



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**EFFECTO DE LA INYECCIÓN INTRATESTICULAR DE
P-CLOROANFETAMINA EN LA ETAPA JUVENIL EN
LA ESPERMATOGÉNESIS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA
PRESENTA:

ANA LAURA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR



MÉXICO, D.F

septiembre 2014

Ana Laura Rodríguez Gutiérrez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DE LA INYECCIÓN INTRATESTICULAR DE P-CLOROANFETAMINA
EN LA ETAPA JUVENIL EN LA ESPERMATOGÉNESIS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA PRESENTA:

ANA LAURA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

Realizado 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-223714

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento en especial a la Dra. Ma. Elena Ayala Escobar directora de esta tesis, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación, por sus consejos en el ámbito académico pero también en lo personal y el apoyo incondicional todo este tiempo, hoy puedo asegurar que no me arrepiento de haber tocado las puertas de pubertad.

Quisiera hacer extensiva mi agradecimiento al Dr. Andrés Aragón Martínez por su asesoría y colaboración, aporte, disposición y sus valiosos y sinceros consejos en la realización de la tesis.

Por supuesto a la Dra. Juana Monroy Moreno por tener siempre la disponibilidad de ayudar con los equipos de cromatografía y por formar parte de mi desarrollo académico inmuchas Gracias!

También quiero dar las gracias a la Dra. Jessica Romero Reyes, por su apoyo, consejos y amistad que hicieron siempre amena mi estancia en el laboratorio a lo largo de la tesis.

De igual manera mi agradecimiento a los maestros en Biología de la Reproducción Animal Cindy Rivas Arzalez y Jesús Quezada Vidal por su colaboración en la realización de la presente tesis.

A los miembros del Jurado:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Juana Monroy Moreno

Ma. en IBSH Angélica Flores Ramírez

Bíol. Carlos Martínez Montoya

Por sus valiosas aportaciones en el desarrollo de la tesis y mi formación académica, a todos ustedes muchas gracias.

A Juan Carlos López Santiago (Juanito) por su ayuda en el trabajo experimental, y sobre todo su buen humor y por todos los momentos compartidos durante la realización del presente trabajo muchas gracias.

A la UNAM, por permitirme conocer excelentes profesores, amigos que me brindaron su apoyo a lo largo de mi formación académica, para lograr llegar al final de mi carrera profesional

Dedicatorias

Quiero dedicar esta tesis a todas las personas que a lo largo de este gran camino me acompañaron:

Primeramente a mi abuelo Juan Arturo Rodríguez y Sánchez que aunque te nos adelantaste estas presente en mis recuerdos, gracias por ser mi padre y mi abuelo, por los valores inculcados, por sus consejos y por ese amor incondicional que me dio a lo largo del tiempo que dios le permitió estar a mi lado lo quiero mucho y lo extrañare por siempre.

A mi abuela y madre Josefina Gutiérrez Barrientos por estar siempre conmigo y quererme incondicionalmente, te quiero mucho, te dedico esta tesis por tu apoyo a lo largo de este tiempo, por los consejos tan valiosos que me das y por soportarme siempre eres lo máximo mi (bolita). Abuelos sientan este logro suyo nada de esto hubiese sido posible si ustedes no hubieran estado a mi lado.

A Rocío Rodríguez Gutiérrez madre este logro también es tuyo, por ese apoyo constante , por el amor incondicional que siempre tienes para mí, por ser cómplice y amiga, pero sobre todo por ser esa gran guerrera que siempre me enseño que no importa cómo se presente la situación, que lo importante es luchar y salir adelante de verdad te admiro y espero que algún día pueda corresponderte aunque sea con la mitad de lo que he tenido de tu parte hasta ahora, no

tengo palabras para agradecerte, simplemente eres parte fundamental de cada una de mis metas.

A mí padre Ildelfonso Reyes Flores esta dedicatoria también es para tí, gracias por todo (poncho) por el apoyo incondicional en cada una de las metas que me he propuesto, también por cada uno de los consejos valiosos que me das y por tu cariño, aunque siempre seas un gruñón jejeje; que al igual que mi madre eres parte fundamental de este gran logro, que siempre tienes un sí por respuesta a cada uno de mis proyectos, me faltan palabras para decirte lo afortunada que me siento de que formes parte de nuestras vidas.

La familia proporciona valores que quedan para toda tu vida. Una familia unida y llena de amor es un lujo difícil de conseguir.

Y no pueden faltar en mis dedicatorias:

Julia Rodríguez, Marco Rodríguez, Armando Rodríguez, Lilitiana Domínguez, Nancy Rodríguez, Luis Rodríguez y Adriana Ruiz; querida familia les quiero dedicar esta tesis porque ustedes son parte fundamental de mi vida, que hubiese sido de mis días sin su compañía, cariño y aprecio, cada uno apoyándome con sus consejos y palabras de motivación, espero que este sea uno de muchos logros que podamos compartir como la gran familia que formamos los quiero mucho de verdad, mil gracias.

A Miguel Ángel (mígue) gracias por estar a mi lado en todo momento en buenos malos y peores te quiero mucho eres el mejor amigo, hermano y cómplice, que la vida pudo poner en mi camino, siempre te estaré agradecida por los consejos, regaños y por tener un hombro donde llorar pero también donde impulsarme, por todo esto y lo que vendrá millones de gracias.

Juan Carlos (sonsacodor) gracias por ser mi amigo a lo largo de la carrera, que junto con mígue hicieron que esta meta fuera más amena con sus locuras y ocurrencias, ya que es tan solo el comienzo de la grandes cosas que pasaremos juntos a lo largo de la vida, que aunque ya robas oxígeno sé que siempre estarás a lado mío apoyándome te quiero mugroso.

Arcelia, querida amiga que hubiera sido de nuestro desarrollo académico y personal si no nos hubiéramos conocido, tantas cosas compartidas en este tiempo, logros y derrotas y sobre todo esas locuras que hemos hecho, por todo esto muchas gracias eres y serás siempre parte importante en mi vida.

Lupe, pamele a ustedes también muchas gracias por brindarme su amistad y por formar parte de este proyecto con sus buenos deseos y apoyo incondicional deseo que nunca se acabe este lazo de amistad y que compartamos todo lo bueno y malo de nuestras vidas y metas les

agradezco por ser esas personas increíbles que se
atravesaron en mi camino mil gracias.

Eli, Irán y pepe gracias a ustedes también por los buenos
momentos compartidos a lo largo de la carrera deseo
infinitamente que nuestra amistad crezca y que
perduremos siempre unidos hasta el fin de nuestros días
compartiendo triunfos, derrotas y mucho más de verdad
muchas gracias

*Lo que hoy somos descansa en lo que
ayer pensamos, y nuestros actuales
pensamientos forjan nuestra vida
futura.
(Buda)*

INTRODUCCIÓN	1
Aparato Reproductor del Macho	1
Espermatogénesis.....	6
Viabilidad de los espermatozoides	11
Esteroidogénesis.....	12
Regulación hormonal de las funciones del testículo	13
Serotonina.....	17
Serotonina y función del testículo.....	19
p-Cloroanfetamina y sistema serotoninérgico.....	21
Anfetaminas y funciones del testículo	23
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
MATERIAL Y MÉTODO	26
Animales de experimentación	27
Inyección intratesticular de PCA o SS	27
Evaluación de espermatogénesis.....	29
Cuantificación de hormonas esteroides.....	30
Cuantificación de serotonina y del 5-HIAA	32
Análisis estadístico de los resultados	32
RESULTADOS.....	34
Evaluación de la espermatogénesis.....	38
Viabilidad	39
Actividad Mitocondrial	43
Concentración de hormonas esteroides	46

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	48
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54

RESUMEN

La Serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) participa en la modulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de las gonadotropinas; Hormona Estimulante del Folículo (FSH) y luteinizante (LH) al actuar en el eje hipotálamo-hipófisis, además ejerce su acción directamente en el testículo modulando sus funciones, espermatogénesis y esteroidogénesis. Sin embargo los resultados que apoyan esta idea no son claros. Aunado a esto en la actualidad la población consume una serie de fármacos para atender problemas de salud y/o como drogas recreacionales, entre las que se encuentran las anfetaminas, que afectan al sistema serotoninérgico y no se han considerado los efectos en el aspecto reproductivo. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la inyección intratesticular de la P-Cloroanfetamina (PCA), inhibidor de la síntesis de 5-HT, sobre la concentración de la 5-HT y en las funciones del testículo. A ratas macho de 30 días de edad de la cepa CII-ZV, se les administraron 0.03 mg/20 µl de PCA o solución salina (SS) al 0.9 % en el testículo izquierdo (TI), derecho (TD) o en ambas gónadas (BIL). Los animales se sacrificaron a los 65 días, se realizó la disección de los conductos deferentes, se colectó el paquete espermático y se evaluó la espermatogénesis, movilidad y viabilidad de los espermatozoides. En el testículo se cuantificó la concentración de (5-HT) y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). En el suero de estos animales se realizó la medición de la concentración de progesterona y testosterona.

En los animales inyectados con PCA en el TI, TD o BIL, no se modificó la concentración 5-HT y del 5-HIAA en comparación con los animales inyectados con solución salina. Este mismo comportamiento se observó cuando se comparan los resultados del testículo en el que se realizó la inyección de la PCA y el contralateral a la administración. La movilidad de los espermatozoides y la viabilidad de estos, evaluada por integridad de la membrana no se modificaron.

Mientras que, la viabilidad de los espermatozoides evaluada por actividad mitocondrial, disminuyó en los animales que se trataron con PCA.

La concentración de progesterona disminuyó significativamente en todos los grupos de animales que se les administró PCA (TI: 1.87 ± 0.31 vs 4.22 ± 1.05 ; TD: 2.12 ± 0.26 vs 6.90 ± 1.82 ; Bil: 3.24 ± 0.48 vs 8.46 ± 1.29 , $p < 0.05$). En cambio, la concentración de testosterona se incrementó en los animales inyectados con PCA en el TI o TD (TI: 2.60 ± 0.18 vs 1.64 ± 0.10 ; TD: 2.70 ± 0.21 vs 2.02 ± 0.16 , $p < 0.05$). Mientras que, en los que se realizó la inyección Bil de PCA, la concentración de esta hormona disminuyó (0.81 ± 0.14 vs 2.92 ± 0.23 , $p < 0.05$).

Con base en los resultados del presente estudio sugerimos que la serotonina en el testículo ejerce un papel estimulante en los mecanismos endocrinos que participan en el desarrollo normal de la espermatogénesis y la secreción de hormonas esteroides en la rata macho.

INTRODUCCIÓN

Aparato Reproductor del Macho

El aparato reproductor del macho está constituido por órganos internos (testículos, epidídimos, conductos deferentes y glándulas accesorias) y externos (pene y escroto) (figura 1) (Caravaca et al., 2005; Gutiérrez, 2005).

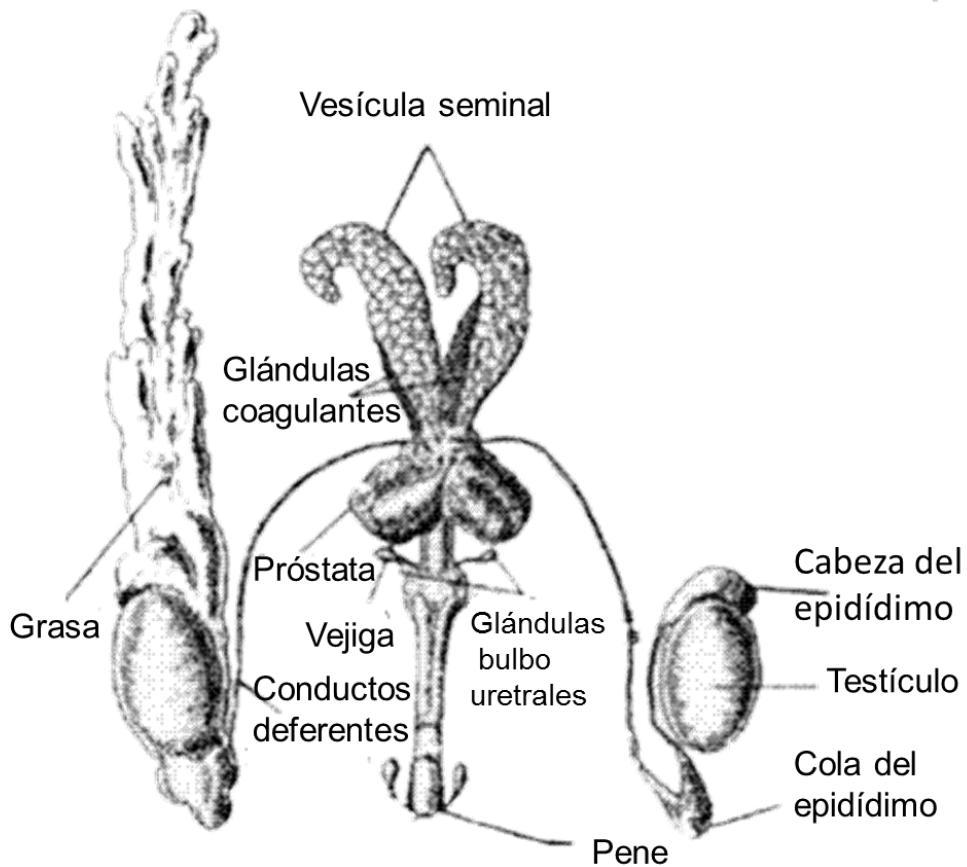


Figura 1. Esquema del aparato reproductor de la rata macho y las glándulas accesorias (Modificado de Setchel et al., 1994).

Epidídimo

Este órgano se apoya en el testículo sobre las superficies superior y posterior. Está compuesto por los conductillos eferentes y el conducto del epidídimo, junto con los vasos sanguíneos, el músculo liso y las cubiertas de tejido conjuntivo asociados (Ross et al., 2004). En el epidídimo se identifican tres regiones, la cabeza, el cuerpo y la cola. Los conductillos eferentes se localizan en la cabeza y el conducto del epidídimo se proyecta desde el cuerpo hasta la cola (Ross et al., 2004). Los espermatozoides que provienen del testículo, durante su tránsito por las diferentes regiones del epidídimo, inician su maduración, adquieren movilidad y la capacidad de fecundar al ovocito (Ross et al., 2004).

Inicialmente los espermatozoides viajan por los conductos eferentes que se comunican con la red testicular. Las células ciliadas y las mioideas que rodean al conducto principal al contraerse y por acción de la inervación adrenérgica que recibe el epidídimo, se favorece el movimiento de los espermatozoides en el órgano y al transporte de estos al siguiente componente del aparato reproductor, el conducto deferente (Campbell, 2007).

Entre las funciones que el epidídimo cumple se incluye el transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides, procesos que son regulados por el líquido y las secreciones vertidas en la luz del conducto principal del epidídimo. La composición bioquímica de estas secreciones, como la osmolaridad, el contenido electrolítico y proteico varían en las diferentes regiones del epidídimo, esto refleja la función diferencial de los componentes del órgano (Campbell, 2007).

Algunos de los componentes del líquido del epidídimo son la glicerolfosforilcolina (GPC), la carnitina y el ácido salicílico. Además, este contiene proteínas que, *in vitro*, tienen efectos fisiológicos sobre los espermatozoides. Algunas de las proteínas que se encuentran en el epidídimo, son la proteína que induce la motilidad, el factor de supervivencia espermático y el factor sustentador de la motilidad progresiva, el factor inhibidor de la motilidad espermática y las proteínas

EP2 y EP3 que inducen la unión del espermatozoide a la zona pelúcida (Campbell, 2007).

El mantenimiento de la estructura y funcionamiento del epidídimo es andrógeno dependiente, debido a que la dehidrotestosterona y la testosterona actúan en el órgano (Campbell, 2007).

Próstata

Se localiza en la pelvis, por debajo de la vejiga, rodea el segmento prostático de la uretra (Ross et al., 2004). Está compuesta por 30 ó 50 glándulas túbulo alveolares dispuestas en tres capas concéntricas: la interna, la submucosa intermedia y la periférica, que contiene las glándulas prostáticas principales. Las glándulas de la capa de la mucosa vierten sus secreciones directamente hacia la uretra. Las glándulas de las otras capas poseen conductos que desembocan en los senos prostáticos ubicados a cada lado de la cresta uretral en la pared posterior a la uretra (Ross et al., 2004).

Las células epiteliales prostáticas producen la enzima fibrinolisisina, el ácido cítrico y la proteasa serina (Ross et al., 2004). Estas enzimas son secretadas hacia los alveolos y se incorporan al líquido seminal. Durante la eyaculación, la secreción alveolar es expulsada hacia la uretra prostática, debido a la contracción del tejido fibromuscular del órgano. La función de la fibrinolisisina es licuefacer el semen (Ross et al., 2004).

Vesícula seminal

Las vesículas seminales, la conforman la mucosa, la capa de músculo liso y la cubierta fibrosa (Ross et al., 2004). La secreción de las vesículas seminales es un material viscoso que contiene fructosa, sustrato metabólico principal para los espermatozoides, junto con los aminoácidos, el ácido ascórbico y prostaglandinas. La función secretora y la morfología de las vesículas seminales es regulado por la testosterona (Ross et al., 2004). Las glándulas coagulantes son estructuras pares

que se localizan en la parte ventral de los lóbulos de la vesícula seminal. En la rata se encuentran muy desarrolladas. Las funciones que cumple esta glándula incluyen: la secreción de proteínas como la transglutaminasa; así mismo se considera que sus secreciones son esenciales en la motilidad de los espermatozoides debido a que proporciona nutrientes, lo que sirven como fuente de energía (Setchel et al., 1994).

Testículo

Los testículos son órganos pares suspendidos por el cordón espermático, contenidos en el escroto, son de forma ovoide y se encuentran cubiertos por una membrana fibrosa llamada túnica albugínea. El tejido testicular lo conforman los túbulos seminíferos y tejido intersticial (Caravaca et al., 2005; Gutiérrez, 2005). Los túbulos se extienden desde la periferia del testículo hasta el borde superior de la gónada donde se anastomosan entre sí y forman una red de testis o de Haller. Después de esta región algunos túbulos se hacen rectos y constituyen los conductos eferentes, que son los que conectan al testículo con el epidídimo (Caravaca et al., 2005, Gutiérrez, 2005).

El túbulo seminífero está conformado del epitelio seminífero que es estratificado compuesto por dos poblaciones celulares básicas:

1.-Células de Sertoli, que no se dividen después de la pubertad, son células cilíndricas con prolongaciones apicales y laterales que rodean las células espermátogénicas contiguas y ocupan los espacios entre éstas. Le proporcionan una organización estructural a los túbulos porque se extienden por todo el espesor del epitelio seminífero, así como soporte a las células germinales (Berne y Levy, 2006; Ross et al., 2004).

2.-Células de la línea germinal, se dividen con regularidad y se diferencian en espermatozoides. Estas derivan de las células germinales primordiales originadas en el saco vitelino que colonizan las crestas gonadales durante la etapa inicial del

desarrollo de los testículos. Se organizan en capas entre las células de Sertoli. Las células espermatogénicas más inmaduras son las espermatogonias, que se encuentran apoyadas sobre la lámina basal y conforme avanza la diferenciación, estas migran hacia la luz del túbulo seminífero, por lo que una población de células en etapas más avanzada de diferenciación, las espermátides, están adheridas a la porción apical de la célula de Sertoli (Berne y Levy, 2006; Ross et al., 2004).

Rodeando al túbulo se encuentra la túnica o lámina propia, también llamado tejido perituberal, es un tejido conjuntivo multiestratificado y consiste de una capa de células miodes. Tienen abundante retículo endoplásmico rugoso. Las contracciones rítmicas de las células miodes crean ondas peristálticas que contribuyen en el movimiento del espermatozoide y del líquido testicular a lo largo de los túbulos seminíferos hacia la red de testis y el epidídimo. Por fuera de la capa miode hay vasos sanguíneos y linfáticos, así como células de Leydig (Ross et al., 2004).

Los túbulos están rodeados por arterias, venas y tejido intersticial donde se encuentran las células de Leydig (Caravaca et al., 2005; Gutiérrez, 2004). Estas células son poliédricas grandes y eosinófilas que contiene inclusiones lipídicas, mitocondrias con crestas tubulovesiculares y retículo endoplásmico liso. Asociadas a este último orgánulo se encuentran las enzimas necesarias en la síntesis de testosterona a partir del colesterol (Ross et al., 2004).

Los testículos cumplen dos funciones: 1) Espermatogénesis, producción de los gametos masculinos o espermatozoides; 2) Esteroidogénesis, síntesis de hormonas esteroideas como la progesterona y testosterona (Caravaca et al., 2005; Gutiérrez et al., 2005).

Espermatogénesis

La espermatogénesis comprende tres procesos: Multiplicación de células germinales, reducción del número de cromosomas del estadio diploide al haploide y la diferenciación de la célula germinal durante la cual se forman los diferentes componentes del espermatozoide. Conjuntamente estos eventos conducen a generar una célula con la estructura que le permita contar con la energía necesaria para sustentar su movimiento y la protección de los cromosomas (Vélez et al., 2006).

La espermatogénesis inicia poco antes de la pubertad, bajo la influencia de concentraciones cada vez mayores de las gonadotropinas, hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH) (Vélez et al., 2006).

La fase uno o de proliferación (mitosis) de las espermatogonias tienen la finalidad de formar los espermatocitos primarios a partir de las espermatogonias y mantener la población de este último tipo celular. Los túbulos contienen células denominadas espermatogonias, que se organizan en dos o tres capas en la zona de la periferia del epitelio tubular (Tresguerres, 1999). Durante la multiplicación de las espermatogonias se generan células en diferentes estadios de maduración. En el comportamiento basal, las espermatogonias se dividen por mitosis y dan lugar a tres tipos de espermatogonias, A oscuras, A claras y B (Berne y Levy, 2006; Tresguerres, 1999).

Durante la transformación de las espermatogonias a espermatozoides, las células se desplazan desde la membrana basal hacia la luz del túbulo (Berne y Levy, 2006). Las espermatogonias tipo B se multiplican y forman a los espermatocitos primarios que entran en meiosis, durante este proceso se produce la duplicación cromosómica, sinapsis, entrecruzamiento, división y separación. En la segunda fase se producen dos divisiones meióticas. Al concluir la primera meiosis, los espermatocitos primarios originan, dos espermatocitos secundarios. Al final de la segunda división meiótica, los dos espermatocitos secundarios dan origen a cuatro espermátides que contienen 22 cromosomas más un cromosoma x o y.

Las espermatídes se sitúan cerca de la luz tubular, unidas a las células de Sertoli mediante uniones especializadas (Berne y Levy, 2006; Tresguerres, 1999).

En la tercera y última fase, espermiogénesis, se producen una serie de cambios nucleares y en el citoplasma que conducen a la transformación de la espermatíde en un espermatozoide diferenciado, con una cabeza rodeado en las dos terceras partes por el acrosoma, otros componentes son la pieza media y el flagelo. Estas transformaciones consisten en la condensación y elongación del núcleo que se dirige a la periferia de la célula, formación del acrosoma, del flagelo con microtúbulos y mitocondrias, así como la pérdida de citoplasma (figura 2) (Berne y Levy, 2006; Tresguerres, 1999).

Una vez que se inicia la espermatogénesis y se forman los diferentes tipos celulares, estos se desplazan de la base hacia la luz del túbulo seminífero y concluida la diferenciación de la espermatíde a espermatozoide, se elimina la mayor parte del citoplasma y se mantiene una cantidad muy pequeña de citoplasma adherida a la célula, la gota citoplasmática (Urbina y Biber, 2008).

En el túbulo seminífero los diferentes tipos celulares se disponen en asociaciones celulares denominadas estadios del epitelio seminífero. Su organización espacial se denomina onda espermatogénica y el conjunto de estadios constituye el ciclo del epitelio seminífero o espermatogénico (Berne y Levy, 2006; Tresguerres, 1999).

Los espermatozoides una vez formados se liberan a la luz de los túbulos seminíferos y la mayor parte de su citoplasma es fagocitado por las células de Sertoli, donde es degradado (Berne y Levy, 2006).

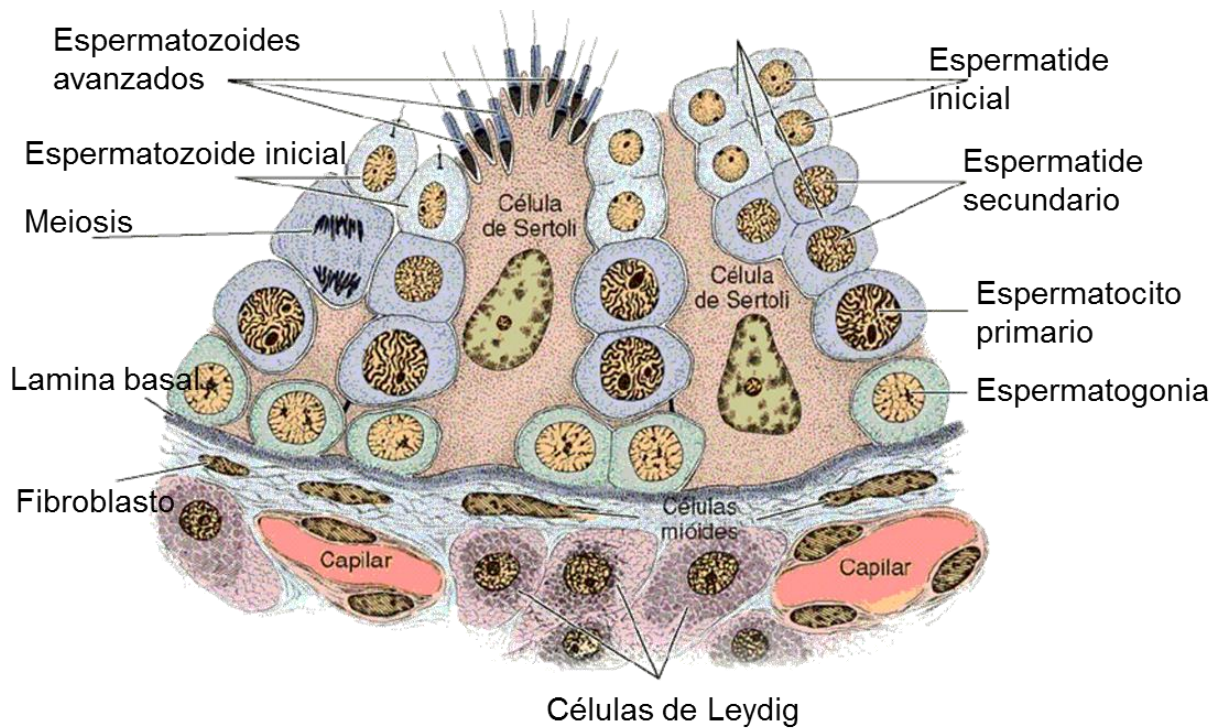


Figura 2. Desarrollo de la espermatogénesis, procesos que se lleva a cabo en las gónadas masculinas diferenciándose de espermátide a espermatozoide (Tomado y modificado de Cediel et al., 2009).

Espermatozoide

El espermatozoide presenta una cabeza (con un acrosoma), un cuello (mitocondrias) y una cola y todas sus funciones quedan subordinadas a proporcionar la movilidad que permite la entrega de la carga de ADN y sus proteínas asociadas que están condensados y enrollados en la cabeza del espermatozoide (Curtis et al., 2006).

El acrosoma del espermatozoide maduro se forma a partir del aparato de Golgi, mientras que los gránulos pro acrosómicos, ricos en glucoproteínas son formados dentro de vesículas derivadas del cuerpo de Golgi en el futuro polo anterior del

espermatozoide. Detrás de esta vesícula acrosómica, aparecen los filamentos de actina encargados de posicionar el acrosóma sobre el núcleo y darle forma adecuada a esta estructura. Esta estructura es esencial en la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida, durante el proceso de fecundación (Urbina y Biber, 2008).

El flagelo del espermatozoide maduro se desarrolla a partir de uno de los centriolos localizados en el polo posterior de la espermatide, mientras que el otro centriolo se va a convertir en el cuello del espermatozoide. El flagelo es una estructura axonémica compuesta de un microtúbulo central doble unido y rodeado por 9 pares de microtúbulos conectados, los cuales van a convertir la energía del trifosfato de adenosina (ATP) en movimiento. Una densa cubierta de células fibrosas se desarrolla alrededor del axonema, lo cual le da rigidez al flagelo y limita la movilidad espermática (Urbina y Biber, 2008).

Mientras en la espermatide en elongación se forma el flagelo, las mitocondrias, localizadas periféricamente, se organizan en forma helicoidal alrededor de la base del flagelo forman una cubierta continua que se envuelve alrededor de la pieza intermedia y constituye una estructura piramidal, la pieza media del espermatozoide, en donde se genera la energía para la movilidad de esta célula (Urbina y Biber, 2008). La energía del espermatozoide proviene de la hidrólisis del ATP que se genera de las mitocondrias a partir del adenosin monofosfato cíclico (ADP) y fosfato, en la pieza media del espermatozoide. El ATP es la molécula que le proporciona la energía para el movimiento de esta célula (Urbina y Biber, 2008; Ferramosca et al., 2011).

En la estructura de los microtúbulos del flagelo, los brazos de dineina que se interconectan con los distintos microtúbulos, producen un movimiento deslizante debido a la energía proporcionada por el ATP (Urbina y Biber, 2008).

Son diferentes los factores que determinan la forma de los espermatozoides, como la estructura cromosómica, proteínas cromosómicas asociadas al

citoesqueleto perinuclear, los microtúbulos en el núcleo caudal, la actina cromosómica y las interacciones con la célula de Sertoli (Urbina y Biber, 2008).

Durante la transformación de las espermatogonias a espermatozoides maduros, se requiere de la síntesis de proteínas y hormonas esteroides (Urbina y Biber, 2008). Las células de Sertoli y de Leydig son las encargadas de proporcionar el microambiente para que se lleve a cabo la diferenciación de la espermátide en espermatozoide (figura 2) (Urbina y Biber, 2008).

La movilidad de los espermatozoides es un reflejo de su vitalidad, y de su funcionalidad. La movilidad progresiva es una característica que le permitirá a la célula desplazarse en el tracto reproductor de la hembra así como penetrar en el complejo cumulus-corona y en la zona pelúcida (Aragón et al., 2013).

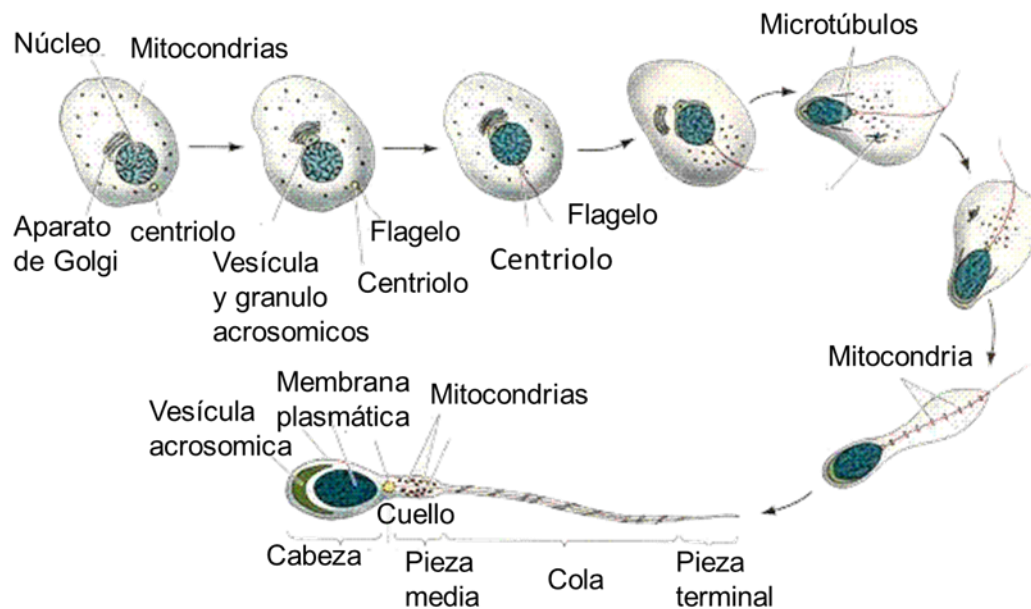


Figura 3. Desarrollo de la espermiogénesis, proceso que da lugar a la diferenciación y especialización de la espermátide a espermatozoide maduro (Tomado y modificado Scott, 2005).

Viabilidad de los espermatozoides

La viabilidad de los espermatozoides, es una característica que permite inferir si estas células presentan características vitales, como la integridad de la membrana citoplasmática o el funcionamiento de la mitocondria (figura 3) (Aragón et al., 2013).

En la membrana citoplasmática se produce el intercambio de materiales que requiere el espermatozoide, debido a que funciona como barrera semipermeable, que permite la comunicación de la célula con su ambiente. Cuando se daña, la célula muere. Es posible identificar ese desequilibrio en las células vivas, mediante el uso de moléculas coloridas para las que la membrana citoplasmática funciona como barrera permeable y que son indicadores de viabilidad. Las células con la membrana citoplasmática retienen en su interior a las moléculas coloridas, por lo que presentaran el color característico de la molécula colorida, y por lo tanto estas células se consideran como viables. Mientras que, las moléculas con daño en la membrana citoplasmática no pueden retener el contenido citoplasmático por lo que no aparecerán teñidas y serán identificadas como no viables (Aragón et al., 2013).

Otro indicador de la viabilidad de los espermatozoides, es el funcionamiento de la mitocondria, que se evalúa por reacciones enzimáticas que realizan en este organelo en presencia de una molécula indicadora que emita un color visible o fluorescente. Específicamente, el rezasurin, que es una molécula permeable en la membrana citoplasmática y mitocondrial que en presencia de deshidrogenasas funcionales es reducida a rezasurín y entonces emite una florescencia roja (Aragón et al., 2013).

Las moléculas capaces de atravesar la membrana citoplasmática están diseñadas para asociarse con moléculas presentes en el citoplasma o con los ácidos nucleicos (por ejemplo los fluorocromos calceina y SYBR14, respectivamente). Se han diseñado otras moléculas capaces de reaccionar con los componentes de un

organelo en particular y en consecuencia emitir un color. El funcionamiento de tales organelos es esencial para el adecuado funcionamiento del espermatozoide (Aragón et al., 2013).

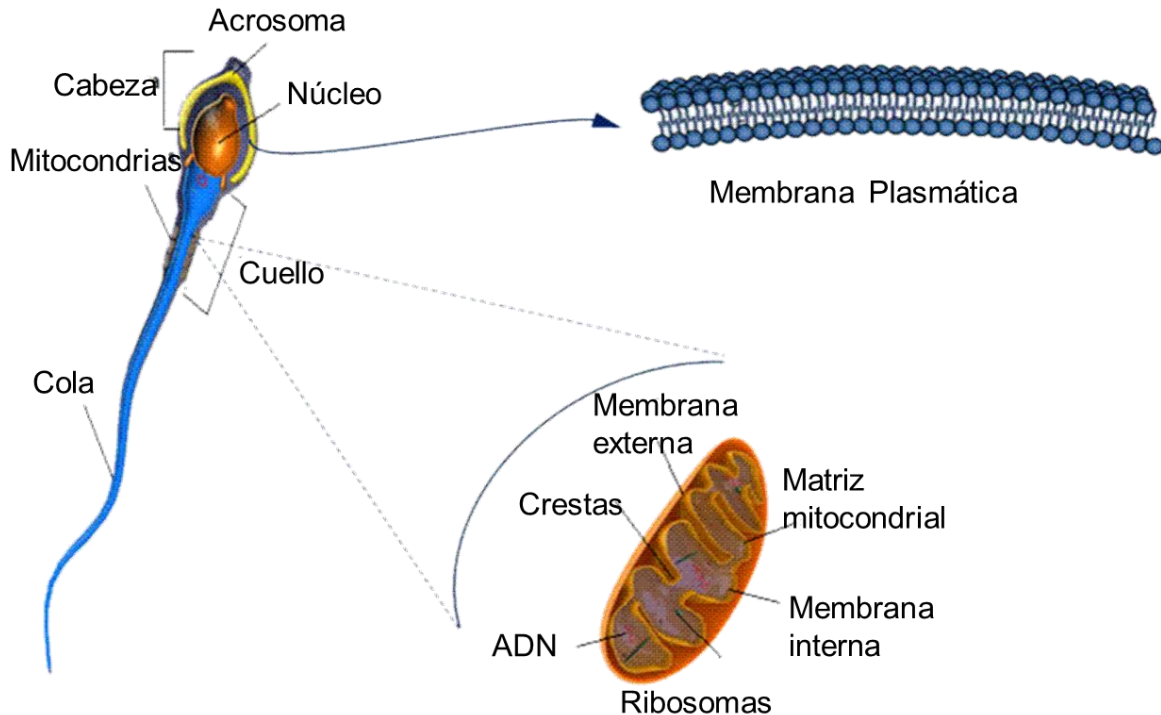


Figura 4. Esquema del espermatozoide y de las diferentes partes que lo componen, mitocondria y membrana plasmáticas, estructuras fundamentales en el mantenimiento de la viabilidad (Modificado de <http://gladysuribeblog.blogspot.mx>).

Esteroidogénesis

Las células de Leydig sintetizan colesterol a partir de acetil-CoA, que lo obtienen del plasma o de los ésteres de colesterol que forman parte de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y que entran a la célula por endocitosis mediada por receptor. Los ésteres de colesterol se almacenan en el citoplasma y constituyen

una fuente de reserva del colesterol libre que se utiliza en la síntesis de los andrógenos (figura 4) (Tresguerres, 1999).

La transformación del colesterol en pregnenolona, paso limitante de esta ruta de biosíntesis, se realiza en la mitocondria, por lo que el colesterol debe ser transportado e internalizado al unirse a la proteína transportadora de esteroides (SCP₂) (Tresguerres, 1999).

La pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa al microsoma donde continúa la esteroidogénesis. En el testículo dos rutas conducen a la síntesis de testosterona, una a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona, conocida como la ruta $\Delta 5$, y otra a partir de 17-hidroxi-progesterona o $\Delta 4$. Los esteroides intermedios de la ruta $\Delta 5$ pueden convertirse en la $\Delta 4$ correspondiente. La importancia relativa de estas dos rutas varía según la especie, en el testículo humano la más importante es la $\Delta 5$, mientras que en los roedores la $\Delta 4$ es la que predomina (Tresguerres, 1999).

La testosterona es convertida por aromatización a 17 β -estradiol o reducida a 5 α -dihidrotestosterona; por esta ruta se transforma primero en dihidrotestosterona (DHT). La testosterona y la DHT circula en su mayor parte unidas a una globulina ligadora de esteroides sexuales (SHBG). Los andrógenos no se almacena en las células de Leydig por lo que después de su síntesis difunde a la circulación de la gónada y a la general (Gal et al., 2007).

Regulación hormonal de las funciones del testículo

Las funciones del testículo son reguladas por factores de naturaleza endocrina y ambiental. Determinados factores procedentes del medio externo (luz, temperatura, alimentación, etc.) o del medio interno (herencia, sanidad, cambios endocrinos, etc.) inciden sobre la corteza cerebral y la pineal y estas a su vez sobre el hipotálamo que secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Caravaca et al., 2005).

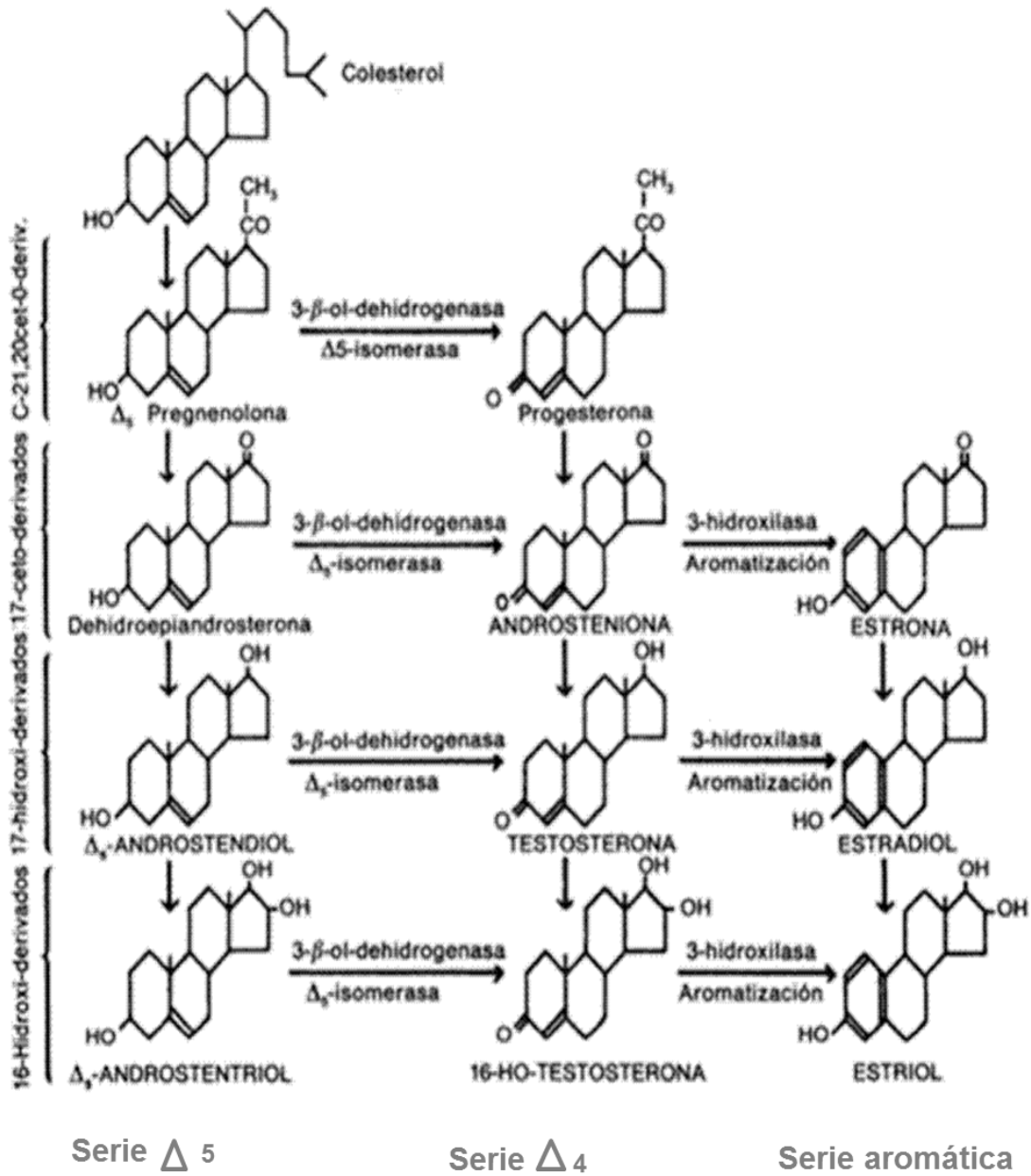


Figura 5. Esquema de la esteroidogénesis a partir del colesterol. La serie delta 5, exclusivamente suprarrenal. La serie delta 4, es típica de la síntesis de esteroides en el ovario y testículo (Tomado y modificado de Lllusia y Nuñez, 1993).

La GnRH se secreta desde el hipotálamo y actúa en el lóbulo anterior de la hipófisis, en donde estimula la producción de la FSH y LH. La secreción de estas hormonas es modulada por los esteroides de origen testicular, principalmente la testosterona por un mecanismo de retroalimentación negativa (figura 5) (González y García, 1990).

La FSH actúa directamente sobre el túbulo, mientras que la LH regula indirectamente la producción de espermatozoides, al activar la secreción de la testosterona por las células de Leydig (Vélez et al., 2006). La FSH modula la espermatogénesis al estimular la mitosis de las células de Sertoli y la adherencia de estas células entre sí, lo que favorece el funcionamiento de la barrera hematotesticular, lo que crea un microambiente apropiado durante la espermatogénesis. Existen receptores a andrógenos en las células de Sertoli, de Leydig y en las mioides peritubulares que rodean al túbulo seminífero. En el testículo, las gonadotropinas, factores de crecimiento y citosinas actúan en el testículo y participan en la diferenciación de las espermatogonias a espermatozoides (Vélez et al., 2006).

La FSH actúa directamente en los túbulos seminíferos, en donde estimula las primeras fases de la espermatogénesis y la función de las células de Sertoli, por ejemplo favorece que en esta célula se lleve a cabo la síntesis de la proteína unidora de los andrógenos (ABP), que se une a la testosterona y su metabolito, la 5α -hidrotestosterona (Caravaca et al., 2005; González y García, 1990). Cuando se incrementa la espermatogénesis, las células de Sertoli producen inhibina que ejerce un efecto de retroalimentación negativo sobre la secreción de FSH por la adenohipófisis, este es un mecanismo de regulación de la espermatogénesis (Caravaca et al., 2005). La FSH también modula la espermatogénesis al actuar en las células de Sertoli y favorecer la producción de los elementos necesarios que nutren y estimulan la diferenciación de la célula germinal hacia espermatozoide (Caravaca et al., 2005).

La importancia de la FSH en la regulación de la espermatogénesis, se ha mostrado cuando a ratas macho adultas se les realiza la hipofisectomía o se les administra un antisuero contra la FSH, como resultado se genera daño en la estructura del epitelio seminífero, debido a que disminuye el número de espermatoцитos secundarios, espermátides, y espermatozoides (Russell et al., 1998; Yang et al., 2010). Estos eventos se restablecen a valores normales, cuando a la rata macho con hipofisectomía se le realiza un reemplazo con FSH. Estas evidencias llevaron a los autores a proponer que la FSH es un factor esencial para que se lleve a cabo la espermatogénesis (Russell et al., 1998; Cheng et al., 2010).

La LH actúa fundamentalmente estimulando las células de Leydig que se secretan primordialmente testosterona. La LH, se une a receptores específicos situados en la membrana de las células de Leydig y se activa a la enzima adenilato ciclasa que estimula la formación de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), a partir del ATP. El AMPc actúa como segundo mensajero y activa al sistema de cinasas que catalizan la fosforilación de proteínas intracelulares necesarias en la transformación del colesterol en pregnenolona y la producción de testosterona (Caravaca et al., 2005; Tresguerres, 1999).

Parte de la testosterona que se sintetiza en las células de Leydig ingresa al tubo seminífero, mientras que el resto ingresa en los vasos sanguíneos y actúa sobre el cuerpo en general, realizando sus funciones androgénicas y anabolizantes; así mismo, ejercen un efecto de retroalimentación negativo sobre la secreción de LH mediante la supresión de la descarga pulsátil de GnRH por el hipotálamo (Caravaca et al., 2005).

Además de las gonadotropinas, las funciones del testículo son reguladas por otros factores como la serotonina (Caravaca et al., 2005).

Serotonina

La serotonina o 5-hidroxitriptamina,(5-HT) es una amina biogénica que se sintetizan a partir del aminoácido triptófano procedente de la dieta, el cual es captado por la célula y se hidroxila por acción de la enzima triptófano hidroxilasa para formar el 5-hidroxitriptofano (5-HTP), está por acción de la L-aminoácido descarboxilasa forma la 5-HT que se almacena en vesículas y es protegida de la acción de las enzimas intracelulares, como la monoaminoxidasa (MAO) (figura 6)(Mardomingo,1994).

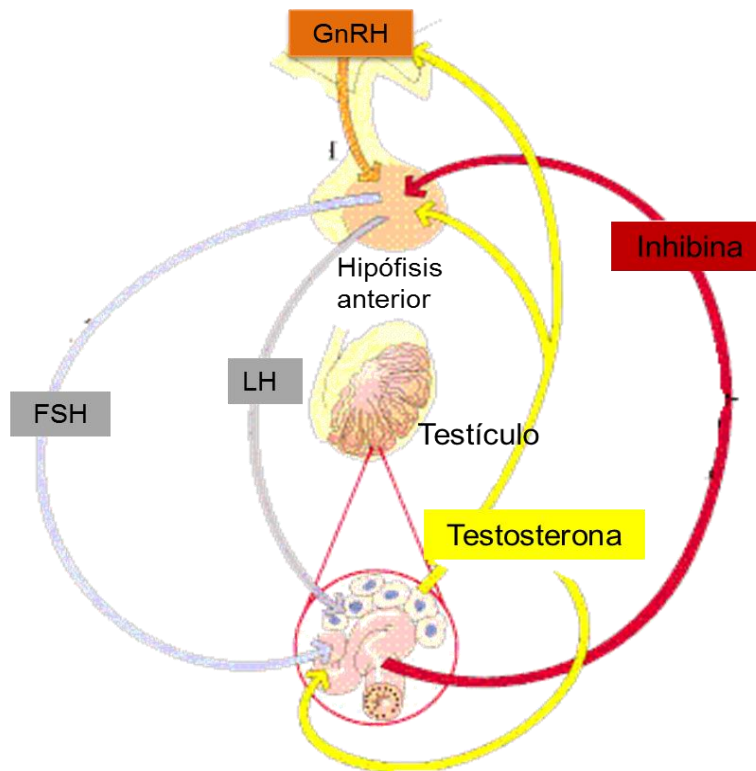


Figura 6. La producción de las hormonas esteroides masculinas como la testosterona es regulada por un sistema en el que participan el testículo, la hipófisis anterior y el hipotálamo. Hormona estimulante del folículo (FSH) y Luteinizante (LH) (Tomado modificado de Sobotta, 2006).

Al entrar el calcio a la neurona presináptica como resultado de la despolarización de la membrana favorece la liberación de la 5-HT en el espacio sináptico que se une a sus receptores postsinápticos. La amina que queda libre la recaptura la neurona presináptica y se metaboliza a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO) y la aldehidodehidrogenasa (Mardomingo, 1994).

La 5-HT es producida en el sistema nervioso central y en algunos órganos periféricos, como el testículo y el epidídimo (Tork, 1990; Tinajero et al., 1993). En el sistema nervioso central se sintetiza por grupos de neuronas que se localizan en el cerebro medio y en algunas zonas de la formación reticulada, de forma conjunta se denominan el núcleo del rafé. Fuxe y colaboradores (1994), clasificaron estos grupos en nueve paquetes celulares que se designan de B1 a B9. Con base en la distribución de estas células, el núcleo del rafé se divide en dorsal, medial y del puente (Whitaker-Azmitia, 1999). Las fibras serotoninérgicas que se originan en los núcleos dorsal y medial inervan casi todas las áreas del encéfalo, entre los que se encuentran el hipotálamo donde se localizan los centros que regulan la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, hormonas que modulan el funcionamiento del testículo y los aspectos reproductivos del macho (Tork, 1990).

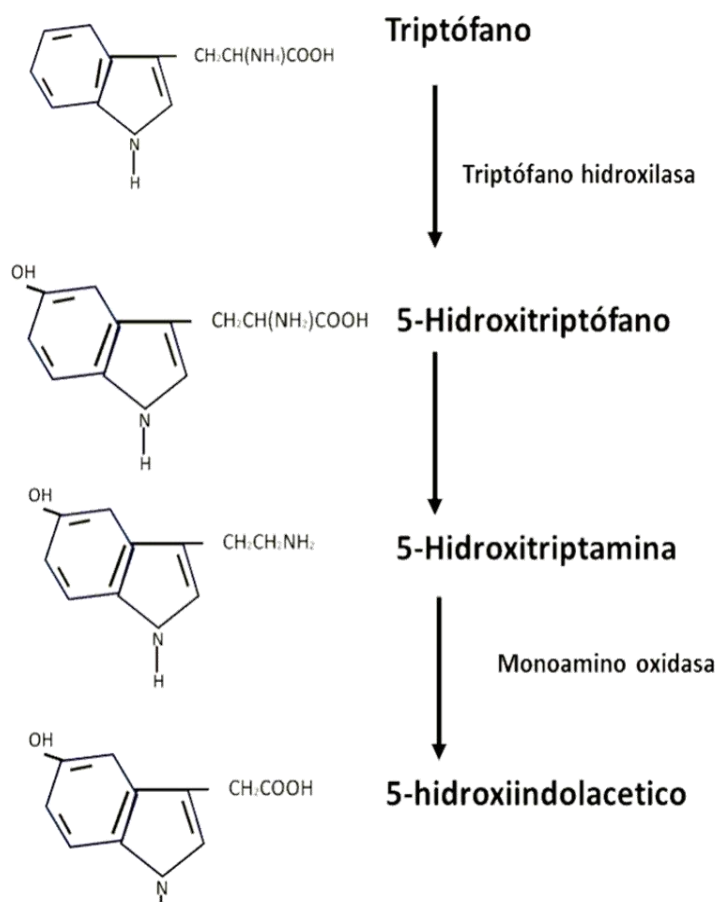


Figura 7. Síntesis de serotonina (Tomado y modificado Mardomingo, 1994)

Serotonina y función del testículo

Kormano y Pentitla (1968), mostraron que el tejido testicular de la rata contiene, 5-HT cuya fuente posiblemente son las fibras nerviosas. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias que muestren la presencia de inervación serotoninérgica en la gónada. También, se sugiere que otras fuentes de 5-HT para el testículo son las plaquetas, los mastocitos y las células de Leydig (Campos et al., 1990; Csaba et al., 1998; Tinajero et al., 1993).

El aporte nervioso que recibe la gónada es principalmente adrenérgico y en menor proporción colinérgico. A esta inervación se le ha implicado en la regulación de las funciones testiculares (Campos et al., 1990; Csaba et al., 1998).

Los mastocitos están presentes en el plexo pampiniforme del testículo de algunas especies (Rerkamnuaychoke et al., 1989). También se han observado en estrecha proximidad con la parte subcapsular de la arteria testicular (Collin et al., 1996). La importancia fisiológica de la presencia de los mastocitos en la vasculatura testicular se desconoce, pero se sugiere que son importantes en la regulación del flujo sanguíneo y como consecuencia de la disponibilidad de las gonadotropinas esenciales en la regulación de las funciones del testículo.

En el fluido intersticial y en la cápsula del testículo la rata adulta se encuentra 5-HT (Campos et al., 1990). Cuando se mantienen células de Leydig en cultivo, se libera 5-HT al medio, estas evidencias llevaron a los autores a proponer que en las células de Leydig se lleva a cabo la síntesis de la amina (Collin et al., 1996) (figura 7). Otro de los componentes en los que se ha identificado un marcador del sistema serotoninérgico, son las células de Sertoli, debido a que en ellas se expresa el receptor a 5-HT del tipo 5-HT₂ (Syed et al., 1999).

Además de las gonadotropinas, la 5-HT participa en la modulación de la síntesis de testosterona por el testículo. Actúa como un regulador autócrino en la modulación de la función de las células de Leydig. La amina al unirse a su receptor 5-HT₂ de la membrana en estas células estimula la secreción del factor liberador de la corticotropina (CRF) que actúa de manera autocrina en la célula de Leydig e inhibe la síntesis de testosterona (Tinajero, 1993).

La 5-HT también se le encuentra en el plasma seminal del humano, e incrementa la motilidad del espermatozoide, concentraciones altas de la amina se han correlacionado con ciertos grados de infertilidad. Sin embargo, el volumen del líquido seminal, pH, morfología del espermatozoide, fructosa, ácido cítrico y los valores

de testosterona en suero fueron similares en pacientes con diferentes concentraciones de 5-HT en sangre (González y García, 1990).

La melatonina que se forma a partir de la 5-HT, también se le encuentra en el semen (Yie et al., 1991). Lubhotzhisky y colaboradores (2002), mostraron que la concentración normal de esta hormona en el semen es de 0.6 a 5.0 pg/ml, valores significativamente más bajos que los detectados en sangre. Concentraciones altas de melatonina se encuentran en el semen de individuos con oligospermia y azoospermia, lo cual permite sugerir que la melatonina participa en la producción de espermatozoides y su motilidad, pero su participación en individuos normales aun no es del todo claro (Yie et al., 1991).

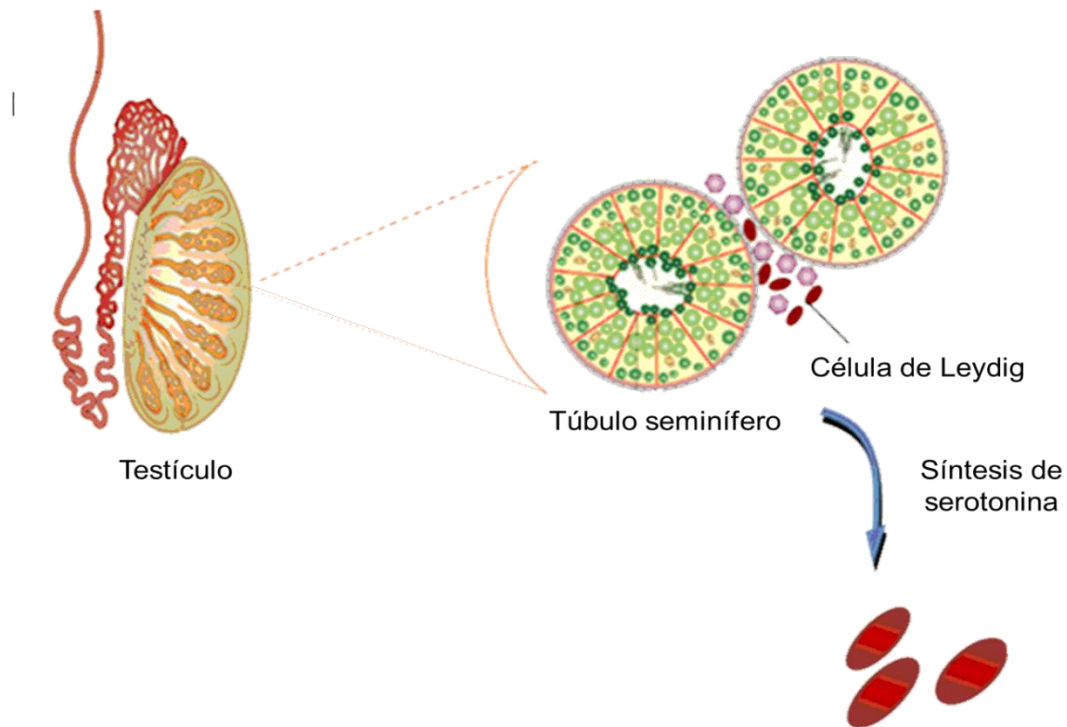


Figura 8. Esquema representativo de las células de Leydig responsables de la síntesis de serotonina en el testículo (Modificado de www.google.com.mx/search?q=tubulo+seminifero).

p -Cloroanfetamina (PCA) y Sistema Serotoninérgico

Anfetaminas es el nombre general asignado a una clase de drogas sintéticas, que poseen efectos psicotrópicos y adictivos. Las anfetaminas afectan significativamente la transmisión serotoninérgica, dopaminérgica o noradrenérgica, debido a que modifican la actividad de las enzimas que participan en la síntesis o metabolismo de estos neurotransmisores, o en las proteínas transportadores de membrana de la dopamina (DA), serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA) (Mendoza, 2008; Redolar, 2008).

La metanfetamina y la 3,4-metilendioxi metanfetamina (éxtasis; MDMA), forman parte de un grupo amplio de drogas recreacionales. La PCA es derivado de las anfetaminas, comparte muchas similitudes en la estructura y función del éxtasis (Mendoza, 2008; Redolar, 2008). A corto plazo, 24 horas después de su administración, induce la liberación de 5-HT e inmediatamente después disminuyen los almacenes intracelulares de la amina en la terminal de la neurona presináptica. Posteriormente inhibe la actividad de la enzima limitante en la síntesis de 5-HT, la triptófano hidroxilasa, así como de la monoamina oxidasa que metaboliza a la 5-HT en el 5-HIAA, estos eventos se reflejan en la disminución en la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en diferentes regiones del cerebro, efectos que se observan a las 48 horas después de su administración y se mantienen hasta por 30 días (Fuller, 1992; Sandersh-Bush et al., 1972; SandershBush et al., 1975).

El catabolismo de las anfetaminas se lleva a cabo principalmente por una reacción de desaminación oxidativa por el complejo enzimático de la citocromo P450 y el principal producto de excreción urinaria, es la fenilacetona un metabolito intermediario en el catabolismo de las anfetaminas que no posee acciones psicoestimulantes y adictivas (Mendoza, 2008).

Anfetaminas y Funciones del Testículo

En relación a los posibles efectos de las anfetaminas en la espermatogénesis y secreción de hormonas esteroides, se ha observado que cuando a ratas macho de 30 ó 40 días de edad se les administra por vía sistémica p-Clorofenilalanina, un inhibidor de la síntesis de 5-HT, no se modifica la concentración de testosterona a los 60 días. Opuesto a esto, cuando se aplica el mismo tratamiento a los 40 ó 44 días de edad, disminuyen las concentraciones de este esteroide y el peso de los testículos. Cuando ratas macho de 30, 32, 34, 36 ó 38 días de edad, se les administra 5-HTP, se observa el incremento en las concentraciones de testosterona en el suero a los 60 días de edad (Shishkin y Dygalo, 2000). Con base en estos resultados, los autores proponen que la 5-HT ejerce un papel estimulante en la secreción de testosterona.

Además de la relación de la 5-HT y secreción de testosterona, también se ha mostrado que cuando a ratas machos de 30 de edad se les administra PCA por vía sistémica, se inhibe la actividad del sistema serotoninérgico del hipotálamo y esto se acompaña de la disminución del número y viabilidad de los espermatozoides. Estas evidencias permiten proponer que la 5-HT del hipotálamo es esencial en la modulación de la espermatogénesis (Aragón et al., 2005).

En el ratón, la administración sistémica de metanfetamina disminuye la concentración de testosterona y la movilidad espermática, así como su capacidad para aparearse y preñar a las hembras (Yamamoto et al., 1999). Cuando en la rata se le administra la misma anfetamina, se observa el aumento en la muerte de las células germinales, disminución en la concentración de testosterona y la espermatogénesis evaluada por producción de espermatozoides (Alavi et al., 2008).

Frith y colaboradores (1987), mostraron que en el perro la administración sistémica del éxtasis induce disminución del peso corporal y de los testículos, lo que se acompaña de hiperplasia de la próstata.

Sin embargo, en este estudio se le dio poca importancia a los posibles efectos del éxtasis en el eje reproductivo hipotálamo hipófisis-testículo, y fue hasta en el 2008, que Dickerson y colaboradores, mostraron que en el área hipotalámica anterior de la rata adulta, el éxtasis induce disminución del ácido ribonucleico mensajero de la GnRH y de testosterona en el suero, sin cambios en la concentración de LH, estos resultados llevaron a plantear que el blanco primario de la droga es el hipotálamo, lo que modifica la función de la hipófisis y esto se refleja en la disminución en la producción de testosterona en el suero. Sin embargo, no existe correlación entre los cambios en la producción de la testosterona y LH, además los autores no consideran el posible efecto de la anfetamina en el propio testículo, lo que explicaría la disminución en la concentración de la testosterona.

Conjuntamente los estudios antes mencionados consideran que las anfetaminas afectan la función gonadal, evaluada por la producción de espermatozoides y secreción de testosterona, debido a su acción en el eje hipotálamo-hipófisis. Sin embargo, no consideran sus efectos directos en la gónada.

JUSTIFICACIÓN

Las funciones del testículo, espermatogénesis y esteroidogénesis, son reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis, vía la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, FSH y LH, respectivamente. Se propone que la 5-HT actúa en los componentes de este eje y como consecuencia en la modulación de las funciones del testículo. También se sugiere que la amina actúa directamente en la gónada y regula la secreción de testosterona. Sin embargo, los resultados al respecto son escasos y contradictorios.

En la actualidad se ha incrementado el consumo de las anfetaminas y sus derivados, para atender problemas de salud o como drogas recreacionales. Estas actúan en el SNC y modifican la actividad del sistema serotoninérgico del hipotálamo. Sin embargo, no se ha considerado si estas sustancias actúan directamente en la gónada y modifican la síntesis de 5-HT del testículo, así como sus funciones.

Por ello, en el presente trabajo se analizaron los efectos de la PCA directamente en el testículo de la rata en la etapa juvenil, 30 días de edad, sobre la concentración de 5-HT en el testículo y en sus funciones, espermatogénesis (movilidad y viabilidad de los espermatozoides) y en la concentración de progesterona y testosterona en suero.

HIPÓTESIS

La 5-HT que se sintetiza en el testículo es esencial en la síntesis de testosterona y este andrógeno participa en la modulación de la espermatogénesis. Por ello, la inhibición de la síntesis de 5-HT, inducida por la administración de la PCA directamente en la gónada, disminuirá la secreción de progesterona y testosterona, así como la espermatogénesis.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la inhibición del sistema serotoninérgico del testículo en la movilidad y viabilidad de los espermatozoides y en la concentración de progesterona y testosterona en el suero de la rata macho prepúber.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Analizar los efectos de la administración intratesticular de PCA en la concentración de 5-HT y del ácido 5-hidroxiindolacético en el testículo de la rata macho prepúber.
- ❖ Analizar los efectos de la administración intratesticular de PCA en la concentración sérica de progesterona y testosterona de la rata macho prepúber.
- ❖ Analizar los efectos de la administración intratesticular de PCA en la movilidad de los espermatozoides.
- ❖ Analizar los efectos de la administración intratesticular de PCA en la integridad de la membrana y actividad mitocondrial del espermatozoide.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de 30 días de edad de las cepas CII-ZV, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (14 h luz-10 h oscuridad), con libre acceso al agua y al alimento. Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos experimentales: 1).- Animales sin tratamiento o testigo absoluto (TA); 2) Animales inyectados con 20 µl de solución salina al 0.9% (SS) en el testículo izquierdo (SSTI), derecho (SSTD) o en ambos (SSBIL); 3) A otro grupo de animales se les inyectó PCA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) de 0.03 mg por testículo en 20 µl de solución salina en el testículo izquierdo (PCATI), en el derecho (PCATD) o en ambos (PCABIL). La dosis de PCA que se administró en la gónada se seleccionó con base en la dosis que reporta Sandersh-Bush (1972), 10 mg/Kg de peso corporal, dosis que disminuye la síntesis y el metabolismo de la serotonina en el sistema nervioso central.

Inyección intratesticular de PCA o SS

La administración de una sola dosis de PCA o SS se realizó bajo anestesia con éter, se limpió la piel de la bolsa escrotal con jabón quirúrgico, se introdujo una aguja de (30G, 22mm), en la región caudal del testículo, y a una profundidad de 5 mm, posteriormente se realizó la inyección de PCA en cada gónada. La aguja de inyección se mantuvo en posición vertical durante dos minutos con la finalidad de que difundiera la PCA y posteriormente se retiró. El procedimiento antes descrito también se realizó de igual forma para la administración de solución salina (SS) (figura 8). Los animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron a los 65 días de edad.

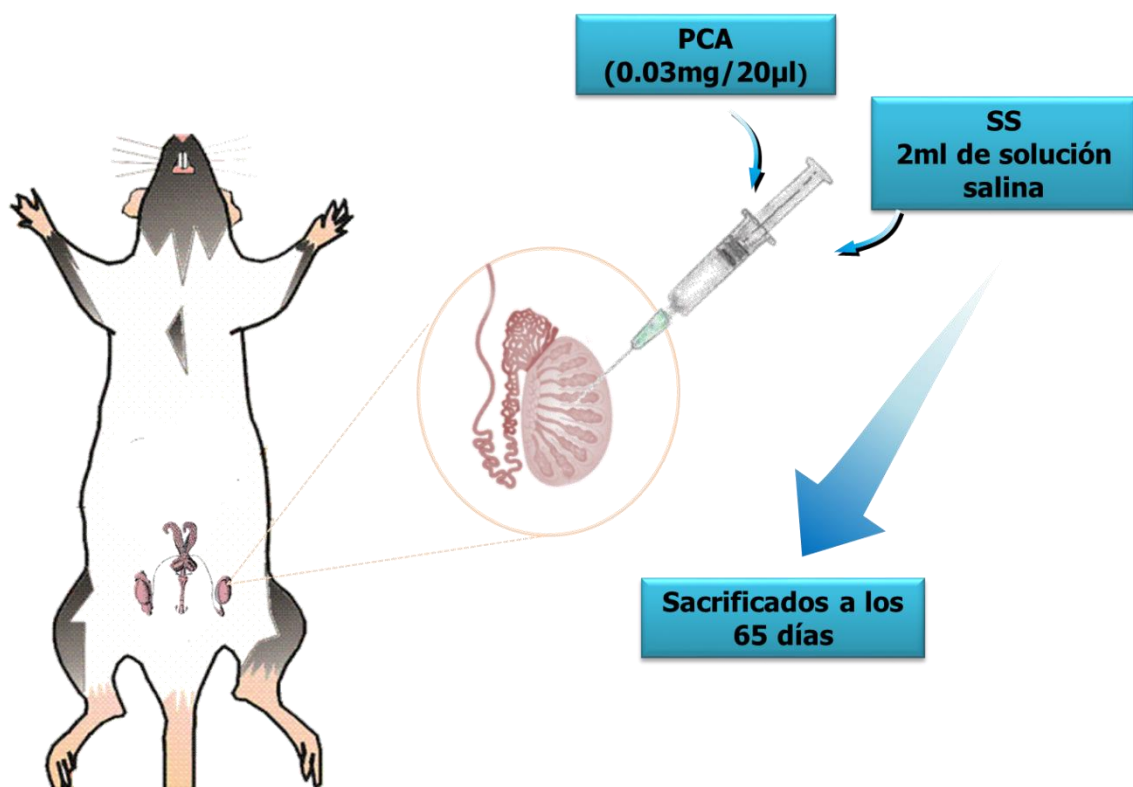


Figura 9. Inyección intratesticular de p-Cloroanfetamina (PCA) o solución salina (SS).

Autopsia de los animales

Los animales se pesaron, se sacrificaron por decapitación, se colectó la sangre del tronco que se dejó coagular por 20 min. Posteriormente se centrifugó a 3,500 rpm y se separó el suero que se almacenó a -20°C , para la cuantificación de hormonas esteroides por radioinmunoanálisis. En el momento del sacrificio se realizó la disección de los testículos, se pesaron y se tomó una fracción del tejido testicular (40-60 mg), a la altura de la red de testis y se almacenó a -70°C para la cuantificación de serotonina por la técnica de cromatografía de líquido de alta presión.

Evaluación de espermatogénesis

En el momento de la autopsia se realizó la disección de los conductos deferentes tanto del testículo izquierdo como el derecho, se tomó el paquete espermático por separado y se colocó en tubos eppendorf con 800µl de solución tirodes (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a una temperatura de 37°C durante 15 minutos.

Movilidad

Veinte µl de la solución espermática se colocaron en un portaobjetos y con ayuda de un microscopio óptico y a un aumento de 10x se contó el número de espermatozoides que presentaron movimientos ondulantes de la cabeza y flagelo, así como de aquellos que permanecieron inertes (inmóviles). Se contaron aproximadamente 100 células por conducto deferente.

Viabilidad

- 1) **Actividad Mitocondrial.** Uno de los aspectos importantes en el funcionamiento de los espermatozoides, son los procesos metabólicos que se llevan a cabo en la mitocondria y que contribuyen a mantener la viabilidad de estas células. Por ello, una alícuota de 100 µl de suspensión espermática se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente con 1µl del fluorocromo, rezasurin mas 1 µl del fluorocromo verde SYTOX (Molecular Probes Inc., Eugene,OR,USA) y con ayuda del clitómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson, USA) se realizó la evaluación en 10,000 células de la actividad mitocondrial, un indicador de la viabilidad de los espermatozoides (Zrimsek et al., 2006). Los resultados se expresaron en % de espermatozoides viables e inviables.
- 2) **Integridad de la Membrana.** Otro de los aspectos de la viabilidad del espermatozoide es la maduración del espermatozoide, proceso que se lleva a cabo en el epidídimo e involucra la reorganización de los componentes de la membrana y como consecuencia la estabilización de la misma. Para ello se tomaron 20 µl de la solución espermática y se agregaron 10 µl de los

fluorocromos, Ioduro de Propidio (rojo) y SYBR-14 (verde) (sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). De esta solución se tomó una alícuota de 10 μ l y se realizó la lectura en el citómetro de flujo, que identifica los espermatozoides viables, membrana plasmática íntegra y los no viables, membrana dañada (Pichardo et al., 2010). Se realizó la evaluación de 10,000 células.

Cuantificación de hormonas esteroideas

La cuantificación de progesterona y testosterona se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), que se llevó a cabo utilizando un kit- comercial (Coat-A-Count, USA Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA) para cada hormona. La concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/ml.

Se toman 100 μ L de suero problema, más 1000 μ L de la hormona marcada, 125 I progesterona o 125 I Testosterona según sea el caso. Para la cuantificación de progesterona, los tubos se agitan e incuban a temperatura ambiente durante tres horas. Posteriormente se decanta el sobrenadante de cada tubo, se secan las paredes de los mismos procurando que el papel absorbente llegue a una altura de los primeros 2/3 del tubo. Los tubos se colocan en las gradillas del contador para la evaluación de la concentración de progesterona. En la evaluación de testosterona, los tubos se colocan en baño María por 3 horas. Posteriormente se incuban a temperatura ambiente por 12 horas y se continúa con el procedimiento descrito en la evaluación de progesterona.

Preparación de la Curva de Progesterona

La curva se realizó por duplicado, se utilizaron calibradores con las siguientes concentraciones de la hormona

No. de tubo	Concentración del calibrador en ng/ml
1	0.0
2	0.1
3	0.5
4	2.0
5	10
6	20
7	40
8	80
Unión máxima: contiene anticuerpo más 1000 μ l de hormona marcada.	

Preparación de la Curva de Testosterona

La curva se realizó por duplicado, se utilizaron calibradores con las siguientes concentraciones de la hormona

No. de tubo	Concentración del calibrador en ng/ml
1	0.0018
2	0.100
3	0.200
4	1.000
5	2.000
6	4.000
7	8.000
Unión máxima: contiene anticuerpo más 1000 μ l de hormona marcada. Cuentas totales: contiene 1000 μ l de hormona marcada.	

Cuantificación de serotonina y del 5-HIAA

Cada fragmento de tejido testicular se pesó y se homogenizó en 300µl de ácido perclórico 0.1 N (Sigma Chemical Co., St Louis,MO, USA), se centrifugó a 12000 rpm a -4°C durante 30 min, se separó el sobrenadante y se filtró con membranas de celulosa de tamaño de poro de 0.45 µm(Millipore Bedford, MA,USA). Veinte µl del filtrado se inyectó al equipo de cromatografía de líquidos para su evaluación y los resultados se expresaron en ng/mg de tejido.

Análisis estadístico de los Resultados

El peso corporal y de los testículos, la concentración de serotonina y del 5-HIAA en el tejido testicular, de progesterona y testosterona se analizaron por la prueba de Análisis de varianza, ANDEVA seguida de la prueba de Tukey. El porcentaje de espermatozoides móviles y viables se realizó por la prueba de X^2 . Cuando se analizó la comparación de los resultados de dos grupos experimentales se utilizó la prueba "t" de Student. Únicamente se consideró como significativas las diferencias entre grupos cuando la p fue igual o menor al 0.05.

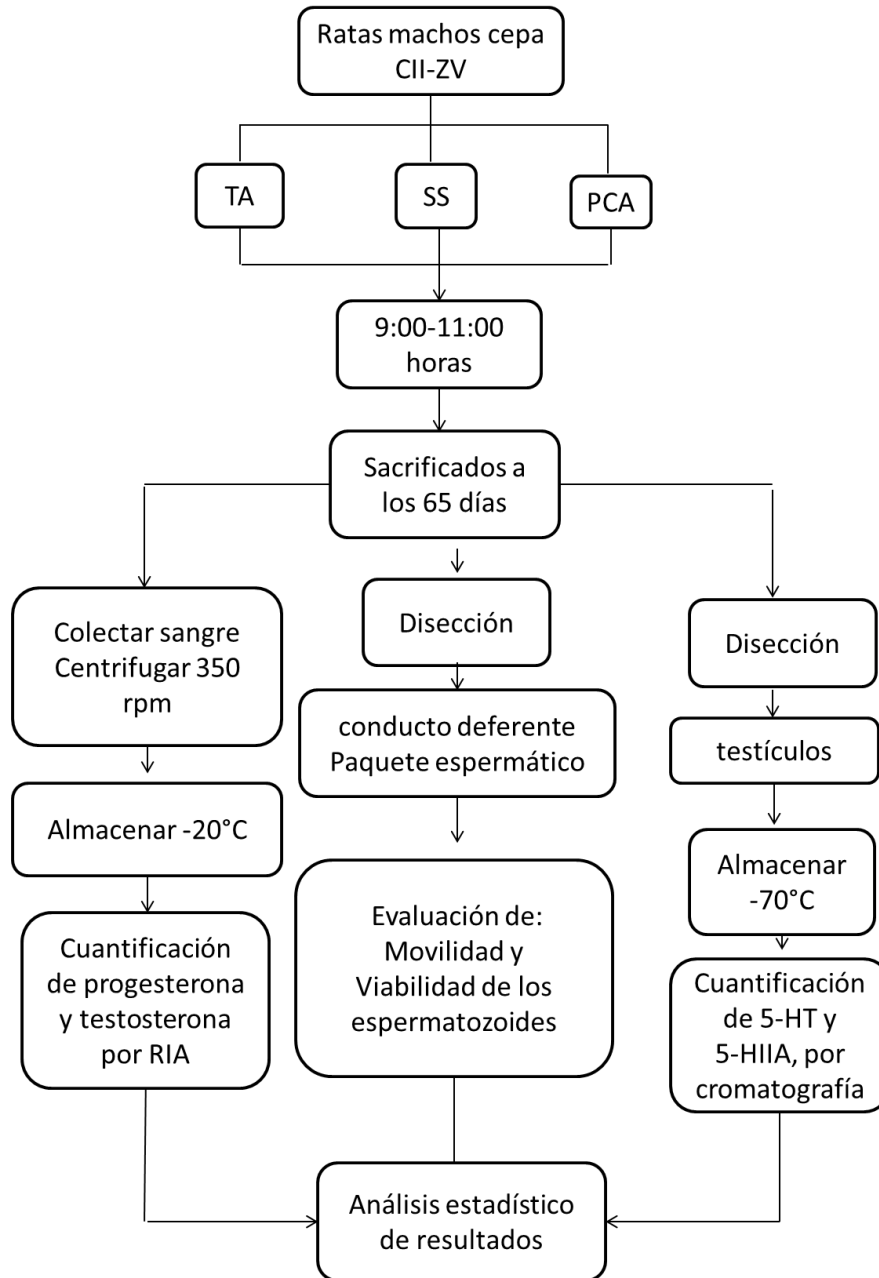


Figura 10. Diagrama de flujo de la metodología. Inyección en el testículo izquierdo, derecho o ambos de solución salina (SS) o con p-Cloroanfetamina (PCA) en ratas de 30 días de edad y sacrificado a los 65 días de edad.

RESULTADOS

El peso corporal de todos los animales en el día del tratamiento fue similar tanto en los que se les inyectó solución salina o PCA (30 días) y no se modificó en el día del sacrificio (figura 11).

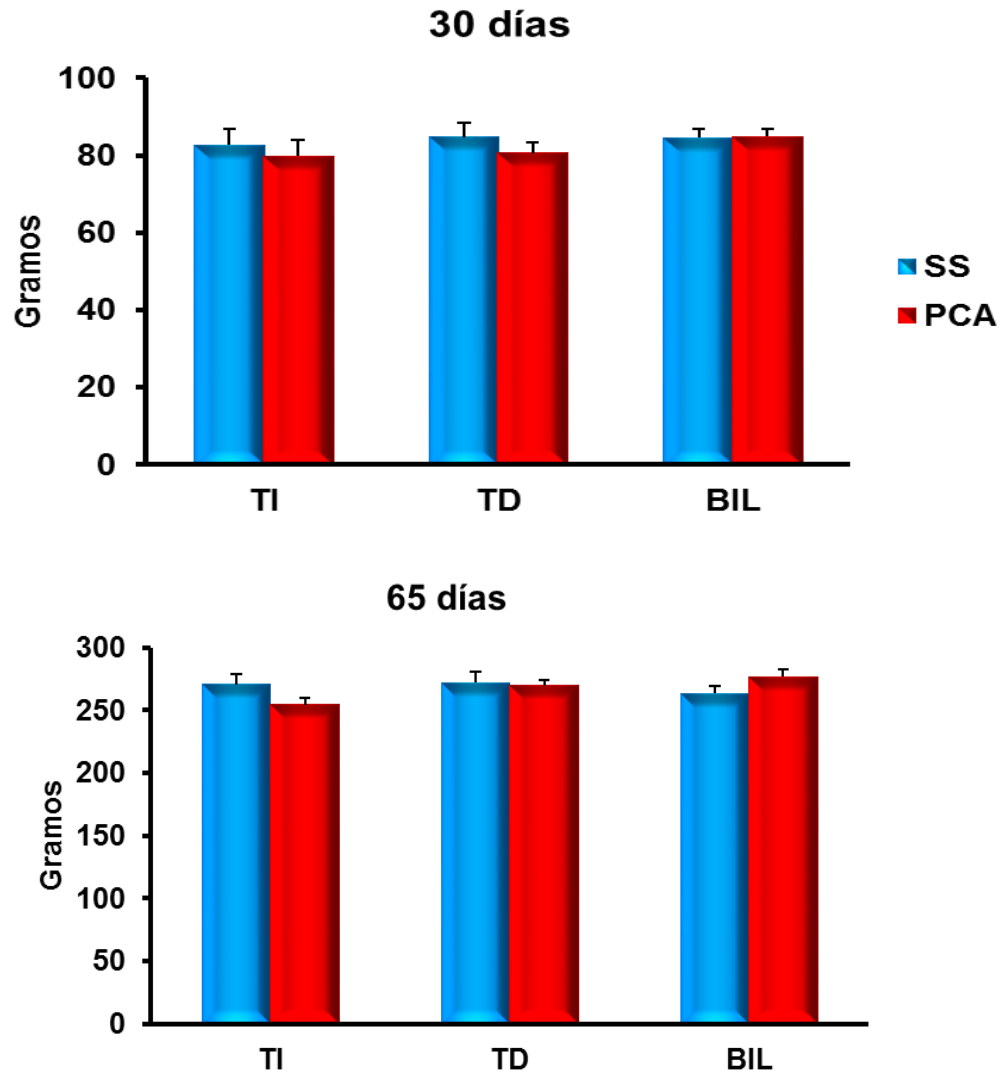


Figura 11. Peso corporal de ratas macho (media \pm e.e.m.) con inyección intratesticular de solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) en el testículo izquierdo (TI), derecho (TD) o ambos (BIL) en el día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días.

En comparación con el testículo contralateral, la inyección de solución salina o PCA no modificó el peso del testículo cuando se realizó la inyección en la gónada izquierda o derecha. En los animales que se realizó la inyección de PCA en ambos testículos, el peso de estos órganos fue similar al de los animales que se les inyectó con de solución salina (figura 12).

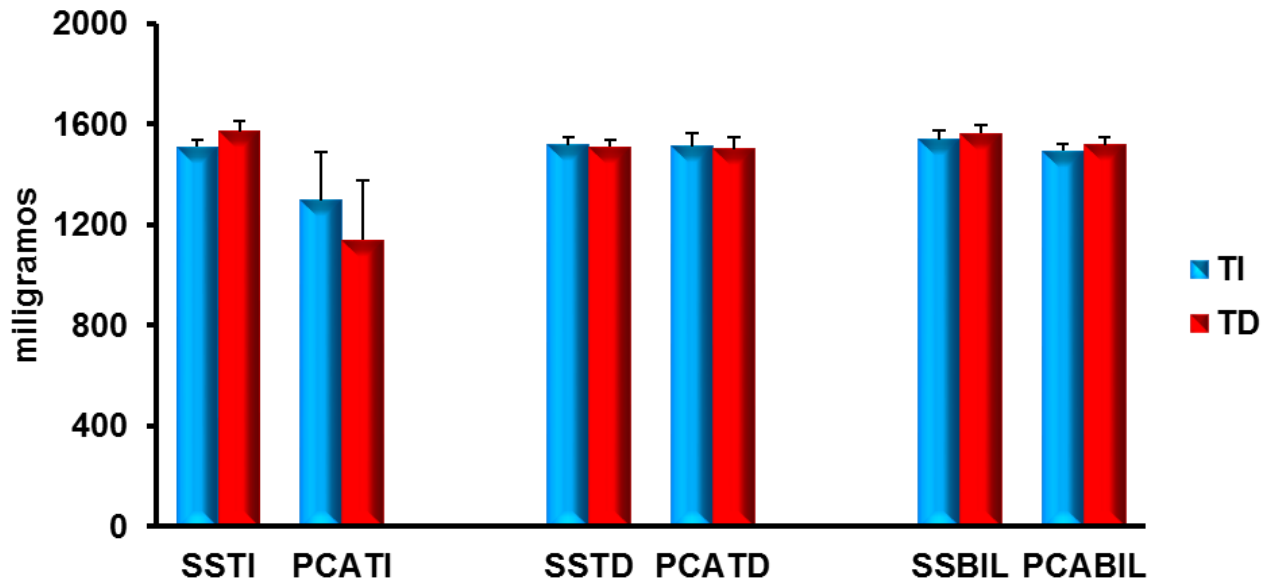


Figura 12. Peso de los testículos (media±e.e.m.) de ratas macho con inyección intratesticular de solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) en el testículo izquierdo (TI), derecho (TD) o ambos (BIL) en el día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días

Cuando se analizó la masa testicular, no se observaron cambios significativos en los animales inyectados con PCA en comparación con los animales que recibieron SS en el testículo izquierdo, derecho o ambos (figura 13).

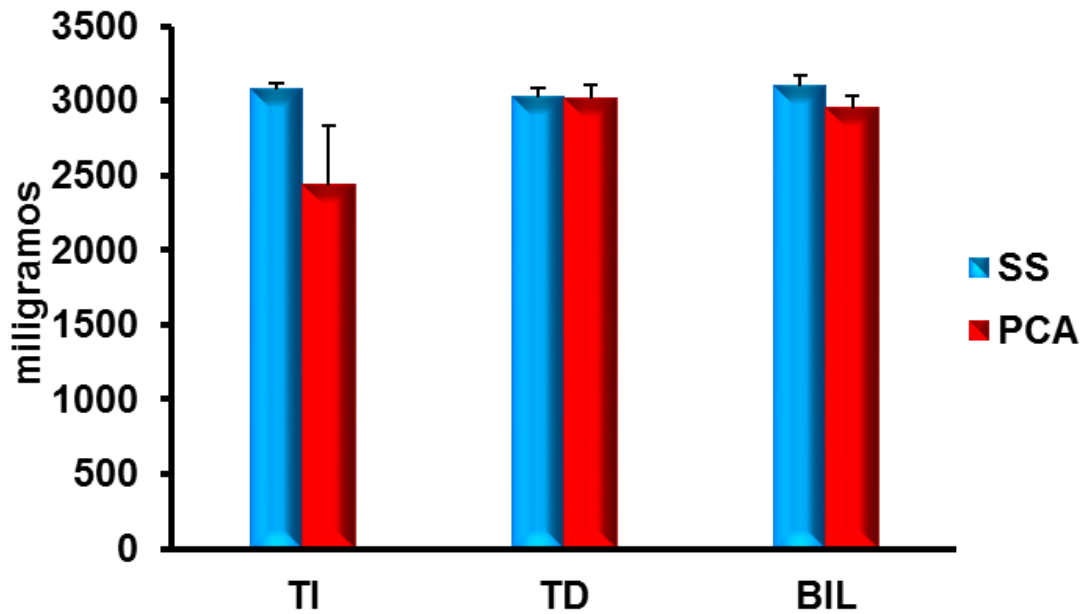


Figura 13. Masa testicular (media \pm e.e.m.) de ratas macho con inyección intratesticular de solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) en el testículo izquierdo (TI), derecho (TD) o ambos (BIL) en el día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días.

Concentración de Serotonina en el Testículo

En comparación con el testículo contralateral, cuando se realizó la inyección de SS o PCA en la gónada izquierda o derecha no se modificó la concentración de serotonina o de su metabolito. Este mismo comportamiento se observó cuando la administración de SS o PCA se realizó en ambos testículos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (media±e.e.m.) en las gónadas de ratas macho con inyección intratesticular de solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) en el testículo izquierdo (TI), derecho (TD) o ambos (BIL) en el día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días.

Grupo	N	5-HT	5-HIAA
SSTI		ng/mg de tejido	
TI	7	0.012±0.004	0.009±0.005
TD		0.020±0.003	0.010±0.008
PCATI			
TI	7	0.028 ±0.009	0.004±0.002
TD		0.022±0.007	0.005±0.002
SSTD			
TI	7	0.035±0.006	0.005±0.003
TD		0.002±0.005	0.004±0.002
PCATD			
TI	7	0.023±0.006	0.005±0.001
TD		0.002±0.005	0.008±0.006
SSBIL			
TI	7	0.021±0.007	0.005±0.004
TD		0.012±0.001	0.001±0.001
PCABIL			
TI	7	0.017±0.005	0.002±0.001
TD		0.009±0.004	0.002±0.001

Evaluación de la espermatogénesis

Movilidad

En comparación con los animales que se les administró SS, en los que se les inyectó PCA no se modificó el número de espermatozoides inmóviles.

En los animales que se les inyectó SS en el testículo izquierdo o derecho, el número de espermatozoides inmóviles fue similar al de la gónada contralateral. Este mismo comportamiento se observó cuando se realiza la inyección de PCA. En los animales que se les realizó la inyección de PCA en el testículo izquierdo, derecho o en ambos, no se modificó el número de espermatozoides inmóviles en comparación con los animales tratados con SS (figura 14).

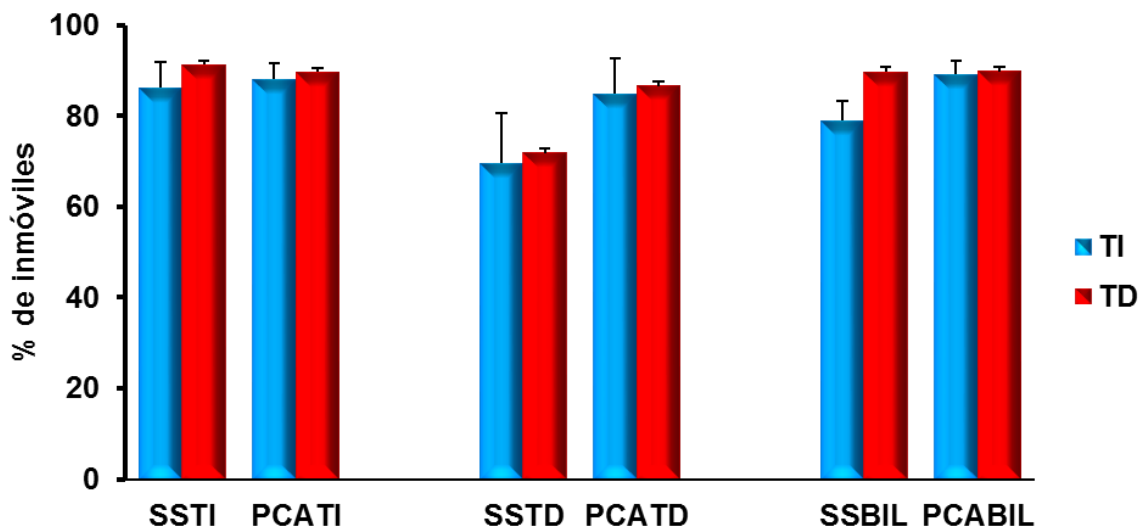


Figura 14. Porcentaje de espermatozoides inmóviles (media±e.e.m.) en el conducto deferente de ratas con inyección intratesticular de solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) en el testículo izquierdo (TI), derecho (TD) o ambos (BIL) en el día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días

Viabilidad

Integridad de Membrana

Cuando se analiza el porcentaje promedio total de viabilidad, evaluada por integridad de la membrana, se observó que en los animales que se les administró SS o PCA en el testículo izquierdo o derecho no se modificó la viabilidad de los espermatozoides en comparación con el testículo contralateral a la inyección. El porcentaje de espermatozoides viables en los animales tratados con PCA fue similar al observado en los animales que se inyectaron con solución salina (figura 15).

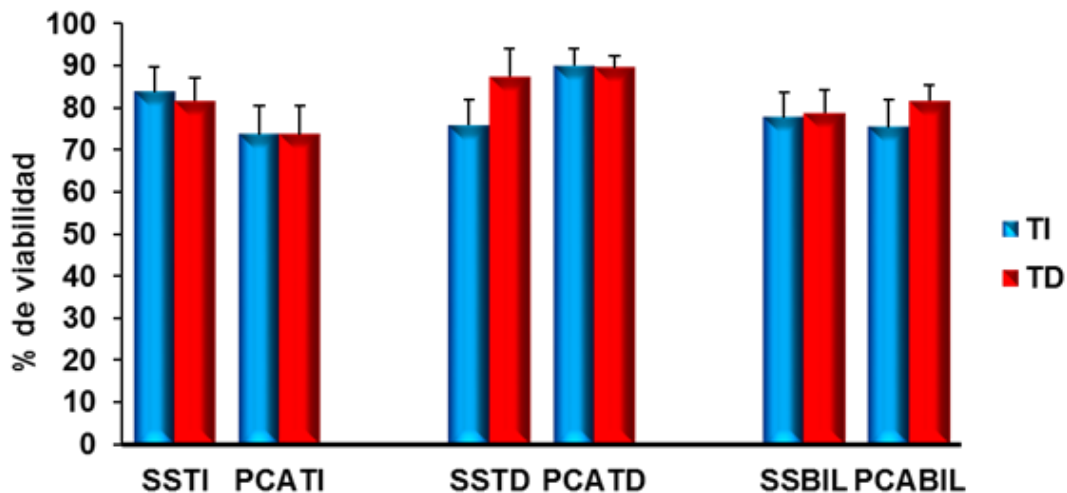


Figura 15. Porcentaje de espermatozoides viables (integridad de la membrana) (media \pm e.e.m.) de ratas macho inyectados con solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) en el testículo izquierdo (TI), derecho (TD) o ambos (BIL) en el día 30 de edad y sacrificados a los 65 días.

En la figura 16, se presentan los citogramas representativos de muestras de espermatozoides en los que se realizó la evaluación de un indicador de viabilidad, integridad de la membrana, al incubar los espermatozoides con dos fluorocromos, SyBR14 + Ioduro de Propidio. Los puntos negros representan espermatozoides que no muestran fluorescencia debido a que no se incubaron con los fluorocromos y es utilizado como punto de comparación de la población de espermatozoides viables y no viables. Los puntos en color verde representan espermatozoides SyBR14+/PI- (viables); los puntos en color rojo representan los espermatozoides SyBR14-/PI+ (no viables); los puntos amarillos representan los espermatozoides SyBR14+/PI+ (No viables).

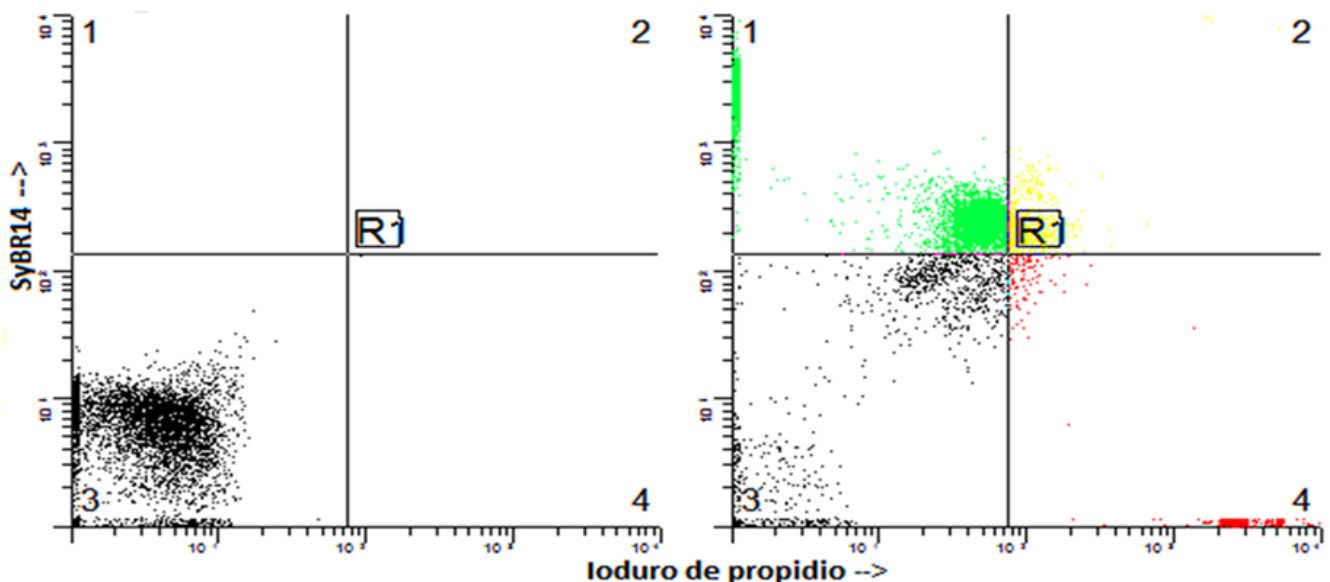


Figura 16. Citograma de espermatozoides en los que se evaluó la integridad de la membrana (Prueba de viabilidad de los espermatozoides), marcada con SyBR14 y Ioduro de Propidio (PI), en rata macho inyectados con solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) de animales de 30 días de edad y sacrificados a los 65 días. R1 (punto de intersección de las diferentes poblaciones de espermatozoides, viables y no viables)

Cuando se realizó el análisis de la viabilidad de los espermatozoides por animal, se observó una gran dispersión de los resultados tanto en los que se les inyectó SS como en los que recibieron PCA, debido a que el porcentaje de espermatozoides viables en la mayoría de los animales de los diferentes grupos experimentales varió de 50 a 90 %. Este parámetro fue similar en el testículo que se inyectó con SS o PCA y la gónada contralateral a la inyección (figura 17).

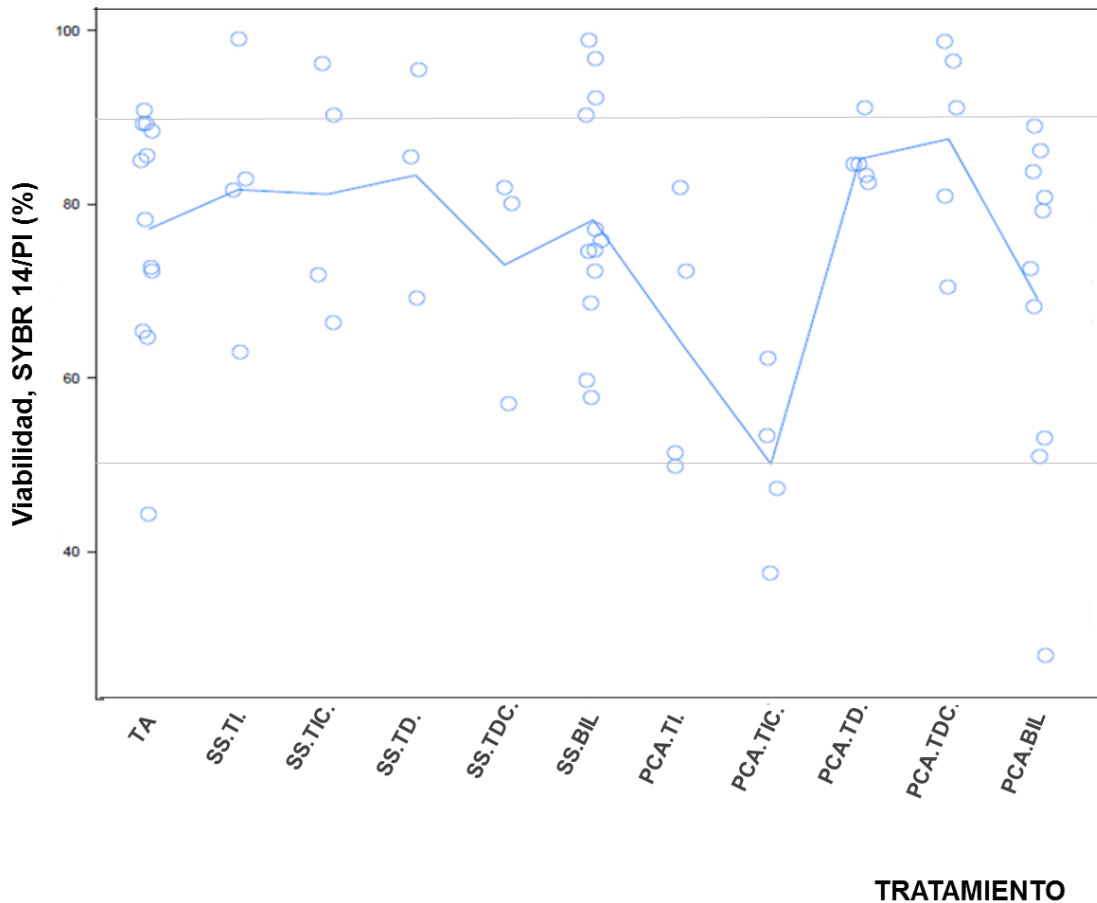


Figura 17. Representación de la evaluación de la integridad de la membrana (Prueba de viabilidad de los espermatozoides), marcada con SyBR14 e Ioduro de Propidio (PI), en rata macho inyectados con solución salina (SS) o p -Cloroanfetamina (pCA) de animales de 30 días de edad y sacrificados a los 65 días. Los círculos representan la proporción de espermatozoides viables (extremo superior de la gráfica) inviables (región inferior de la gráfica). Testículo derecho contralateral a la inyección (TDC), testículo izquierdo contralateral a la inyección(TIC).

Como se observa en la figura 17, el porcentaje de espermatozoides viables producidos en el testículo que se inyectó con PCA fue similar al evaluado en el testículo contralateral a la inyección.

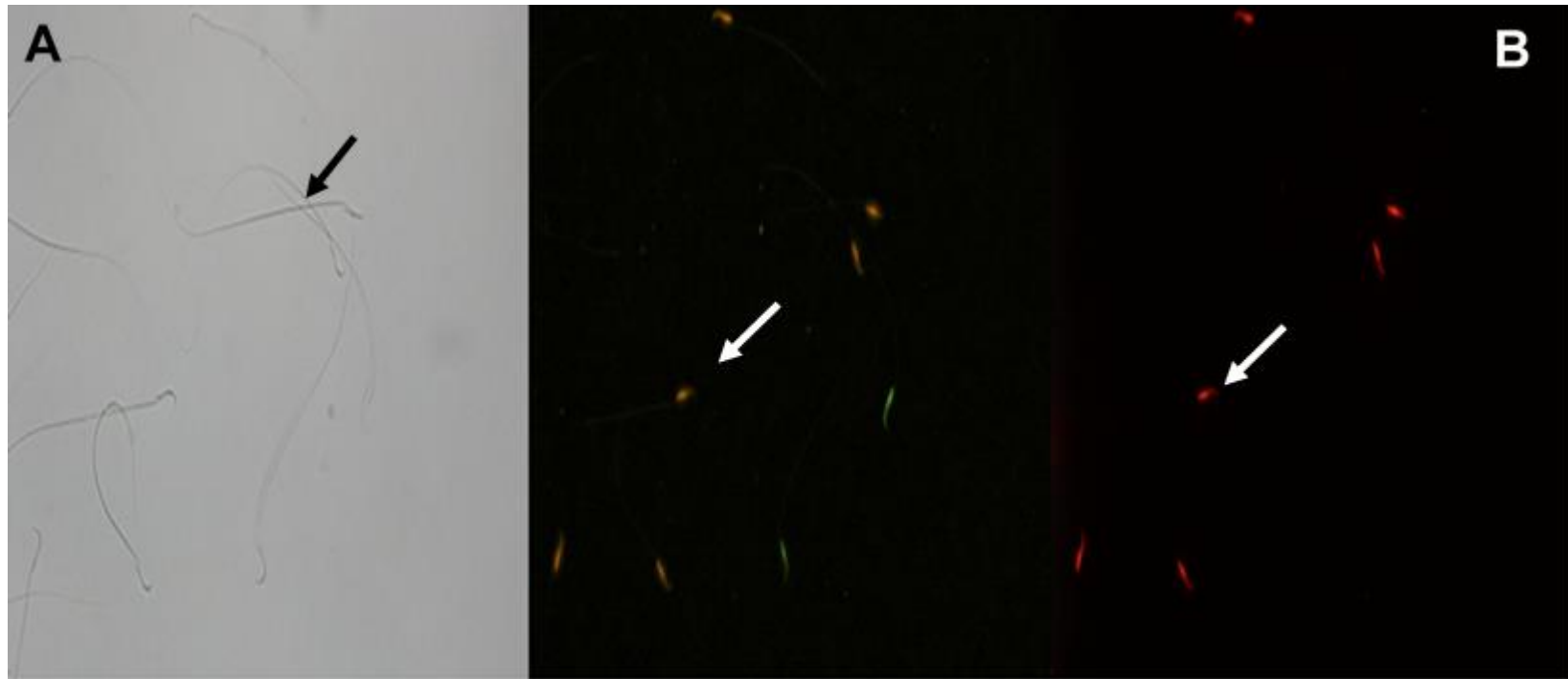


Figura 18. Micrografías de espermatozoides obtenidos del conducto deferente de ratas tratadas con PCA, en los que se evaluó la integridad de la membrana (Prueba de viabilidad de los espermatozoides). Campo claro (A), en el que se observan espermatozoides sin fluorescencia debido a que no se incubaron con los fluorocromos SyBR14 y Ioduro de Propidio (PI). Espermatozoides con fluorescencia (B) marca con SyBR14 (rojos) o Ioduro de Propidio (PI) (verdes) 200X.

Ana Laura Rodríguez Gutiérrez

Actividad Mitocondrial

En la figura 19 se presentan los resultados del porcentaje promedio de viabilidad, evaluada por actividad mitocondrial, en la que se observa que en los animales con SS o PCA no se modificó la viabilidad de los espermatozoides en comparación con el testículo contralateral a la inyección. El porcentaje de espermatozoides viables en los animales tratados con PCA fue similar al observado en los animales que se inyectaron con solución salina (figura 19).

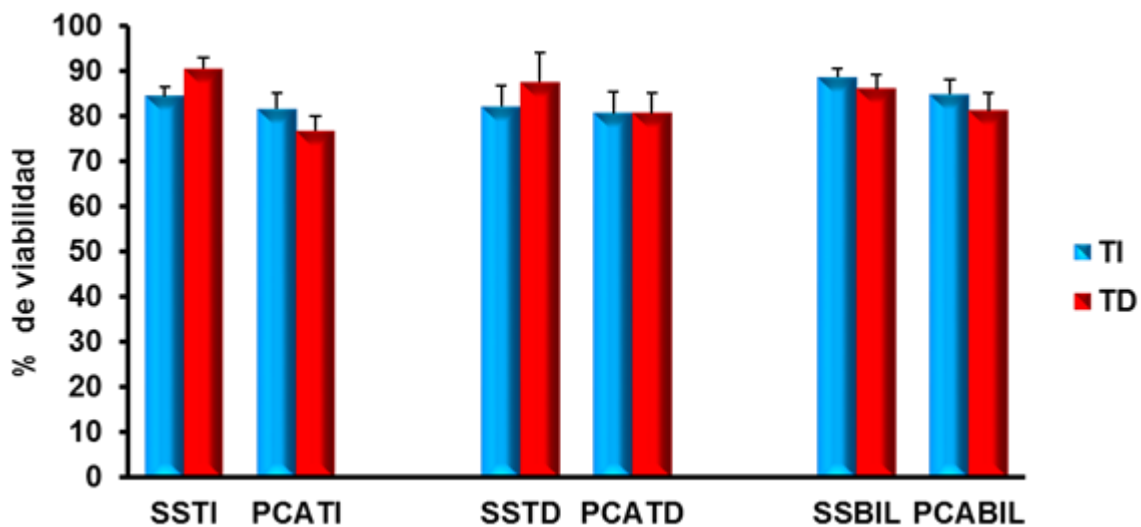


Figura 19. Porcentaje de espermatozoides viables (actividad Mitocondrial) (media \pm e.e.m.) de rata macho inyectados con solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) de animales de 30 días de edad y sacrificados a los 65 días.

En la figura 20, los puntos negros representan espermatozoides que no muestran fluorescencia debido a que no se incubaron con los fluorocromos y funcionan como punto de referencia. En color verde se representa espermatozoides Sytox+/Resazurin- (viables); los puntos en color rojo representan los espermatozoides Sytox-/Resazurin+ (no viables); en amarillo se representan los espermatozoides Sytox+/Resazurin+ (no viables).

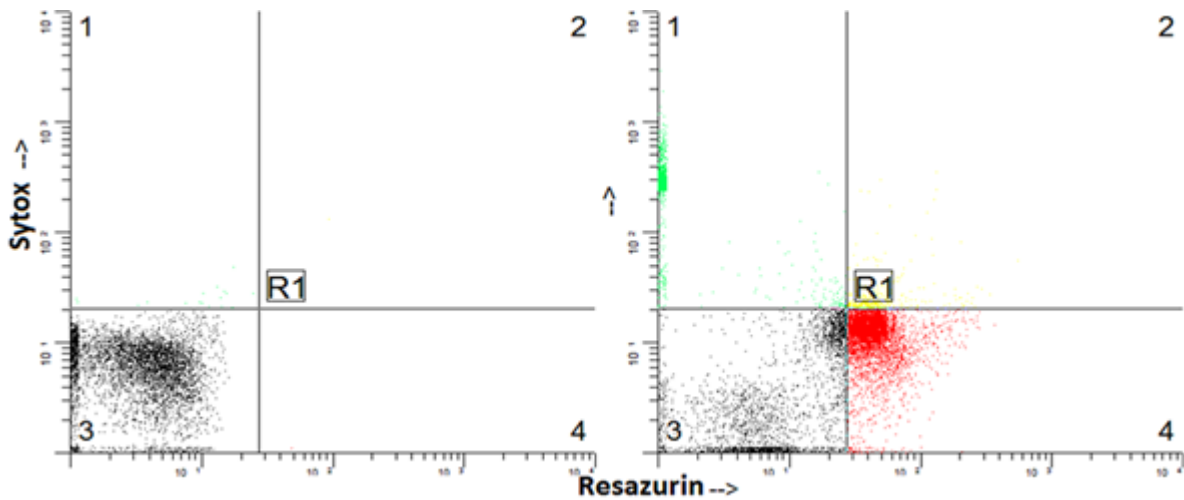
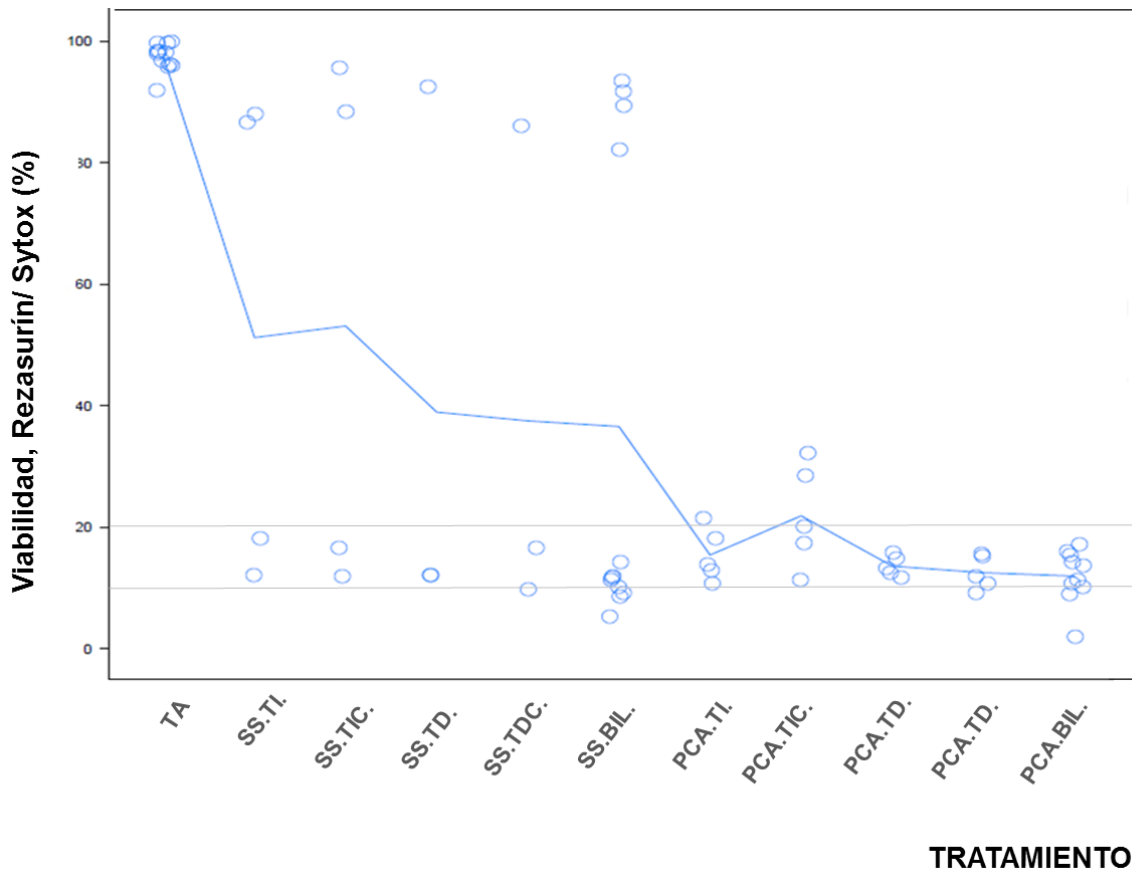


Figura 20. Citograma de espermatozoides en los que se evaluó la actividad mitocondrial (Prueba de viabilidad de los espermatozoides), marcada con Sytox y Resazurín, en rata macho inyectados con solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) a los 30 días de edad y sacrificados a los 65 días. R1 (punto de intersección de las diferentes poblaciones de espermatozoides, viables y no viables)

En el 50 % de los animales que se les inyectó SS en el testículo izquierdo, derecho o en ambos, del 90% al 100% de los espermatozoides presentaron actividad mitocondrial. Mientras que en el resto de los animales el porcentaje de espermatozoides que presentaron tal actividad disminuyó del 10 al 20 %. En todos los animales que se les inyectó PCA independientemente de la gónada tratada, el porcentaje de espermatozoides con actividad mitocondrial fue de 15 a 25 % (figura 21).

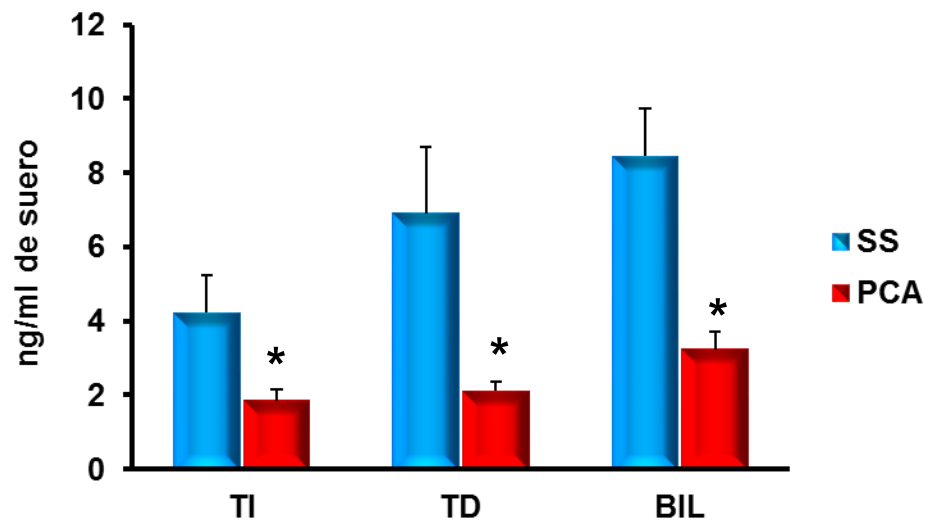


3Figura 21. Representación de la evaluación de la actividad mitocondrial (Prueba de viabilidad de los espermatozoides), marcada con Resazurín y Sytox, en rata macho inyectados con solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) de animales de 30 días de edad y sacrificados a los 65 días. Los círculos representan la proporción de espermatozoides viables (extremo superior de la gráfica) o inviables (región inferior). Testículo derecho contralateral a la inyección (TDC), testículo izquierdo contralateral a la inyección (TIC).

Concentración de hormonas esteroides

La concentración de progesterona en el suero de los animales con inyección intratesticular de PCA en testículo izquierdo, derecho o bilateral disminuyó significativamente en comparación con sus respectivos grupos de animales con SS (figura 22).

La concentración sérica de testosterona de los animales que recibieron PCA en el testículo izquierdo o derecho se incrementó significativamente en comparación con los animales que se les inyectó SS. Mientras que, cuando se efectuó la inyección de la PCA en ambos testículo, la concentración de testosterona disminuyó significativamente en relación a los que se les administró SS en ambas gónadas (figura 22).



*p <0.05 vs SS (Prueba "t" de Student)

Figura 21. Concentración (media \pm e.e.m.) de progesterona en el suero de ratas macho con inyección intratesticular de solución salina (SS) o p Cloroanfetamina (PCA) en el testículo izquierdo (TI), derecho (TD) o ambos (BIL) en el día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de este estudio nos permiten sugerir que la 5-HT en el testículo participa en la modulación de la secreción de testosterona. El hecho de que en los animales que se les inyectó la PCA en ambos testículos disminuyera la concentración de testosterona en el suero y que se acompañara de la disminución de la actividad mitocondrial apoya esta idea.

Se ha sugerido que una de las fuentes de 5-HT en el testículo posiblemente es endógena debido a que se sintetiza por las células de Leydig (Tinajero, 1993). En nuestro estudio, la administración directa de PCA en el testículo no modificó la concentración de 5-HT en este órgano, posiblemente debido a que a los 35 días después de la inyección, el efecto de la anfetamina sobre la síntesis de 5-HT ya no es evidente. En relación a esta idea se ha mostrado que cuando se administra por vía sistémica la PCA a ratas macho se inhibe la actividad de la triptófano hidroxilasa, enzima que cataliza la transformación del triptófano en 5-hidroxitriptófano y esto se traduce en la disminución en la concentración de 5-HT en el sistema nervioso central (Frazer y Hensler, 1999). Este efecto es evidente a los 2 días posteriores a la administración y el sistema serotoninérgico inicia su recuperación a los 10 días después del tratamiento (Sanders-Bush et al., 1972). Conjuntamente con las evidencias reportadas en bibliografía y lo observado en nuestro estudio es posible que la administración de una sola dosis de PCA en el testículo disminuyó la síntesis de 5-HT en la gónada en los días inmediatos al tratamiento, pero posteriormente se recuperó lo que se reflejó en falta de cambios de la concentración de la amina en el momento del sacrificio.

Otra posible explicación a la falta de cambios observada en los animales que recibieron la inyección intratesticular de PCA, es que posiblemente se deba a que en las células de Leydig existe una isoforma de la enzima triptófano hidroxilasa, limitante en la síntesis de 5-HT, la cual es resistente a los efectos de la anfetamina, tal como se ha mostrado en los mastocitos localizados en la duramadre de la glándula pineal.

En apoyo a esta idea, en ratones se identificó una segunda isoforma de la enzima limitante en la síntesis de 5-HT, la TPH2, que se encuentra presente principalmente en el Sistema Nervioso Central, mientras que en tejidos periféricos se encuentra la TPH1. Se propone que la actividad de las dos isoformas es afectada de forma diferencial por los agentes farmacológicos (Walther et al., 2003).

Al igual que en el sistema nervioso central, en el testículo la PCA no modificó la concentración de la noradrenalina, dopamina y sus respectivos metabolitos en el testículo. Existe información, en la que se muestra que un marcador del sistema noradrenérgico, la tirosina hidroxilasa se encuentra presente en el testículo y que las fibras catecolaminérgicas se distribuyen en la periferia del testículo en asociación con la cápsula, la vasculatura y en el mediastino (Rauchenwald et al., 1995).

Previamente mostramos que cuando se inyecta en el testículo izquierdo la PCA, disminuye el número de espermatozoides en el conducto deferente izquierdo y en el contralateral, el derecho no se modifica este parámetro, un efecto similar se presenta cuando se realiza la inyección del fármaco en la gónada derecha (García, 2011). Sin embargo, en el presente estudio cuando se realizó la evaluación de la movilidad no se observaron cambios en este parámetro de la espermatogénesis. Estos resultados posiblemente sean el reflejo de que en el epidídimo se llevaron a cabo adecuadamente los eventos que conducen a la maduración del espermatozoide y que este adquiriera la movilidad, ya que es en este órgano donde se llevan a cabo estos procesos (Ross et al., 2004).

El Ioduro de propidio tiene la capacidad de entrar en los espermatozoides con membrana plasmática dañada. Se une al núcleo, y emite fluorescencia roja, por lo que fue posible identificar a los espermatozoides muertos o en proceso de degeneración.

Mientras que el SyBR14, atraviesa la membrana intacta, se une al ADN y emite fluorescencia verde (Pichardo et al., 2010), lo que nos permitió identificar la población de espermatozoides vivos. Por ello, el hecho de que en los animales que se les administró PCA no se modificara, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra, indicador de viabilidad de los espermatozoides, nos llevó a pensar que la mayoría de los espermatozoides producidos en el testículo de estos animales eran vivos.

Sin embargo, cuando se analiza la función metabólica de los espermatozoides se observó que tal actividad celular está disminuida en los animales que se les administró la PCA. Tal evaluación es posible debido a que en la mitocondria de los espermatozoides existe actividad deshidrogenasa, por lo que al incubar los espermatozoides con el resazurín, las deshidrogenasas de las mitocondrias funcionales la reducen y se torna una molécula fluorescente verde (Pichardo et al., 2010), lo que nos permitió identificar este indicador de viabilidad de los espermatozoides.

Conjuntamente los resultados de la evaluación de dos indicadores de viabilidad de la membrana, nos llevaron a pensar que en los animales que se les administró la PCA, un alto porcentaje de espermatozoides evaluados estaban vivos, pero que en la mayoría de los casos su actividad mitocondrial era baja.

No tenemos una explicación al hecho de que en el 50 % de los animales que se les administró SS en el testículo izquierdo, derecho o ambos disminuyera el porcentaje de espermatozoides con actividad mitocondrial, mientras que en el 50% está actividad era alta. Este efecto posiblemente se asocie a la susceptibilidad diferencial que tienen los animales ante una manipulación.

Los cambios en la concentración de progesterona y testosterona en el suero de los animales que recibieron la PCA no se acompañó de modificaciones en la concentración de 5-HT en el testículo, lo que nos llevaría a pensar que la 5-HT en

este órgano no participa en la modulación de la secreción de testosterona en la rata macho. Estos resultados no coinciden con lo reportado en la bibliografía debido a que se sugiere que cuando se mantienen en cultivo células de Leydig y al medio se le adiciona 5-HT, disminuye la producción de testosterona (Tinajero, 1993). Sin embargo, el modelo reportado en la bibliografía es diferente al utilizado en nuestro estudio.

La disminución en la concentración de progesterona y el aumento de testosterona en el suero de los animales que se les administró la PCA en el testículo izquierdo, derecho es un indicador de que se activó la esteroidogénesis en el testículo. Es posible que esto sea el resultado de un mecanismo de compensación que se presentó en el testículo contralateral a la inyección, lo que se reflejó en el incremento en la esteroidogénesis, en respuesta a los cambios en el sistema serotoninérgico del testículo inducido por la administración de la PCA.

La posibilidad de que cuando se afecta el funcionamiento de una de las gónadas en el contralateral se activan mecanismo de compensación se apoya en los resultados de Furuya, (1990), quien mostró que cuando en la rata de 40 días se elimina una de las gónadas, se incrementa significativamente la concentración de testosterona 30 días después de la cirugía y esto se acompaña de la hipertrofia del tejido intersticial, evaluado por el aumento del volumen en general del tejido intersticial y de las células de Leydig. Eventos que indica que en el testículo remanente se incrementa la actividad esteroidogénica, lo que se refleja en el aumento en la producción de testosterona.

A diferencia de lo que se observó en los animales con inyección unilateral de la PCA, en los que se les administró el fármaco en ambos testículos, la disminución en la concentración de progesterona se acompañó de la disminución de testosterona, lo que indica que se inhibió la esteroidogénesis.

La posibilidad de que la disminución en la concentración de testosterona observada en los animales que se les administró bilateralmente la PCA, sea el reflejo de la acción de la anfetamina en la gónada se apoya en las evidencias que muestran que al mantener in vitro células de Leydig de ratas y administrar al medio anfetamina aumenta la concentración de AMPc y disminuye la actividad de las enzimas involucradas en la transformación del colesterol en testosterona, la 3β -HED, P450c17 y 17β -HED, lo que a su vez se traduce en la disminución en la concentración de testosterona.

Otra posibilidad es que la PCA al actuar en el sistema serotoninérgico del testículo en los días posteriores al tratamiento, modificará el sistema vascular del testículo provocando vasoconstricción, lo que se reflejó en la disminución de la disponibilidad de LH que llegan al testículo y por lo tanto esto se modificó el funcionamiento de la célula de Leydig. Esto posiblemente se reflejó en la disminución en la secreción de testosterona en los animales que recibieron la anfetamina. Esta idea se basa en el hecho de que se ha mostrado que en la 5-HT en el testículo puede modificar el flujo sanguíneo y como consecuencia la disponibilidad de las gonadotropinas que participan en la regulación de la esteroidogénesis (Collin et al., 1996).

CONCLUSIONES

La p-Cloroanfetamina no modifica a largo plazo al sistema serotoninérgico del testículo en la rata juvenil.

La inyección de PCA en el testículo disminuye la secreción de progesterona.

La inyección de PCA en el testículo izquierdo o derecho incrementa la secreción de testosterona en la gónada contralateral a la inyección.

La PCA disminuye la viabilidad del espermatozoide, evaluada por actividad mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

Alavi H., Taghavin M., Moallen S. (2008). Evaluation of effects of mathamphetamine repeated dosing on proliferation and apoptosis of rat germ cells. *System Biology Reproduction Medicine*. 542; 85-91.

Aragón M., Ayala M., Marín M., Aviles A., Damián P., Dominguez R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepupertal rat inhibitions spermatogenesis development. *Journal of Reproduction and Fertility*. 129; 717-727.

Aragón A., Arenas E., Arteaga M., Matzumura P., León M. (2013). Curso Teórico Practico; Análisis de la evaluación de la calidad espermática. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Berne M., Levy N. (2006). Fisiología. 4ta edición. Elversier España S.A. 817 Pág. ISBN 978-848174-948-9.

Campbell W. (2007). Urología. Tomo1, 9ª edición, Medica Panamericana S.A, México D.F.1127 pág. ISBN 978-950-06-8267.

Campos B., Vitale L., Calandra S., Chiochio R. (1990). Serotonergic innervation of the Rats testis. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88; 475-479.

Caravaca P., Castel J., Guzmán L., Delgado M., Mena G., Alcalde M., González P. (2005). Bases de la reproducción animal. Universidad de Sevilla.515 Pág. ISBN 84-472-0764-1.

Cediel J., Cárdenas M., García A., Chuaire L., Payón C., Villegas V., Sánchez C. (2009). Manual de histología; tejidos fundamentales. Facultad de Medicina. Universidad Del Rosario. 35 Pág. ISBN 978-958-8378-89-3.

Cheng Y., Wong E., Hele Y., Mruck D. (2010). Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Molecular Cellular and Endocrinology*. 5; 49-56

Collin O., Damber E., Berg A. (1996). 5-Hidroxytryptamine-a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 106; 17-22.

Csaba Z., Csernus V., Gerendai I. (1998). Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis. *Journal of Neuroendocrinology*.10; 371-376.

Curtis H., Schenek A., Flores G. (2006). Invitación a la Biología, 6ta edición, editorial Medica Panamericana México D.F. 675 Pág. ISBN 950-06-0447-7.

Dickerson M., Walker M., Reveron E., Duvauchelle I., Gore A. (2008). The recreational drug ecstasy disrupts the hypothalamic-pituitary-gonadal reproductive axis in adult male rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 88; 95-102.

Shishkina G., Dygalo N. (2000). Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for aggressive toward. *Toxicology and Pharmacology*. 125; 45-51

Ferramosca A., Provenzano P., Coppola L., Vincenzo Z. (2012). Mitochondrial Respiratory Efficiency is positive correlated with. Human Sperm Motility. *Journal of Urology*. 79; 809-814.

Frazer A., Hensler G. (1999). Basic Neurochemistry: Molecular and Cellular, Medical Aspects. Serotonin. 6ta edición. Department of Farmacology, University of Texas. 782884-7764.

Frith H., Chang M., Lattin L., Walls C., Hamm J., Doblin R. (1987). Toxicity of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the dog and the rat. *Journal of Society of Toxicology*. 91; 110-9.

Fuller W. (1992). Effects of p-chloroamphetamine on brain serotonin neurons. *Neurochemical Research*. 175; 449-456.

Fuxe K., Dahistrom A., Jonsson G., Marcellino D., Guescini M., Dam M., Manager P., Agnati L. (1994). The discovery of central monoamine neurons gave volume de transmission to the wired brain. *Progress in Neurobiology*. 90; 282-100.

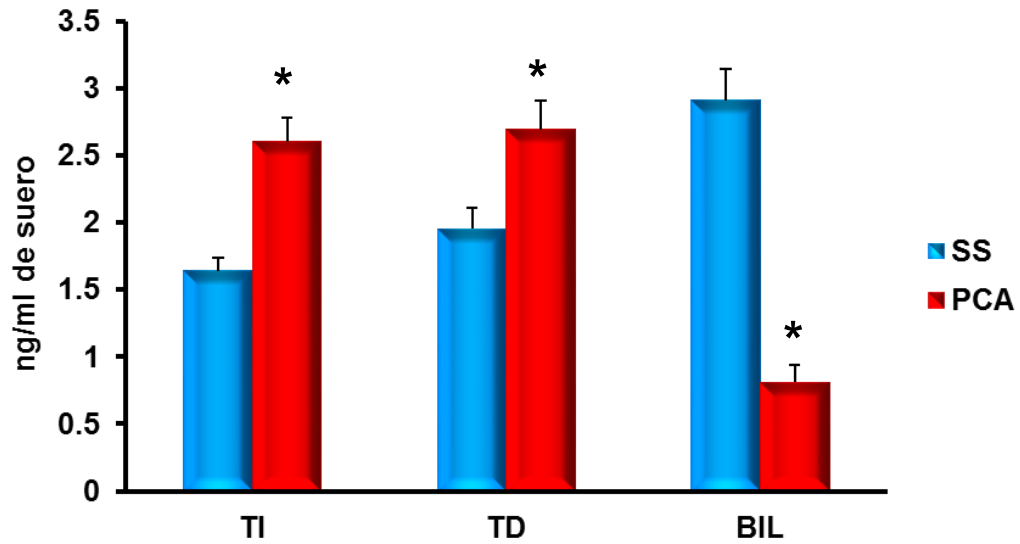
Furuya T. (1990). Onset of compensatory hypertrophy of interstitial tissue and Leydig cells in Rats Hemicastrated around the time of puberty. *Biology of Reproduction*. 42; 491-498.

Kormano M., Penttila A. (1968). Distribution of endogenous and administered 5-hydroxytryptamina in the rat testis and epididymis. *Annales Medicinæ Experimentalis et Biologi Fenniae*. 46; 468-473.

Gal B., López M., Martín A., Prieto J. (2007). Bases de la Fisiología, 2da edición. Tébar S.A. 626 Pág.

García M. (2011). Efecto de la administración sistémica e intratesticular de p-Cloroanfetamina sobre la secreción de testosterona y la espermatogénesis. La rata como modelo de estudio. Tesis Faculta de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Pág. 85

González G., Garcia M. (1990). Blood/seminal serotonin levels in infertile men with varicocele. *Archives of Andrology*. 24; 193-199.



* $p < 0.05$ PCA vs SS (Prueba "t" de Student)

Figura 22. Concentración (media \pm e.e.m.) de testosterona en el suero de ratas macho con inyección intratesticular de solución salina (SS) o p-Cloroanfetamina (PCA) en el testículo izquierdo (TI), derecho (TD) o ambos (BIL) en el día 30 de edad y sacrificadas a los 65 días de edad.

Gutiérrez G. (2005). Principios de anatomía, fisiología e higiene. Limusa: Noriega Editores. 309 Pág. ISBN 968-18-4662-1.

Luboshitzky R., Shen Z., Herer P. (2002). Seminal plasma melatonin and gonadal steroid concentrations in normal men. *Archives of Andrology*. 43; 225-232.

Llusiá J., Nuñez A. (1993). Tratado de Ginecología, 14va edición, Ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid España. 1058 Pág. ISBN 84-7978-092-9

Mardomingo SJ. (1994). Psiquiatría del niño y del adolescente. Díaz de Santos de S.A. Madrid España. 700 Pág. ISBN 84-7978-164-5

Mendoza Patiño N. (2008). Farmacología Médica. Universidad Nacional Autónoma de México: Medica Panamericana S.A de C.V. 1000 Pág. ISBN 978-968-7988-44-3

Pichardo L., Aragon A., Ayala E., Ignacio A., Dominguez V. (2010). Viability Test, Active Caspase-3 and-7, and chromatin structure in Ram Sperm Selected Using The Swim-Up Procedure. *Journal of Andrology*. 31; 169-176

Rauchenwald M., Steers W., Desjardins C. (1995). Efferent innervation of the rat testis. *Biology of Reproduction*. 52; 1136-11

Redolar D. (2008). Cerebro y Adicción. Editorial UOC, Barcelona. 568 Pág. ISBN 978-84-9788-747-2

Rerkamnuaychoke W., Nishida T., Kurohmaru M., Hayashi Y. (1989). Vascular morphology of the golden hamster spermatic cord. *Archives Histology and Cytology*. 52; 183-190.

Ross G., Gordon I., Wojciech P. (2004). Histología. Texto y atlas a color celular y molecular. 4ta edición, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 864 Pág. ISBN 978-950-06-0435-2

Russell L., Kershaw M., Borg K., Shennawy A., Rulli S., Gates R., Calandra R. (1998). Hormonal Regulation of Spermatogenesis in the Hypophysectomized Rat: FSH Maintenance of Cellular Viability during Pubertal Spermatogenesis. *Journal of Andrology*. 19; 308-319

Sandersh B., Bushing J., Sulser F. (1975). Long-Term effects of p-Cloroamphetamine and related drugs on central serotonergic mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 192; 33-41.

Sandersh B., Bushing J., Sulser F. (1972). Long-Term effects of p-chloroamphetamines on tryptophan hydroxylase activity and on the levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid in brain. *European Journal of Pharmacology Experimental*. 20; 385-388.

Setchel B., Maddocks S., Brooks D. (1994). Anatomy vasculature innervation and fluids of the male reproductive tract. The physiology of reproduction. Raven Press. New York, EUA, 1063-1170.

Scott F. (2005). Biología del desarrollo. 7ta edición. Editorial Medica Panamericana, México D.F. 882 pág. ISBN 950-06-0869

Shishkina GT., Dygalo N. (2000). Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressives toward humans. *Comparative Biochemistry and Phisiology*. 125; 45-51.

Sobotta W. (2006). Histologia. 2da edición, Medica Panamericana S.A. México D.F. 676 Pág. ISBN 978-84-9835-178-1

Syed V., Gomez E., Hecht N. (1999). Messenger Ribonucleic acids encoding a serotonin receptor and a novel gene are induced in Sertoli cells by secreted factor(s) from male rat meiotic germ cells. *Journal Endocrinology*. 140; 5754-60.

Tinajero J., Fabbri A., Ciocca D., Dufau, M. (1993). Serotonin secretion from rat leydig cells. *Journal Endocrinology*. 133; 3026-9.

Törk I. (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Annals Academy of Sciences*. New York. 600; 9-34.

Tresguerres J. (1999). Fisiología Humana. McGraw-Hill. Madrid España.389 Pág. ISBN 1033-1047.

Urbina M., Biber J. (2008). Fertilidad y reproducción asistida. Medica Panamericana S.A, México D.F. 623 Pág. ISBN 9789806908161

Walther D., Peter J., Bashammakh S., Hortnag H., Voits M., Fink H., Bader M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan Hydroxylase isoform. *Science* 3; 299-76

Whitaker A. (1999). The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology*. 21; 2s-8s

Vélez H., William R., Borrero J. (2006). Endocrinología. 6ta edición. Corporación para Investigaciones Biológicas, CBI: Bogotá Colombia. 448 Pág. ISBN 958-9400-75-2.

Yamamoto Y., Yamamoto K., Hayase T. (1999). Effect of methamphetamine on male mice fertility. *Journal of Obstetric Gynecology Research*. 25; 353-8.

Yie S., Daya S., Brown G., Deys L., Young L. (1991). Melatonin and aromatase stimulating activity of human seminal plasma. *Journal of Andrology*. 23; 227-231.

Zrimsek P., Kosec M., Kunc I., Mrkun J. (2006). Determination of the diagnostic value of the rezasurin reduction assay for evaluating boar semen by receiver operating characteristic analysis. *Journal of Andrology*. 8; 343-8

Páginas de internet citadas

<http://www.gladysuribeblog.blogspot.mx>

[www.google.com.mx/search=tubulo + seminífero](http://www.google.com.mx/search=tubulo+seminifero)