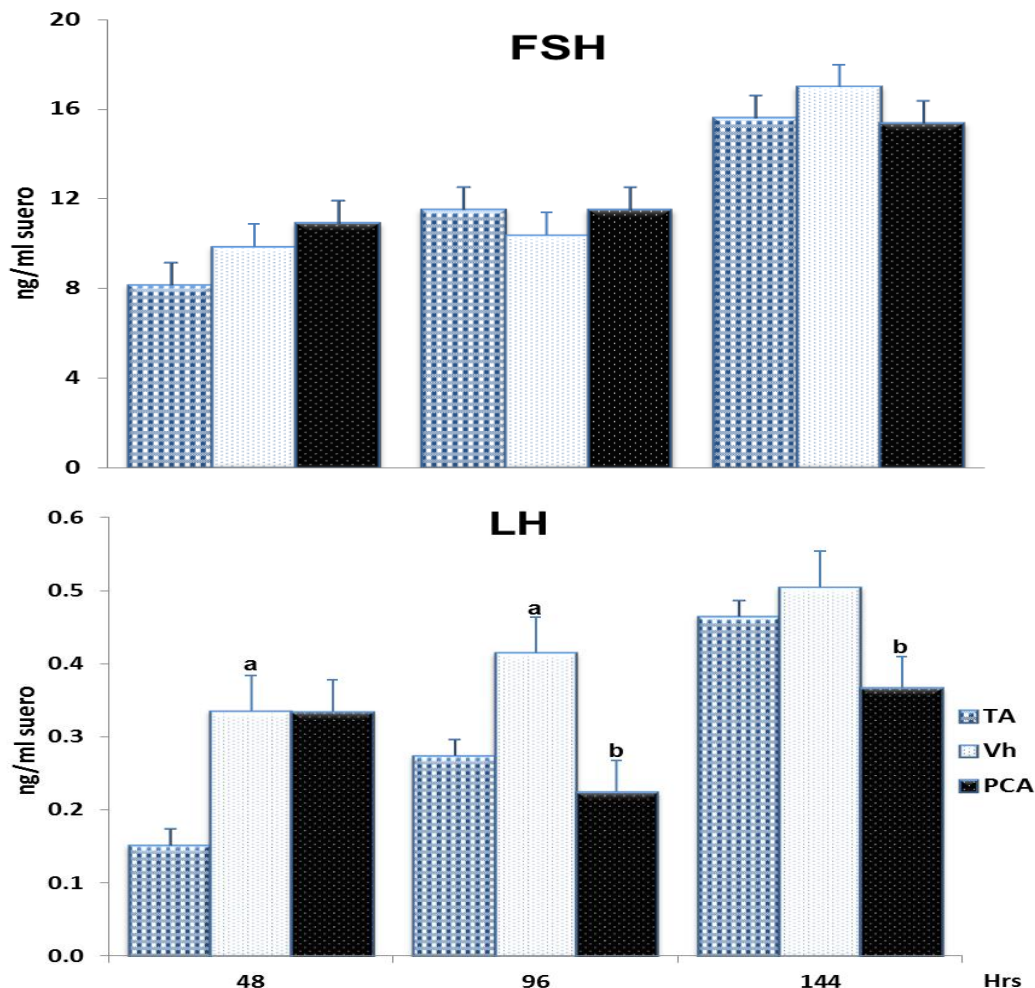


Figura 6. Concentración de hormona estimulante del foliculo (FSH) y Luteinizante (LH) (Media \pm e.e.m.) en el suero de ratas macho prepúberes testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 48, 96 ó 144 horas después del tratamiento. *a* $p < 0.05$ vs. TA; *b* $p < 0.05$ vs. respectivo grupo Vh (ANOVA seguida de Tukey).

En comparación con el grupo de animales TA, la inyección del Vh incrementó la concentración sérica de progesterona significativamente a las 48 y 144 horas y disminuyó a las 96 hrs. La concentración de testosterona no se modificó y la de estradiol disminuyó en los animales sacrificados a las 96 horas. La inyección de pCA no modificó la concentración de progesterona en ninguno de los tiempos estudiados, mientras que testosterona disminuyó significativamente a las 48, 96 y 144 horas, en relación con el grupo con Vh. La concentración de estradiol disminuyó significativamente únicamente en los animales sacrificados a las 96 y 144 hrs, en comparación con el grupo de animales tratados con Vh ó TA (**Fig.7**).

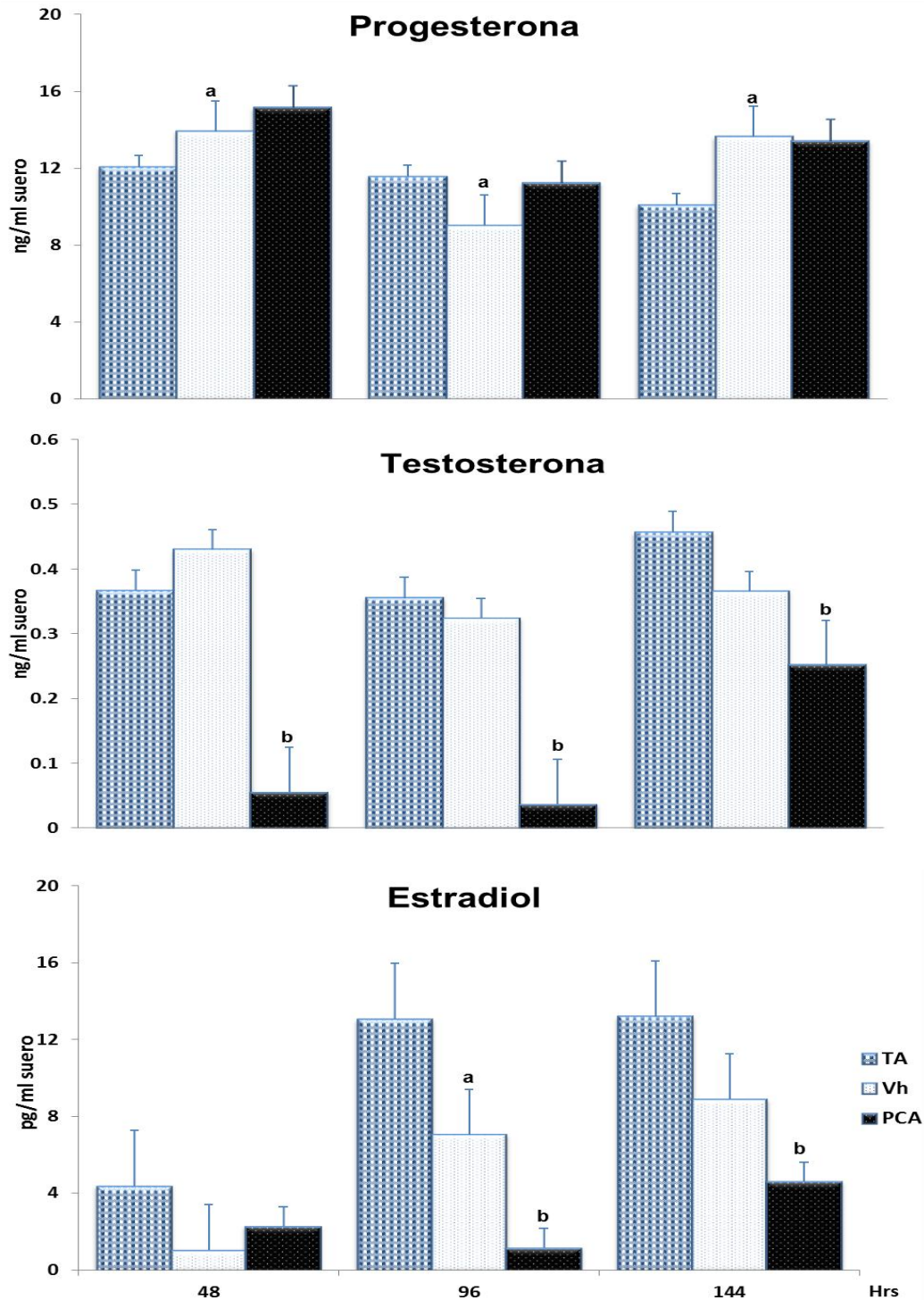


Figura 7. Concentración de progesterona, testosterona y estradiol) (Media \pm e.e.m.) en suero de ratas macho prepúberes testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 48, 96 ó 144 horas después del tratamiento. a $p < 0.05$ vs. TA; b $p < 0.05$ vs. respectivo grupo Vh (ANOVA seguida de Tukey).

Ciclo del Epitelio Seminífero

En la **Fig.8** se presenta el diámetro promedio de los túbulos seminíferos de los animales testigo absoluto (TA) o tratados con Vh o pCA, en la que se observa la disminución significativa del diámetro de los túbulos seminíferos de los animales tratado con Vh y sacrificados a las 144 horas. En los que se les administró la pCA este efecto se presentó desde las 48 hrs postratamiento.

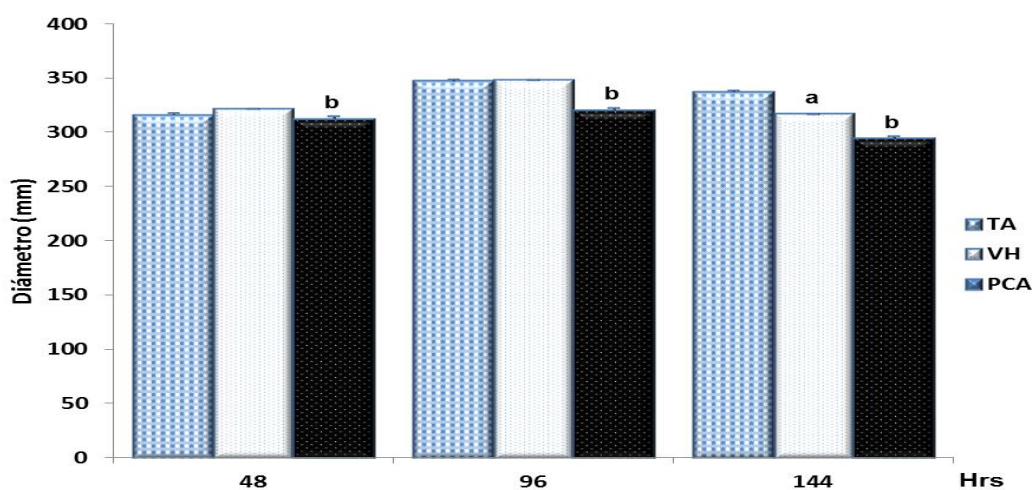


Figura 8.- Diámetro promedio (Media \pm e.e.m.) de los túbulos seminíferos de testículos de ratas machos prepúberes testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 48, 96 ó 144 horas después del tratamiento. a $p < 0.05$ vs. TA; b $p < 0.05$ vs. respectivo grupo Vh (ANOVA seguida de Tukey).

Cuando se analizó el número de túbulos, se observó que algunos de ellos no presentaban la organización característica del epitelio seminífero, debido a que: 1).- se perdieron parte de las células (muerte por apoptosis); 2).-se observaron células multinucleadas; 3).-células con una gran cantidad de citoplasma; 4).-se incrementó la luz de los túbulos. En cualquiera de estos casos los túbulos se consideraron anormales. En los testículos de los animales tratados con el Vh o con la pCA se incrementó significativamente el porcentaje de túbulos anormales en todos los tiempos estudiados, pero este efecto fue más evidente en los que se inyectaron con la anfetamina (**Fig.9**).

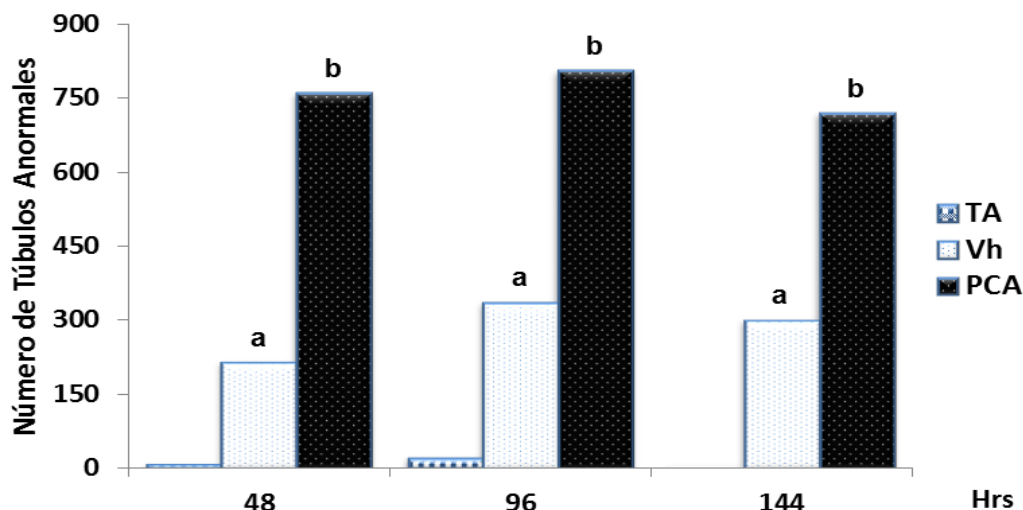


Figura 9. Número de túbulos anormales (Media \pm e.e.m.) de testículos de ratas machos prepúberes testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 48, 96 ó 144 horas después del tratamiento *a* $p < 0.05$ vs. TA; *b* $p < 0.05$ vs. respectivo grupo Vh (ANOVA seguida de Tukey).

En los animales TA sacrificados a las 48, 96 ó 144 horas, la mayoría de los túbulos seminíferos presentaron una organización normal y en menor proporción células multinucleadas (**Fig. 10, 11, 12**). En el grupo de animales que recibieron Vh y sacrificados a las 48, 96 ó 144 hrs se presentó disminución en el número de túbulos normales y se observaron algunos de ellos con una gran cantidad de citoplasma en la luz. En los animales tratados con pCA y sacrificados a los diferentes tiempos se observó un porcentaje alto de túbulos anormales, debido a que el epitelio se caracterizó por la pérdida de la progenie celular, células en apoptosis, células multinucleadas, así mismo se incrementó la proporción de túbulos con citoplasma en la luz (**Fig. 10, 11, 12**).

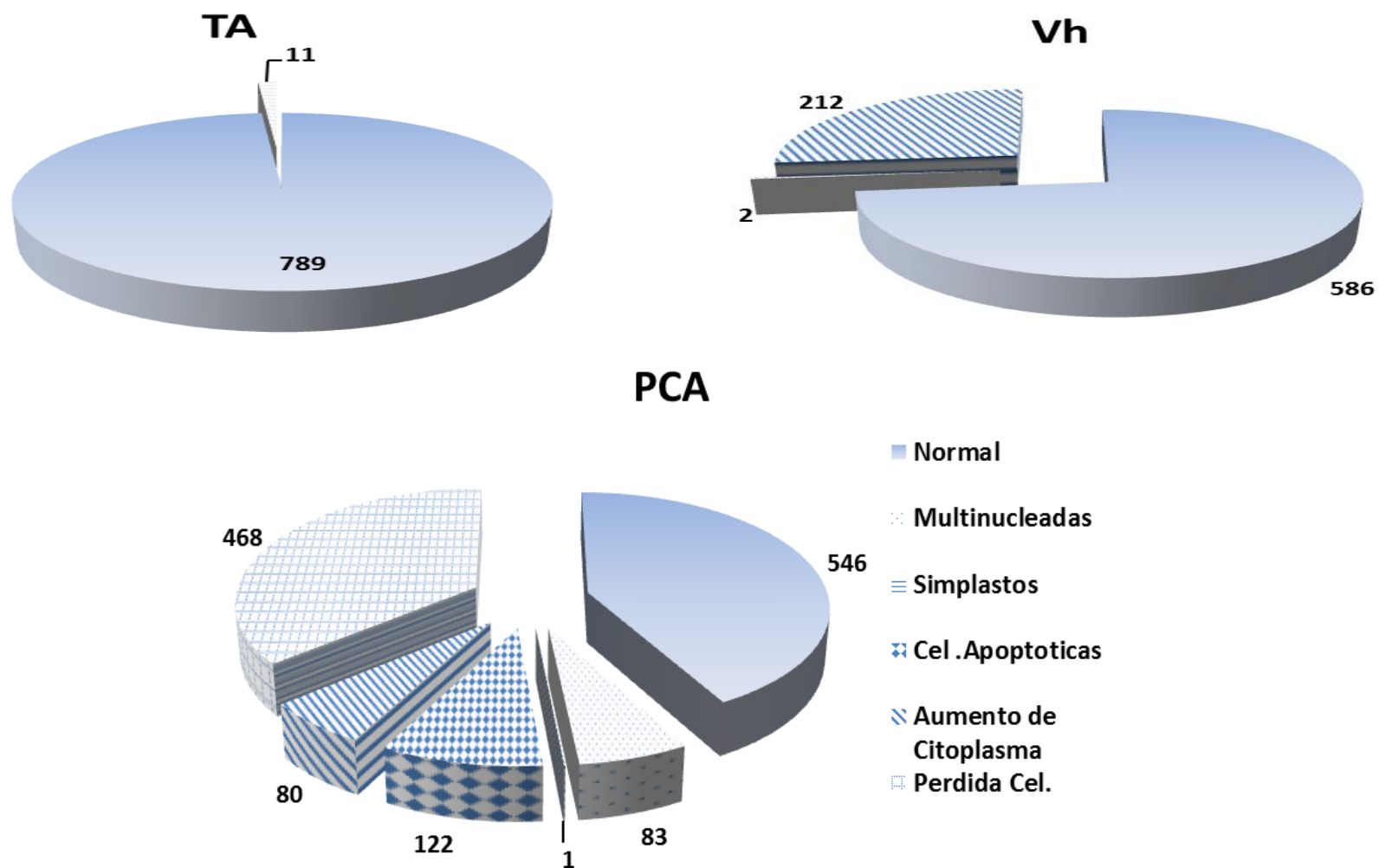


Figura 10. Anormalidades presentes en los testículos de ratas machos prepúberes testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 48 horas después del tratamiento.

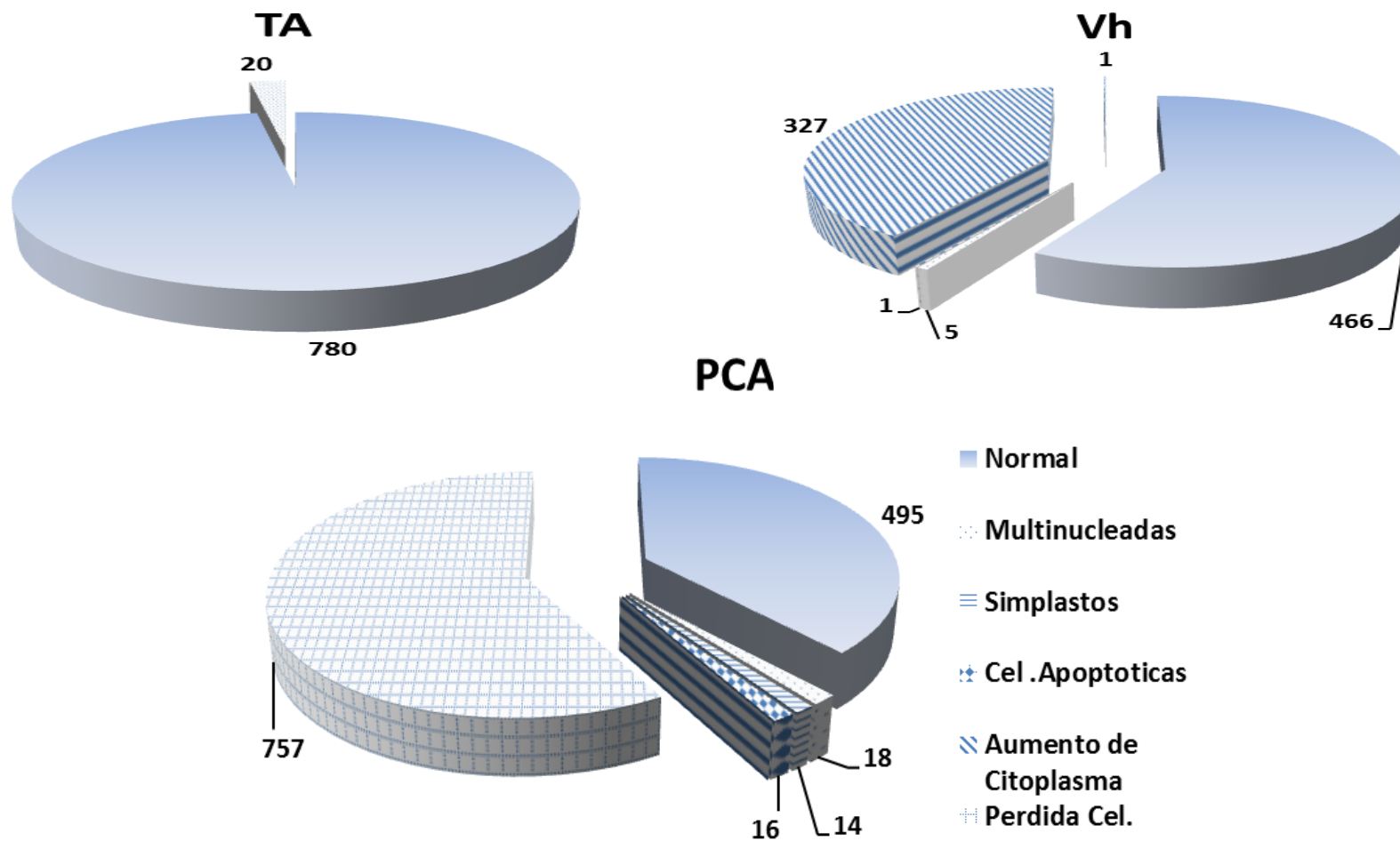


Figura 11. Anormalidades presentes en los testículos de ratas machos prepúberes testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) ó con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 96 horas después del tratamiento.

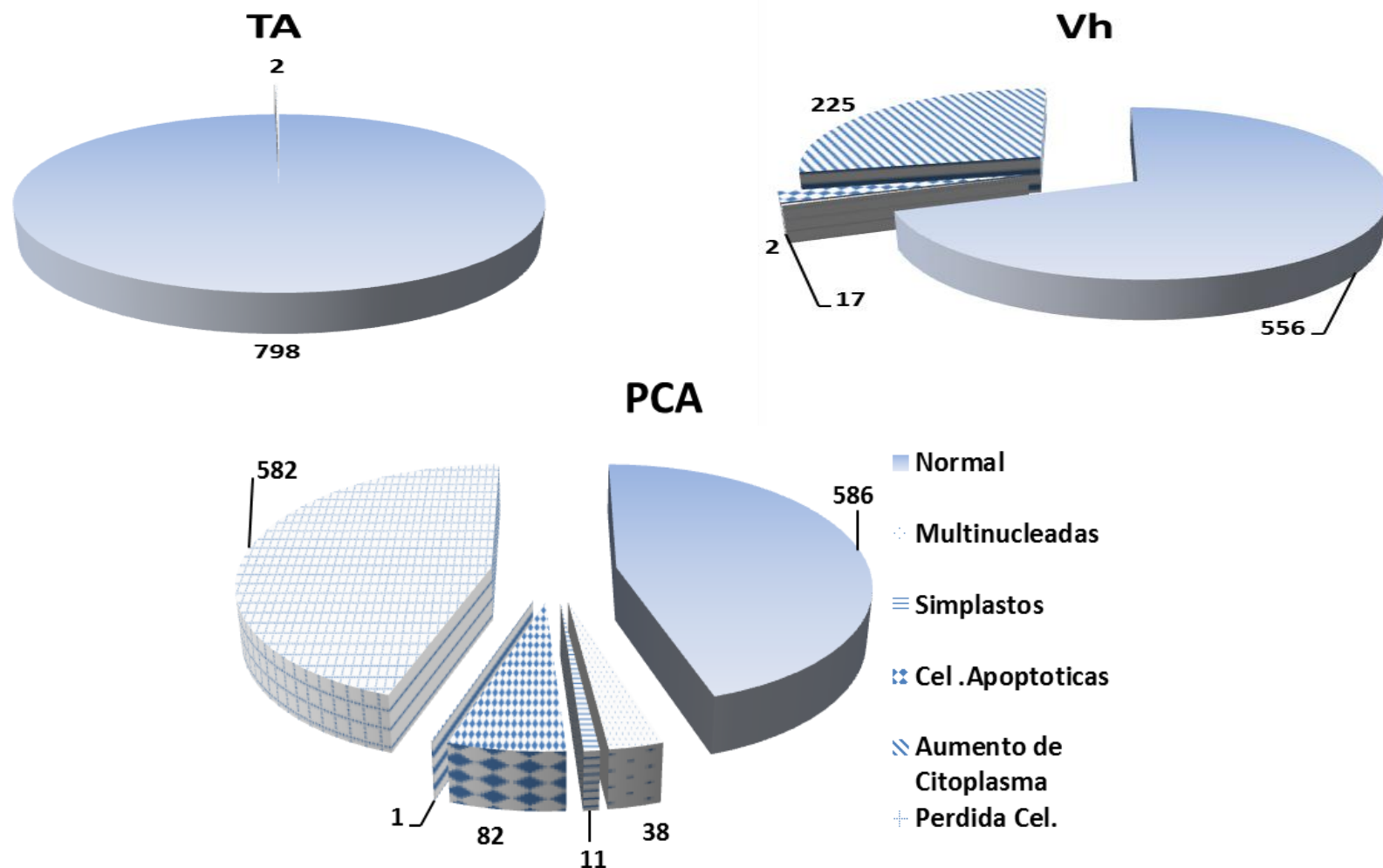


Figura 12. Anormalidades presentes en los testículos de ratas machos prepúberes testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 144 horas después del tratamiento.

En el análisis del ciclo del epitelio seminífero de los animales TA se observó que a las 48 hrs del sacrificio se observaron túbulos del estadio I al VII, caracterizados por la presencia de espermátidas tipo 1, que se forman después de la división meiótica. También se observa el desarrollo progresivo de las espermátides, la transición de espermátocitos en preleptoteno a leptoteno y aumento en su tamaño. En el testículo de los animales TA, predominan túbulos en estadio I al III que se caracterizan por la presencia de espermátidas tipo 1, 2 y 3, se observa la formación de gránulos acrosómicos, seguidos de la fusión de estos gránulos en una vesícula proacrosómica, así mismo se encontraron espermátocitos en paquiteno y no se observan espermátides maduras, ni espermátocitos secundarios **(Fig.13)**.

En los testículos de los animales que recibieron Vh predominaron túbulos seminíferos en el estadio IV, caracterizados por el crecimiento de la vesícula proacrosómica, y su extensión sobre la superficie del núcleo, también se observó el aumento significativo en el porcentaje de túbulos en el estadio I, II-III y V caracterizados por la presencia de espermátidas redondas en las que se ha iniciado la formación de los gránulos acrosómicos y la fusión en una vesícula **(Fig.13)**.

En los animales tratados con pCA se observó la disminución en el número de túbulos en estadio I y se incrementaron los túbulos en estadio II-III, IV y VII, donde se observó la reducción en el número de espermátocitos en paquiteno **(Fig.13)**.

En el testículo de los animales TA, al igual que en el grupo de animales tratados con Vh ó con pCA no se observaron túbulos en las etapas VIII a XIV, que se caracterizan por la presencia de espermátidas maduras del tipo 8 al 14, elongación del eje apico-caudal y un estrechamiento bilateral del núcleo, la formación de protuberancias en la cara ventral de la espermátide **(Fig.13)**.

En los animales sacrificados a las 96 hrs se observaron túbulos desde el estadio I al VIII, caracterizados por la formación de gránulos acrosómicos y los diferentes tipos celulares por los que pasan las espermátogonias durante su desarrollo, en los

estadios más avanzados ya se aprecia la región acrosómica en contacto con la membrana celular del núcleo, la orientación de las espermátides hacia la membrana basal del túbulo con una ligera elongación del núcleo. En los animales del grupo TA predominaron los túbulos en estadio II-III, seguido de los estadios IV y V que se caracterizan por que en estas dos etapas se lleva a cabo el crecimiento de los espermaticitos en paquiteno y su desarrollo celular progresivo, así mismo se observó la disminución en el número de túbulos en el estadio I (**Fig.14**).

En el grupo de animales que recibió Vh predominan túbulos en los estadios II-III y V. En los animales que se inyectaron con la pCA predominaron los túbulos en estadio II-III, IV y V, además disminuyó el número de túbulos en los estadios VI y VII (**Fig.14**).

En los testículos de los animales sacrificados a las 144 hrs ya se observan túbulos en los estadios del I al X, donde se aprecia la continua elongación y estrechamiento del núcleo, el ápice de la cabeza es más prominente, el acrosoma cubre el ápice y toda la parte dorsal, etapas que son importantes en la transición de la espermátide a espermatozoide. En el grupo TA predominaron los túbulos en estadio II-III y disminuyeron los del estadio V.

En los animales inyectados con Vh se observó el aumento en el número de los túbulos del estadio IV y V, con la disminución significativa en los túbulos del estadio II-III y VII, el grupo tratado con pCA presentó disminución de los túbulos en los estadios I, VIII y IX, y el incremento en el estadio IV (**Fig.15**).

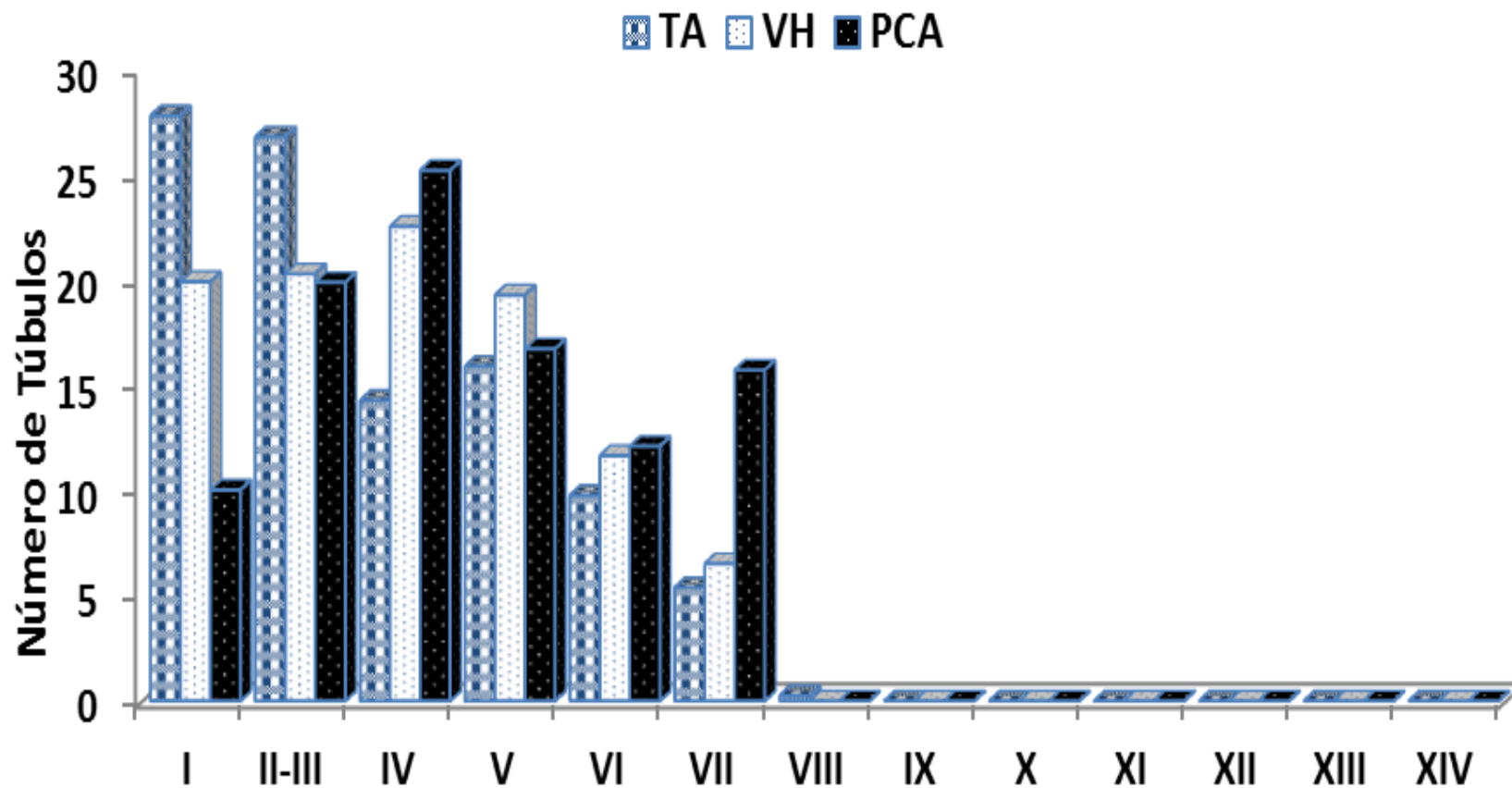


Figura 13. Distribución (Media \pm e.e.m.) de los estadios del ciclo del epitelio seminífero de ratas macho prepúber testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 48 Hrs.

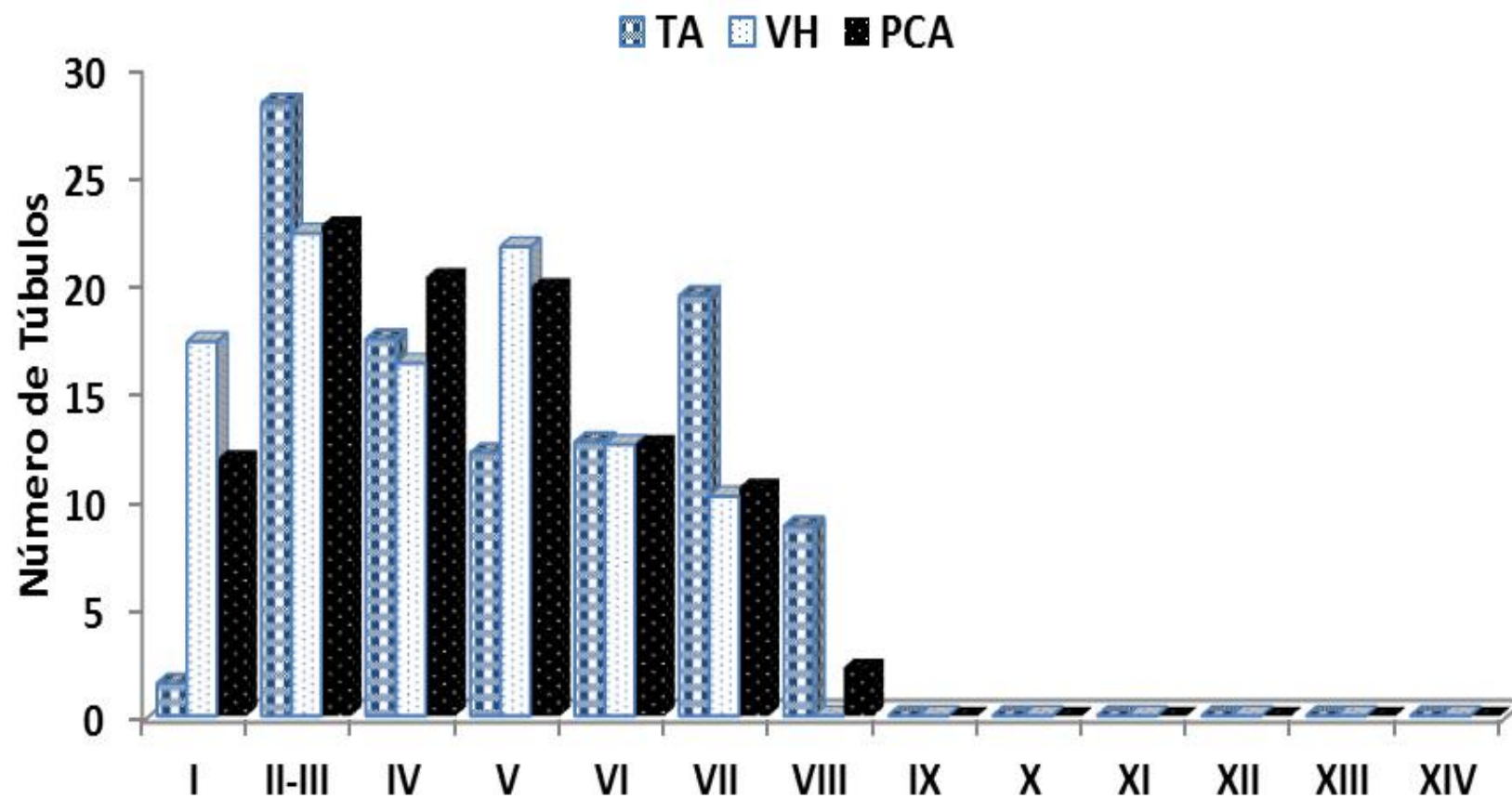


Figura 14. Distribución (Media \pm e.e.m.) de los estadios del ciclo del epitelio seminífero de ratas macho prepúber testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 96 Hrs.

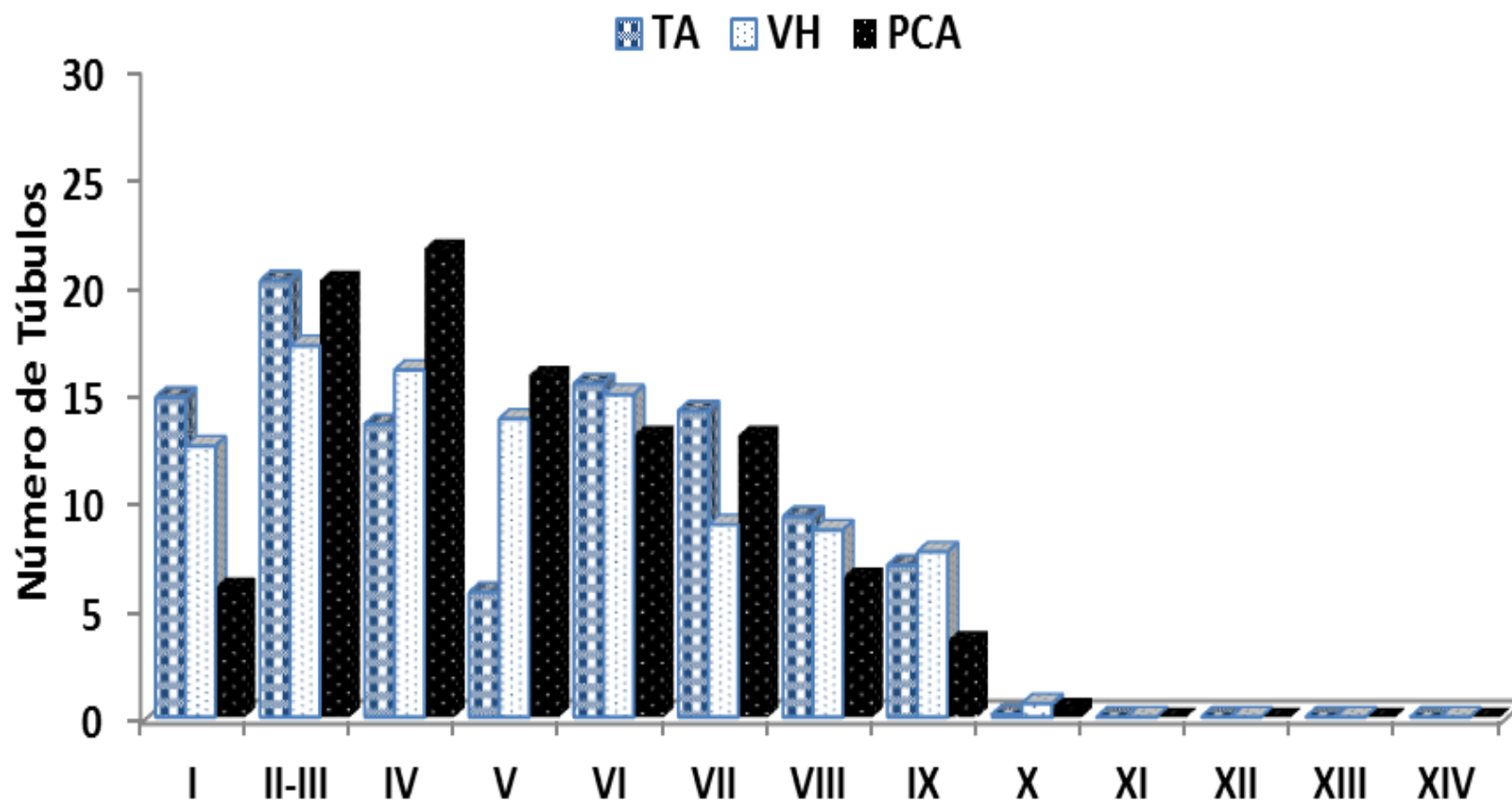


Figura 15. Distribución (Media \pm e.e.m.) de los estadios del ciclo del epitelio seminífero de ratas macho prepúber testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Vh) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y sacrificadas a las 144Hrs

Análisis Histológico

El análisis histológico de los testículos teñidos por la técnica de PAS (Reactivo de Schiff), se presentan en las **Fig.16, 17 y 18**, donde se observa que en los animales TA sacrificados a las 48 hrs el epitelio de los túbulos presenta una organización normal, que corresponde a los estadios I al VIII (**Fig.16-A y A1**). Los animales con Vh presentan una estructura similar, con la variante de que este grupo se presenta aumentó en la luz de los túbulos, como se observa en los túbulos en estadio V (**Fig. 16-B y B1**). Los animales tratados con pCA (**Fig.16-C y C1**), se observan túbulos en estadio IV y VII caracterizados por la pérdida total ó parcial de las células germinales.

En los animales TA sacrificados a las 96 hrs se observaron túbulos seminíferos cuya progenie celular corresponde a los estadios II-III, IV y VII, con el aumento considerable del tamaño de los espermatoцитos en paquiteno, al final del estadio VII (**Fig.17-D y D1**). En grupo inyectado con Vh se observan túbulos en estadios V, VI y VIII, que se caracterizan por la presencia de espermatoцитos que empiezan a abandonar la lámina basal, así como por el aumento del diámetro de los túbulos debido a la presencia de un gran número de espermatoцитos en paquiteno (**Fig.17-E y E1**).

En los testículos del grupo de animales que recibió pCA se aprecia la pérdida de la progenie celular, principalmente las del compartimento adluminal, así mismo un considerable aumentó de células apoptóticas y de citoplasma en el lumen (**Fig.17-F y F1**). También se observan simplastos, estructuras redondeadas llenas de Espacio constituido por citoplasma de las distintas células que presenta continuidad a través del plasmodesmos (el citoplasma de la célula se comunica con el de las células vecinas).

En los cortes de testículo de los animales TA sacrificados a las 144 hrs, se observan túbulos en los estadios II-III y VII, donde la estructura del túbulo es mas alargada debido a la distribución y el reacomodo celular (**Fig.18-G y G1**). Una

estructura similar se observa en los animales tratados con Vh (**Fig.18-H y H1**). En los cortes de los animales del grupo pCA se aprecian células multinucleadas y simplastos en los túbulo en estadio II-III, mientras que los estadios más avanzados (VII y IX) presentan la reducción del compartimiento basal (**Fig.18-I y I1**).

Apoptosis

La técnica de TUNEL, permite identificar células en apoptosis, las cuales se tiñen de un color café. El análisis de la distribución de células en apoptosis en los túbulos seminíferos en los diferentes estadios se presenta en la **Fig.19**, donde observamos que los animales del grupo TA presentan pocas células en apoptosis (**Fig. 20-a y a1, 21-d y d1, 22-g y g1**), en el grupo con Vh se observa el incremento en el número de células en apoptosis en los túbulos en los estadios II-III y IV a las 48 y 96 hrs (**Fig. 20-b y b1, 21-e y e1**).

En los animales tratados con pCA se observó un mayor número de células en apoptosis, en los animales sacrificados a las 48 hrs este incremento se presentó en los túbulos en los estadios II-III y V (**Fig.20-c y c1**), a las 96 hrs en los estadios II-III, IV, VI, VII, (**21-f y f1**), y a las 144 hrs se observó aumento en el número de células en apoptosis en los estadios IV, II-III y VI, (**22-i y i1**).

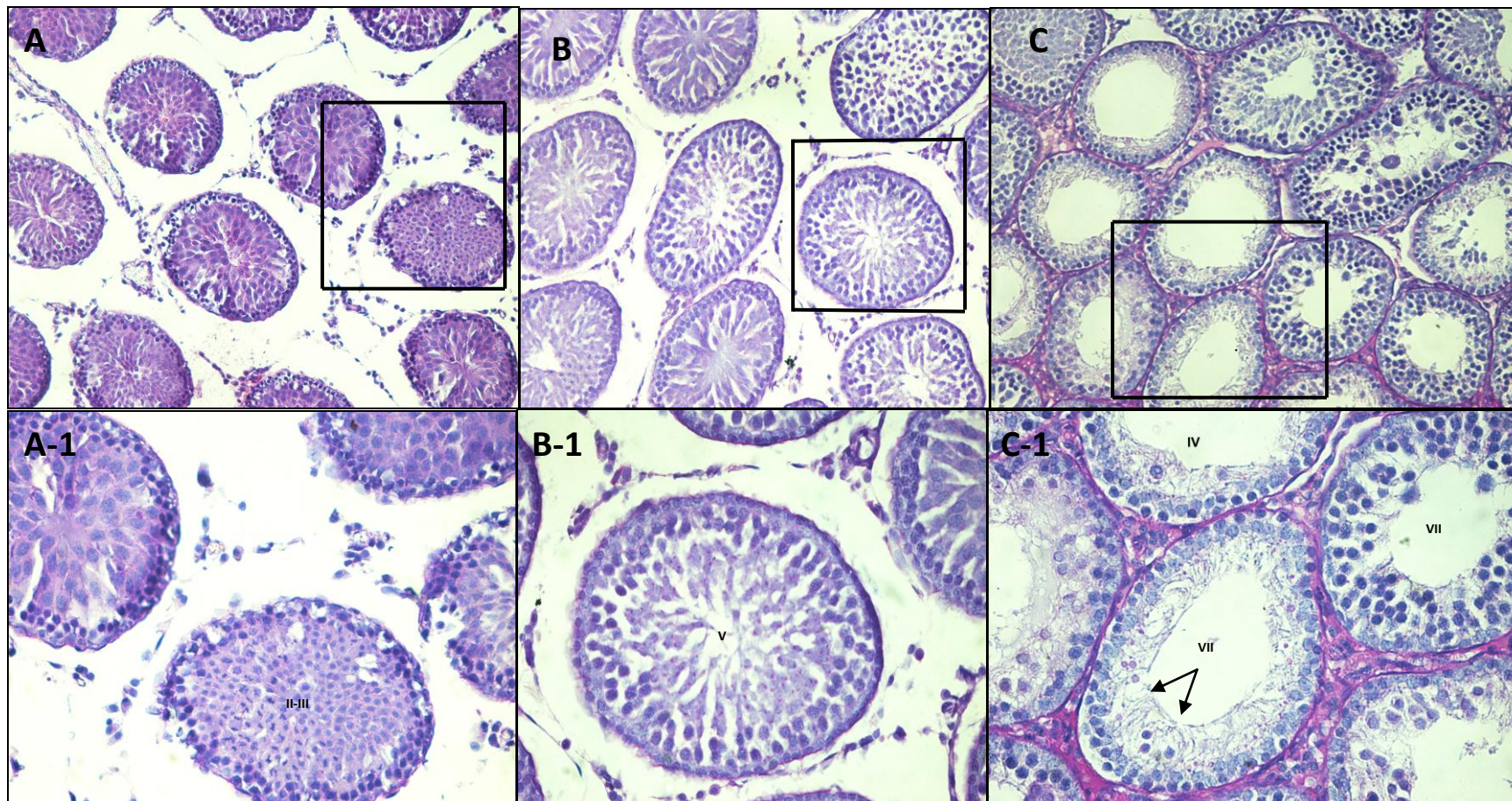


Figura 16. A: Fotomicrografía de testículo de animales testigo absoluto sacrificados a las 48 horas después de cumplir 30 días, teñidas por la técnica PAS (Reactivo de Schiff) en el que se observan los túbulos seminíferos normales (20 x); A-1: aumento (40x) en el que se observa tubulo en estadio II-III; B: Corte de testículo de animales tratados con Vh (20 x), sacrificados a las 48 horas postratamiento; B-1: aumento (40x), se observa tubulo en estadio V; C: Corte de testículo de animales que se inyectaron con pCA (20x) y sacrificados a las 48 horas, en el que se observan túbulos seminíferos con muerte celular masiva en el epitelio germinal, C-1: aumento (40x) en el que se observan tubulos con disminución celular masiva, en la etapa IV y VII. Los números romanos indican el estadio del túbulo y las flechas la pérdida celular.

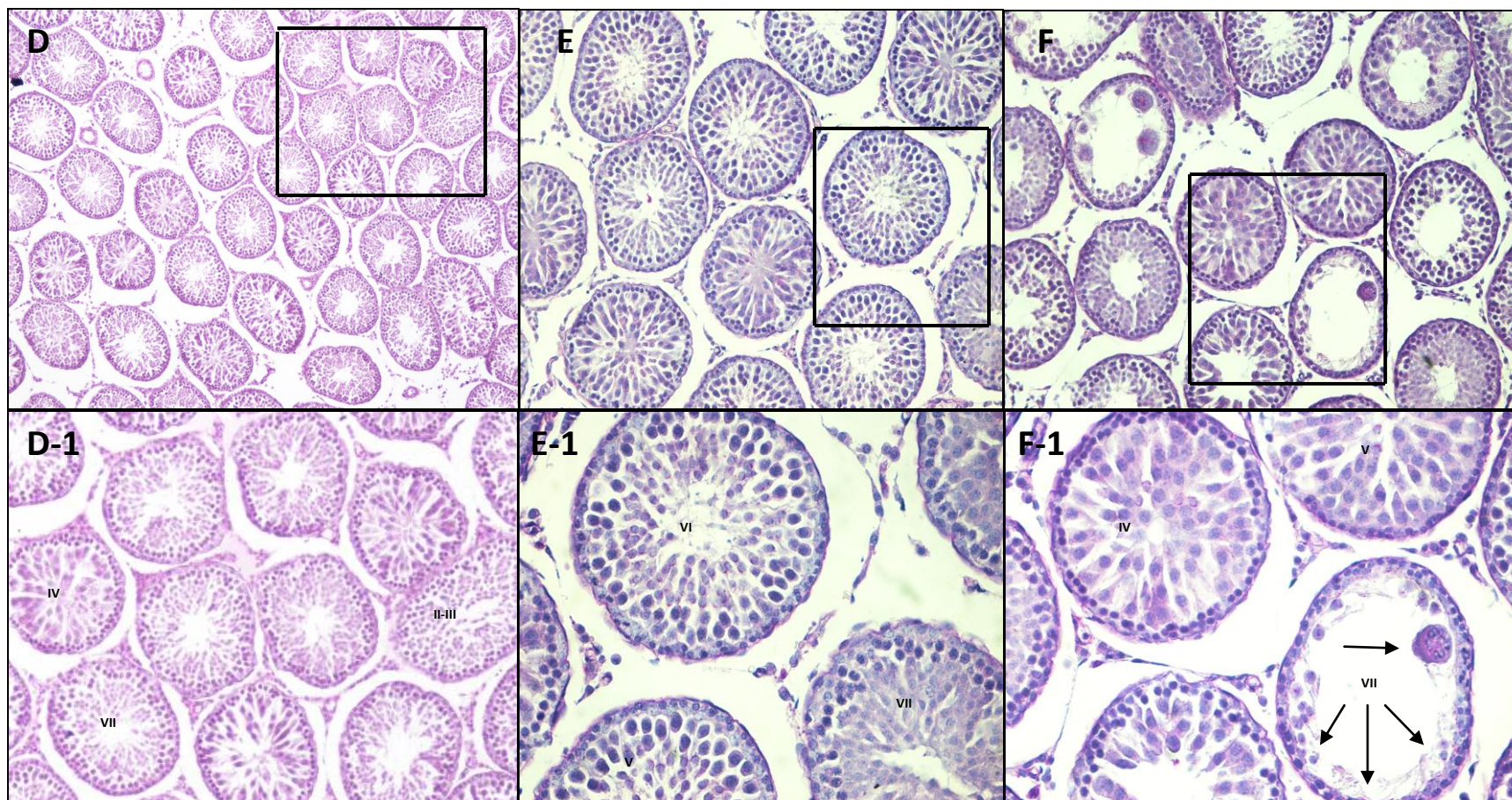


Figura 17. D: Fotomicrografía de testículo de animales testigo absoluto sacrificados a las 96 horas después de cumplir 30 días teñidos por la técnica PAS (Reactivo de Schiff), en el que se observan los túbulos seminíferos normales (20 x);**D-1:** aumento (40x) en el que se observa tubulo en estadio II-III, IV y VIII; **E:** Corte de testículo de animales tratados con Vh (20 x) y sacrificados a las 96 horas postratamiento;**E-1:** aumento (40x), en el que se señalan túbulos seminíferos en las etapas V, VI y VII; **F:** Corte de testículo de animales que se inyectaron con pCA (20x) y sacrificados a las 96 horas;**F-1:** aumento (40x), en el que se observan túbulos seminíferos con mayor deterioro celular a nivel del compartimiento adluminal en el estadio VII la flecha señala simplasto. Los números romanos indican el estadio del túbulo y las flechas la pérdida celular masiva.

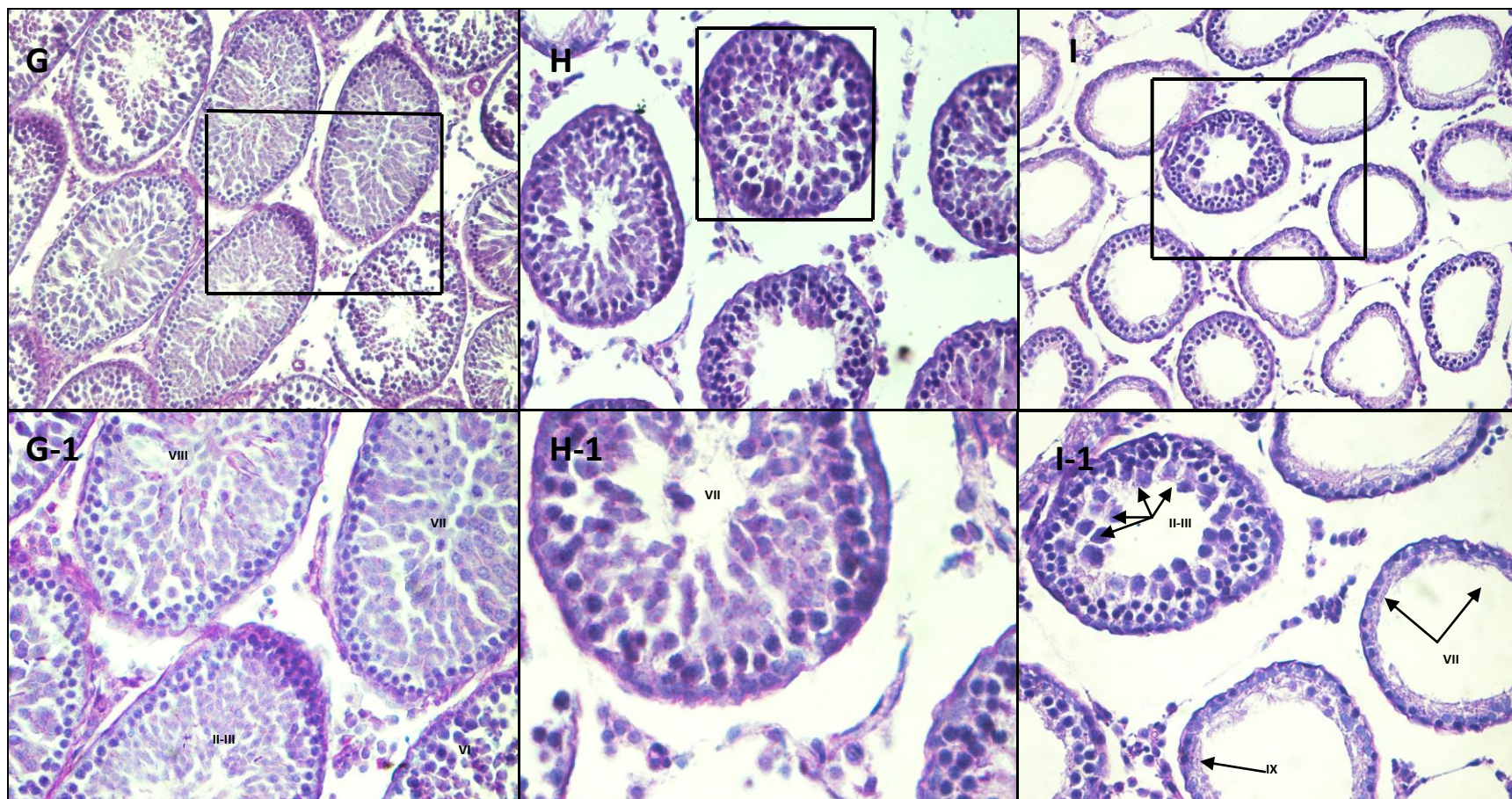


Figura 18. G: Fotomicrografía de testículo de animales testigo absoluto sacrificados a las 144 horas teñidas por la técnica PAS (Reactivo de Schiff) después de cumplir 30 días (20 x); G-1: aumento (40x), en el que se observan los túbulos seminíferos normales en los estadios II-III, VI, VII, y VIII; H: Corte de testículo de animales tratados con Vh (20 x) y sacrificados a las 144 horas postratamiento; H-1: aumento (40x), en el que se señala un túbulo seminífero en la etapa VII; I: Corte de testículo de animales que se inyectaron con pCA (20x), sacrificados a las 144 horas; I-1: aumento (40x), en el que se observan túbulos en estadio II-III, VII y IX, con muerte celular masiva donde las células se han reducido al compartimento basal únicamente, así mismo una gran cantidad de simplastos. Los números romanos indican el estadio del túbulo y las flechas la pérdida celular masiva.

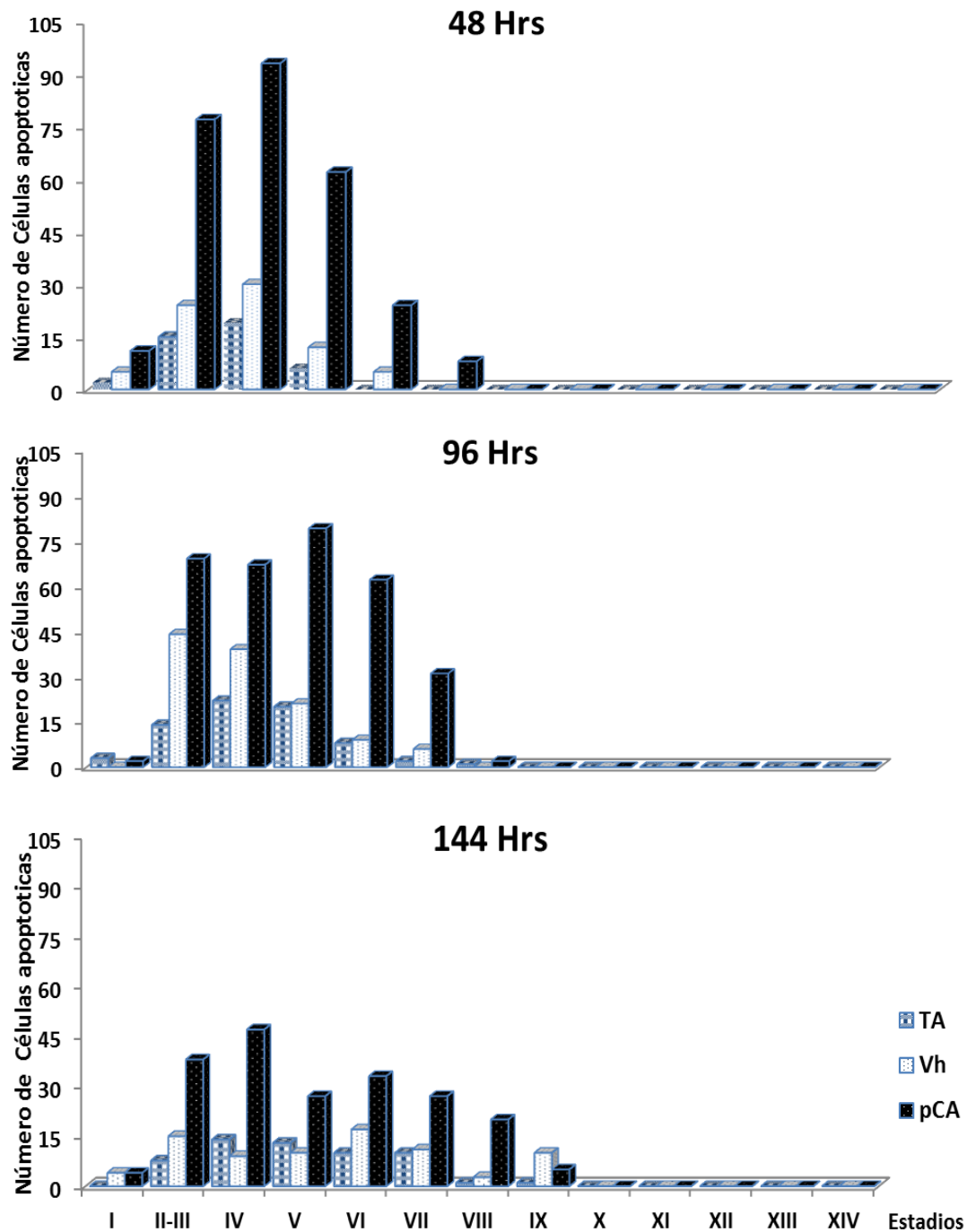


Figura 19. Distribución (Media \pm e.e.m.) de las células apoptóticas con base al estadio del ciclo del epitelio seminífero en los animales sacrificados a las 48, 96 ó 144 Hrs post tratamiento.

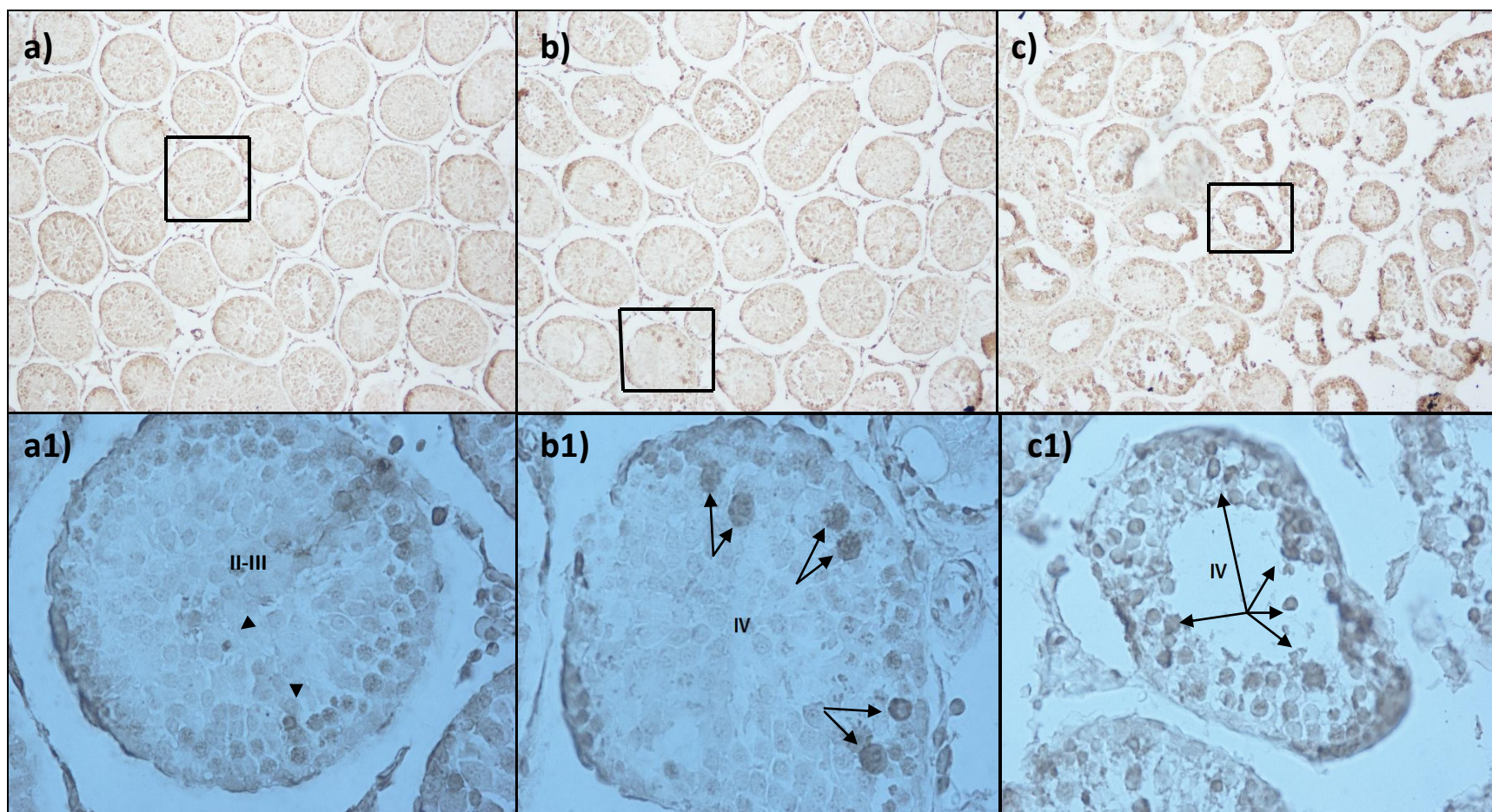


Figura 20. a) Sección de testículo de animal testigo absoluto sacrificados a las 48 horas después de cumplir 30 días, teñidas por TUNEL (40x); a1) aumento (60 x), en el que se observan túbulos seminíferos normales, la punta de flecha indica una célula apoptótica; b) Corte de testículo de animales tratados con Vh sacrificado a las 48 horas postratamiento (40x); b1) aumento (60 x), en el que se señala un túbulo seminífero en la etapas IV, podemos observar un mayor número de células apoptóticas; c) Corte de testículo de animales que se inyectaron con pCA, sacrificados a las 48 horas (40x); c1) aumento (60x), en el que se observan túbulos seminíferos con deterioro masivo celular, con gran cantidad de células apoptóticas, observadas con mayor pigmentación.

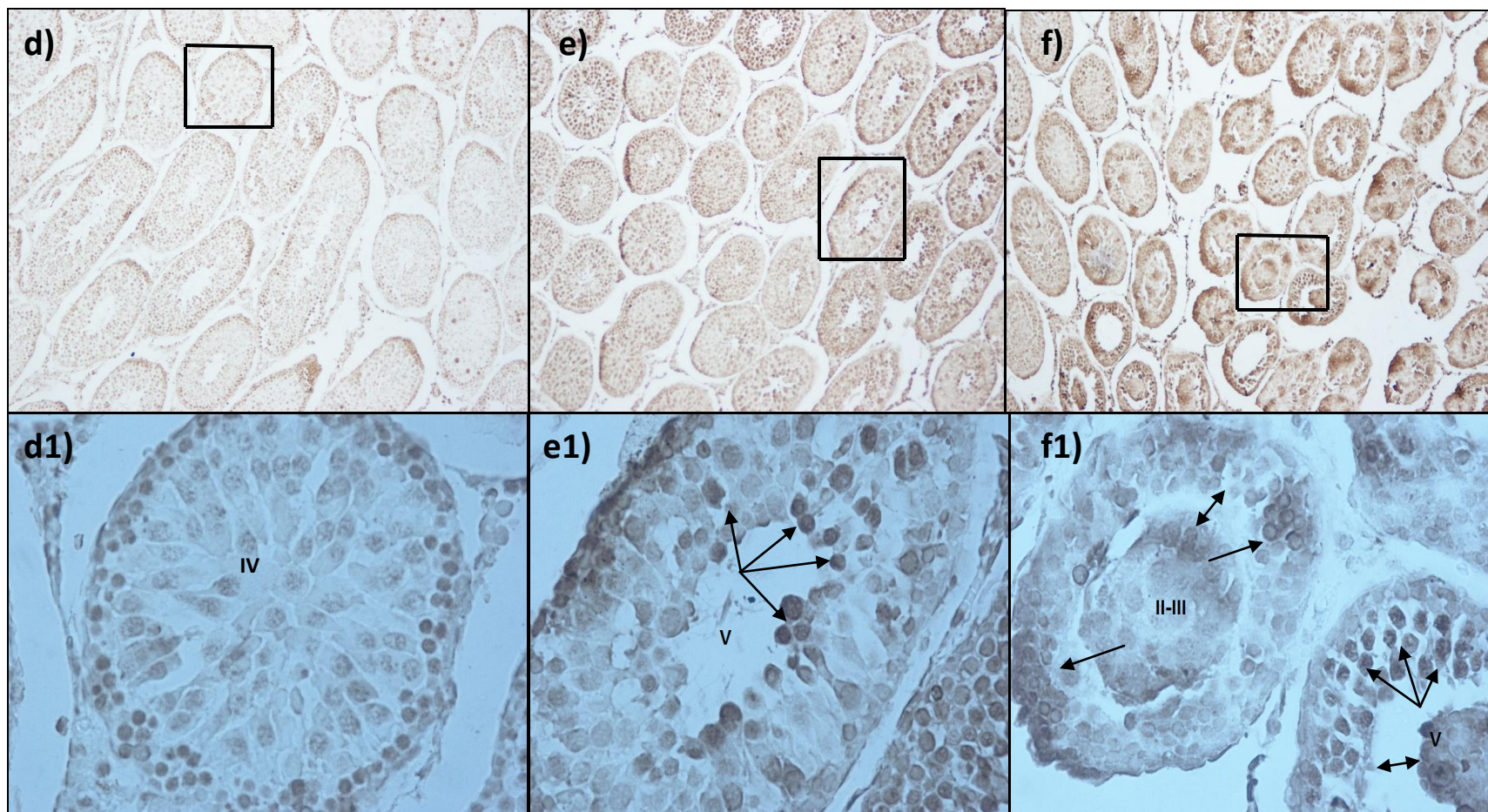


Figura 21. d) Sección de un testículo de animal testigo absoluto sacrificados a las 96 horas después de cumplir 30 días, teñidas por TUNEL (40x); d1) aumento (60x), en el que se observa un túbulo seminífero normal en estadio IV; e) Secciones de testículo de animales tratados con Vh, sacrificados a las 96 horas después de cumplir 30 días (40x); e1) aumento (60x), en el que se observa un mayor número de células apoptóticas en estadio V; f) Corte de testículo de animales tratados con pCA, sacrificados a las 96 horas postratamiento (40x); f1) aumento (60x), en el que se señalan túbulos seminíferos en la etapas II-III y V, podemos observar una marcada separación de células basales y adluminales así mismo un mayor número de células apoptóticas.

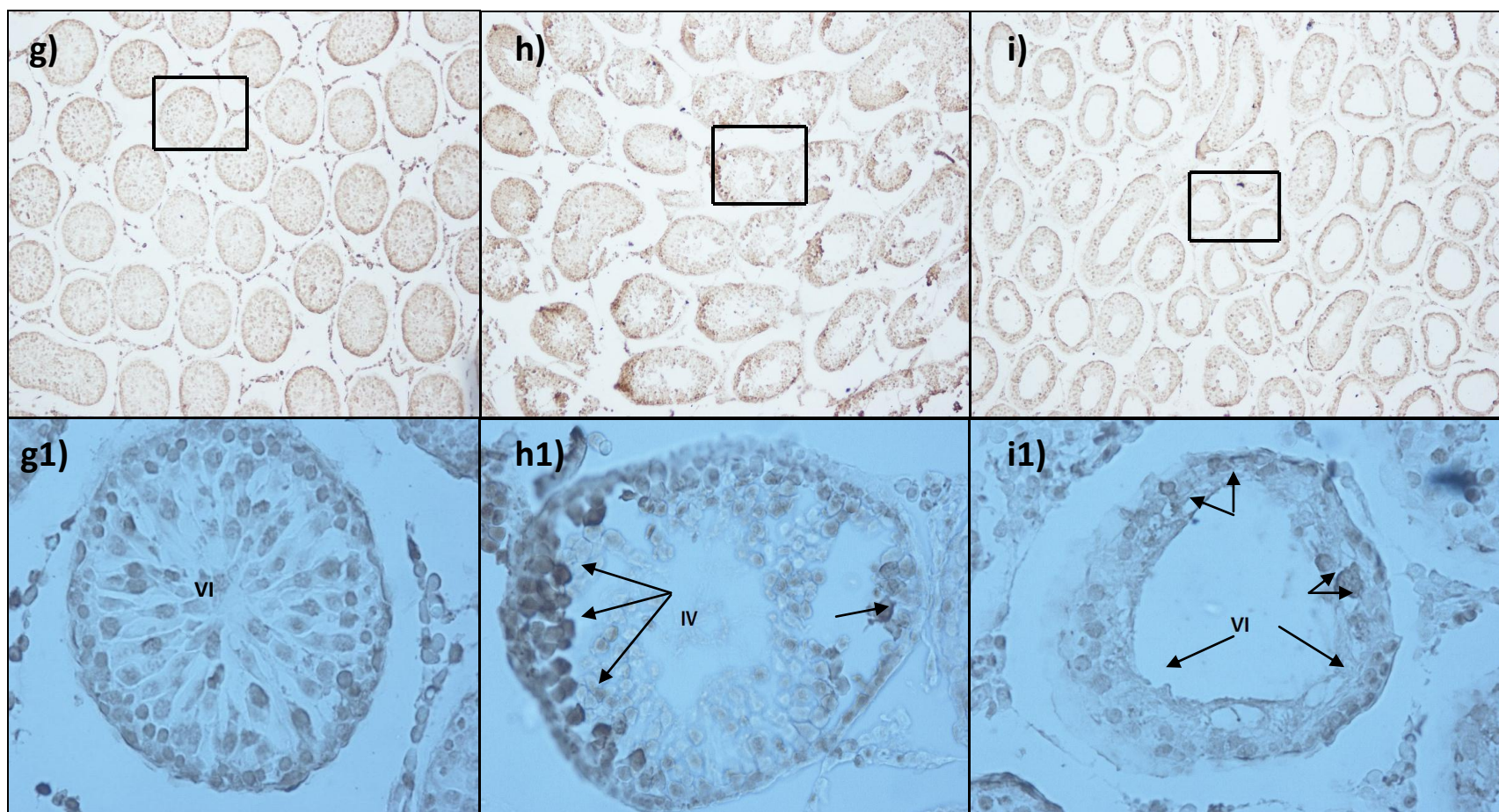


Figura 22. g) Sección de testículo de animal testigo abosoluto sacrificados a las 144 horas después de cumplir 30 días, teñidas por TUNEL (40x); g1) aumento (60x), en el que se observa un túbulo seminífero normales en estadio VI; h) Corte de testículo del grupo con Vh, sacrificado a las 144 horas (40x); h1) aumento (60x), en el que se observa un túbulo seminífero en estadio IV, con células apoptóticas; i) Sección de testículo de animal tratado con pCA, sacrificado a las 144 hrs (40x); i1) aumento (60x), se observa un túbulo en estadio VI con células apoptóticas, disminución significativa de las células principalmente en el lumen del tubulo, el deterioro masivo de la progenie celular así como la modificación de su estructura . Las flechas indican el deterioro masivo celular en el túbulo.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que el sistema serotoninérgico es esencial para el mantenimiento de la estructura del testículo, regulando el inicio de la espermatogénesis, así como en la secreción de testosterona. El hecho de que en el hipotálamo de los animales tratados con la pCA disminuyera la síntesis de serotonina y de testosterona y esto se acompañara de daño en el epitelio seminífero apoya esta interpretación.

La disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior y medio de los animales que se inyectaron con la pCA indica que la síntesis de la amina disminuyó. Estos resultados coinciden con lo reportado en bibliografía, donde se ha mostrado que cuando se administra este fármaco a ratas machos adultas disminuye la concentración de serotonina en el cerebro a las 48 hrs postratamiento, efecto que se mantiene hasta por 196 horas y posteriormente se inicia la recuperación del sistema (**Sekerke y col., 1975; Sanders-Bush y col., 1975; Colado, 2008**). Así mismo, la pCA inhibe la actividad de la enzima limitante en la síntesis de la serotonina, la triptófano hidroxilasa. A largo plazo este fármaco induce degeneración selectiva de las terminales serotoninérgicas, lo que conduce a la depleción de la caída en la concentración de serotonina en diferentes regiones del cerebro (**Prada y Álvarez, 1996; Sanders-Bush y col., 1975**).

Se sugiere que el daño que induce la pCA en el sistema serotoninérgico es similar al inducido por el MDMA, que estructuralmente es similar a la anfetamina que se utilizó en este estudio. Cuando en la rata se administra una sola dosis de MDMA (**Nordahl y co.l, 2003; Scott y col., 2007**) se induce la disminución en la densidad de las terminales y/o axones serotoninérgicos que a veces incluso afecta al cuerpo neuronal (**Colado, 2008; Itzhak y col., 2004**).

En nuestro estudio observamos que además de disminuir la concentración de serotonina, se modificó el metabolismo de la amina, ya que en el hipotálamo

anterior y medio se observó la disminución en la concentración del metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético, que se forma por la acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO), en relación a esto se ha observado que la pCA bloquea la actividad de esta enzima **(Sekerke y col., 1975; Utrilla 2000; Sander-Bush, 1975)**. La disminución en la concentración del metabolito se asocia con la menor concentración de 5-HT, ya que al disminuir no se cuenta con la concentración del sustrato suficiente que se transforme en el 5-HIAA **(Sekerke y col., 1975; Shennawy, 1998)**.

La disminución en la síntesis y metabolismo de la serotonina posiblemente se asocien a la modificación de los contactos sinápticos en los que participa las neuronas que sintetizan la amina conduciendo a que las diferentes funciones en las que está involucrada este sistema de neurotransmisión se modifiquen, tal es el caso de la secreción de la GnRH y como consecuencia de las gonadotropinas. En el hipotálamo anterior se localizan los somas de las neuronas que producen la GnRH y en el medio las terminales de estas neuronas **(Justo y col., 1989)**, con base en estas evidencias anatómicas, es posible pensar que la disminución en la concentración de serotonina y de su metabolito en el hipotálamo de los animales que se trataron con la pCA se acompañó de la modificación en la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas. No se ha demostrado que exista localización del ácido ribonucleico mensajero de los receptores a serotonina 5-HT1 o 5-HT2 en las neuronas que secretan la GnRH **(Wright y Jennes, 1993)**. Sin embargo, existe el sustento anatómico que apoya la idea de que la serotonina modifica la actividad de las neuronas del área preóptica que producen la GnRH, vía sus terminales que están en yuxtaposición con las neuronas GnRHérgicas **(Kiss y Halász, 1985)**.

En diferentes estudios se propone que la serotonina tiene dos funciones importantes en la modulación de la secreción de las gonadotropinas, como inhibidor o estimulador, lo cual depende de la edad y del sexo del animal de estudio **(Moguilevsky y col., 1985; Shishkina y Dygalo, 2000; Berger y col., 2009; Aragón y col., 2005)**. En relación a esto mostramos en nuestro estudio que en los

animales en los que se les administró la pCA no se modificó la secreción de FSH, mientras que la de LH disminuyó a partir de las 96 horas postratamiento, lo que nos permite plantear que en la rata macho juvenil, la serotonina modula de manera diferencial la secreción de gonadotropinas, debido a que no participa en la modulación de la secreción de FSH y es esencial en la de LH. Este efecto diferencial de la serotonina posiblemente se asocie a la existencia de un factor liberador para cada gonadotropina. En relación a esto se ha planteado que además del factor liberador de la LH, el LHRH hay un factor liberador para la FSH, el FSHRH. Además, la estimulación o lesión en la región preóptica medial puede aumentar o suprimir la liberación de LH respectivamente sin modificar la secreción de FSH (**McCann y col., 2002**). Con base en esto es posible que las neuronas secretoras de estos factores expresen o no alguno de los diferentes subtipos de receptores a serotonina, lo cual se refleja en un efecto diferencial en la secreción de las gonadotropinas.

El hecho de que en los animales que se les administró la pCA no se modifica la concentración de LH en los animales sacrificados a las 48 hrs., y si disminuyera a las 96 y 144 hrs. posiblemente se asocie al tipo de receptor a serotonina que se expresa en los animales estudiados a los diferentes periodos. En modelos animales se ha mostrado que la serotonina ejerce ambos efectos, estimulatorio e inhibitorio en la modulación de la secreción de la GnRH, dependiendo del subtipo de receptor a serotonina que se exprese en ese momento y de la ruta de señalización que se active (**Hery y col., 1997; Pelletier, 1995**).

Los cambios observados en la concentración de LH en el suero de los animales tratados con pCA posiblemente también sean el resultado de la modificación del funcionamiento de la hipófisis. En apoyo a esta idea se ha mostrado que esta glándula contiene serotonina (**Payette y col., 1986**) y convierte el triptófano en serotonina (**Saavedra y col., 1975**). Además en el lóbulo anterior de la hipófisis se expresan los receptores a serotonina del tipo 5-HT₄, 5-HT₅ y 5-HT₆ (**Papageorgiou y Deneff, 2007**).

La LH al unirse a sus receptores de membrana en la célula de Leydig desencadena una cascada de señalización que culmina con la activación de los complejos enzimáticos que participan en la síntesis de testosterona (**Tobin y col., 1997; McCann y col., 2001**). Por ello, la disminución en la concentración de testosterona observada en los animales inyectados con pCA, posiblemente es el resultado de la disminución en la concentración de LH. Sin embargo, esto no se aplica en los animales sacrificados a las 48 horas, dado que en este grupo de animales no se observó la disminución en la concentración de LH.

Otra posible explicación a la menor concentración de testosterona observada en los animales que se les administró la pCA puede ser el resultado de la acción del fármaco directamente en el testículo. Esta idea se sustenta en las evidencias que han mostrado que en el testículo se encuentra la serotonina cuyo origen son los mastocitos, la síntesis de *ново* en las células de Leydig.

La FSH, la LH y la testosterona actúan de forma coordinada en la regulación de la espermatogénesis (**Levy y col., 2006**), si se interfiere o modifica la secreción de alguna de ellas, como ocurrió con la disminución de LH y testosterona, al administrar la pCA, se altera el desarrollo del ciclo del epitelio seminífero y como consecuencia la espermatogénesis.

En nuestro estudio la disminución en la concentración de testosterona que se inyectaron con pCA, se acompañó de la muerte de algunos tipos celulares del epitelio germinal y del incremento en el número de túbulos anormales. Las células germinales del estadio I y II-III (espermatogonias y espermatoцитos) resultaron ser las más dañadas, dado que se ha mostrado que la testosterona estimula la división meiótica de las células germinales y la transformación de la espermátide a espermatozoide (**Billig y col., 1995; Derradji y Baatout, 2003; Walczak-Jędrzejowska y col., 2007**).

La FSH y la LH actúan en el testículo estimulando la secreción de varios factores secretados por la propia gónada y que son esenciales para mantener la proliferación celular, cualquier disminución en la concentración tanto de LH como de FSH se traduce en la disminución del diámetro del túbulo seminífero (**Katzenellenboger, 1997; Moguilevsky y col., 1985; Chemes y col., 1979**), como ocurrió en los animales tratados con pCA. Otra posible explicación a la disminución del diámetro del túbulo seminífero es el incremento en la muerte por apoptosis de algunos tipos celulares que conforman el epitelio seminífero,

Tres factores son determinantes para el inicio de la apoptosis de las células germinales masculinas: 1) la etapa de desarrollo del animal; 2) concentraciones séricas de testosterona y de gonadotropinas, sobre todo la FSH; 3) etapa específica del ciclo del epitelio seminífero (**Billig y col., 1995**). Con base en esto, el incremento en la apoptosis observada en los animales a los que se les administró pCA se correlaciona con la disminución en la concentración de testosterona, hormona que se considera un factor que inhibe la apoptosis en las células germinales (**Derradji y Baatout, 2003**).

CONCLUSIONES

- ❖ En la rata macho prepúber, la serotonina es esencial en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del testículo.
- ❖ En la rata macho prepúber, la pCA disminuye la síntesis y metabolismo de la serotonina.
- ❖ La serotonina participa de manera diferencial en la regulación de la secreción de las gonadotropinas en la rata macho prepúber, ejerce un efecto estimulante en la de LH y no participa en la secreción de FSH.
- ❖ La pCA actúa directamente en el testículo de la rata prepúber, e inhibe la síntesis de testosterona.
- ❖ La disminución en la concentración de testosterona estimula la muerte de las células germinales en el testículo.

Bibliografía:

- **Adams AL., Steiner AR., (1988).** Puberty. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 18: 1-52.
- **Aguilar E., Pinilla L., Tena-Sempere M., Bellido C., Gaytán F. (1997).** La pubertad masculina y femenina. En: *La evolución de la sexualidad y los estados intersexuales*, **Botella J. y Fernández A. (Eds.)**. Díaz de Santos y Fundación Gregorio Marañón, Madrid España, 163-177pp.
- **Alexander M., Rothman RB., Baumann MH., Endres ChJ., Brasic JR., Wong DF. (2005).** Noradrenergic and Dopaminergic Effects of (+)-Amphetamine-Like stimulants in the Baboon *Papio anubis*. *Synapse*, 56: 94-99.
- **Aragón MA., Ayala ME., Marín M., Avilés A., Damian-Matsumura P., Domínguez R. (2005).** Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction*, 129:717–727.
- **Archer T. (1982).** Serotonin and fear retention in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 96:491-516.
- **Ayala ME. (2009).** Brain serotonin, psychoactive drugs, and effects on reproduction, *Central Nervous System Agents in Medical Chemistry*, 9(4):258-76.
- **Bartke A. (1995).** Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon?. *Endocrinology*, 136:3-4.
- **Becu-Villalobos D., Lacau-Mengido IM., Libertun C. (1989).** Developmental Changes in FSH secretion induced by 5-hidroxitriptophan, nalaxone and haloperidol in male and female rats. *Developmental Brain Research*. 47: 181-186.
- **Berger M., Gray JA., Roth BL., (2009).** The Expanded Biology of Serotonin. *Review of Medicine*, 60:355–366.
- **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.

- **Billig H., Furuta I., River C., Tapanainen J., Parvinen M., Hsueh AJ. (1995).** Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology*, 136:5-12.
- **Brokelmann J. (1963).** Fine structure of germ cells and Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 59: 820-850.
- **Budziszewska B., Jaworska-Feil L., Lason W. (1996).** The effect of repeated amphetamine and cocaine administration on adrenal, gonadal and thyroid hormone levels in the rat plasma. *Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes*, 104; 334-8
- **Camí J., Farré M. (1996).** Éxtasis, la droga de la Ruta del Bakalao. *Medic Clinic.* 106:711-716.
- **Casabiell X. (2006).** Eje Hipotálamo-Hipófiso-Testicular. En: *Endocrinología. Arce VM., Catalina PF. y Mallo F. (Eds.)* Primera Edición, Universidad de Santiago de Compostela, España 89-95pp.
- **Chemes He., Dym M., Raj Hgm. (1979).** The Role of Gonadotropins and Testosterone on Initiation of Spermatogenesis in the Immature Rat. *Biology of Reproduction* 21: 241-249.
- **Clermont Y., Trott M. (1969).** Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-Thymidine and radioautography. *Fertility and Sterility*, 20: 805-817.
- **Colado MI. (2008).** Éxtasis (MDMA): estudios neurobiológicos en el laboratorio. *Trastornos Adictivos*, 10(3):183-189.
- **Colado MI., Lorenzo P. (1995).** MDMA (Éxtasis): Farmacología y Toxicología. En: *Éxtasis aspectos Farmacológicos, psiquiátricos y médico-legales: Bobes J. (Eds.)* Segunda Edición. Citrán, Barcelona, 1-46pp.
- **De Rooij DG., Russell LD. (2000).** All You Wanted to Know About Spermatogonia but Were Afraid to Ask. *Journal of Andrology*, 21: 776-798.
- **Derradji H., Baatout S. (2003).** Apoptosis: A Mechanism of Cell Suicide, in vivo, 17:185-192.

- **Dym M., Clermont Y. (1970).** Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *American Journal of Anatomy*, 128, 265-282.
- **Eaker S., Pyle A., Cobb J., Handel MA. (2001).** Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *Journal of Cell Science*, 114: 2953-2965.
- **Escohotado A. (1995).** MDMA. En: *Historia General de las Drogas, Tomo II*, Editorial Alianza, España, Capítulo 20:560-566pp.
- **Feldman JM., Lee EM. (1985).** "Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid". *The American Journal of Clinical Nutrition*, 42 (4): 639–43.
- **Fink G. (2000).** Neuroendocrine Regulation of Pituitary Function. En: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine: Conn MP., Freeman ME. (Eds.)* One Edition, Humana Press, E.U, 107-135pp.
- **Frazer A., Hensler JG. (1999).** Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. En: *Serotonin. Siegel JG., Agranoff BW., Albers RW., Molinoff PB. (Eds.)* Six Editions. Lippincott Williams and Wilkins. USA. Philadelphia. 264-292pp.
- **Fuller RW. (1992).** Effects of p-chloroamphetamine on brain serotonin neurons. *Neurochemical Research*.17(5); 449-456.
- **Ganong WF. (2004).** Bases Generales y Celulares de la Fisiología Médica En: *Fisiología Médica. Decima novena Edición, Manual Moderno, España, 10-22 pp.*
- **Gartner L. (1995).** Aparato Reproductor del Macho. N En: *Atlas color de histología, Segunda Edición, Medica Panamericana, Argentina, Capítulo18:342-359 pp.*
- **Gartner L., Hiatt JL. (2008).** Aparato Reproductor del Macho. En: *Texto Atlas de Histología, Tercera Edición, McGrawHill, China, 489-510 pp.*
- **Gerra G., Zaimovic A., Ferri M., Zambelli U., Timpano M., Neri E., Marzocchi GF., Delsignore R., Brambilla F. (2000).** Long-Lasting Effects of

- 3,4-Methylene-dioxymethamphetamine (Ecstasy) on serotonin system function in humans. *Biology Psychiatry*, 47: 127-136.
- **Gottfries CG. (1990).** Disturbance of the 5-hydroxytryptamine metabolism in brains from patients with Alzheimer's dementia, *Neural Transmitt*, 30 Supplement, 33-43.
 - **Griswold MD. (1988).** Protein secretion of Sertoli cells. *International Review of Cytology*, 110: 133-156.
 - **Hery M., Francois_Bellar AM., Hery F., Deprez P., Becquet D. (1997).** Serotonin directly stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from Gt1 cells via 5-HT₇ receptors. *Endocrine*, 7: 261-265.
 - **Igual MM. (1993).** El mundo de la Serotonina y sus Receptores: Aspectos Fisiopatológicos, Clínicos y Terapéuticos. *Medicina Clínica*, 101(4): 144-153.
 - **Itzhak Y., Achat-Mendes CN., Ali SF., Anderson KL. (2004).** Long-lasting behavioral sensitization to psychostimulants following *p*-chloroamphetamine-induced neurotoxicity in mice. *Neuropharmacology*, 46:74-84.
 - **Jégou B. (1993).** Sertoli-germ cell communication network in mammals. *International Review of Cytology*, 147: 25-96.
 - **Jessel TM. (2000).** Neurobiología de la conducta. En: *Principios de Neurociencia. Kandel RE., Schwartz JH. (Eds.) Cuarta Edición.* McGraw Hill Interamericana, E.U., 35-40 pp.
 - **Jeyaraj DA., Grossman G., Petrusz P. (2003).** Dynamics of testicular germ cell apoptosis in normal mice and transgenic mice overexpressing rat androgen-binding protein. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1: 48-61.
 - **Justo SN., Rossano GL., Szwarcfarb B., Rubio MC., Moguilevsky JA (1989).** Effect of serotonergic system on FSH in male and female rats: evidence for stimulatory and inhibitory actions. *Neuroendocrinology*, 50:382–386.
 - **Katzenellenboger B. (1997).** General considerations of hormones. En: *Hormones. Norman AW., Litwack G. Second Edition,* Academic Press, E.U., Reino Unido, London, 10-33 pp.

- **Kiss J., Hálasz B. (1985).** Demonstration of serotonergic axons terminating on luteinizing hormone releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography. *Neuroscience* 14: 69-78.
- **Levy MN., Stanton BA., Koeppen BM. (2006).** Reproducción masculina. En: *Fisiología Berne y Levy*, Sexta Edición, Editorial Elsevier Mosby, España., 716-721.
- **Mahmoud H., Lunenfeld E., (2004),** Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors, *Asian Journal Andrology*, 6: 259-268.
- **Manzana EJP., Chen WA., Champney TH. (2001).** Acute melatonin and para-chloroamphetamine interactions on pineal brain and serum serotonin levels as well as estress hormone levels. *Brain Research*, 909: 127-137
- **McCann SM., Karanth S., Mastronardi CA., Dees WL., Childs G., Miller B., Sower S., Yu WH. (2002).** Hypothalamic control of gonadotropin secretion. En: *Progress in Brain Research*, Vol. 141, Parhar, IS. (Ed.) Chapter 11.
- **McCann SM., Karanth S., Mastronardi CA., Dess WL., Childs G., Miller B., Sower S., Yu WH. (2001).** Control of Gonadotropin Secretion by Follicle-Stimulating Hormone-Releasing Factor, Luteinizing Hormone-Releasing Hormone, and Leptin. *Archives of Medical Research*, 32: 476-485.
- **Mclachlan R.I., O'donnell L., Meachem SJ., Stanton PG., De Kretser, Pratis K., Robertson DM. (2002).** Identification of Specific Sites of Hormonal Regulation in Spermatogenesis in Rats, Monkeys, and Man. *The Endocrine Society*, 57:149-179.
- **Miething A. (1992).** Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of golden hamster. *Cell Tissue Research*, 267: 583-590.
- **Moguilevsky JA., Faigon MR., Rubio M., Scacchi P., Szwarcfarb B. (1985).** Sexual differences in the effects of serotonin on LH secretion in rats. *Act Endocrinology*, 109:320–325.
- **Nordahl ED., Salo R., Leamon M. (2003).** Neuropsychological Effects of Chronic Methamphetamine Use on Neurotransmitters and Cognition: A

- Review. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 15:317–325.
- **Oakberg EF. (1956).** Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithellium. *American Journal of Anatomy*, 99: 507.
 - **Ojeda RS., Urbanski FH. (1994).** Puberty in the Rat. En: *The Physiology of Reproduction* vol. 2 chapter 40, Raven Press Ltd., New York, 363-404 pp.
 - **Papageorgiou A., Deneff C. (2007).** Estradiol induces expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT) 4,5-HT5, and 5-HT6 receptor messenger ribonucleic acid in rat anterior pituitary cell aggregates and allows prolactin release via the 5-HT4 receptor. *Endocrinology*, 148: 1384-1395.
 - **Payette RE., Gershon MD., Nunez EA. (1986).** Colocalization of luteinizing hormone and serotonin in secretory granules of mammalian gonadotrops. *Ant. Rec.*, 215: 51-58.
 - **Pelletier G. (1995).** Involvement of serotonin in the regulation of GnRH gene expression in the male rat brain. *Neuropeptides*, 29: 21-25.
 - **Prada C., Álvarez FJ. (1996).** MDMA o éxtasis: aspectos farmacológicos, toxicológicos y clínicos. *Medicina Clínica*, 107(14): 549-555.
 - **Print CG., Loveland KL. (2000).** Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bio Essays*, 22: 423-430.
 - **Ramaley JA., (1979).** Development of Gonadotropin Regulation in the Prepubertal Mammal. *Biology of Reproduction*, 20: 1-31.
 - **Rapport MM., Green AA., Page IH. (1948).** Serum vasoconstrictor (serotonin): IV. Isolation and characterisation. *Journal Biology Chemistry* 176: 1.243-1.251.
 - **Ricaurte GA., McCANN UD. (1992).** Neurotoxic Amphetamine Analogues: Effects in Monkeys and Implications for Humans. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, 11; 648:371-82.
 - **Rodriguez I., Ody C., Araki K., Gucia I., Vassalli P. (1997).** An early and massive wave of terminal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBOJ*, 16:2262-2270.

- **Roiser JP., Rogers RD., Sahakian BJ. (2007).** Neuropsychological function in ecstasy users: a study controlling for polydrug use, *Psychopharmacology (Berl)*, 189(4): 505–516.
- **Roosen-Runge EC. (1973).** Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35: 339-348.
- **Ross KP. (2005).** *Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular Y Molecular*, 4ta ed., Editorial Panamericana., Argentina, Capitulo 21:684-726 pp.
- **Russell LD., Ettlín RA., Sinha Hikim AP., Clegg ED. (1990).** Histological and Histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, USA.1-40pp.
- **Russell LD., Kershaw M., Borg KE., Shennawy A., Rulli SS., Gates RJ., Calandra RS. (1998).** Hormonal Regulation of Spermatogenesis in the Hypophysectomized Rat: FSH Maintenance of Cellular Viability During Pubertal Spermatogenesis, *Journal of Andrology*, 19:308-319.
- **Saavedra JM., Palkovits M., Kizer JS., Brownstein M., Zivin JA. (1975).** Distribution of biogenic amines and related enzymes in the rat pituitary gland. *J. Neurochemical.*, 25: 257-260.
- **Sanders-Bush E., Bushing JA., Sulser F. (1975).** Long-Term effects of P-Chloroamphetamine and related drugs on central serotonergic mechanisms, *The Journal of Pharmacology Andexperimental Therapeutics*, 192: 33-41.
- **Scott JC., Steven PW., Matt GE., Meyer RA., Heaton RK., Atkinson H., Grant I.(2007).** Neurocognitive Effects of Methamphetamine: A Critical Review and Meta-analysis. *Neuropsychology review*, 17:275–297.
- **Scott JC., Woods SP., Matt GE., Meyer RA., Heaton RK., Atkinson JH., Grant I. (2007).** Neurocognitive Effects of Methamphetamine: A Critical Review and Meta-analysis, *Neuropsychology Review*, 17:275–297.
- **Sekerke HJ., Smith HE., Bushing JE. (1975).**Correlation between brain levels and Biochemical effects of the optical isomers of P-Chloroamphetamine, *The Journal of Pharmacology And experimental Therapeutics*, 193:835-844.

- **Shennawy A., Gates RJ., Russell LD. (1998).** Hormonal Regulation of Spermatogenesis in the Hypophysectomized Rat: Cell Viability After Hormonal Replacement in Adults After Intermediate Periods of Hypophysectomy. *Journal of Andrology*, 19: 320-334.
- **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. Toxicology & Pharmacology*, 125: 45-51.
- **Sinha Hikim AP., Swerdloff RS. (1999).** Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis, *Reviews of Reproduction*, 4:38–47.
- **Skinner MK. (1991).** Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, 12: 45-77.
- **Sofikitis N., Giotitsas N., Tsounapi P., Baltogiannis D., Giannakis D., Pardalidis N. (2008).** Hormonal Regulation of Spermatogenesis and Spermogenesis, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109: 323-330.
- **Sreranka LR., Sander-Bush E. (1978).** Long-Term Reduction of Brain Serotonin by p-Chloroamphetamine: Effects of Inducers and Inhibitors of Drug Metabolism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 206(2): 460-467.
- **Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca DR., Dafau ML. (1993).** Serotonin Different secretion from Rat Leydig cells. *Endocrinology*, 133(6): 3026-3029.
- **Tobin VA., Millar RP., Canny BJ. (1997).** Testosterone acts directly at the pituitary to regulate gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotropes. *Endocrinology*, 138: 3314-3319.
- **Tortora GJ., Anagnostakos NP. (1984).** *Principios de Anatomía y Fisiología*, Tercera Edición, Editorial Harla, México, 904-915.
- **Utrilla P. (2000),** Aspectos farmacológicos de las anfetaminas, *Ars. Pharmaceutica*, 41(1): 67-77.
- **Vernon RG., Go VLW., Fritz IB. (1975).** Hormonal Requirements of the Different Cycles of the Seminiferous Epithelium During Reinitiation of

- Spermatogenesis in Long-Term Hypophysectomized Rats, *Journal of Reproduction of Fertility*, 42:77-94.
- **Waeber CH., Schoeffter P., Hoyer D., Palacios JM. (1990).** The serotonin 5-HT_{1D} receptor: a progress review. *Neurochemistry Research*, 15: 567-582.
 - **Walczak-Jedrzejska R., Slowikoska-Hilczer J., Marchlewska 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. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45:59-64.
 - **Webb SJ., Harrison DJ., Wyllie AH. (1997).** Apoptosis: An Overview of the Process and Its Relevance in Disease. En: *Apoptosis (Pharmacological Implications and Therapeutic Opportunities)* **Kaufmann SH. (Eds.)** Primer Edición, Academic Press, 41:1-28 pp.
 - **Weis L. (1988).** The tissue. En: *Cell and Tissue Biology: A Textbook of Histology*, **Johnson PR. and Greenwood MRC. (Eds.)** Sexta Edición, Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 191-209 pp.
 - **Wiley-Liss, Clermont Y. (1963).** The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, 112:35-52.
 - **Wright DE., Jennes L. (1993).** Lack of expression of serotonin receptor subtype 1a, 1c, and 2-mRNA in gonadotropin-releasing hormone producing neurons of the rat. *Neuroscience. Lett.*, 163: 1-4