



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Efecto de la administración intratesticular de 5,6-Dihidroxitriptamina
en la espermatogénesis y en la estructura del testículo de la rata
prepúber

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

Sandra Ivette Rodríguez Trujillo

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar



México, D.F.

2015



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

Efecto de la administración intratesticular de 5,6–Dihidroxitriptamina
en la espermatogénesis y en la estructura del testículo de la rata
prepúber

Tesis para obtener el Título de:

BIÓLOGA


PRESENTA:

Sandra Ivette Rodríguez Trujillo

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

Tesis realizada en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción,
Laboratorio de Pubertad

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de PAPITT,
IN223714



La voluntad es lo que puede darte el triunfo cuando tus pensamientos te dicen que ya estás derrotado, la voluntad es lo que te hace invulnerable. Lo importante para un guerrero es llegar a la totalidad de uno mismo, el guerrero busca la impecabilidad en sus propios ojos y llama a eso humildad, la humildad implica ser impecable en sus propios actos y sentimientos, debes empujarte más allá de tus límites, cuando un hombre decide hacer algo debe ir hasta el fin, buscar un camino con corazón y voluntad...ese es el modo del guerrero.

Juan Matus

... Vivimos en un mundo estremecedoramente bello y misterioso, lleno de complejos mecanismos que desencadenan reacciones que culminan en lo que parecen simples placeres para nosotros como el aroma de una flor o el sabor de una fruta... Un científico es humilde al saber que podrá acercarse a la verdad pero nunca tendrá la verdad absoluta. Un científico es historia, ya que su legado permanecerá para la posteridad y análisis de generaciones futuras. Un científico es un soñador con disciplina.

Roberto Rojo

*Alguien me habló todos los días de mi vida
al oído, despacio, lentamente
Me dijo: vive, Vive, VIVE!...Era la muerte.*

Jaime Sabines

“Nada tiene sentido en la biología si no es a la luz de la evolución “

T. Dobzhansky

Agradezco especialmente a la Dra. María Elena Ayala Escobar, la confianza que me brindó la por abrir las puertas de su laboratorio e integrarme a su equipo, todos sus consejos tanto académicos como personales y especialmente por compartir sus valiosos conocimientos conmigo, por hacerme ver mis errores siempre para bien, día a día los llevo conmigo tratando de ponerlos todos en práctica.

A mis compañeros de laboratorio: Nicté, Gracias por tu paciencia, amistad, consejos y apoyo a lo largo de estos años, eres una gran persona. Juan Carlos, Ana, Magali, Jessi, Maribel, Jessica y Adrián, por su valiosa contribución en los seminarios, por los momentos compartidos, por la amistad y su ayuda en el trabajo experimental.

Quiero agradecer también infinitamente a mis padres, por todo el apoyo que siempre me han brindado, además de mil y un atributos que puedo decirles, son para mí un gran ejemplo de fortaleza, madurez, de vitalidad y tenacidad, no tengo palabras suficientes para devolverles aunque sea un poco de todo su inmenso apoyo aun cuando la salud no está a nuestro favor siempre está ahí la simpatía de papá o un abrazo y consejo de mamá. Por ustedes he logrado alcanzar algunas de mis metas, si no fuera también por su esfuerzo cada día o los desvelos jamás hubiera llegado hasta aquí, cada uno de mis éxitos también son suyos.


Beto, no pude haber tenido un mejor hermano que tú, gracias por ser mi compañero de vida, mi cómplice, mi amigo, por los miles de consejos, regaños y cuidados que siempre he recibido de ti, gracias por compartir tu pasión por tu vocación y conocimientos conmigo, por aguantarme en mis peores momentos, y estar ahí siempre para hacerme reír. Por los lugares que me has llevado a conocer y vivir momentos inolvidables, por que crecimos junto a un ser que nos unió más para siempre, gracias por ser y estar siempre.

Gracias a mis Tíos Guadalupe y Ambrosio, tengo para ustedes más que un agradecimiento, son ejemplo infinito y admirable que lo que es la fortaleza entre una pareja frente a las adversidades, de ustedes aprendí que nunca habrá nada más valioso que la salud, su apoyo cuando mis padres lo han necesitado. Por su cariño y haberme enseñado lo que es la vida fuera de una zona de confort.

A mis tíos Jesús y Patricia porque de ustedes admiro la gran paciencia y fortaleza que muestran frente a cualquier circunstancia, por ser como unos padres para Beto y para mi mostrándonos su ejemplo para continuar y su incondicional apoyo.

A mis Tíos Antonio, Martha, Graciela, Alberto, Juana y David por hacer de mi infancia mejor de lo que pude haber deseado, por los juegos, por las aventuras y las palabras que aún después de tantos años y la distancia que ahora existe, jamás han dejado de apoyarme con su cariño, consejos y apoyo que supera lo material, ustedes son un ejemplo a seguir.

A mi primos, Diana, Adolfo, Angie, Belén, Gonzalo, Ulises, Francisco, Elvia, Juan... más que mis primos ustedes son como mis hermanos,



Gracias por ser parte de lo más valioso que existe para mí, mi Familia.

A mis amigos:

Dulce gracias por tu valiosísima amistad, por la confianza que me has brindado siempre, por tus detalles, por las risas, las lágrimas compartidas, por dejarme ser parte de tu vida y tu familia, por tus consejos y el tiempo, te quiero Morris☺.

Roberto, mi querido amigo, gracias por todo lo que has compartido conmigo, por darme la mano para siempre levantarme cuando tropiezo, por las risas, por siempre dar una palabra de aliento, por las mejores aventuras tan extremas que hemos vivido, por los años de confianza ¡Si tú saltas, yo salto!
¿No?

Víctor, porque has sido más que sólo uno de mis mejores amigos, un compañero de risas, de experiencias nuevas, por que crecí con ustedes... tantos años y tantas aventuras que hemos compartido siempre serán parte de lo que soy y seré para toda la vida.


Gracias Erika por ser incondicional, por las risas, por tu gran ejemplo como Madre y amiga, eres parte de este camino en la universidad que definitivamente llegó para cambiar el rumbo de mi vida, las cosas que compartimos durante algún tiempo siempre las llevaré conmigo como las mejores experiencias en ésta etapa, gracias por tu amistad y por compartir conmigo tu amor por la vida.

Nicté , Cecilia y Gabriela, gracias porque amistades como ustedes no se encuentran a la vuelta de la esquina, por compartir parte de éste camino tan hermoso que me pudo ofrecer la Biología, por que aprendí mucho de ustedes y por dejarme ser parte de sus vidas ☺ las quiero.

Gracias Juanjo por tu amistad, risas y por las miles de palabras tan acertadas que siempre compartes conmigo, y por abrir las puertas de un mundo que desconocía, un gusto haberte conocido.

Julio gracias por ser, porque he aprendido de ti que las excepciones siempre son una puerta a un camino diferente de vivir, a pesar de los años nunca fue tan acertado el tiempo en volver a cruzar nuestros caminos y seguir aprendiendo de ti.

A aquellas personas que se nos adelantaron, Abuela Rosa, Sr. Dionisio, gracias por hacerme fuerte, por enseñarme que la vida es un suspiro y tenemos que vivirla cada segundo como si fuera el último...



Índice

Resumen.....	I
INTRODUCCIÓN.....	1
Serotonina.....	1
Aparato Reprodutor del macho.....	4
Espermatogénesis.....	6
Espermiogénesis.....	8
Espermatozoide.....	10
Anormalidades.....	12
Movilidad.....	12
Esteroidogénesis.....	13
Regulación hormonal de las funciones del testículo.....	17
Serotonina y funciones del testículo.....	20
Regulación neural de las funciones del testículo.....	21
Anfetaminas, Serotonina y funciones del testículo.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Inyección intratesticular 5,6-DHT o VH.....	27
Procedimiento de autopsia.....	28

Cuantificación de 5-HT Y 5-HIAA.....	28
Espermatogénesis.....	28
Estructura del testículo.....	29
Cuantificación de Testosterona en suero.....	29
Análisis estadístico de los resultados.....	29
RESULTADOS.....	30
1) Peso del testículo y masa testicular.....	30
2) Concentración de 5-HT y 5-HIAA.....	31
3) Concentración de testosterona.....	32
4) Espermatogénesis.....	32
4.1) Movilidad de espermatozoides.....	33
4.2) Espermatozoides anormales.....	35
4.3) Alteraciones en la cabeza.....	36
4.4) Alteraciones en la pieza media.....	38
4.5) Alteraciones en todo el espermatozoide.....	39
4.6) Evaluación de la estructura del testículo.....	41
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	46
CONCLUSIONES.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53

Resumen

La serotonina en el testículo modula sus funciones, espermatogénesis y secreción de testosterona, hormona que contribuye con el mantenimiento de la estructura y función de la gónada. En la actualidad existen una serie de sustancias, como las anfetaminas o sus derivados que disminuyen la actividad del sistema serotoninérgico en el hipotálamo. Cuando en la rata macho prepúber de 30 días de edad, se le administra un derivado de las anfetaminas, la p-cloroanfetamina (pCA), disminuye la producción de testosterona y la espermatogénesis. El efecto que ejerce la pCA es mediado por la formación de un metabolito, la 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT).

Con base en lo anterior, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración intratesticular 10 μ g de 5,6-DHT, neurotóxico selectivo del sistema serotoninérgico, en ratas macho de 30 días de edad; sobre la concentración de serotonina en el testículo izquierdo, derecho y en las funciones del testículo (espermatogénesis y secreción de testosterona).

En comparación con el grupo testigo absoluto o con el grupo vehículo (inyección de ácido ascórbico en el testículo), en los animales a los cuales se les administró 5,6- DHT, y se sacrificaron a los 65 días de edad, la concentración de serotonina disminuyó significativamente en el testículo izquierdo (0.027 ± 0.005 , 0.028 ± 0.007 vs 0.019 ± 0.008 ng/mg de tejido $p < 0.05$) y en el derecho (0.017 ± 0.002 , 0.026 ± 0.005 vs 0.016 ± 0.008 ng/mg de tejido, $p < 0.05$). No se presentaron cambios en la concentración del metabolito de serotonina, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

En relación con el grupo testigo absoluto o con el grupo vehículo en los animales a los cuales se les administró 5,6- DHT, la concentración de testosterona en suero disminuyó significativamente (3.40 ± 0.34 ; 3.43 ± 0.21 vs 1.68 ± 0.35 ng/mL $p < 0.05$).


En comparación con el grupo testigo absoluto, en el grupo de animales a los que se les inyectó ácido ascórbico o 5,6-DHT se modificó significativamente la movilidad de los espermatozoides en ambos testículos, izquierdo (43.35 ± 2.32 vs 23.02 ± 3.18 , 16.9 ± 3.69 %, $p < 0.05$), y derecho (36.94 ± 2.32 vs 25.02 ± 4 , 13.32 ± 1.66 % $p < 0.05$).

En el análisis de la morfología de los espermatozoides se observó un aumento significativo en el número de espermatozoides anormales en los animales que se les inyectó la 5,6- DHT, testículo izquierdo (11.74 ± 0.67 vs 30.46 ± 1.55 , 37.4 ± 1.13 , $p < 0.05$) y derecho (13.1 ± 1.05 vs 31.42 ± 1.44 , 39.36 ± 0.43 $p < 0.05$) en comparación con el grupo de animales testigo absoluto o con ácido ascórbico.

Las anomalías que se observaron en el espermatozoide involucraron a la cabeza, pieza media y flagelo.

Las alteraciones en la morfología el espermatozoide se acompañaron de daño en la estructura del testículo que involucró la desorganización del epitelio seminífero.

Con base en los resultados del presente estudio se concluye que la 5,6-DHT inhibe al sistema serotoninérgico del testículo y que esto se acompaña de la disminución de las funciones de la gónada del macho.



Introducción

Serotonina

Las aminas biogénicas son un grupo de neurotransmisores derivados de la descarboxilación enzimática de los aminoácidos. Entre estos transmisores se incluyen las catecolaminas y la serotonina, las que se encuentran implicadas en la regulación de una amplia gama de funciones cognitivas y homeostáticas, así como en aspectos reproductivos (Aliya y Stanwood, 2009).

La serotonina o 5-Hidroxitriptamina (5-HT) se sintetiza en los somas de las neuronas serotoninérgicas que se localizan en la región del mesencéfalo, el núcleo del rafé que consisten de nueve grupos de neuronas que se identifican con la letra B seguido de un número del 1 al 9 (B₁ al B₉) y se dividen en dorsal (NDR), medial (NMR) y del puente (NPR). Las fibras que se originan en estos grupos de neuronas se proyectan a diferentes regiones del cerebro como la corteza prefrontal, hipotálamo e hipófisis y a la médula espinal. En el hipotálamo se le identifica en diferentes núcleos como el paraventricular, supraóptico, núcleo supraquiasmático, ventromedial y arcuato (Palkovits, 1977; Jorgensen, 2007; Wenyu y col., 2010) (Figura 1).

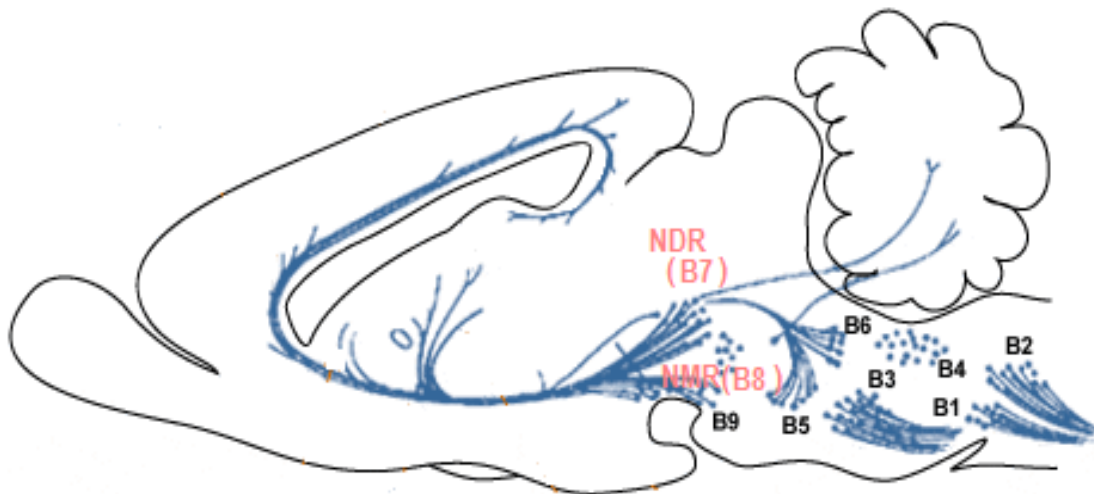


Figura 1. **Núcleo del rafé, B1 a B9 paquetes de neuronas serotoninérgicas, Núcleo dorsal del rafé (NDR); núcleo medial del rafé (NMR)** (Modificado de Jorgensen, 2007).

A la serotonina también se le encuentra en las células y tejidos periféricos, como las plaquetas, mastocitos, células enterocromafines, el epidídimo y en la cápsula y tejido intersticial del testículo (Campos y col., 1990; Tinajero y col., 1993; Aguilar y col., 1995; Sirotkin y Schaeffer, 1997; Aragón, 2005; Jorgensen, 2007; Sanders-Bush y Hazelwood; 2012).

La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido triptófano que proviene de los alimentos, éste atraviesa la barrera hematoencefálica y se incorpora a la neurona serotoninérgica por un mecanismo de transporte activo. El siguiente paso es la transformación del aminoácido en 5-Hidroxitriptofano (5-HTP), por acción de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), de la cual existen dos isoformas TPH1 y TPH2, la última predomina en el sistema nervioso central y la 1ª en tejidos periféricos. Finalmente el 5-HTP se convierte en serotonina por acción de la enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilasa (Mendoza, 2008; Clark y col., 2009; O´Shea y Cloraro 2008; Wenyu y col., 2010; Sanders-Bush y Hazelwood, 2012).

La serotonina se acumula en vesículas en la terminal de la neurona presináptica, se libera por exocitosis a la hendidura sináptica y se une a sus receptores en la neurona postsináptica. Parte de la serotonina que queda libre es recapturada por un transportador específico de serotonina, conocido como SERT (Rang, 2003; O´Shea y Cloraro 2008; Sanders-Bush y Hazelwood, 2012). Incorporada la amina en la terminal presináptica, la principal vía de metabolismo de ésta es la desaminación oxidativa que sucede bajo la acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO) para formar el ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA), principal metabolito de la serotonina. Existen dos isoformas de la MAO (A y B), la MAO-A es la que metaboliza preferentemente a la serotonina y la B a las catecolaminas (Mendoza, 2008; Molina y Cruz, 2010; Sanders-Bush y Hazelwood, 2012) (Figura 2).

La serotonina actúa como un neurotransmisor en el sistema nervioso central, modula funciones cerebrales múltiples, que incluyen el sueño, cognición, conducta sexual, secreción hormonal y también se asocia con la modulación de las funciones de las plaquetas, células enterocromafines, el epidídimo y el testículo (Campos y col., 1990; Tinajero y col., 1993; Aragón, 2005; Jorgensen, 2007; Sanders-Bush y Hazelwood; 2012).

Con base en estudios neuroquímicos, farmacológicos y de inmunohistoquímica se han caracterizado un conjunto de receptores a serotonina que se identifican con las siglas 5-HT seguidas de un número del 1 al 7 (5-HT₁-5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇). El receptor 5-HT₁ se subdivide en subtipos, el 1b, 1d, 1e, y 1f; el receptor 5-HT₂ en 2a, 2b, y 2c (Mendoza, 2008; Jorgensen, 2007).

Aparato reproductor del macho

Al aparato reproductor masculino lo conforman los testículos, los epidídimos, las vesículas seminales, próstata y órgano copulador (Tresguerres, 2010). El testículo es el órgano primario del aparato reproductor del macho, en donde se lleva a cabo la espermatogénesis y la esteroidogénesis, principalmente andrógenos los que mantienen la estructura y funcionamiento del resto de los componentes del aparato reproductor (Ross, 2003; Junqueira, 2005; Geneser, 2010; Welsch, 2010).

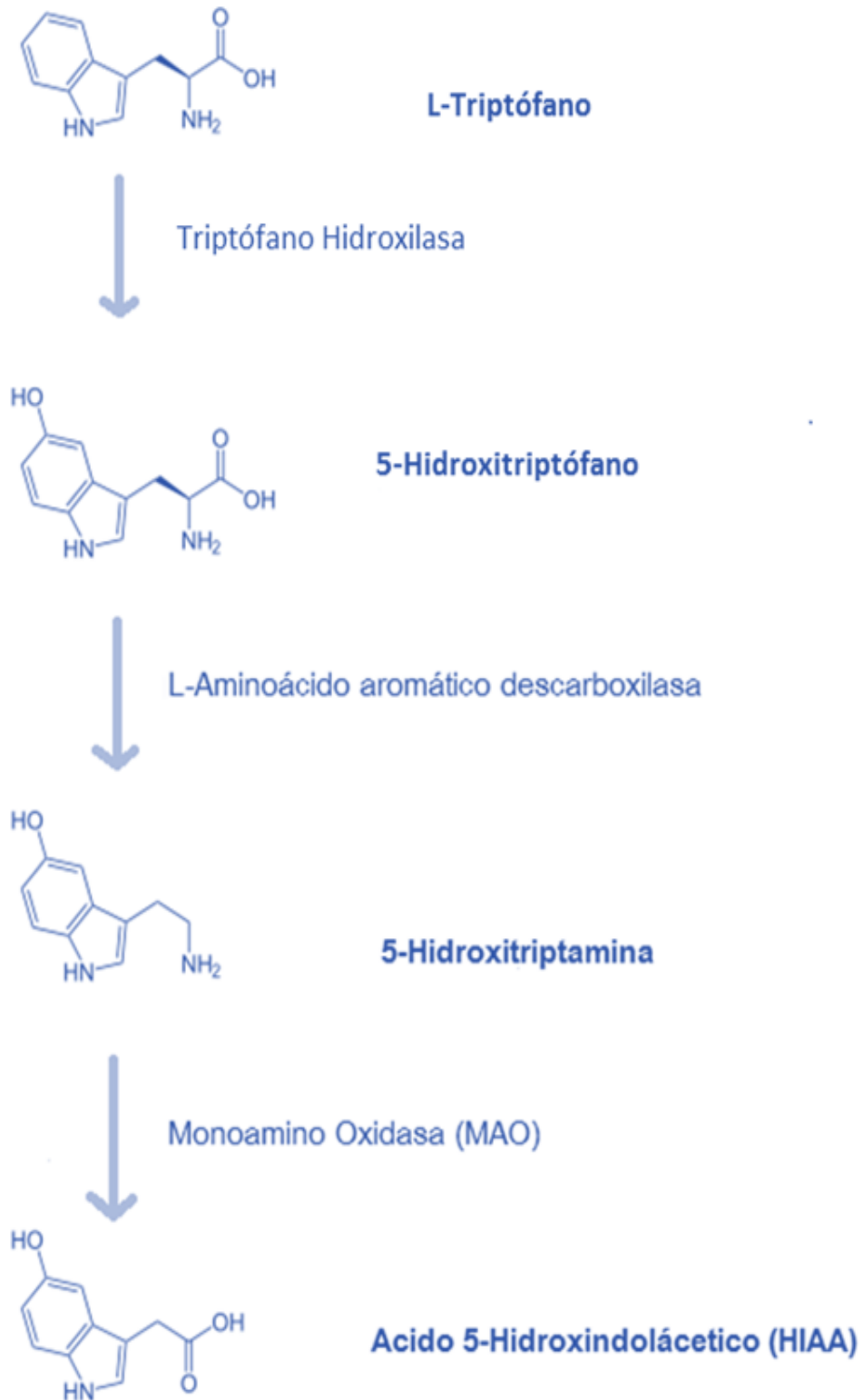


Figura 2. *Síntesis de serotonina* (Modificado de O'Shea y Cloraro, 2008).

El testículo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo denso, la túnica albugínea. Parte de ésta son los túbulos seminíferos, en donde se lleva a cabo la espermatogénesis, entre los túbulos seminíferos se encuentra el tejido intersticial conformado por tejido conectivo, vasos sanguíneos y células intersticiales o de Leydig (García y Hurlé, 2005; Junqueira, 2005; Ross, 2003; Setchell y Breed, 2006). En el testículo hay una región, el mediastino testicular, compuesto por tejido conjuntivo y por donde ingresan a la gónada los vasos sanguíneos y linfáticos, así como fibras nerviosas (García, 2005; Kuhnel, 2005).

Los túbulos seminíferos desembocan en la red testicular o red de Haller que se continúa con los conductos eferentes (García y Hurlé, 2005; Kuhnel, 2005). Cada túbulo seminífero se encuentra rodeado por células de músculo liso, las células mioideas, inmediatamente después se encuentra la membrana basal que sostiene al epitelio germinal, conformado de células germinales y de Sertoli. Entre las células de la línea germinal se identifican, las espermatogonias, espermatoцитos primarios y secundarios, así como la espermátide en diferentes etapas de desarrollo (Figura 3) (Tresguerres, 2010).

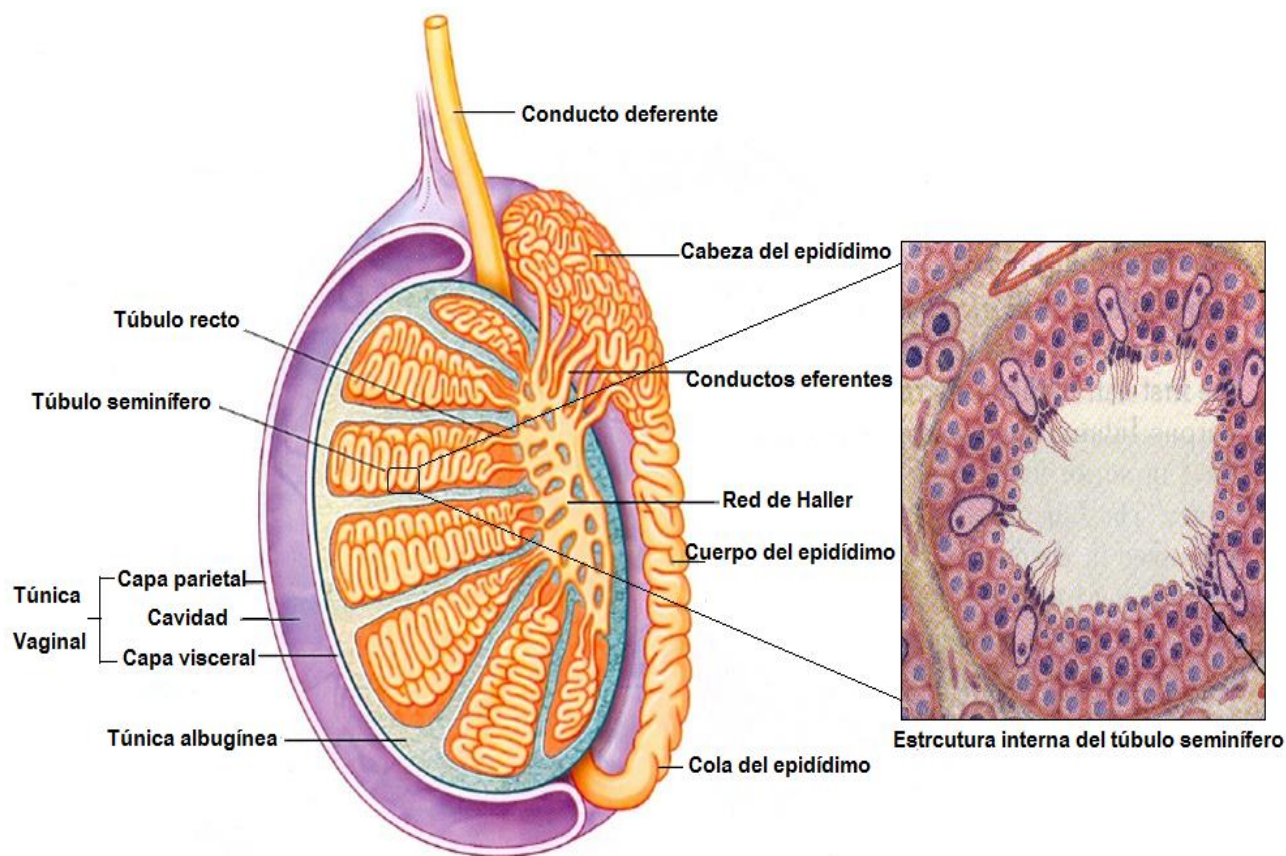


Figura 3. *Estructura interna del testículo y sus componentes* (Modificado de <http://goo.gl/6wV3ZI>).

Las células de Sertoli se apoyan en la membrana basal del túbulo. Son células con prolongaciones citoplasmáticas que sostienen o soportan parcialmente a las células germinales y los extremos apicales de las células de Sertoli se encuentran en la luz del túbulo. Estas células se conectan entre sí por uniones que forman la barrera hematotesticular, que divide en dos compartimentos al epitelio germinal: el basal y abdominal (Griswold, 1998; Junqueira, 2005). Ésta impide el paso de moléculas grandes desde el tejido intersticial y parte del túbulo cerca de la lámina basal hacia la región cercana a la luz tubular (compartimento adluminal) (Griswold, 1998; Junqueira, 2005; Barrett y col., 2013).

Las espermatogonias y los espermatoцитos primarios se ubican en el compartimiento basal, los espermatoцитos secundarios y las espermátides en las diferentes etapas de desarrollo se encuentran en el compartimiento abdominal (Ross, 2003; Junqueira, 2005).

La función principal de las células de Sertoli es dar soporte, protección y proporcionar los nutrientes necesarios para la multiplicación y diferenciación de las espermatogonias a espermatozoides (Junqueira, 2005). Durante la transformación de la espermátide a espermatozoides se pierden residuos de citoplasma que son fagocitados y digeridos por las células de Sertoli (Junqueira, 2005; Tresguerres, 2010).

Las células de Sertoli secretan la proteína unidora de los andrógenos (ABP), cuya función es unirse a la testosterona con la finalidad de que este andrógeno se transporte en la sangre hacia sus órganos blanco, como los túbulos seminíferos donde es necesaria para la espermatogénesis. En las células de Sertoli, la testosterona se aromatiza a estradiol y secretan inhibina, que disminuye la síntesis y liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) por la hipófisis (García, 2005; Junqueira, 2005; Griswold y McLean, 2006; Hess y De Franca, 2008; Tresguerres, 2010).

El epidídimo es un órgano anexo al testículo, de forma alargada en el que se distingue una cabeza, cuerpo y cola, sirve de reservorio y lugar de maduración de los espermatozoides. Está situado en el borde posterior y la cara lateral del testículo. La cabeza se encuentra sobre el polo superior del testículo y el mediastino testicular. La región de la cola se adhiere al testículo y continúa con el conducto deferente (Barrios, 2002; García y Hurlé, 2005; Robaire y col., 2006).

El conducto del epidídimo está revestido por epitelio pseudoestratificado cilíndrico y que recibe el nombre de estereocilios, cuya función es la fagocitosis de residuos de citoplasma que no fueron eliminados por las células de Sertoli, así como de espermatozoides que degeneran en el conducto. Las células principales secretan glicerofosocolina, ácido siálico y glucoproteínas que contribuyen a la maduración de los espermatozoides (Barrios, 2002; Ross, 2003).

Entre las funciones del epidídimo se encuentran el transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides, que son regulados por el líquido y secreciones vertidas en la luz del conducto principal del epidídimo (Schlegel y col., 2007). Algunos de los

componentes del líquido del 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. Estas funciones y la estructura del órgano son dependientes de los andrógenos principalmente de la testosterona y dihidrotestosterona (Schlegel y col., 2007).

En el epidídimo también se lleva a cabo la estabilización de las membranas celulares para evitar que en los espermatozoides se presente la reacción acrosómica antes del contacto con el ovocito. El espermatozoide concluye el proceso de capacitación en el tracto reproductivo femenino dentro del oviducto (White y Porterfield, 2013).

Entre los túbulos seminíferos, uno de los componentes del tejido intersticial, son las células de Leydig (García y Hurlé, 2005; Ojeda y Skinner, 2006; Geneser, 2010; Ira, 2010; Welsch, 2010). Estas cumplen una función endócrina, ya que sintetizan testosterona, bajo la acción de la hormona luteinizante (LH), que al unirse en sus receptores de membrana activa los sistemas enzimáticos que transforman el colesterol en testosterona. Sintetizado el andrógeno, éste difunde a la circulación general o hacia el túbulo seminífero (Ross, 2003; Tresguerres, 2010).

La arteria testicular es una de las principales fuentes de irrigación al testículo, la cual es una ramificación de la aorta abdominal. Por otro lado, una ramificación del Plexo renal conforma al nervio espermático superior, mientras que el nervio espermático inferior es una ramificación del Plexo hipogástrico que inerva directamente a la cola del epidídimo (García y Hurlé, 2005; Velázquez, 1998).

Espermatogénesis

La espermatogénesis es la secuencia de eventos que se llevan a cabo en el túbulo seminífero y que consiste en la multiplicación y diferenciación de la espermatogonia para formar los espermatozoides. Este proceso comprende dos etapas, espermatocitogénesis y espermiogénesis (Ross, 2003, Junqueira, 2005, Brehm y Steger; 2005; Tresguerres, 2010; Ira, 2010; O'Donnell y col., 2011; Barrett y col., 2013).

Espermatocitogénesis

La espermatocitogénesis se lleva a cabo en dos fases, la división por mitosis de la espermatogonia y posteriormente la división reduccional, meiosis, para formar una célula haploide, la espermátide. La primera fase o de replicación de la célula germinal consiste en la proliferación por mitosis de las espermatogonias para mantener el número de estas células y formar los espermatoцитos primarios, las espermatogonias se encuentran en la parte basal del túbulo seminífero (Ross, 2003; Junqueira, 2005; O'Donnell y col., 2006; Tresguerres, 2010; Barrett y col., 2013; White y Porterfield, 2013). En la segunda fase, en los espermatoцитos

primarios se inicia la meiosis y como resultado a partir de un espermatocito primario se forman dos células más pequeñas con número haploide de cromosomas denominadas espermatocitos secundarios, en los cuales se produce la segunda división reduccional para formar las espermátides redondas. Durante las divisiones reduccionales las células se encuentran conectadas entre sí por puentes de citoplasma, que se forman por citocinesis incompleta durante la telofase de la mitosis. Esto contribuye a que se sincronice el desarrollo y diferenciación de una población de células germinales (Ross, 2003; Junqueira, 2005; O'Donell y col., 2006; Tresguerres, 2010; Barrett y col., 2013; White y Porterfield, 2013) (Figura 4).

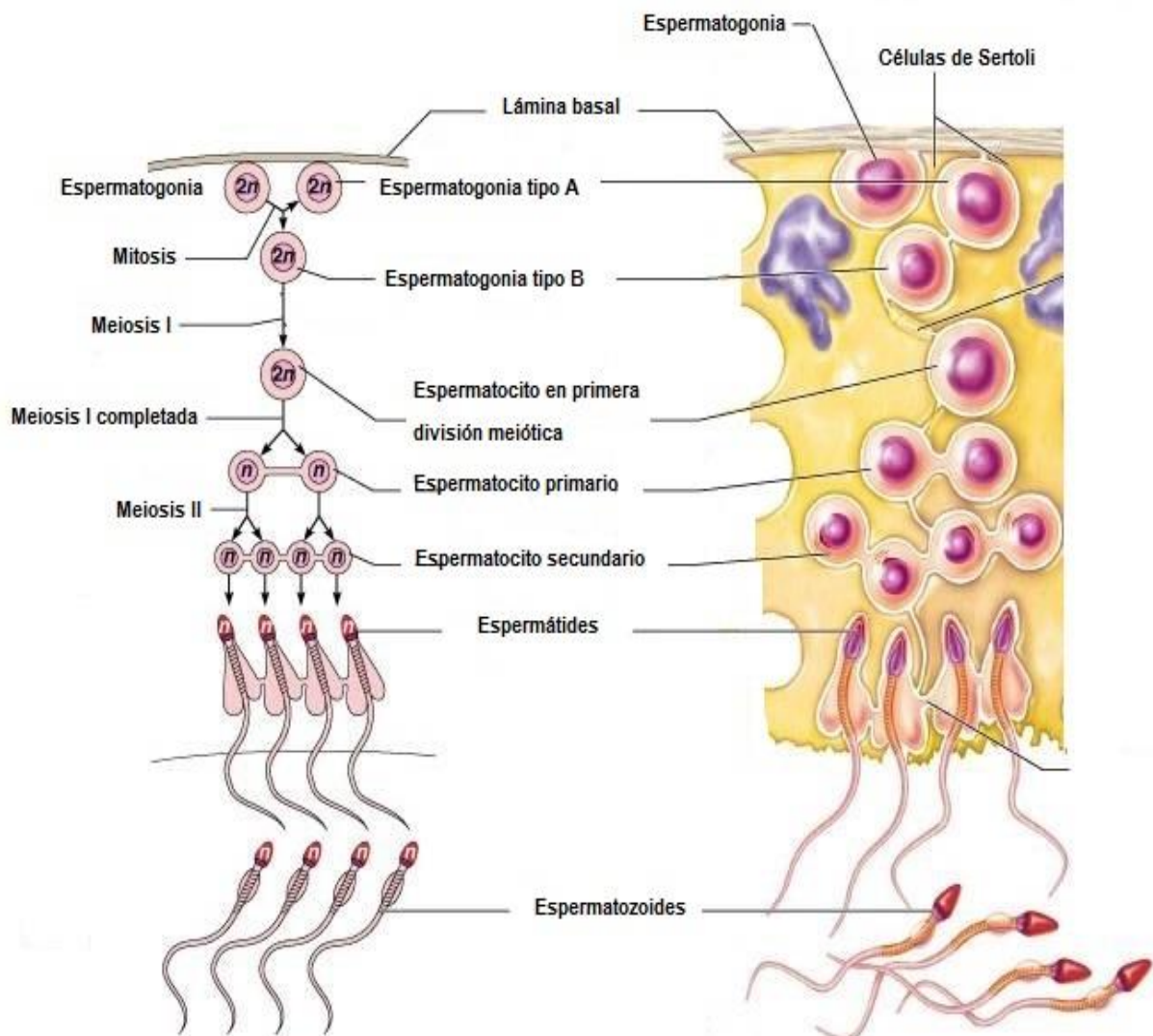


Figura 4. *Epitelio seminífero*. Se observan las diferentes células germinales (Modificado de <http://goo.gl/OVOmoe>).

Concluida la meiosis se forman las espermátides haploides, que se localizan en el compartimento adluminal, cerca de la luz del túbulo seminífero. Las espermátides son pequeñas, con un núcleo redondo que se transforman a espermatozoides por un proceso denominado espermiogénesis (O'Donnell y col. 2011; White y Porterfield, 2013).

Espermiogénesis

En la espermátide redonda se producen cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que conducen a la condensación de la cromatina nuclear, desarrollo del acrosoma y formación del flagelo (Brehm y Steger, 2005). La diferenciación de las espermátides a espermatozoide se clasifica en 4 fases: Golgi, capsular, acrosómica y de maduración (Hess y De Franca, 2008; O'Donnell y col. 2011).

Fase Golgi: Se caracteriza por la presencia de gránulos positivos a ácido peryódico reactivo de Schiff (PAS) y que se forman a partir del Aparato de Golgi. Estos gránulos denominados proacrosómicos, tienen glucoproteínas; posteriormente estos gránulos se unen y forman la vesícula acrosómica, que está contigua a la envoltura nuclear. La vesícula aumenta de tamaño y su posición determina el polo anterior del espermatozoide. Los centriolos migran hacia el polo inferior de la espermátide, donde el centriolo inicia el armado de los nueve dobletes microtubulares periféricos y de los microtubulos centrales que forman el axonema de la cola del espermatozoide (Ross, 2003; Junqueira, 2005; Hess y De Franca, 2008) (Figura 5)

Fase acrosómica: La espermátide se reorienta de modo que la cabeza se proyecta a la lámina basal y el flagelo en desarrollo se dirige y extiende dentro de la luz del túbulo seminífero. El material genético del núcleo se condensa, se aplana y se alarga; la mayor parte del citoplasma se desplaza hacia atrás. Los microtubulos citoplasmáticos se organizan en una vaina cilíndrica, que se extiende desde el borde posterior del acrosoma hacia el polo posterior de la espermátide. Los centriolos que antes habían iniciado el desarrollo del flagelo, ahora regresan a la superficie posterior del núcleo (Ross, 2003; Junqueira, 2005; Hess y De Franca, 2008; O'Donnell y col., 2011) (Figura 5).

Asímismo, se inicia la formación de la pieza de conexión o región del cuello del espermatozoide en desarrollo. Durante la formación del flagelo, la membrana plasmática se mueve hacia atrás para cubrirlo y las mitocondrias migran desde el resto del citoplasma para formar una vaina helicoidal que rodea las fibras gruesas en la región del cuello (Ross, 2003; O'Donnell y col., 2011) (Figura 6).

Fase de maduración: El material genético del núcleo se condensa y madura el acrosoma. Los ribosomas, lípidos, vesículas y otros componentes citoplasmáticos no utilizados son fagocitados por las células de Sertoli (Ross, 2003; Junqueira, 2005; Hess y De Franca, 2008) (Figura 6).

Durante la espermiogénesis el material genético de la espermatíde experimenta cambios en su composición y propiedades. Uno de estos cambios comprende la reorganización de la cromatina con las protaminas. Este proceso es importante porque el genoma se protege del daño físico y bioquímico al que pudiera estar expuesto durante el largo periodo de maduración y almacenamiento del espermatozoide (Reyes y Chavarría, 1998; O'Donnell y col., 2011).

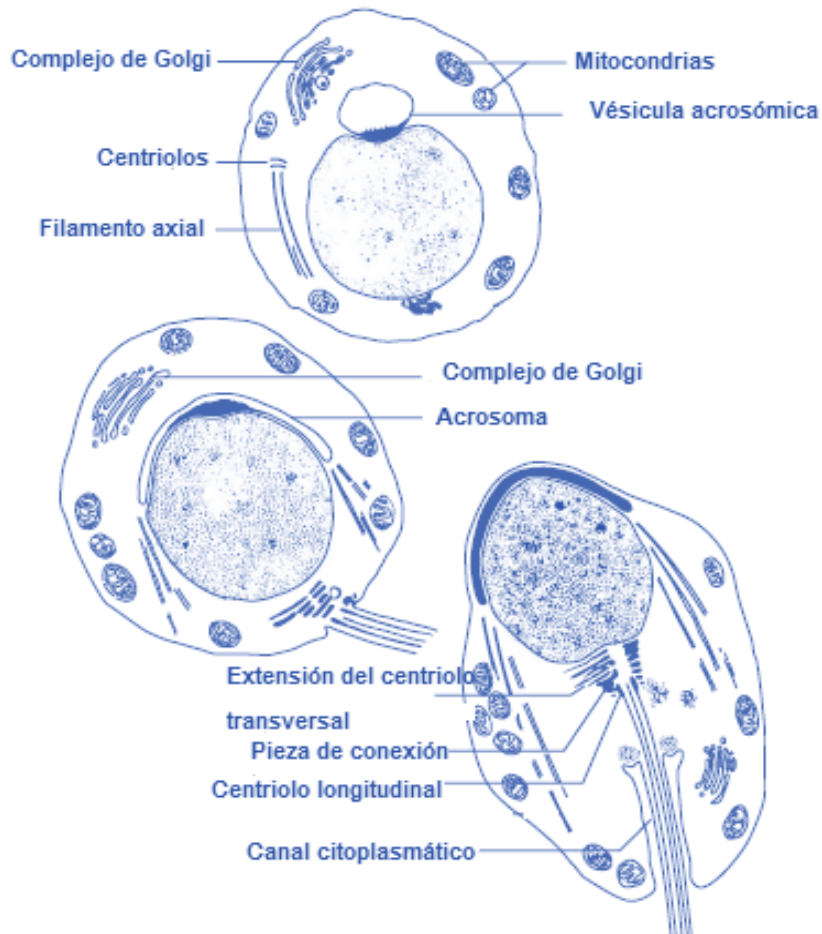


Figura 5. *Fase Golgi y Fase capsular en la espermiogénesis* (Modificada de Knobil y Neill, 2006).

Mientras el espermatozoide pasa por el epidídimo, los residuos de cisteína presentes en las protaminas se entrecruzan por puentes disulfuro, esto es un evento importante que estabiliza la membrana de los espermatozoides (Reyes y Chavarría, 1998). También se pierde la gota citoplasmática de los espermatozoides, aumenta la carga negativa superficial (Barrios, 2002).

La cromatina de la célula espermátide durante la condensación y reorganización hacen que adquiera una disposición considerada cristalina, ya que el genoma se protege del daño físico y bioquímico al que pudiera estar expuesto durante el largo periodo de la maduración y del almacenamiento del gameto. Se ha propuesto que la gran estabilidad conferida al núcleo durante su diferenciación puede constituir un mecanismo de protección contra la acción de mutágenos, tanto endógenos como exógenos, a los cuales está expuesto (Reyes y Chavarría, 1998).

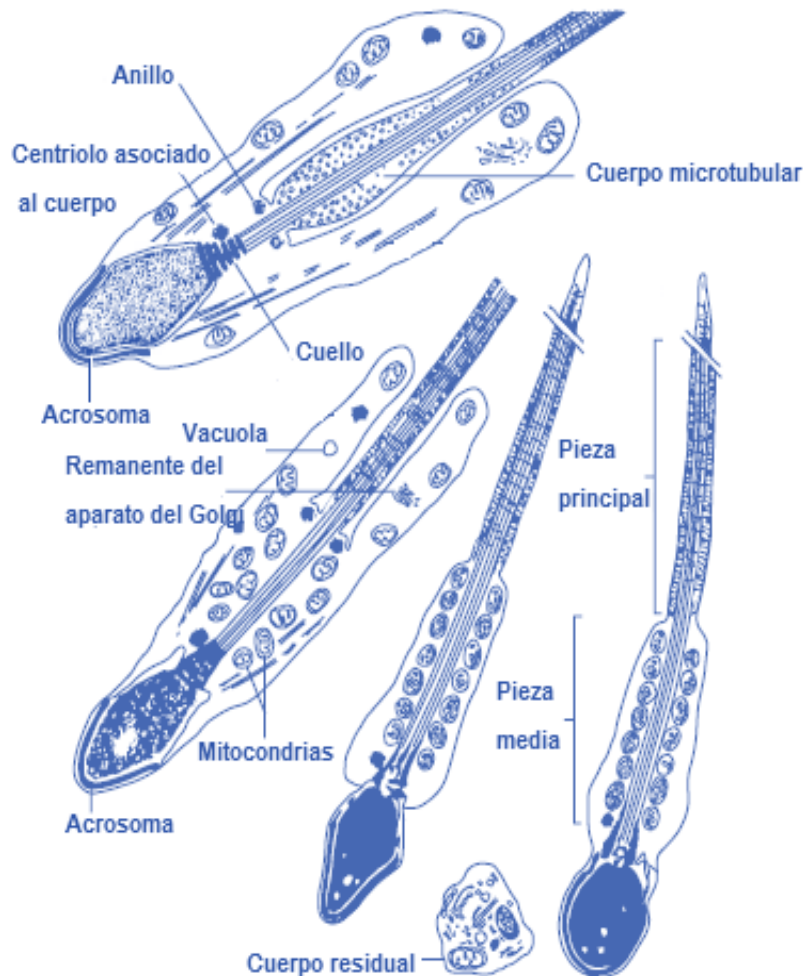


Figura 6. *Fase acrosómica y Fase de maduración en la espermiogénesis* (Modificada de Knobil y Neill, 2006).

Espermatozoide

El espermatozoide es una célula alargada especializada cuya función es fertilizar el ovocito, y tiene un contenido haploide de cromosomas (1n cromosoma) (Barrios, 2002). Esta célula se compone de la cabeza, pieza media, principal y final, las dos últimas conjuntamente constituyen el flagelo (Barrios, 2002; Ross, 2003; Hess y De Franca, 2008; Tresguerres, 2010; White y Porterfield, 2013; Barrett y col., 2013) (Figura 7).

El acrosoma tiene forma de capuchón y cubre el polo anterior de la cabeza del espermatozoide. En la región anterior tiene el cuerpo apical, y en la caudal tiene un estrechamiento que conforma el segmento ecuatorial. El acrosoma está conformado de una doble pared, interna y externa que se fusionan en su extremo caudal (Barrios, 2002).

Entre el núcleo y el acrosoma se encuentra la sustancia perinuclear. La base del núcleo está rodeada por la vaina post-acrosómica donde hay proteínas y receptores que reconocen al ovocito durante la fecundación (Barrios, 2002).

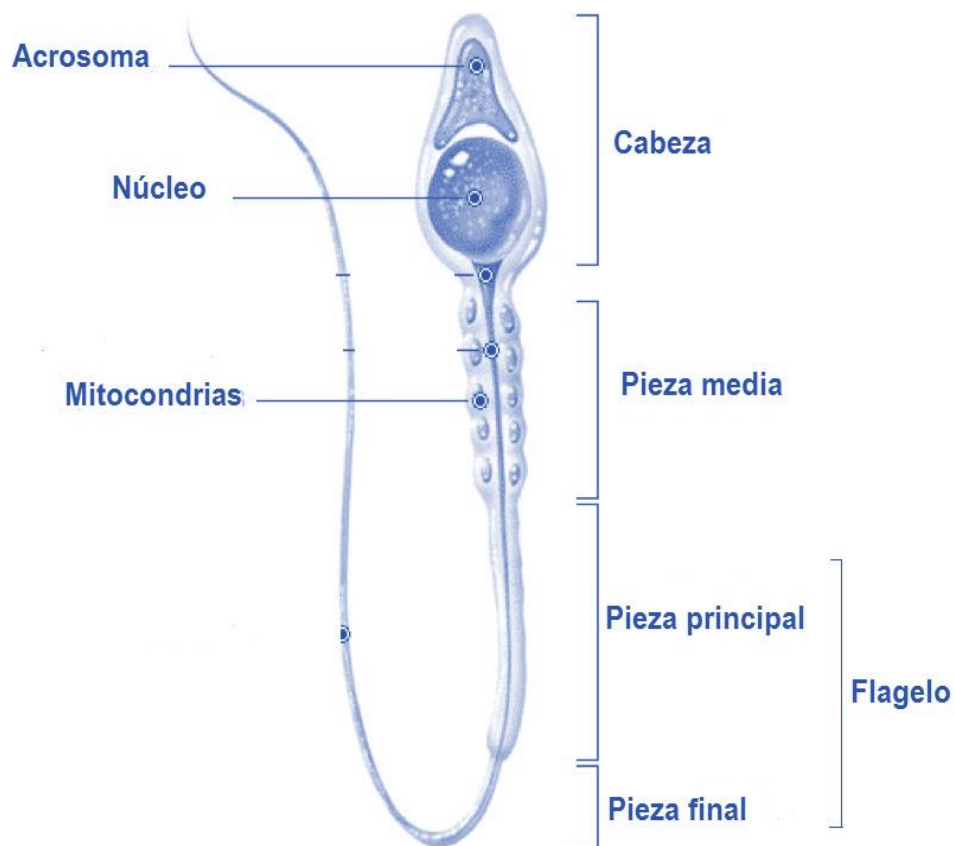


Figura 7. *Estructura del espermatozoide maduro* (Modificado de: <http://goo.gl/9XIX2X>).

El cuello del espermatozoide es una estructura corta, ubicada entre la cabeza y la pieza media. Tiene un centriolo rodeado de nueve fibras periféricas orientadas longitudinalmente que continúan con las fibras exteriores de la pieza media (Barrios, 2002).

La pieza media tiene dos microtúbulos centrales y nueve dupletas periféricas que constituyen el filamento axial. Estas estructuras a su vez están rodeadas por nueve fibras exteriores orientadas longitudinalmente conectadas a las fibras del cuello. Además, las mitocondrias dispuestas en patrón helicoidal conforman el aparato metabólico y rodean a las nueve fibras exteriores (Barrios, 2002). Este orgánulo se encarga de producir trifosfato de adenosina (ATP), que proporciona la energía necesaria para la motilidad del flagelo (White y Porterfield, 2013) (Figura 8).

Un engrosamiento en forma de anillo señala el límite entre la pieza media y la pieza principal (Barrios, 2002).

La pieza principal es idéntica a la estructura de la pieza media, igualmente está rodeado por las fibras exteriores que son continuación de la pieza media. Sin embargo, las fibras están sujetas a variaciones de tamaño y forma, y se van estrechando gradualmente hacia el final de la pieza principal. La vaina fibrosa periférica es otra estructura de la pieza principal y se forma mediante la fusión de dos fibras exteriores con bandas semicirculares de proteínas estructurales (Barrios, 2002).

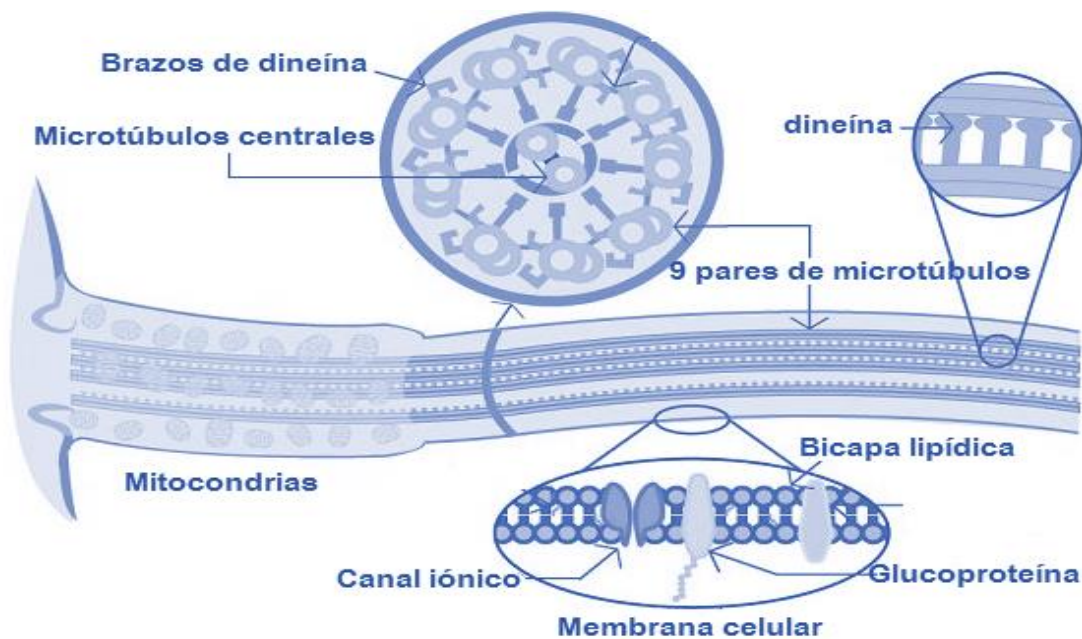


Figura 8. **Componentes de la membrana celular y estructura interna del flagelo del espermatozoide** (Modificada de <http://goo.gl/931sQS>).

La pieza terminal comienza donde finaliza la vaina fibrosa de la pieza principal, contiene solamente el complejo del filamento axial, y los microtúbulos se reducen gradualmente en unidades que terminan en diferentes niveles (Barrios, 2002).

Anormalidades en los espermatozoides

Cuando se afecta la espermatogénesis, las espermatogonias están propensas a morir, las espermátides sufren anomalías estructurales y metabólicas, disminuye la proporción de espermatozoides vivos y progresivos móviles, y se incrementan las formas anormales de los espermatozoides, por defectos en la formación de la cabeza o del flagelo principalmente (Barrios, 2002).

Las células germinales son muy sensibles a los daños, lo que implica la exfoliación prematura de las células o la formación de células gigantes multinucleadas, entre los factores que afectan la espermatogénesis se pueden mencionar: deficiencia en la producción de andrógenos, la exposición a mutágenos, drogas o radiación. En consecuencia, las células de Sertoli y las células de Leydig son menos vulnerables que las células germinales en diferenciación, ya que se dividen activamente (Ross, 2003).

La morfología de los espermatozoides se considera un reflejo del estado fisiológico del aparato reproductor masculino. Los espermatozoides anormales se han clasificado en aquellas que presentan alteraciones de la cabeza, la pieza media y en el flagelo, además de las que presentan gotas citoplasmáticas (Nereyda, 2000).

Las anomalías en los espermatozoides se han clasificado en primarias y secundarias, según la estructura anatómica en la que se generan. Las primarias se originan dentro del testículo y se deben a fallas en la espermatogénesis. Estas anomalías incluyen espermatozoides con escaso desarrollo, espermatozoides dobles y defectos de cabeza, entre ellos, protuberancia acrosómica, cabeza deformada, cabeza plana, contorno rugoso de la cabeza, cabeza en forma de banana, espermatozoides microcefálicos y cabezas libres (Barrios, 2002) (Figura 9).

La mayoría de los defectos de la cola del espermatozoide también son considerados anomalías primarias, entre ellas están el defecto de la pieza media, presencia de gota citoplasmática, cola enrollada y flagelo doble (Barrios, 2002).

Las anomalías secundarias son aquellas originadas dentro del epidídimo, entre las que se encuentran cabeza ancha, cabezas normales libres, membranas del acrosoma separadas y dobladas, colas enrolladas en la porción terminal, etc. (Barrios, 2002). Se considera que al menos el 70 % de los espermatozoides evaluados deben ser normales, mientras que los defectos del acrosoma y del flagelo es de 25 % (Barrios, 2002).

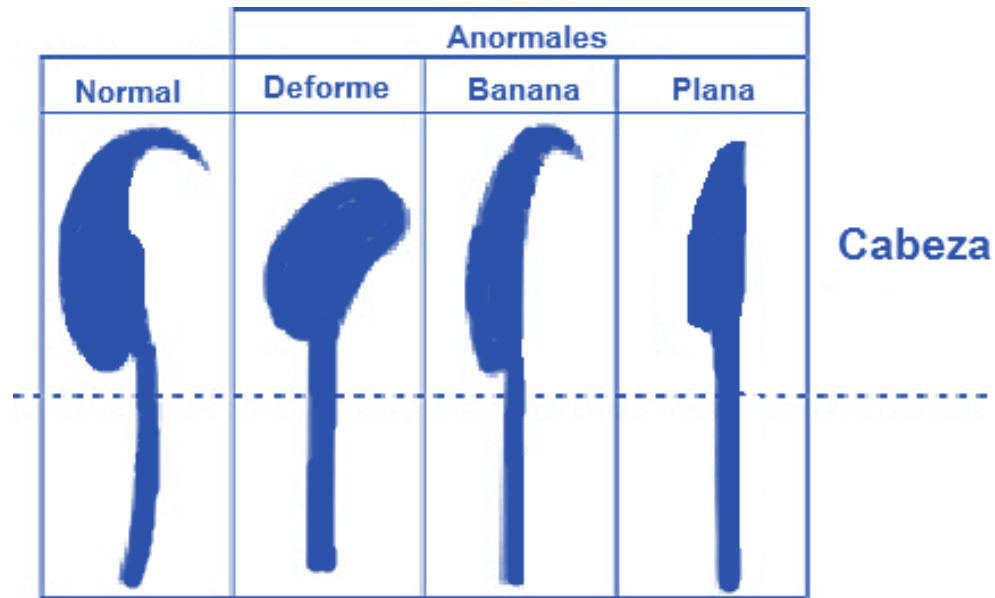


Figura 9. *Principales formas anormales en espermatozoides de rata* (Modificado de: <http://goo.gl/2hB0Ac>).

Movilidad de los espermatozoides

Las contracciones de las células mioideas son las responsables de mover el fluido luminal (sintetizado por célula de Sertoli) (Ross, 2003) y espermatozoides fuera de los túbulos seminíferos por la red y los conductos eferentes en el epidídimo, estas células se contraen en respuesta a la oxitocina (Robaire y col., 2006; Kuhnel, 2005).

El fluido y los espermatozoides viajan a los túbulos rectos. En el mediastino testicular, el líquido y los espermatozoides entran en la red de testis, un sistema de conductos revestidos por epitelio simple cúbico. Desde la red de testis, los espermatozoides se desplazan hacia la porción extratesticular de los conductillo eferentes y luego hacia el segmento proximal del conducto del epidídimo (Barrios, 2002; Ross, 2003).

Los espermatozoides provenientes del testículo que entran en el epidídimo, maduran durante su paso a lo largo del conducto del epidídimo, donde adquieren movilidad y la capacidad de fecundar un ovocito. La capacidad para desplazarse en sentido anterógrado (movilidad progresiva), se adquiere en el epidídimo (Barrett y col, 2013). Este proceso es dependiente de los andrógenos. Las contracciones del músculo liso que rodea el conducto epididimario ayudan al transporte de los espermatozoides mediante movimientos peristálticos hasta que estos alcancen la porción de la cola del epidídimo, donde se almacenan antes de la eyaculación (Ross, 2003).

La movilidad progresiva de los espermatozoides es fundamental para la fecundación, ya que una vez presentes en el cuello uterino, deben propulsarse por sí mismo a través de la mucosa cervical hacia el útero, las trompas de Falopio y el óvulo (Reyes y Chavarría, 1998; Barrios, 2002; Strasinger y Schaub, 2008). A este proceso también se le conoce como hiperactivación, que consiste en la generación de la fuerza requerida para la penetración de la capa de células de la granulosa y la inserción inicial del espermatozoide en la zona pelúcida del ovocito. La expresión más evidente de la activación espermática es la movilidad vigorosa pero con poco desplazamiento progresivo; sus características principales son: aumento del movimiento y flexión del flagelo, gran amplitud del desplazamiento de la cabeza y la trayectoria observada es curvada (Reyes y Chavarría, 1998).

También se ha demostrado en el hámster que la expresión de la hiperactivación en los espermatozoides capacitados *in vitro* es precedida por una elevación en las concentraciones intracelulares del AMPc y del calcio, asociada con una disminución del pH intracelular. Como sucede en la movilidad espermática y en otras estirpes celulares el efecto del AMPc se lleva a cabo a través de la acción de proteasinas dependientes de este nucleótido cíclico. Estas enzimas se localizan unidas intracelularmente a sitios específicos a través de la interacción de las subunidades reguladoras con proteínas que les sirven de anclas (Reyes y Chavarría, 1998).

Esteroidogénesis

Los testículos secretan las hormonas sexuales masculinas, que reciben el nombre de andrógenos, como la testosterona, 5 α -dihidrotestosterona y androstendiona. La testosterona puede seguir dos rutas metabólicas y transformarse en otros esteroides biológicamente activos. Por la ruta de la 5 α reductasa forma a la Dihidrotestosterona (DHT) y por la ruta de la aromatasa, la testosterona se transforma en estradiol (Iglesias y col., 2007).

En el testículo, el sustrato para la esteroidogénesis es el colesterol e inicia con la entrada de colesterol a la célula de Leydig. En esta célula, la LH se une a la región extracelular de su receptor de membrana y activa al sistema de proteínas G, que a su vez activan a la enzima adenilato ciclasa que cataliza la transformación del trifosfato de adenosina en adenosin monofosfato cíclico (AMPcíclico). Este actúa como mensajero intracelular y estimula a las enzimas que transforman al colesterol en andrógenos (Stocco y McPhaul, 2006; Tresguerres, 2010).

Las células de Leydig obtiene el colesterol de diferentes fuentes, lo sintetizan a partir del acetil-CoA, lo obtiene del plasma sanguíneo o de las reservas de la propia célula en forma de ésteres de colesterol. La transformación del colesterol en pregnenolona, paso limitante de esta ruta de biosíntesis se lleva a cabo en la mitocondria mediante la unión y transporte de la proteína transportadora de esteroides (SCP₂) (Tresguerres, 2010). Esta fosfoproteína regula la translocación intramitocondrial del colesterol, cuya función es generar un puente lipídico que

permite el paso del colesterol entre las membranas externa e interna de la mitocondria (Devoto, 2004).

En la célula de Leydig el colesterol se convierte a pregnenolona en la membrana interna de la mitocondria por acción de la CYP11A1, la pregnenolona es entonces procesada a progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona, y androstendiona por 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (3 β -HSD2) y CYP17. En la célula de Leydig se expresa la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD3), que convierte a la androstendiona en testosterona (Leping y col., 2011; White y Porterfield, 2013).

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 (Tresguerres, 2010; Leping y col., 2011) (Figura 10).

La vía $\Delta 4$ primero fue demostrada en los testículos de rata. La vía $\Delta 5$ es predominante en el testículo humano, aunque también existe la vía $\Delta 4$ (Leping y col., 2011).

La testosterona es convertida por aromatización a 17 β -estradiol o reducida 5 α -dihidrotestosterona. La testosterona y la Dihidrotestosterona (DHT) circulan unida a una globulina ligadora de esteroides sexuales (SHBG). Los andrógenos no se almacenan en las células de Leydig, después de la síntesis se difunden a la circulación general y de la gónada (Tresguerres, 2010).

Una vez sintetizada la testosterona, entra en una de las siguientes vías de transformación: 1).-Por acción de la enzima 5 α - reductasa transformarse en 5-dihidrotestosterona (5-DHT), un andrógeno más activo, este evento se produce en algunos de los órganos blanco de la testosterona, como el epidídimo; o 2).-Aromatizarse a estradiol, las células de Sertoli expresan la enzima CYP19 (aromatasa) encargada de convertir la testosterona a estradiol (Tresguerres, 2010; White y Porterfield, 2013).

La testosterona dentro de los túbulos seminíferos se mantiene en una concentración mayor que la circulante. Esta concentración de testosterona intratubular es necesaria para que se desarrolle la espermatogénesis. La 5-dihidrotestosterona que resulta de la reducción de la testosterona favorece el desarrollo de los túbulos seminíferos y potencia la acción de la FSH sobre el epitelio germinal y en animales hipofisectomizados es capaz por si sola de mantener la espermatogénesis (Tresguerres, 2010) (Figura 11).

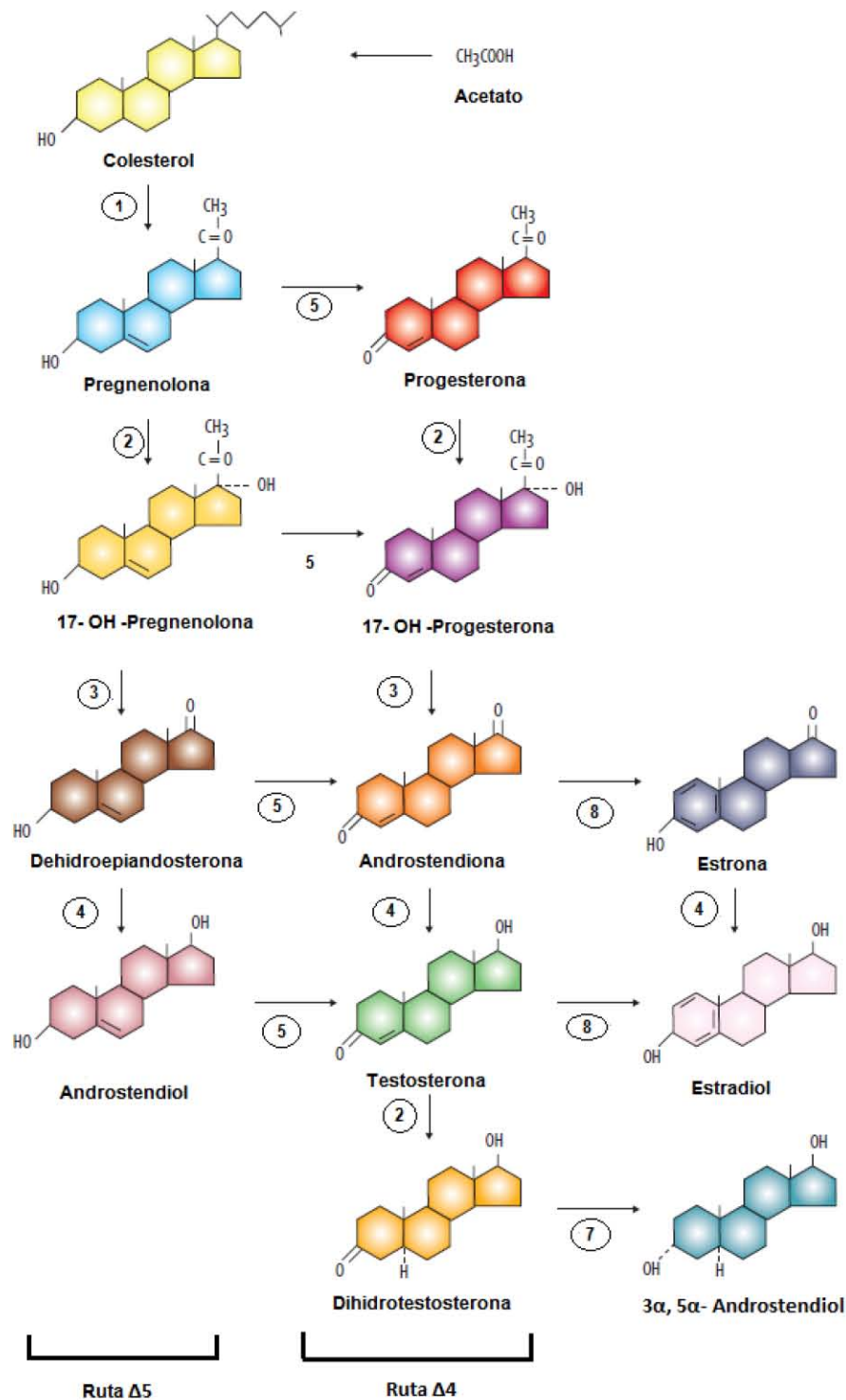


Figura 10. **Síntesis de hormonas esteroides gonadales**. En la figura se muestran las diferentes enzimas que intervienen en el proceso de esteroidogénesis en un círculo: (1) CYP11A1, (2) CYP17-hidroxilasa, (3) 17,20-liasa, (4) 17-β-OH-esteroide deshidrogenasa, (5) 3 β-ol-deshidrogenasa y δ4-5 isomerasa, (6) 5α-reductasa, (7) 3α-reductasa, (8) CYP19-aromatasa (Modificada de Tresguerres, 2010).

La testosterona mantiene la estructura y funcionamiento del epidídimo. En las células de este órgano se incorpora la testosterona y la enzima 5 α -reductasa la convierte en 5-dihidrotestosterona, que al unirse a sus receptores intracelulares favorece el funcionamiento del órgano. Cuando se realiza la castración, disminuye la secreción de testosterona y el epidídimo involuciona. Cuando después de la castración se administra este andrógeno se mantiene la estructura y funcionamiento del epidídimo (Barrios, 2002).

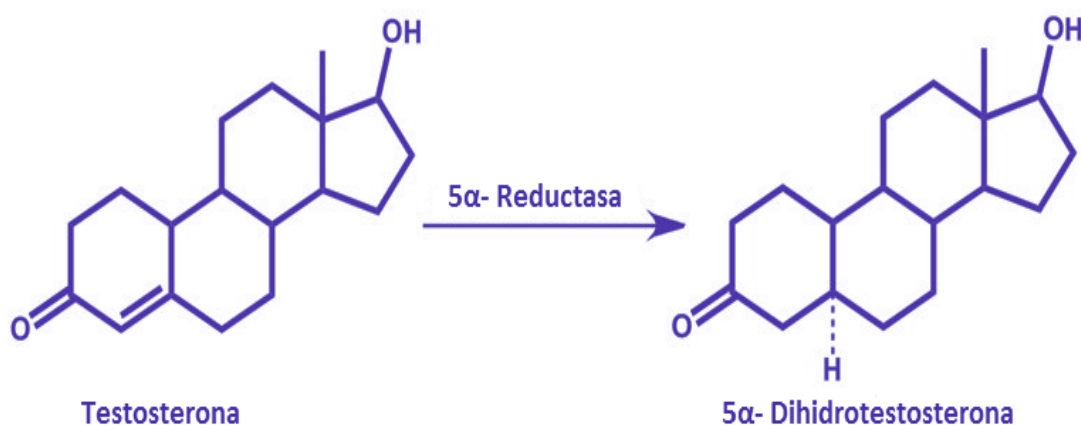


Figura 11. *Conversión de testosterona a 5 α -Dihidrotestosterona* (Modificado de <http://goo.gl/rXJ3Vx>).

Regulación hormonal de las funciones del testículo

Las funciones del testículo espermatogénesis y esteroidogénesis, son reguladas por las gonadotropinas, FSH y LH. El lóbulo anterior de la hipófisis o adenohipófisis, secreta estas dos hormonas a la circulación general y viajan en sangre hasta el testículo donde regulan su funcionamiento (O'Donnell y col., 2006; Ross, 2006; Welsch, 2010; Ira, 2010; Tresguerres, 2010, Barrett y col., 2013).

La secreción de gonadotropinas es regulada por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que es producida en el hipotálamo y vertida al sistema portal hipotalámico hipofisario en donde se transporta y alcanza la hipófisis anterior y estimula la secreción de la LH y FSH (Figura 12).

La FSH al unirse a sus receptores en la célula de Sertoli, favorece la producción de factores de crecimiento y proteínas que estimulan la multiplicación y diferenciación de la espermatogonia a espermatozoide. La FSH conjuntamente con la testosterona estimula la espermatogénesis (Griswold, 1989; Junqueira, 2005; Bhasin y Benson, 2006; Welsch, 2010; Tresguerres, 2010). Esta hormona es necesaria para la síntesis inicial de la proteína unidora de los andrógenos (ABP), se secreta en el lumen de los túbulos seminíferos y allí se une

específicamente a la 5- α -Dihidrotestosterona y la transporta a sus órganos blanco (Caravaca, 2005; Tresguerres, 2010).

La LH es responsable del desarrollo y funcionamiento de las células de Leydig. La unión de esta hormona a su receptor inicia una cascada de reacciones que conducen a la estimulación de la esteroidogénesis y al aumento en la producción de testosterona. La actividad biológica de la LH está mediada por la activación de la enzima adenil ciclasa e influenciada por la concentración de calcio libre en el citoplasma de la célula de Leydig. Los efectos de la LH involucra la activación de enzimas que regulan la incorporación, liberación y uso del colesterol en la biosíntesis de testosterona. La LH facilita la ruptura de la cadena lateral del colesterol y como consecuencia la formación de pregnenolona, etapa esencial de la biosíntesis de testosterona (Reyes y Chavarría, 1998; Tresguerres, 2010).

Cuando se incrementa la espermatogénesis, las células de Sertoli producen inhibina que ejerce un efecto de retroalimentación negativo sobre la secreción de FSH, este es un mecanismo de regulación de la espermatogénesis (Caravaca, 2005).

Parte de la testosterona que se sintetiza en las células de Leydig ingresa al túbulo 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 ejerce un efecto de retroalimentación negativo sobre la secreción de LH mediante la supresión de la GnRH por el hipotálamo (Caravaca, 2005).

Sofikitis y colaboradores. (2008) sugieren que las hormonas como la testosterona, FSH y LH, influyen directamente sobre las espermatogonias indiferenciadas del epitelio seminífero, ya que la eliminación de estas hormonas induce la apoptosis de estas células en el testículo humano. Mientras que cuando se administra testosterona se impide la muerte de las células; lo que indica que este andrógeno es un factor de sobrevivencia de las células germinales del testículo.

Por otra parte se han realizado estudios en los cuales al disminuir la concentración de testosterona intratesticular en ratas, las espermátides redondas son incapaces de completar el proceso de elongación. Este efecto podría estar mediado por la pérdida de la adherencia de las espermátides con la célula de Sertoli, y como consecuencia se han encontrado espermátides redondas en el lumen del túbulo seminífero (Sofikitis y col. 2008). Por el contrario en ausencia de testosterona, los espermatozoides maduros no pueden ser liberados y son fagocitadas por las células de Sertoli (Walker, 2011).

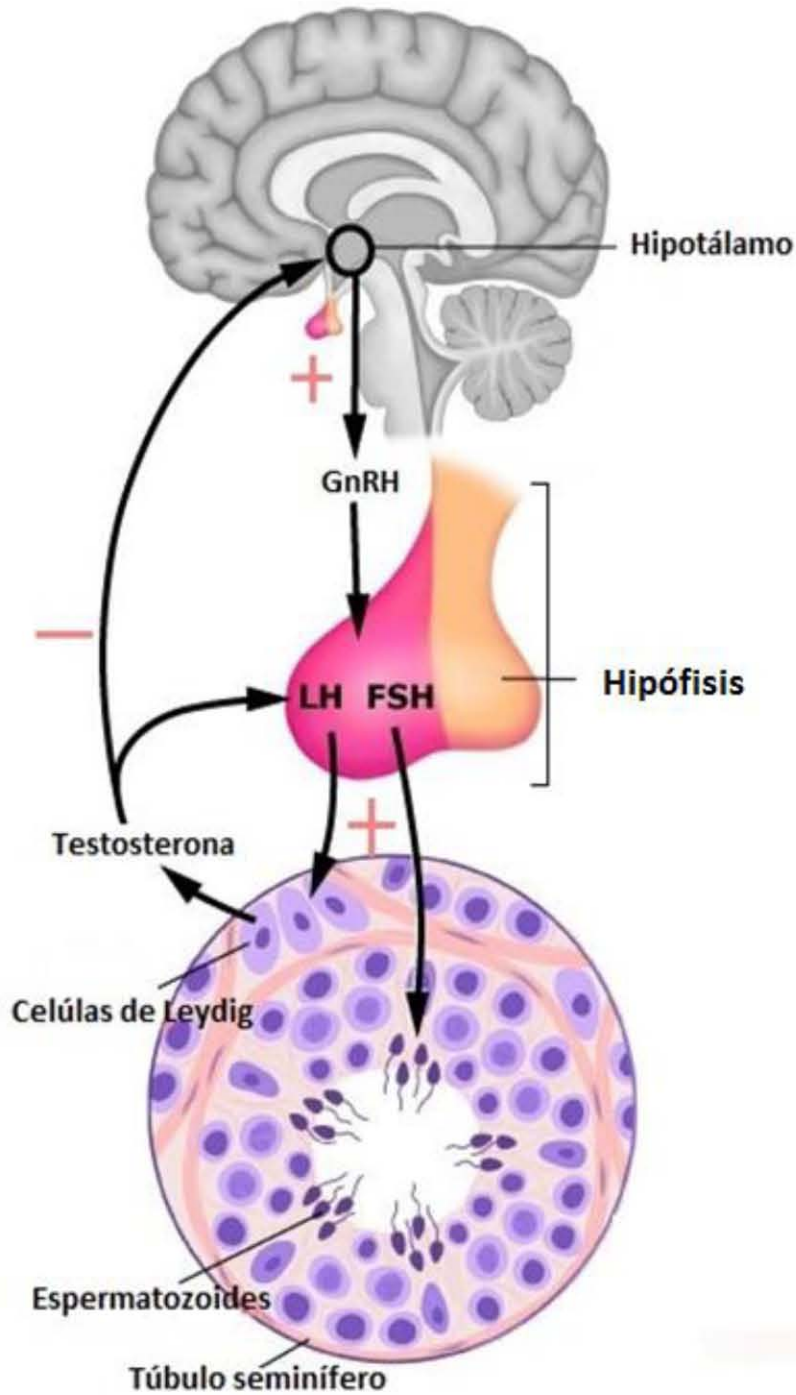


Figura 12. *Eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), hormonas estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH). Efecto estimulante (+), efecto inhibitorio (-)* (modificado de <http://goo.gl/OoTLRr>).

Serotonina y Funciones del Testículo

En el hipotálamo, la serotonina participa en la modulación de la secreción de la GnRH y por esta vía la secreción de las gonadotropinas, FSH y LH. Los axones de las neuronas serotoninérgicas inervan directamente al hipotálamo, en donde se encuentran las células que sintetizan GnRH. A la amina también se le encuentra en los gonadotropos, por lo que se propone que regula la secreción de las gonadotropinas directamente en la hipófisis (Wada, 2006; Krsmanovic, 2010). En el testículo se ha mostrado que modula la secreción de testosterona por las células de Leydig (Campos y col., 1990, Tinajero y col., 1993). Con base en estas evidencias se sugiere que la serotonina regula las funciones del testículo (Tinajero y col., 1993; Shishkina y Dygalo, 2000; Aragón y col., 2005).

La posibilidad de que la serotonina participa en la modulación de la secreción de la GnRH se apoya en los resultados de Wada y colaboradores (2006), quienes mostraron que cuando se mantiene en cultivo neuronas GnRHérgicas (GT1-7) y se le adiciona serotonina al medio, se inhibe la secreción de GnRH. En relación a la secreción de las gonadotropinas, Justo y colaboradores. (1989) observaron que cuando a ratas macho de 16, 26, 30 ó 60 días de edad, se les administra, 5-hidroxitriptofano (5-HTP) precursor de la síntesis de serotonina), se incrementa la concentración de FSH en el suero.

La serotonina, además de modular la secreción de las gonadotropinas y como consecuencia las funciones del testículo, también actúa directamente en el testículo, en donde regula su funcionamiento. Tinajero y colaboradores en (1993) mostraron que la serotonina se sintetiza en las células de Leydig, que actúa de forma autocrina debido a que al unirse al receptor 5-HT₂, estimula la producción del factor liberador de la corticotropina (CRF), el cual inhibe la síntesis de testosterona. En apoyo a esto, se observó que cuando se inyecta bilateralmente Ketanserina, antagonista selectivo de los receptores 5-HT₂, ó 5,7-Dihidroxitriptamina, neurotoxina selectiva del sistema serotoninérgico, las concentraciones de testosterona en el suero disminuyen significativamente (Csaba y col., 1998). Con base en estas evidencias se muestra que la serotonina se sintetiza en el testículo y modulan la esteroidogénesis.

Bocabella y colaboradores (1962), mostraron que cuando a la rata macho adulta se le administran 10 mg de serotonina por vía sistémica se induce atrofia del testículo, lo que se acompaña de la presencia en la gónada de espermátides multinucleadas, espermatoцитos con picnosis y disminución de la movilidad de los espermatozoides.

Cuando en ratas macho prepúberes de 30 (Aragón y col., 2005) 34 ó 40 días de edad (Shishkina y Borodin, 1989) se les administra por vía sistémica el inhibidor de la síntesis de serotonina, p-Cloroanfetamina, disminuye el peso corporal, de los testículos y de las vesículas seminales, así como el número y movilidad de los espermatozoides, lo que llevó a los autores a proponer que la serotonina es esencial en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del sistema reproductor del macho.

Regulación Neural de las Funciones del Testículo

Las funciones del testículo son reguladas por las hormonas y por la inervación que recibe el órgano (Bell y McLean 1973; Campos y col., 1990; Rauchenwald y col., 1995; Gerendai y col., 2000; Selvage y col., 2003).

Cuando en el testículo de la rata adulta se inyecta un trazador retrogrado, el virus de Pseudorabia - Herpes virus Siu-4, por inmunohistoquímica a los 3, 5 y 6 días postinyección se observó la presencia de marca en diferentes regiones del sistema nervioso central, como el tronco cerebral, hipotálamo, telencéfalo, rafe caudal y locus coeruleus. Estos datos anatómicos muestran que existe comunicación neural entre el sistema nervioso central y el testículo (Gerendai y col., 2000). Estos resultados se apoyan en los resultados obtenidos por Lee y colaboradores (2002), en el cual utilizando la misma técnica axonal retrógrada con el virus de Pseudorabia para lesionar la medula espinal y la posible inervación neural hacia los testículos en ratas macho de 70- 75 días de edad, se observó que interferían significativamente en la disminución de la concentración de testosterona, aun cuando se estimulaba la síntesis de esta hormona con inyecciones interventriculares del Factor Liberador de la corticotropina (CRF) o Gonadotropina coriónica humana (hCG), los autores sugieren con los resultados obtenidos que existe una comunicación neural testículo independiente de la hipófisis.

Bell y McLean (1973) revelaron la presencia de fibras adrenérgicas en la túnica albugínea y vasculosa y en el mediastino testicular. Sin embargo, la inervación que recibe el testículo es principalmente catecolaminérgica y proviene del nervio espermático y de los ganglios pélvicos (Rauchenwald y col., 1995); en este estudio el autor también propone que existe comunicación entre ambos testículos, ya que al inyectar unilateralmente fluorocromos en el testículo, al realizar una técnica de inmunohistoquímica se encontraba el marcador en ambos testículos, sin embargo no se cuenta con evidencia anatómica precisa sobre esta dicha comunicación.

También es posible que el nervio espermático sea una fuente importante de serotonina para la gónada (Campos y col., 1990). En apoyo a esta idea, cuando a ratas macho adultas se les secciona el nervio espermático superior unilateralmente disminuye la concentración de serotonina en la cápsula testicular y en el fluido intersticial en el testículo (Campos y col., 1990).

La serotonina también podría estar implicada en la regulación fisiológica de la vasoconstricción testicular. Collin y colaboradores (1996), realizaron un experimento en el cual se estudiaron los efectos de la administración intratesticular de Ketanserina, antagonista del receptor 5-HT₂ de 5-Hidroxitriptamina, a ratas adultas en donde los resultados obtenidos muestran que el flujo sanguíneo fue disminuido por 5-HT en forma dosis dependiente y AMPc en el testículo fue inhibido. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Celuch y Sloley (1988) en donde la administración de serotonina produce la contracción de los conductos deferentes. Mientras que en el epidídimo, la serotonina estimula la liberación de aniones en el epitelio de la cauda, posiblemente al activar los receptores tipo 5-HT 1b Y 5-HT 2B (Leung y col., 1999).

Otra evidencia que sugiere el papel de la inervación en la modulación de las funciones del testículo son los resultados obtenidos por Selvage y colaboradores (2003), en un experimento en el cual inyectaron en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), un agonista del receptor β -adrenérgico, el isoproterenol. La respuesta de las células de Leydig a la LH es afectada y como consecuencia la disminución de la producción de testosterona, los autores proponen una vía de comunicación que involucra a las células del PVN que inervan grupos de células noradrenérgicas, las que envían proyecciones a la médula, y éstas al testículo, existiendo así una posible comunicación neural al testículo que module sus funciones.

Anfetaminas, Serotonina y Funciones del Testículo

Existen un conjunto de sustancias, las anfetaminas, que afectan la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión, como la serotonina y que se utilizan como fármacos, para atender algunos problemas de conducta como déficit de atención en los niños o como drogas recreacionales (Iversen, 2008; Aliya y Stanwood, 2009; Molina y Cruz, 2010; Adori y col., 2011). Estas sustancias derivan de la Feniletilamina (Iversen, 2008) (Figura 13). Entre estas sustancias se encuentran la metanfetamina (MA), y los derivados de las anfetaminas como el 3,4-etilendioximetanfetamina (MDMA) y la p-Cloroanfetamina (pCA) (Mamounas y Molliver, 1988; Iversen, 2008; Aliya y Stanwood, 2009; Adori y col., 2011).

Fuller en 1980 menciona que entre los efectos que se observan tras la administración de p-Cloroanfetaminas se encuentran la inactivación del sistema de recaptura de serotonina, ya que PCA se transporta activamente en la neurona y éste bloquea el sistema de recaptura de ésta amina quitándola de la hendidura sináptica, aumentando así la concentración de su metabolito 5-HIAA. Por otra parte, PCA una vez dentro de la neurona agota serotonina liberándola o mediante la inhibición de la síntesis por la evidencia de la disminución de la enzima Triptófano Hidroxilasa y de la Monoamino oxidasa, llevado así un segundo posible mecanismo de acción de esta anfetamina.

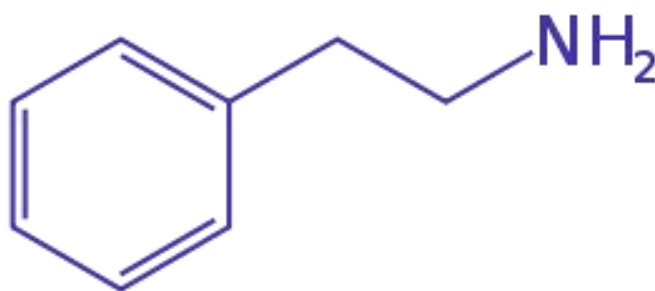


Figura 13. **Estructura básica de las anfetaminas (Feniletilamina)** (Tomada de: <http://goo.gl/agDOWA>).

En la actualidad, las causas de neurotoxicidad y los efectos que estas sustancias ejercen sobre el Sistema Nervioso Central se desconocen, pero se sugieren que sus efectos son mediados por la formación de metabolitos tóxicos que se forman a partir de la anfetamina o de los neurotransmisores implicados, como la serotonina y la dopamina (Commins y col., 1987; Utrilla, 2000; Fernández, 2003; Aliya y Stanwood, 2009).

Las anfetaminas se metabolizan por oxidación, hidroxilación y desaminación, ejemplos de estos metabolitos es la norefedrina e hidroxianfetamina, que se produce por alquilación de las anfetaminas, y son farmacológicamente activos (Karch, 1998; Fernández, 2003). Uno de los principales metabolitos que se forman en los animales que se les administra la p-Cloroanfetamina o MDMA, es la 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6 DHT) (Commins y col., 1987). Este metabolito, es neurotóxico selectivo del sistema serotoninérgico (Breese y col., 1974; Baumgarten y Bjorklund, 1974) (Figura 14).

La 5,6-DHT induce la degeneración anterógrada de las terminales nerviosas serotoninérgicas debido a que induce la formación de radicales libres y como consecuencia daño en los lípidos de la membrana, también altera el funcionamiento de las mitocondrias, y de las vesículas que almacenan al neurotransmisor en la neurona presináptica. Estos efectos se mantienen hasta por 30 días después de su administración (Sinhababu y col., 1985; Baumgarten y Bjorklund, 1974; Berge 1983; Fuller, 1992; Fernández, 2003).

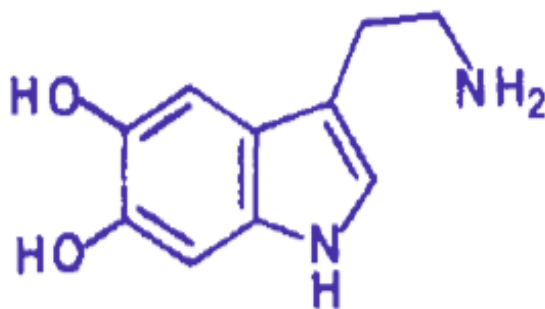


Figura 14. **Estructura química de la neurotoxina 5,6 – Dihidroxitriptamina** (Tomada de Sinhababu y col., 1984).

En un experimento realizado por Collu (1978) en donde se realizó una inyección intraventricular a ratas prepúberes (21 y 23 días de edad) de 50 µg de 5,6 DHT, se observó la disminución de la concentración de FSH dos semanas después de la administración de la anfetamina, mientras que el peso de los testículos también disminuyó significativamente, estos cambios fueron acompañados de la disminución del número de espermatozoides, el tamaño de los túbulos seminíferos, mientras que algunas espermátides generalmente no presentaban desarrollo posterior de la etapa de paquiteno en el ciclo de diferenciación.

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 de testosterona en plasma y del número de espermatozoides. Cuando a los animales se les administra el 5-hidroxitriptofano, precursor de la síntesis de serotonina, se incrementa la concentración de testosterona y del peso de los testículos a los 60 días de edad. Con base en estos resultados los autores sugieren que la serotonina parece ser esencial en la regulación de las funciones del testículo (Shishkina y Dygalo, 2000).

Cuando a ratas macho de 30 días de edad se les administra por vía sistémica, la p-Cloroanfetamina, inhibidor de la síntesis de serotonina, se observa la 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 es esencial en la modulación de la producción de espermatozoides y de la secreción de testosterona (Aragón y col., 2005).

Con base a los resultados mostrados por Budzszewska y col. (1996), al administrar MDMA y cocaína a ratas macho adultas bloqueando el sistema serotoninérgico disminuye la secreción de testosterona sin que se modifique la de LH, se sugiere que la serotonina actúa directamente en el testículo modulando la esteroidogénesis, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lin y colaboradores. (1997) cuando realizaron la administración de anfetaminas en ratones, se observó que disminuye la concentración de testosterona junto con el aumento de AMPc, los autores sugieren que con la existencia de daños neurológicos a causa de las anfetaminas, se podría también deber el daño en los testículos a causa del estrés oxidativo.

Otra evidencia del papel de la serotonina en las funciones del testículo fueron los resultados obtenidos por Yamamoto y colaboradores (1999), realizaron un estudio en donde a ratones macho en etapa juvenil, se les administró diferentes dosis de MDMA (15 mg/kg, 7.5 mg/kg, o 3.75 mg/kg) en donde se observó que la concentración de testosterona en suero y la movilidad de los espermatozoides, disminuía significativamente, también observaron la disminución de la capacidad reproductiva.

Yamamoto y colaboradores. (2002) realizaron un estudio en el cual administraron metanfetamina (MAMP) intratesticular en ratones machos de 10 semanas de edad en diferentes dosis (1, 5, 10 y 15 mg/kg), se detectaron células TUNEL-positivas en los túbulos seminíferos en animales 24 horas después de un tratamiento único con 5, 10 ó 15 mg/kg MAMP. Después de un sólo tratamiento con 10 mg/kg MAMP, el porcentaje de túbulos apoptóticos aumentó con el tiempo, y se convirtió en significativa a las 24 horas, los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Lin y colaboradores. (2014), en un experimento en el cual, la administración crónica de metanfetamina en la rata adulta induce disminución del peso de los testículos, del epidídimo y de la concentración de testosterona en suero y esto se

acompaña del incremento en la apoptosis en las células germinales y células de Leydig demostrado que la administración de metanfetaminas induce apoptosis en túbulos seminíferos en los testículos de ratas y ratones macho.

Justificación

La fuente de serotonina del testículo son los mastocitos, las plaquetas, las fibras nerviosas que inervan al órgano o la síntesis *de novo*. A la amina se le asocia con la modulación de la secreción de testosterona por la célula de Leydig y como consecuencia, posiblemente está implicada en la regulación de la espermatogénesis. Aunado a esto se sugiere que las anfetaminas o sus derivados modifican las funciones del testículo. Sin embargo, no se tiene información si estas sustancias modifican al sistema serotoninérgico del testículo y como consecuencia la espermatogénesis y esteroidogénesis. Por ello, en el presente trabajo se analizaron los efectos de la inyección intratesticular de la 5,6-dihidroxitriptamina, neurotóxico del sistema serotoninérgico, en la concentración de testosterona en el suero, en la movilidad y formas anormales de los espermatozoides y en la estructura del testículo.

Hipótesis

En el animal prepúber, la serotonina actúa directamente en el testículo y es esencial en la modulación de sus funciones. Por ello, la inhibición del sistema serotoninérgico de la gónada se traducirá en la disminución de la movilidad y formas normales de espermatozoides y en la alteración de la estructura del testículo.

Objetivo General

Evaluar en la rata macho prepúber los efectos de la inhibición del sistema serotoninérgico del testículo inducido por la administración de 5,6-dihidroxitriptamina en la movilidad y formas normales de espermatozoides y estructura del testículo.

Objetivos Particulares

- Analizar en la rata prepúber los efectos de la administración intratesticular de 5,6-dihidroxitriptamina en la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético en la gónada.
- Evaluar los efectos de la administración intratesticular de 5,6-dihidroxitriptamina en la movilidad, y formas anormales de espermatozoides.
- Analizar los efectos de la inyección intratesticular de 5,6-dihidroxitriptamina en la concentración de testosterona en el suero.
- Evaluar los efectos de la inyección intratesticular de 5,6-dihidroxitriptamina en la estructura del testículo.

Materiales y Métodos

Se emplearon ratas macho de 30 días de la cepa CIIZ-V, con libre acceso de las crías a la madre hasta los 21 días (destete), así como de agua y alimento hasta el día de sacrificio (65 días de edad). Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos experimentales.

Grupos experimentales

1.-Grupo Testigo Absoluto

Animales que no se sometieron a ningún tratamiento.

2.-Grupo ácido ascórbico

Animales a los que se les administró ácido ascórbico en ambos testículos.

3.-Grupo 5,6–Dihidroxitriptamina (5,6-DHT)

Animales a los que se les administró 5,6-Dihidroxitriptamina en ambos testículos

Inyección de 5,6 Dihidroxitriptamina o ácido ascórbico

Entre las 9:00 y 10:00 h, ratas de 30 días de edad se anestesiaron con éter, posteriormente se rasuró la piel del escroto que recubre los testículos, se realizó una incisión pequeña en el escroto y se procedió a introducir la aguja de microinyección que se encuentra acoplada a una bomba de microinyección (MCA/100 Bioanalytical System, Inc. West Lafayette, In, USA) y se procedió a realizar la inyección de 10 µg de 5,6–Dihidroxitriptamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) disuelta en 20 µL de ácido ascórbico. La velocidad de inyección fue de 10 µL por minuto, por testículo. Después de realizar la inyección del fármaco, la jeringa se mantuvo en esa posición por un lapso de 1 minuto para que la solución del fármaco se difundiera homogéneamente en el tejido testicular. Posteriormente se retiró la aguja y se procedió a suturar la piel. Este procedimiento se realizó en ambos testículos. La dosis de 5,6-DHT que se inyectó en cada testículo es la dosis que se ha mostrado disminuye en un 50 % la concentración de serotonina en el cerebro (Baumgarten y col., 1972). En otro grupo de animales se siguió el mismo procedimiento y en ambos testículos se administraron únicamente 20 µL de ácido ascórbico. En los animales la inyección de 5,6-DHT o ácido ascórbico se inició en el testículo izquierdo y posteriormente se administró en el testículo derecho.

Procedimiento de Autopsia

Animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron a los 65 días de edad por decapitación después del tratamiento. Se realizó la extracción de ambos testículos, se pesaron, se extrajo un fragmento de tejido testicular y el tejido remanente se fijó en líquido de Bouin para el posterior análisis de la estructura del testículo. La extracción del fragmento de testículo se realizó en la región craneal del testículo a la altura de la región de la red de testis o Red de Haller y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior cuantificación de la concentración de serotonina (5-HT) y su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Cuantificación de 5-HT y 5-HIAA en testículos por la técnica de HPLC

La biopsia de testículo se pesó en tubos ependorff y se homogenizó individualmente en 300 μL de ácido perclórico (0.1 N) y se centrifugó a 12000 rpm, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Se obtuvo el sobrenadante, que se filtró a través de filtros de celulosa de tamaño de poro $0.45\text{ }\mu\text{m}$. Veinte μL del filtrado se inyectaron al sistema de cromatografía. La concentración de 5-HT y 5-HIAA se expresó en ng/mg de tejido. La sensibilidad del método es de 0.001 ng/mg de tejido (Monroy y col., 2003).

Espermatogénesis

Durante el sacrificio, se extrajeron los conductos deferentes izquierdo y derecho, de los cuales se obtuvo el paquete espermático que se colocó en 800 μL solución Tirodes (Sigma Chemical) a una temperatura de 37°C . Esta solución espermática se incubó a la temperatura antes mencionada por 15 minutos.

Movilidad

Se tomó una alícuota de 20 μL de la solución espermática y se colocó en un portaobjetos precalentado a 37°C y con ayuda de un microscopio óptico y a un aumento de 40x, se contó el número de espermatozoides que presentaron movimientos rectilíneos progresivos y los inmóviles. En total se realizó el conteo de 100 células aproximadamente. Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides móviles e inmóviles.

Anormalidades en los espermatozoides

Se tomaron 20 μL de la solución espermática y se colocaron en uno de los extremos de un portaobjetos previamente lavado y limpio con una solución de alcohol-éter. Se realizó el barrido de la solución espermática con la ayuda de otro portaobjetos. La preparación se tiñó con la

técnica de hematoxilina-eosina y con ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 40X se procedió a realizar la evaluación de los espermatozoides con morfología normal y anormal.

Entre los criterios que se consideraron como morfología anormal se encuentra: gota citoplásmica, cabeza de alfiler, flagelo doblado, pieza media doblada, espermatozoides juntos, dos o más anormalidades en un solo espermatozoide así como deformación de la membrana, doble flagelo, sin cabeza, cabeza plana, dos cabezas y cabeza deforme.

Estructura del Testículo

En el momento del sacrificio se extrajeron los testículos, los cuales se fijaron en líquido de Bouin, posteriormente se deshidrataron e incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 10 micras con ayuda de un micrótopo; se colocaron en portaobjetos previamente preparados con una capa de albúmina y etiquetados respectivamente.

Los cortes se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-eosina y se procedió a realizar la evaluación la estructura del testículo.

Cuantificación de testosterona en suero

La evaluación de la concentración de testosterona se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, para lo cual se utilizó un kit (Coat-A-count, USA), la concentración de testosterona se expresó en ng/ mL.

Análisis estadístico de resultados

Los resultados se analizaron con el programa (*Graphpad Instant [Data set1.ISD]*) y se expresaron como media \pm error estándar de la media. El peso de los testículos, la concentración de serotonina y de su metabolito en el testículo y la concentración de testosterona en el suero, el porcentaje de espermatozoides móviles e inmóviles y el número de formas anormales se analizaron por la prueba de *t* de Student. Se consideraron como significativas las diferencias entre grupos cuando la probabilidad fue menor o igual a 0.05.

Resultados

En el grupo testigo absoluto (TA) el peso del testículo izquierdo y derecho fue similar y este mismo comportamiento se observó en los animales que se les administró el ácido ascórbico (VH) o la 5,6-dihidroxitriptamina (5,-DHT), lo que se reflejó en que no se presentan cambios en la masa testicular (Figura 15).

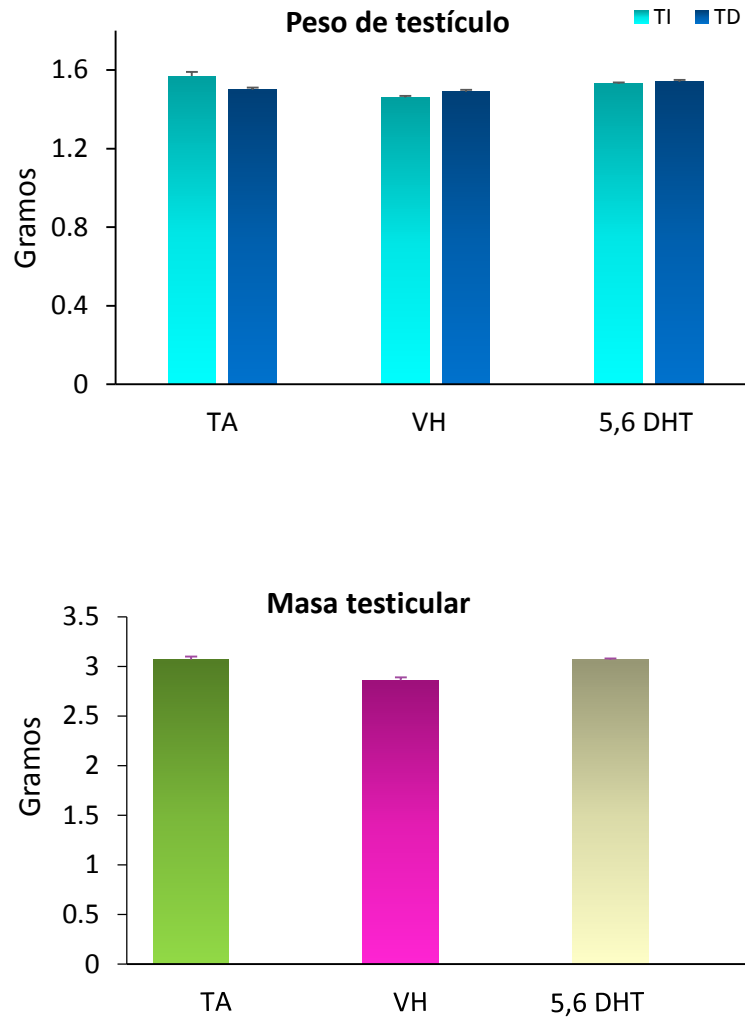
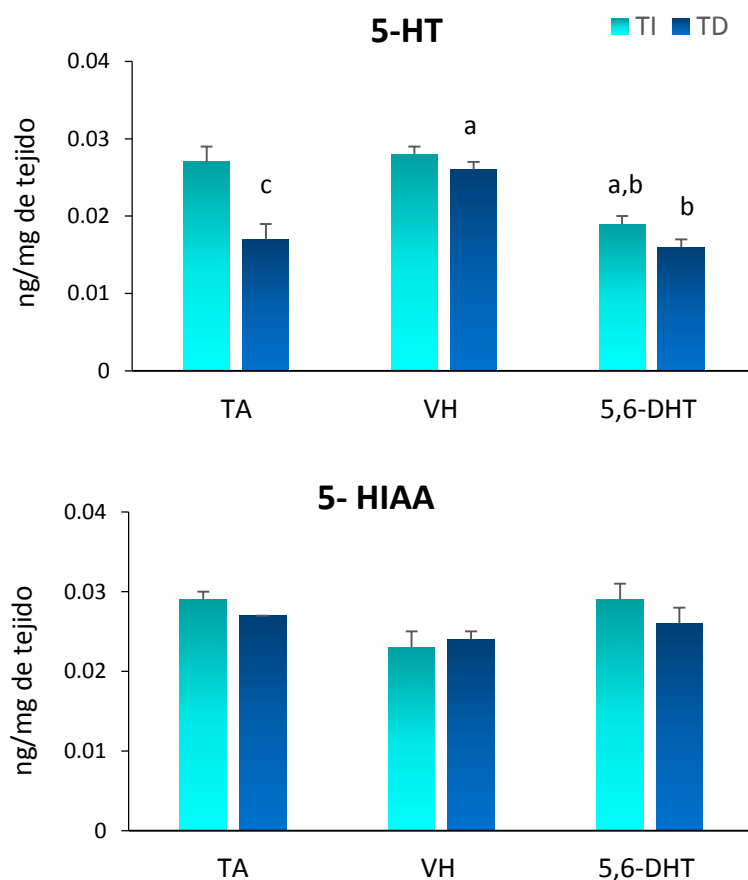


Figura 15.- Peso (media + e.e.m.) del testículo izquierdo (TI), derecho (TD) y masa testicular de ratas machos testigo absoluto (TA) o con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.

Concentración de 5-HT y del 5-HIAA

En el grupo de animales testigo absoluto la concentración de serotonina en el testículo izquierdo fue mayor que en el derecho. Mientras que, en los animales que se les administró el VH o 5,6-DHT, la concentración de la amina fue similar en ambas gónadas. En comparación con el grupo con VH, en los que se les inyectó la 5,6-DHT la concentración de serotonina disminuyó significativamente en ambas gónadas. La concentración del metabolito, el 5-HIAA fue similar en el TI y TD en los diferentes grupos experimentales (Figura 16).



a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student)

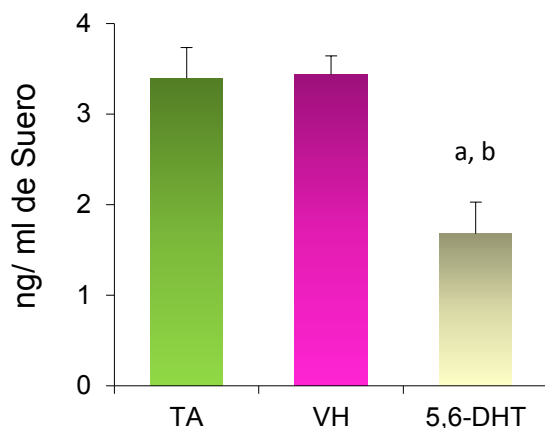
b, $p < 0.05$ vs. VH (Prueba "t" de Student)

c, $p < 0.05$ vs. TI (Prueba "t" de Student)

Figura 16.- Concentración (media + e.e.m.) de serotonina (5-HT) o del ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) en el testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratas machos testigo absoluto (TA) o con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.

Concentración de testosterona

La concentración de testosterona en el suero de los animales que se les administró el VH no se modificó en comparación con los animales TA. Mientras que, en los animales que se les inyectó la 5,6-DHT la concentración de este esteroide fue menor que en el grupo TA o con VH (Figura 17).



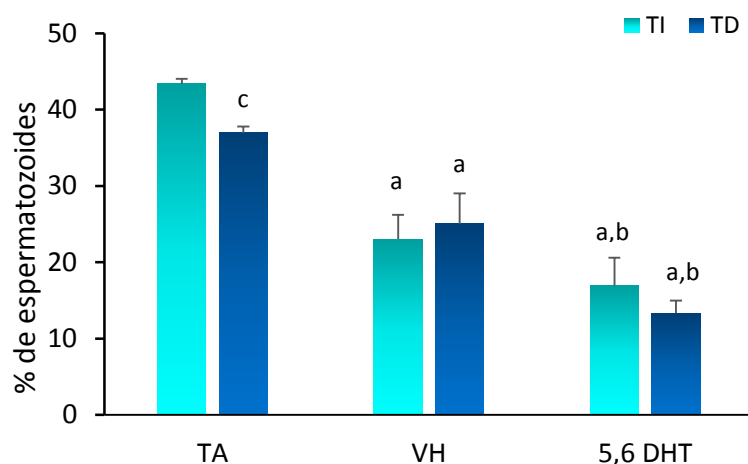
a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student)

b, $p < 0.05$ vs. VH (Prueba "t" de Student)

Figura 17.- Concentración (media + e.e.m.) de testosterona en el suero de ratas machos testigo absoluto (TA) o con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.

Espermatogénesis

En el grupo de animales TA el porcentaje de espermatozoides móviles obtenidos del conducto deferente izquierdo fue mayor que en el conducto deferente derecho. En comparación con el grupo de animales TA, en los animales que se les inyectó el VH este parámetro disminuyó significativamente en ambos conductos y este efecto fue más evidente en los que se les inyectó 5,6-DHT en comparación con los grupos TA o con VH (Figura 18).



a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student)

b, $p < 0.05$ vs. VH (Prueba "t" de Student)

c, $p < 0.05$ vs. TI (Prueba "t" de Student)

Figura 18.- Porcentaje (media \pm e.e.m.) de espermatozoides móviles en el testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratos machos testigo absoluto (TA) o con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.

Cuando se analizó la forma de los espermatozoides se observó que el porcentaje de espermatozoides anormales producidos entre el TI y TD fue similar en los diferentes grupos experimentales. Este parámetro se incrementó significativamente en los animales que se les inyectó VH en ambas gónadas. En el grupo de animales que se trataron con la 5,6-DHT el porcentaje de espermatozoides anormales se incrementó significativamente en comparación con los grupos TA o con VH (Cuadro 1).

Cuando se analizó las alteraciones en los tres componentes del espermatozoide, la cabeza, pieza media y flagelo se observó que el porcentaje de espermatozoides con alteración en la forma de la cabeza se incrementó significativamente en los animales con VH en comparación con el grupo TA. Este efecto fue más evidente en los que se les inyectó la 5,6-DHT. En comparación con el grupo TA, en los animales con VH o con 5,6-DHT el porcentaje de espermatozoides con alteración en la pieza media se incrementó significativamente y este incremento fue similar en ambos grupos. El porcentaje de espermatozoide con daño en el flagelo no se modificó en los animales con VH y se incrementó significativamente en los

animales con 5,6-DHT en relación con el grupo TA o con VH (Cuadro 1). En los animales que se les administró el VH o la 5,6-DHT se observó que algunos espermatozoides presentaban alteración en más de uno de sus componentes, por lo que a estos se les consideró como alteración en todo el espermatozoide.

Considerando este criterio, en comparación con el grupo TA o con VH en los animales que se les administró la 5,6-DHT se observó el incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides con daño en todo el espermatozoide (Cuadro 1).

Cuando se analizaron las diferentes alteraciones en la cabeza del espermatozoide, observamos que en relación con el grupo TA, en los animales que se les administró el VH se incrementó el porcentaje de espermatozoides con cabeza plana, deforme o con dos cabezas. Mientras que, en los animales que se les inyectó la 5,6-DHT, se incrementó significativamente el porcentaje de espermatozoides sin cabeza (figura B), con cabeza plana (figura C), de alfiler (figura D), deforme (figura F) o con dos cabezas (Figura E), en comparación con el grupo de animales TA o con VH (Figuras 22 y 23-24).

En la evaluación de la pieza media de los espermatozoides tratados con el VH no se observaron cambios con respecto a los animales TA, mientras que, los animales tratados con 5,6 DHT presentan un incremento en el daño de la pieza media, en relación con TA o VH. En los animales tratados con VH se observó un incremento de los espermatozoides que presentaron gota citoplasmática en relación al grupo TA en ambos testículos, mientras que, en los animales tratados con 5,6 DHT (Figura 25) se observa un incremento significativo en el testículo derecho en relación al TA y VH (Figuras 25 y 26).



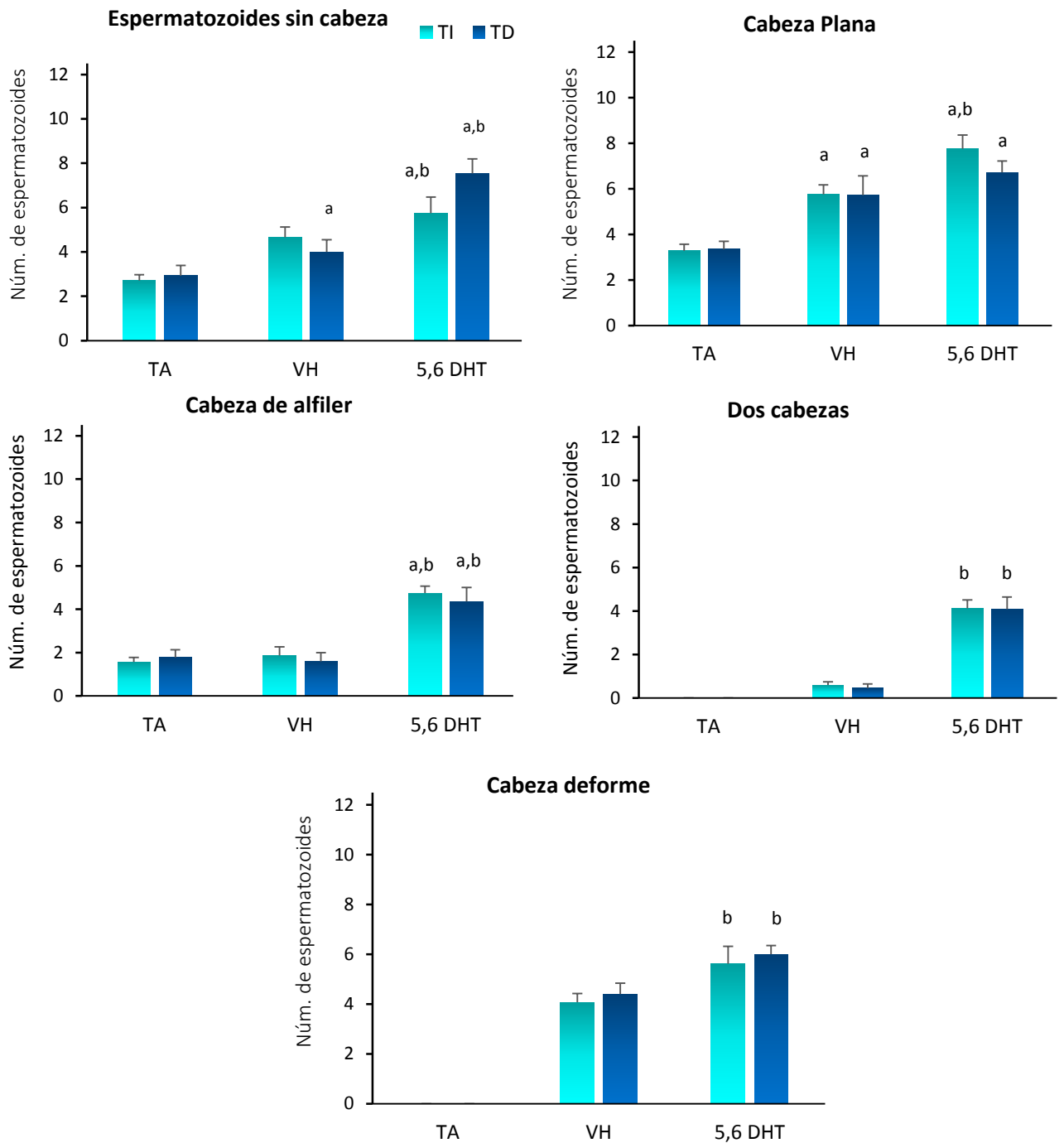
Grupo	Porcentaje de espermatozoides anormales	Componentes del espermatozoide dañado				
		Cabeza	Pieza media	Flagelo	Todo el espermatozoide	
TA	TI	11.74 ± 0.67	7.33 ± 0.53	3.86 ± 0.42	0	0
	TD	13.1 ± 1.05 ^C	7.85 ± 0.66	4.07 ± 0.32	0	0
VH	TI	30.46 ± 1.55 ^a	14.81 ± 1.22 ^a	11.56 ± 0.85 ^a	0.937 ± 0.1	14.06 ± 1.3
	TD	31.42 ± 1.44 ^a	13.81 ± 1.41 ^a	12.33 ± 1.18 ^a	0.333 ± 0.12	15.33 ± 1.42
5,6 - DHT	TI	37.4 ± 1.13 ^{a,b}	28 ± 1.16 ^{a,b}	12.5 ± 0.59 ^a	6.25 ± 0.18 ^b	20 ± 1.25 ^b
	TD	39.36 ± 0.43 ^{a,b}	28.72 ± 1.19 ^{a,b}	13.9 ± 1.2 ^a	6.54 ± 0.14 ^b	18.18 ± 1.49 ^b

Cuadro 1.- Porcentaje (media + e.e.m) de espermatozoides anormales y de las alteraciones en la cabeza, pieza media, flagelo o en todo el espermatozoide producidos en el testículo de ratas macho de los grupos testigo absoluto (TA) o con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.

a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student)

b, $p < 0.05$ vs. VH (Prueba "t" de Student)

c, $p < 0.05$ vs. TI (Prueba "t" de Student)



a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student)
 b, $p < 0.05$ vs. VH (Prueba "t" de Student)

Figura 22.- Número (media + e.e.m.) de espermatozoides sin cabeza, cabeza plana, dos cabezas, cabeza de alfiler y cabeza deforme en el testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratas machos testigo absoluto (TA) o con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.

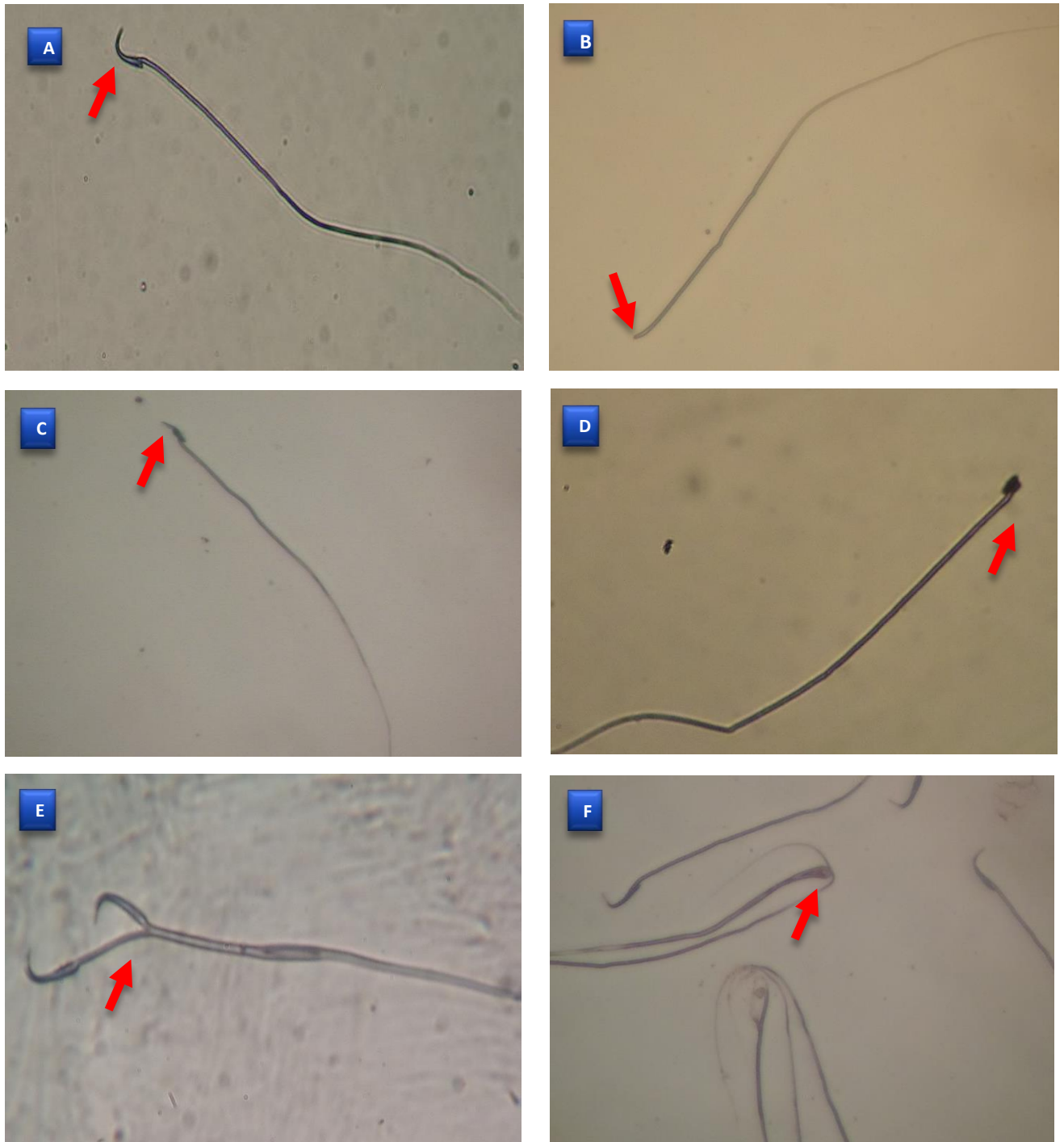
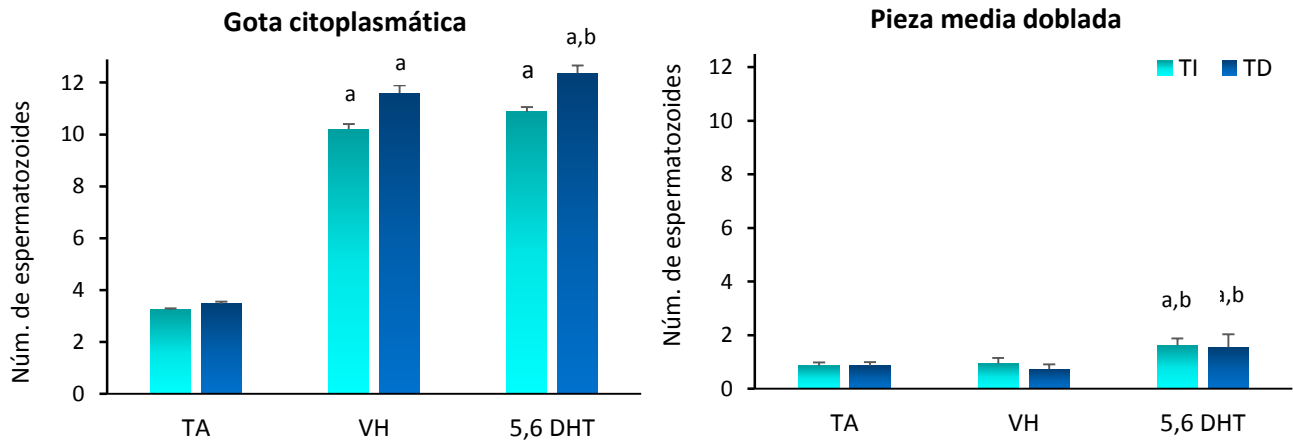


Figura 23.- Fotomicrografías (60x) de espermatozoide normal (A), sin cabeza (B), cabeza plana (C) cabeza de alfiler (D), dos cabezas (E), deforme (F) producidas en los testículos de ratas machos testigo absoluto (TA) o con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.



Figura 24.- Fotomicrografías (100x) de espermatozoides con más de dos cabezas (G) producidas en el testículo de ratas macho con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.



a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student)
 b, $p < 0.05$ vs. VH (Prueba "t" de Student)

Figura 25.-Número (media + e.e.m.) de espermatozoides con gota citoplasmática y pieza media doblada en el testículo izquierdo (TI) y derecho (TD) de ratas machos testigo absoluto (TA) o con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.



Figura 26.- Fotomicrografías (100x) de espermatozoides con pieza media doblada (H), gota citoplásmica (I) de ratas machos testigo absoluto (TA) o con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.

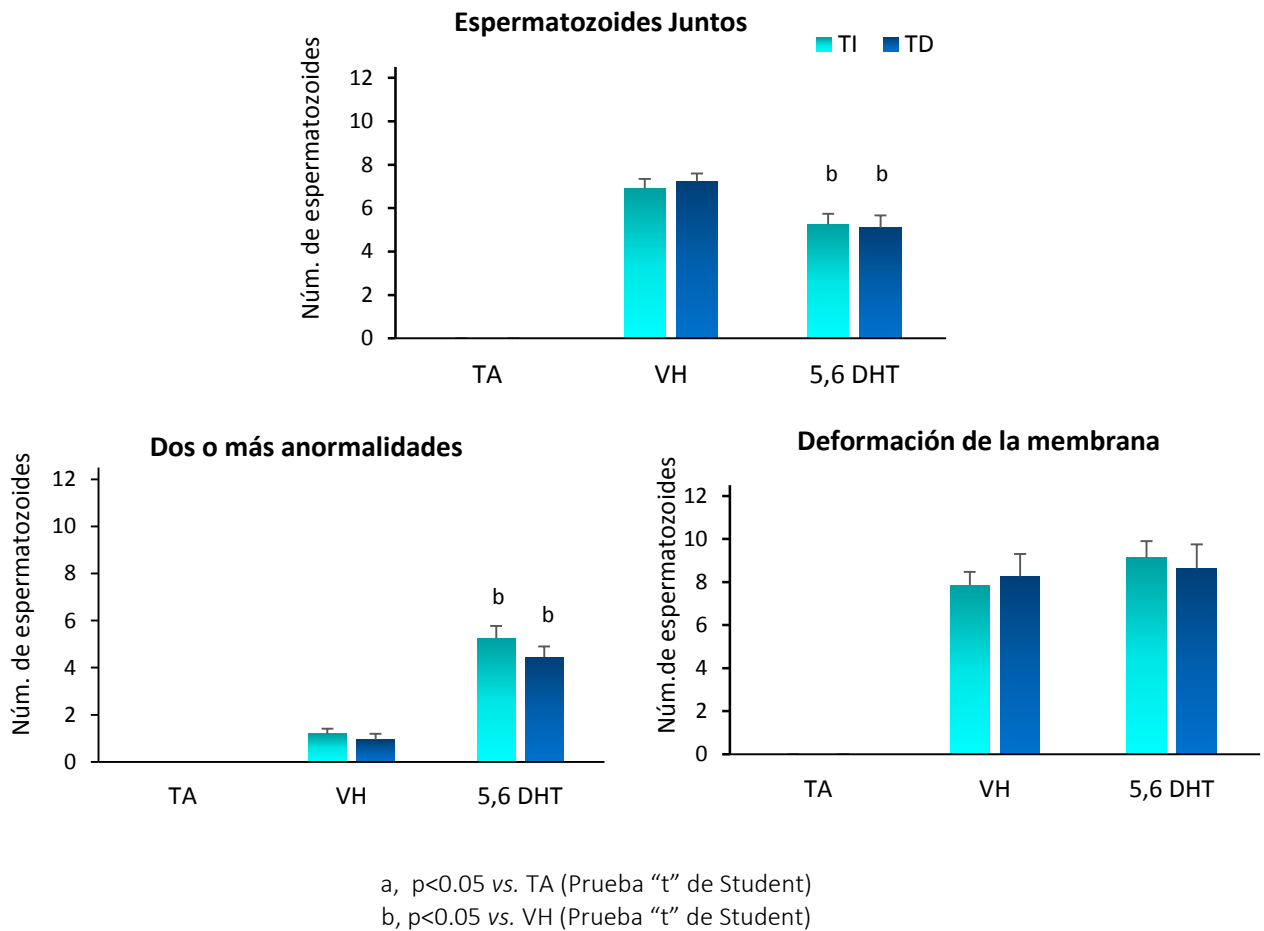




Figura 27.- Número (media + e.e.m.) de espermatozoides juntos, con dos más anomalías, o deformación de la membrana de ratas machos con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.



Figura 28- Fotomicrografías (100x) de espermatozoides unidos (J), con dos o más anomalías (K), deformación en la membrana (L) producidos en el testículo de ratas machos con inyección en ambas gónadas de ácido ascórbico (VH) o 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el día 30 y sacrificadas a los 65 días de edad.

Evaluación de estructura del testículo

En el grupo control, el arreglo de los túbulos seminíferos fue regular, y la mayoría de los túbulos estuvieron rodeados de una pared muscular. Los túbulos seminíferos tuvieron una forma regular normal, las células germinales organizadas en capas concéntricas y con un lumen regular. La superficie del tejido peritubular fue rectilínea y mostró varios núcleos de células peritubulares (Figura 29 A-F). Esta misma organización regular se observó en los animales que se les administró el ácido ascórbico (Figura 30 A-E).



En las secciones de los testículos de los animales tratados con 5,6-DHT se observaron túbulos seminíferos atróficos y deformes con el contorno irregular mostrando desorganización en el arreglo de las células germinales (Figura 31). El número de capas de células en el túbulo disminuyó. La pérdida de células germinales y del lumen en algunos túbulos seminíferos fue evidente (Figura 31B, 31C y 31 D). Se observaron espermátides redondas y elongadas en una posición inusual, en el lumen, indicando pérdida de células germinales (Figura 31D).

Rodeando el epitelio alterado se observó que el tejido peritubular fue de contorno irregular (Figura 31C y 31 D).

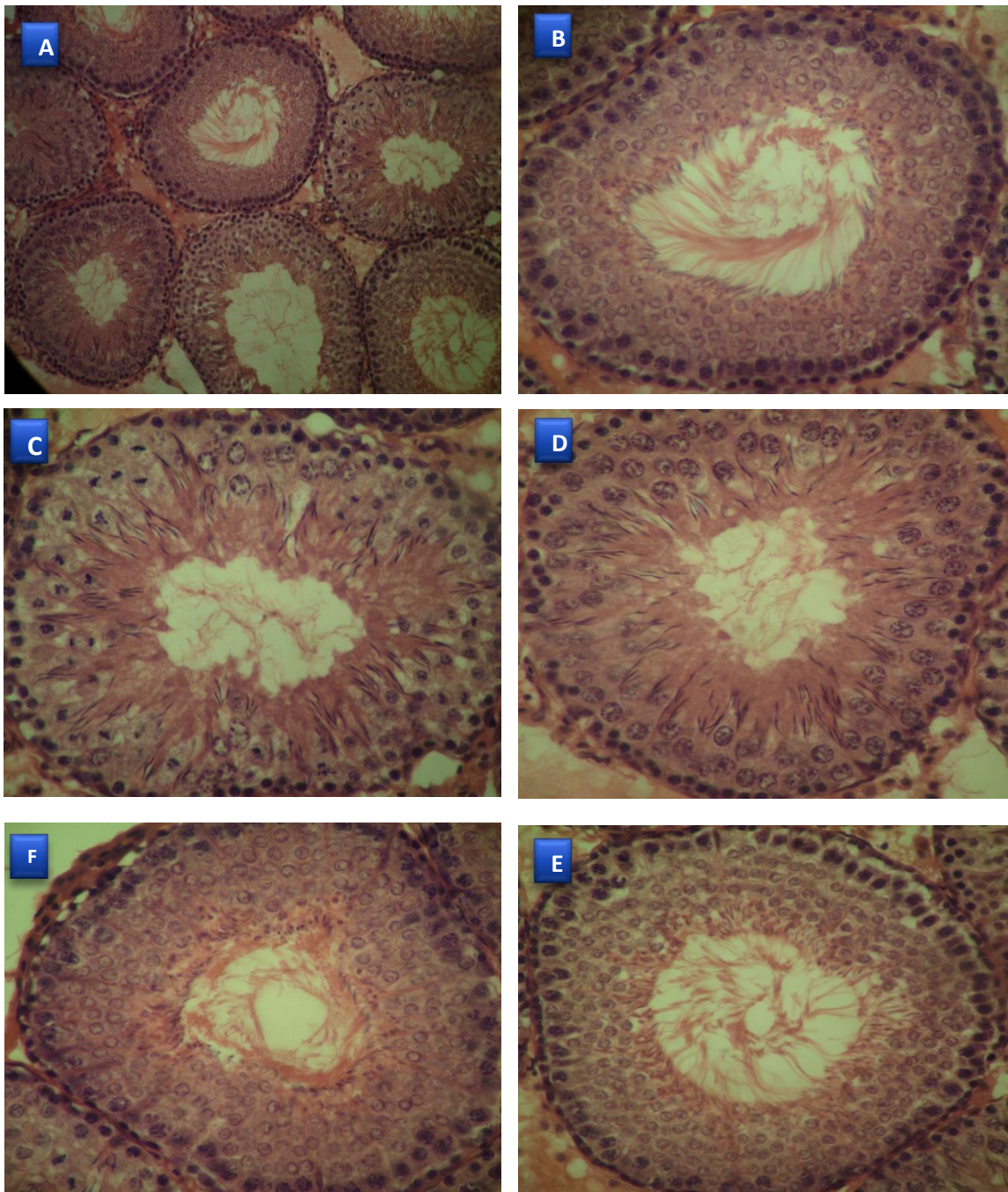


Figura 29. Cortes histológicos del testículo de animales control, el arreglo de las células germinales en el túbulo seminífero es regular y la mayoría de los túbulos tuvieron una pared muscular. (A, B, C, D y E). 40X, se observa el arreglo de diferentes túbulos seminíferos (A). 60 X, se observan diferentes etapas de diferenciación de las células germinales y en la figura B se aprecian espermatozoides en el lumen del túbulo.

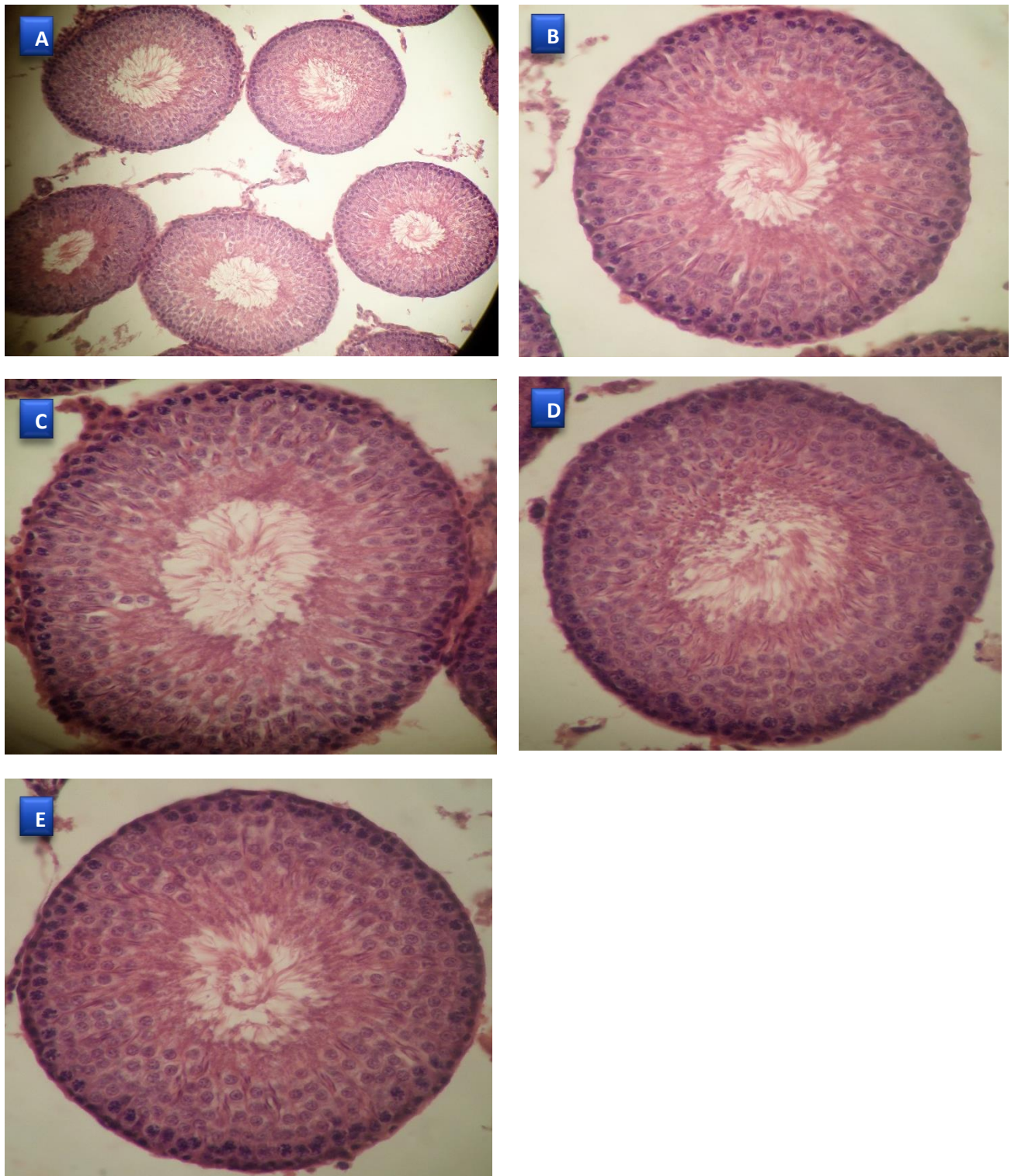


Figura 30. Cortes histológicos del testículo de animales tratados con ácido ascórbico, el arreglo de las células germinales en el túbulo seminífero es (A, B, C, D y E). 40X, se observa el arreglo de diferentes túbulos seminíferos (A). 60 X, se túbulo con espermatozoides en el lumen (B, C, D y E).

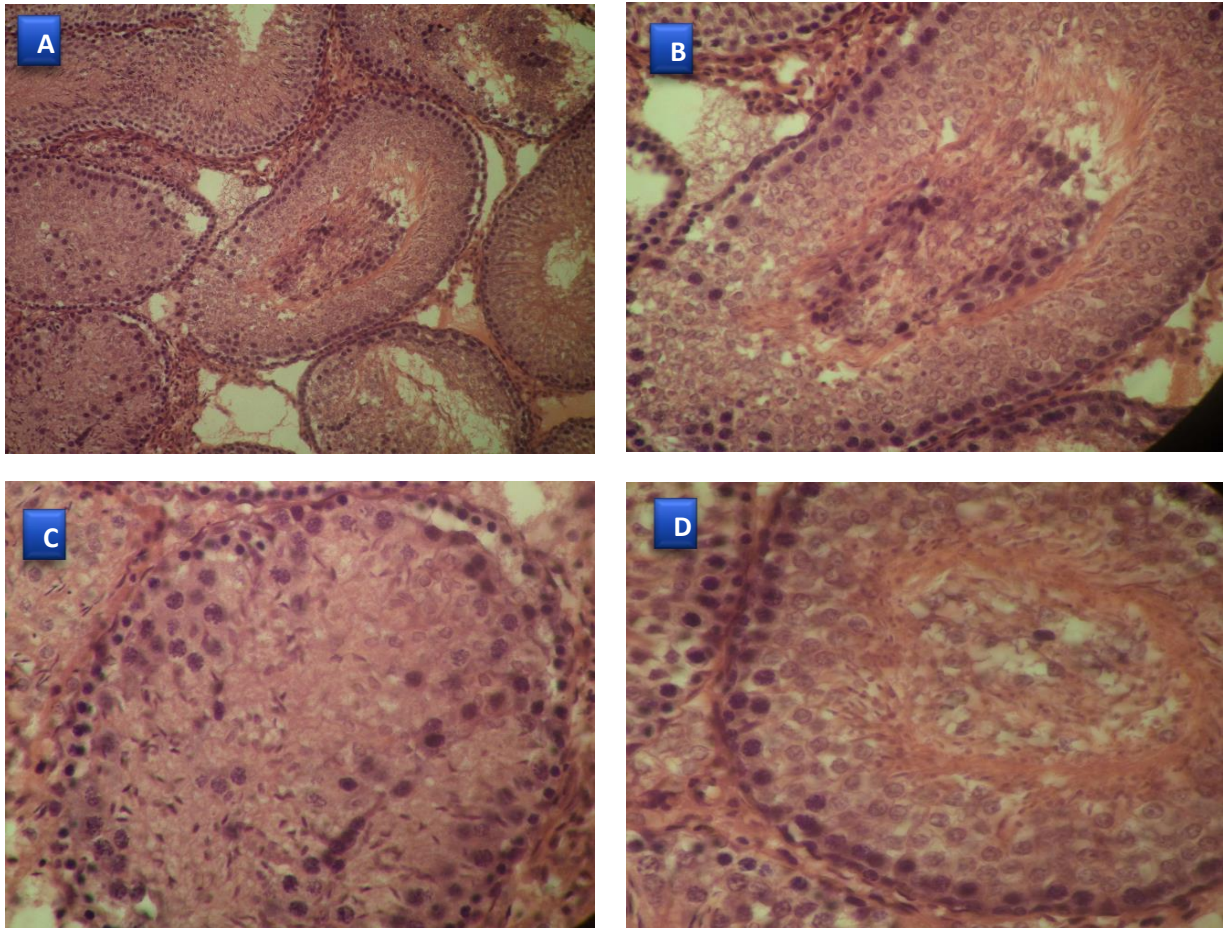


Figura 31. Cortes histológicos del testículo de animales con inyección de 5,6-Dihidroxitriptamina, el arreglo de las células germinales en el túbulo seminífero es irregular la mayoría de los túbulos no presentan lumen (A, B, C, D). 40X, se observa el arreglo de diferentes túbulos seminíferos (A). 60 X, se observan túbulos seminíferos con células germinales en el lumen y no se aprecian espermatozoides (B, C, y D).

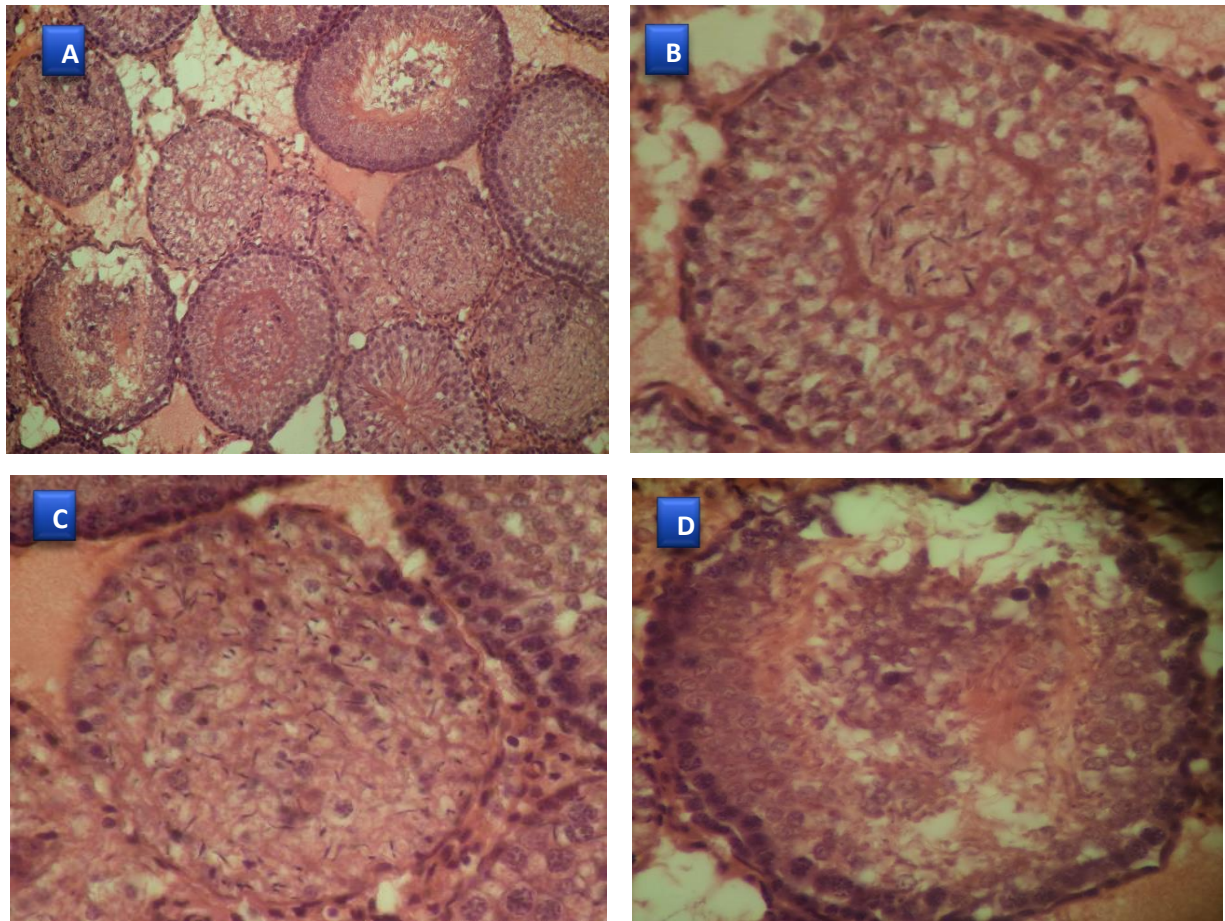


Figura 32. Cortes histológicos del testículo de animales con inyección de 5,6-Dihidroxitriptamina, el arreglo de las células germinales en el túbulo seminífero es irregular la mayoría de los túbulos no presentan lumen (A, B, C, D). 40X, se observa el arreglo de diferentes túbulos seminíferos (A). 60 X, se observan túbulos seminíferos con células germinales en el lumen y no se aprecian espermatozoides (B, C, y D).

Parámetro	VH	5,6 DHT
Masa testicular	=	=
Serotonina (5-HT)	= TI ↑TD	↓
Ácido Hidroxindolácetico (5-HIAA)	=	=
Testosterona	=	↓
Movilidad	↓	↓
Espermatozoides anormales	↑	↑
Anomalías en la cabeza	↑	↑
Anomalías en pieza media	↑	↑
Anomalías en el flagelo	=	↑
Anomalías en todo el espermatozoide	↑	↑
ANORMALIDADES EN LA CABEZA		
Sin cabeza	↑TI = TD	↑
Cabeza plana	↑	↑
Cabeza alfiler	=	↑
Dos cabezas	=	↑
Cabeza deforme	=	↑
ANORMALIDADES EN LA PIEZA MEDIA		
Pieza media doblada	=	↑
Gota citoplasmática	↑	↑
ANORMALIDADES EN TODO EL ESPERMATOZOIDE		
Espermatozoides juntos	↑	↓vs VH
Dos o más anomalías	=	↑
Deformación de la membrana	↑	= vs VH

Discusión

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudios se muestra que la administración de 5,6-Dihidroxitriptamina en el testículo de la rata a los 30 días de edad, modifica la estructura y funcionamiento del testículo, producción de testosterona y algunos parámetros de la espermatogénesis (movilidad y morfología del espermatozoide).

En los animales que se les administró el ácido ascórbico en el testículo, no se modificó la concentración de serotonina en la gónada, sin embargo se presentaron alteraciones en algunos parámetros de la espermatogénesis, tales como la morfología del espermatozoide. Estos resultados son opuestos lo reportado en bibliografía debido a que se considera que el ácido ascórbico protege al testículo de daños inducidos por el estrés oxidativo (Jewo y col., 2012). En relación a esto, Azari y colaboradores (2014), mostraron que cuando se induce criptorquidia unilateral en ratas adultas, se generan problemas de fertilidad, debido a que el testículo que no desciende se encuentra a una temperatura mayor lo que se acompaña de alteraciones en la espermatogénesis debido al estrés oxidativo que se genera en el túbulo seminífero por el calor. Cuando a estos animales se les administra ácido ascórbico por 60 días se ha observado que se inhibe la formación de radicales libres e impide la lipoperoxidación de las membrana y ayuda a la sobrevivencia de las células del epitelio germinal e inhibe la apoptosis.

No tenemos una explicación a las alteraciones en la morfología del espermatozoide que se observó en los animales tratados con ácido ascórbico. Sin embargo, es posible que las diferencias observadas entre el estudio antes mencionado y lo observado en el presente trabajo se vinculen con el tiempo y vía de administración del ácido ascórbico, debido a que en el trabajo de Azari y colaboradores (2014), la administración del ácido ascórbico se realizó por vía sistémica y de forma crónica por 60 días y en nuestro estudio se administró directamente en la gónada y fue una dosis única.

La disminución en la concentración de serotonina en el testículo de los animales que se les administró la 5,6-DHT coincide con los efectos que se le atribuyen a esta neurotóxina en el cerebro. Wiklund y colaboradores (1978), mostraron que cuando se realiza la inyección intraventricular de la 5,6-DHT disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo y en otras regiones del cerebro a partir de las 3 horas después del tratamiento y este efecto se mantiene hasta por 30 días. Este efecto en la producción de serotonina se asocia con el daño en la neurona serotoninérgica (Baumgarten y Bjorklund. 1974; Sinhababu y col. 1985) la inhibición de la enzima triptófano hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de serotonina (Loverberg y Bruckwick, 1978).

Conjuntamente los resultados de nuestro estudio y lo descrito por otros autores, nos permiten proponer que en los animales que se realizó la inyección intratesticular de la 5,6-DHT se dañaron las fibras serotoninérgicas que inervan al testículo y que transcurren por el

nervio espermático, ya que algunos autores proponen que este nervio es una de las fuentes de serotonina para la gónada del macho (Campos y col., 1990). En relación a esto se ha mostrado que cuando se secciona el nervio espermático superior, disminuye la concentración de serotonina en la cápsula y el fluido intersticial.

La posibilidad de que la 5,6-DHT genere daño en las neuronas serotoninérgicas se apoya en las evidencias que han mostrado que esta neurotoxina es recapturada selectivamente por estas neuronas y en el interior de la célula se autooxida, lo que promueve la formación de radicales libres superóxido, como el O_2^- ; radicales hidroxilo, como el HO^- y H_2O_2 , que dañan el ADN, proteínas y lípidos. Además estas especies reactivas de oxígeno inhiben la función de la mitocondria, lo que contribuye con la muerte de la neurona (Sinhababu y col., 1985; Jiménez del Río y Velez-Pardo, 2002).

Otra posible explicación a la disminución en la concentración de serotonina en el testículo de los animales que se les administró la neurotoxina, posiblemente se asocia a la inhibición de la enzima triptófano hidroxilasa, enzima limitante para la síntesis de serotonina. En relación a esto, Loverberg y Bruckwick (1978) observaron que cuando en la rata se realiza la inyección intraventricular de 5,6-DHT, la actividad de esta enzima en el cerebro y en el tronco cerebral disminuye hasta en un 70 % y este efecto se mantiene hasta 20 días después del tratamiento. Por ello, es posible que en la célula de Leydig que sintetiza serotonina (Tinajero y col., 1993) disminuyera la producción de la amina.

La 5,6-DHT indujo daño selectivo en las fibras serotoninérgicas que inervan al testículo, sin modificar las fibras noradrenérgicas que también transcurren por el nervio espermático. La selectividad de la 5,6-DHT sobre el daño de las fibras productoras de serotonina se ha reportado en sistema nervioso, debido a que cuando la neurotoxina se inyecta directamente en el tercer ventrículo (Collu, 1978) o en los núcleos dorsal y medial del rafe, fuente principal de serotonina del cerebro (Mendoza, 2008; Vázquez, 2008;) no se modifica la concentración de noradrenalina o dopamina en el hipotálamo. Estos resultados coinciden con lo observado en nuestro estudio, debido a que en los animales que se les realizó la inyección de la 5,6-DHT, no se modificó la concentración de noradrenalina y dopamina en el testículo.

La disminución en la concentración de serotonina en el testículo de los animales que se les inyectó la 5,6-DHT se acompañó de la menor producción de testosterona en el suero de estos animales. Estos resultados coinciden con lo reportado en otros estudios en donde se observa que cuando a la rata macho prepúber se le administra de forma aguda (Shishkina y Dygalo, 2000) o crónica p-cloroanfetamina por vía sistémica (Aragón y col., 2005), disminuye la concentración de testosterona. Un resultado similar lo observó Budziszewska y colaboradores (1996), quienes mostraron que cuando a la rata macho adulta se le administra anfetaminas por vía sistémica disminuye la secreción de testosterona sin que se modifique la de LH. Con base en los dos últimos estudios, los autores proponen que los efectos de la anfetamina sobre la esteroidogénesis pueden estar asociados a su acción directa en el testículo.



Tinajero (1993) sugiere que la serotonina actúa como modulador autócrino en la función de las células de Leydig, la amina producida por esta célula, se une a su receptor 5-HT₂ de la membrana, estimula la secreción de factor liberador de la corticotropina (CRF) e inhibe la síntesis de testosterona, por lo que a la serotonina se le atribuye un papel inhibitorio en la esteroidogénesis en el testículo. Sin embargo, con base en los resultados observados en nuestro estudio es posible pensar que en la rata prepúber la serotonina es esencial en la modulación de la producción de testosterona. La posibilidad de que la participación de la amina en la esteroidogénesis varía con la edad del animal se ha mostrado en los estudios de Csaba y colaboradores (1985), quienes observaron que cuando en la rata adulta se inyecta serotonina en ambas gónadas disminuye la secreción de testosterona, un efecto opuesto se observa mientras que se administra el antagonista de los receptores a serotonina 5-HT₂, la Ketanserina. Mientras que, cuando el antagonista se administra en el animal prepúber, la secreción de testosterona es suprimida.

La menor producción de testosterona en el suero de los animales que se les administró la 5,6-DHT, posiblemente se asocie al daño que se generó en las fibras serotoninérgicas que transcurren por el nervio espermático (Campos y col., 1990). Cuando en la rata macho prepúber de 30 días de edad se realiza la sección del nervio espermático superior e inferior, la concentración de testosterona disminuye, induce apoptosis en las células de Leydig, disminuye la 3beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 y el RNAm del receptor para la LH (Huo y col., 2010). Estos resultados sustentan la idea de que la información neural que transcurre por el nervio espermático es esencial en la modulación de la esteroidogénesis, en la transición de la etapa puberal a la adulta.

La disminución de la concentración de serotonina y de testosterona observada en los animales que se inyectaron con la 5,6-DHT, se acompaña de modificaciones de la espermatogénesis, movilidad y aumento de formas anormales de espermatozoides. Los cambios en la espermatogénesis son el resultado de la disminución en la producción de testosterona, ya que se ha reportado que este andrógeno es esencial para la espermatogénesis (Barrios, 2002; Tresguerres, 2010; White y Porterfield, 2013), debido a que participa en la maduración de la espermatogonia, y espermatoцитos, favorece la elongación de las espermátides redondas a espermatozoide y en general mantiene el desarrollo del epitelio seminífero (Ross, 2003, Junqueira, 2005). En apoyo a la idea antes, Duru y colaboradores (2013), mostraron que cuando en la rata se realiza la vasectomía unilateral, la concentración de testosterona y la movilidad espermática disminuye, se incrementa el porcentaje de espermatozoides con anomalías y la atrofia en el túbulo seminífero.

Conjuntamente estas evidencias y nuestros resultados muestran que la testosterona es esencial en el mantenimiento de la espermatogénesis y la estructura del testículo.



Además del daño en la estructura del espermatozoide, en los animales que se les administró la 5,6-DHT, disminuyó la movilidad. Esto posiblemente se asocie con el incremento en la presencia de espermatozoides dobles y defectos de cabeza, contorno rugoso de la



membrana en la cabeza, espermatozoides microcefálos, pieza media doblada, presencia de gota citoplasmática, cola enrollada y doble flagelo. Los espermatozoides con daño en la cabeza no son funcionales y presentaran problemas durante la fertilización. Mientras que, cuando el daño se observa en el flagelo o en la pieza media, son espermatozoides con problemas de movilidad. Esta relación del daño en determinada región del espermatozoide con su funcionalidad se ha propuesta previamente por otros autores (Strasinger y Schaub, 2008). El incremento en las formas anormales de los espermatozoides se relaciona con la disminución en la concentración de testosterona que se observó en los animales tratados con 5,6-DHT. Se ha mostrado que la transformación de la espermátide redonda a espermatozoide es estimulada por la presencia de testosterona (Sofikitis, 2008).

McKinnel y colaboradores (1995), observaron que en ratas macho adultas de 80 ó 100 días de edad, la administración intraperitoneal de Sulfonato de Dimetano disminuye la producción de testosterona, degeneran las células de Leydig, disminuye el número de espermatozitos en paquiteno, así como la transformación de las espermátides a espermatozoides, este último evento se presenta de la etapa VI a la VIII del ciclo del epitelio seminífero. Aunado a esto se ha mostrado que cuando disminuye la producción de testosterona como resultados de la inmunoneutralización de la LH, administración de antiandrógenos o por la hipofisectomía, la espermatogénesis se interrumpe, debido a que la testosterona modula las funciones de la célula de Sertoli, que incluye síntesis de factores de crecimiento que favorecen la multiplicación de las células germinales, translocación de espermatozitos a espermátides, condensación nuclear de espermátides redondas, maduración y liberación de espermatozoides (Walker, 2010).

Otra posible explicación a la disminución en la movilidad y aumento en el porcentaje de formas anormales de espermatozoides, posiblemente se relacione que el estrés oxidativo que se ha reportado induce la 5,6-DHT (Sinhababu y col., 1985; Jiménez del Rio y Velez-Pardo, 2002). Estos efectos concuerdan con los resultados obtenidos por Siervo y colaboradores (2015), mostraron que cuando a ratas macho se les administra etanol por vía oral, se incrementan las especies reactivas de oxígeno y la peroxidación de los lípidos de las membranas, lo cual se acompaña del daño en la estructura de los espermatozoides y disminución en la movilidad. Efectos que se revierten cuando a los animales se les administra vitamina C. Las membranas de los espermatozoides de mamíferos son muy sensibles a ácidos y especies reactivas de oxígeno (ROS) ocasionando daños mediante la peroxidación de lípidos, y formación de radicales libres lo que induce daño de la membrana celular (Suresh, 1996). Estas alteraciones se reflejan en la disminución de la movilidad, la cual también puede estar vinculada con la pérdida de ATP intracelular, daños en el axonema, y defectos en la capacitación y reacción acrosómica del espermatozoide. Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno también provocan daño en la síntesis de proteínas a través de la oxidación de grupos sulfhidrilo (-SH) lo que modificará la estructura y función de los espermatozoides (Cummins y col., 1994).



Las gotas citoplasmáticas, la deformación del flagelo puede ser propiciada por las bajas concentraciones de testosterona, que a su vez afectaron el correcto funcionamiento del epidídimo en donde el espermatozoide madura y adquiere movimiento. El mantenimiento de la estructura y funcionamiento del epidídimo es dependiente de la testosterona que se sintetiza en los túbulos seminíferos y la que proviene de la circulación general (White y Porterfield, 2013). Se ha mostrado que el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática que se encuentran en el epidídimo es mayor a los espermatozoides eyaculados por hombres sometidos a tratamiento farmacológico. (Nereyda, 2000).

Durante las divisiones reduccionales las células se encuentran conectadas entre sí por puentes de citoplasma, que se forman por citocinesis incompleta durante la telofase de la mitosis, esto contribuye a que se sincronice el desarrollo y diferenciación de una población de células germinales (Barrios, 2002; Ross, 2003; Tresguerres, 2010), este proceso junto con la unión de las células germinales a la célula de Sertoli son reguladas por la testosterona (Sofikitis; 2008). Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se sugiere que la disminución en la concentración de testosterona inducida por la administración de 5,6 Dihidroxitriptamina ocasionó que los mecanismos antes mencionados no se llevaron a cabo completamente y se interrumpió el proceso de diferenciación del espermatozoide antes de ser liberada por la célula de Sertoli, lo que se reflejó en la presencia de espermatozoides unidos en diferentes regiones del flagelo.

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos se concluye que:

- 1.-En el animal prepúber la 5,6-Dihidroxitriptamina disminuye la síntesis de testosterona en el testículo.
- 2.-La administración intratesticular de 5,6-Dihidroxitriptamina no modifica las catecolaminas en la gónada de la rata prepúber.
- 3.-En el animal prepúber la serotonina modula de forma estimulante la síntesis de testosterona.
- 4.-La 5,6-Dihidroxitriptamina disminuye la espermatogénesis.
- 5.-En el animal prepúber, la inyección intratesticular de 5,6-Dihidroxitriptamina se acompaña de la disminución de la movilidad del espermatozoide y del incremento de anomalías en la estructura del mismo.
- 6.- La administración de 5,6 Dihidroxitriptamina modifica la estructura del testículo

Bibliografía

- Adori C., Low P., Andó RD., Gutknecht L., Pop G., Truszka F., Takács J., Kovacs GG., Lesch KP., Bagdy G. (2011). Ultrastructural characterization of tryptophan hydroxylase 2-specific cortical serotonergic fibers and dorsal raphe neural cell bodies after MDMA treatment in rat. *Phychopharmacology*, 213; 377-391.
- Aliya F., Stanwood G. (2009). Drugs, biogenic amine targets and the developing brain. *Developmental Neuroscience*, 31; 7-22.
- Aguilar R., Anton F., Bellido C., Aguilar E., Gaytan F. (1995). Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. *Journal of Endocrinology*, 46; 15-21.
- 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.
- Barret KE., Barman SM., Boitano B. (2013). Aparato reproductor masculino. En: *Fisiología Médica, Ganong (Edit.)*, 24ª Edición, Ed. McGraw Hill. Madrid, España. 325-331.
- Barrios DR. (2002). Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toro post-mortem. En: *Fisiología de la reproducción*, XI Congreso venezolano de producción e industria animal.
- Baumgarten HG., Bjorklund A., Lachenmayer A., Nobin A., Stenevi U. (1972). Long-Kasting selective depleton of brain serotonin by 5,6-dihidroxytryptamine. *Acta Physiological Scandinavian*. 373, 1-15.
- Baumgarten HG., Bjorklund A., Lachenmayer L., Rensch A., Rosengren E. (1974). Chemical degeneration of indolamine axons in rat brain by 5, 6-Dihidroxytryptamine: An ultrastructural study. *Z. Zellforsch*, 129; 256-271.
- Bell C., McLean JR. (1973). The autonomic innervation of the rat testicular capsule. *Journal of Reproduction and Fertility*, 32; 253-258.
- Berge OG., Fasmer OB., Flatmark T., Hole K. (1983). Time course of changes in nociceptors after 5.6 DHT Lesions of descending 5-HT pathways. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 18; 637-643.

- Bocabella AB., Salgado ED., Alger EA. (1962). Testicular function and histology following serotonin administration. *The Endocrine Society*, 71; 827-837.
- Breese GR., Cooper BR., Grand LD., Smith RD. (1974). Biochemical and behavioral alterations following 5,6-Dihydroxytryptamine administration into brain. *Neuropharmacology*, 13; 177- 187.
- Brehm R., Steger K. (2005). Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. En: *Advances in anatomy embryology and cell biology*. 1ª Edición, Ed. Springer. Alemania. 8-21.
- Budziszewska B., Jaworska-Feil J., 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 (4); 334-338.
- Campos MB., Vitale ML, Calandra RS., Chiocchio SR. (1990). Serotonergic innervation of the rat testis. *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.
- Celuch SM., Sloley BD. (1988). Regional distribution of dopamine, 5-hydroxytryptamine, and noradrenaline in the rat vas deferens. *Neurochemical Research*, 10; 967-972.
- Collin O., Damber JE., Bergh A. (1996). 5-hydroxytryptamine: a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. *Reproduction and Fertility*, 106; 17-22.
- Collu R. (1978). Endocrine effects of brain serotonin depletion by 5,6 Dihydroxitriptamine in prepuberal male rats. *Annals New York Academy of Sciences*. 414-420.
- Clark MS., McDevitt RA., Neumaier JF. (2009). Quantitative mapping of tryptophan hydroxylase-2, 5-HT1A, 5-HT1B, and serotonin transporter expression across the anteroposterior axis of the rat dorsal and median raphe nuclei. *Journal Comparative Neurology*, 498; 611–623.
- Commins DL., Axt KJ., Vosmer G., Seiden LS. (1987). Endogenously produced 5, 6-dihydroxytryptamine may mediate the neurotoxic effects of para-Chloroamphetamine. *Brain Research*, 419; 253-261.

- Csaba ZS., Csermus V., Gerendai I. (1998). Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis. *Neuroendocrinology*, 10; 371-376.
- Cummins JM., Jequier AM., Kan R. (1994). Molecular biology of human male infertility links whit aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Molecular Reproduction and development*, 37; 335-362.
- Datla KP., Curzon G. Effect of p- Chlorophenylalanine at moderate dosage on 5-HT and 5-HIAA concentrations in brain regions of control and p-Chloroamphetamine treated rats. *Neuropharmacology*, 35; 315-320.
- Devoto I., Kohen P., Espinoza I., Strauss JF. (2004). Rol funcional de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) en el cuerpo lúteo humano, *Medicina: Biología de la reproducción*, 64; 33-35.
- Dufau ML., Tinajero JC., Fabbri A. (1993). Corticotrophin-releasing factor an antireproductive hormone of the testis, *FASEB Journal*, 7; 299-307.
- Duru F., Ayayi S., Azu O. (2013). The effect of unilateral vasectomy on testosterone and testicular parameters in the adult male African giant rat (*Cricetomys gambianus*). *African Healt Sciences*, 13; 483-489.
- Fernández LP., Hernández IL. (2003). Características farmacológicas de las drogas recreativas (MDMA y otras anfetaminas, ketamina, GH3, LSD y otros alucinógenos). *Adicciones*, 15; 51-75.
- Frankel Al., Ryan EL. (1981). Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress. *Biology of Reproduction*, 24; 491-495.
- Fuller RW. (1980). Mechanism by which uptake inhibitors antagonize p-Chloroamphetamine induced depletion of brain serotonin. *Neurochemical Research*, 5; 241-245.
- Fuller RW. (1992). Effects of p- Chloroamphetamine on brain serotonin neurons. *Neurochemical Research*, 17; 449-456.
- García JA., Hurlé JM. (2005). Aparato Reproductor Masculino. En: *Anatomía Humana*. Primera Edición, Panamericana, McGraw Hill, España. 502-520.
- Geneser F. (2010). *Histología sobre bases biomoleculares*, Tercera edición, Ed. Panamericana, Madrid, España.647-660.

- Gerendai I., Toth IE., Boldogkoi Z., Medveczky I., Halasz B. (2000). Central Nervous system structures labeled from the testis using the transsynaptic viral tracing technique. *Journal of Endocrinology*, 12; 1087-1095.
- Griswold MD. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell and Developmental Biology*, 9; 411-416.
- Griswold MD., McLean D. (2006). Male reproductive system En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil J.O Neill (Edits). Vol.1. 3ª Edición, Elsevier Inc., New York EUA. 771-1173.
- Hess RA. De Franca LR. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. En: *Molecular Mechanism in Spermatogenesis*. Cheng C.Y. (Edit.). *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 636. 1ª Edición, Library of Congress, EUA. 1-10.
- Huo S., Xu Z., Zhang X., Zhang J., Cui S. (2010). Testicular denervation in puberty rat inhibits seminiferous tubule development and spermatogenesis. *Journal of Reproduction and development* 56; 370-378.
- Iglesias GB., López GM., Velasco AI., Prieto J. (2007). *Bases de la fisiología*. Segunda edición. Tébar Ediciones, Madrid, España. 2006-211.
- Ira FS. (2010). Aparato reproductor masculino En: *Fisiología Humana*, 12ª edición, Mc Graw Hill. Madrid, España. 202-211.
- Iversen L. (2008) *Speed, Ecstasy, Ritalin: The science of amphetamines*, 5ª edición. Oxford. 5-10.
- Jewo PI., Duru FI, Fadeyibi IO., Saalu LC., Noronha CC. (2012). The protective role of ascorbic acid in burn-induced testicular damage in rats. *Burns* 38; 113-119.
- Jiménez del Rio M., Velez-Pardo C. (2002). Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism involvement of hydrogen peroxide (H₂O₂), caspase-3 and nuclear factor Kappa-B (NF-κB), p53, c-Jun transcription factor. *Biochemical Pharmacology*, 63; 677-688

- Jorgensen H. (2007). Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Danish Medical Bulletin*, 54; 266-288.
- Junqueira LC. (2005). Aparato reproductor masculino. En: *Histología Básica: Texto y Atlas*, 6ª Edición. Ed. Masson, Barcelona. 355-370.
- Karch Steven B. (1998). *Drug Abuse Handbook*, 1a edición, Ed.CRC Press, New York EUA.174-176
- Kerr JB., Lovelan KL., O'Bryan MK., Krester DM. (2006). Male reproductive system En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil J.O Neill (Edits). Vol.1.Tercera edición, Elsevier Inc., New York EUA. 771-1173.
- Krsmanovic LZ., Hu L., Leung PK., Feng H., Catt KJ. (2010). Pulsatile GnRH secretion: Roles of the G protein coupled receptors, second messengers and ion channels. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314; 1-12.
- Künel W. (2005). *Atlas a color Citología e Histología*, 11ª Edición. Ed. Panamericana. Madrid, España. 375-389.
- Lee S., Miselis R., River C. (2002). Anatomical and functional evidence for a neural hypothalamic testicular pathway that this independent of the pituitary. *Endocrinology*, 143; 4447-4454.
- Leping Y., Zhi-Jian S., Ren-Shan G. (2011). Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules*, 16; 9983-10001.
- Leung GP. Dun SL., Dun NJ. Wong PY. (1999). Serotonin via 5-HT1B and 5-HT2B receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium. *Journal of Physiology*, 519; 657-667.
- Lin JF., Lin, YH., Liao PC., Lin YC., Tsai TF., Chou, KY., Chen HE., Tsai SC., Hwang T. (2014). Induction of testicular damage by daily methamphetamine administration in rats. *Chinese Journal of Physiology*, 57; 19-30.
- Lovenberg W., Bruckwick E. (1978).Enzyme changes as an index of neurotoxins specificity. *Annals New York Academy of Sciences*; 182-187.

- Mamounas LA., Molliver ME. (1988). Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: Axons from the dorsal and medial raphe nuclei. Are differentially vulnerable to the neurotoxin p- Chloroamphetamine (PCA). *Experimental Neurology* (102) 23-26.
- Mckinnel C., Sharpe RM. (1995). Testosterone and spermatogenesis: Evidence that androgens regulate cellular secretory mechanism in stage VI-VIII seminiferous tubules from adults rats. *Journal of Andrology*, 16; 499-509.
- Mendoza JL. (2008). Efecto de la Lesión del núcleo dorsal del rafé en la etapa juvenil sobre el proceso de espermatogénesis y esteroidogénesis en la rata. Tesis de Licenciatura, FES Zaragoza UNAM.
- Mendoza N. (2008). Sistema nervioso central. En: *Farmacología médica*. 3ª Edición. Ed. Médica Panamericana; 269-271.
- Molina J., Cruz, S. (2010), Interacciones farmacológicas En: *Psicofarmacología*. 1ª Edición, Elsevier. Madrid, España. 83.
- Nereyda OP. (2000). Estudio de los características espermáticas y de la criopreservación en espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico obtenidos postmortem. En: *Tesis doctorales*. Cuenca Ediciones. Universidad de Castilla. 50-54
- O'Donnell L., Meachem SJ., Staton PG., McLachlan R. (2006). Male reproductive system En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil J.O Neill (Edits). Vol.1.Tercera edición, Elsevier Inc., New York EUA. 771-1173.
- O'Donnell L., Nicholls PK., O'Bryan MK., McLachlan RI., Staton PG. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1; 14-35.
- Ojeda SR., Skinner MK. (2006). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil J.O Neill (Edits). Vol.1.Tercera edición, Elsevier Inc., New York EUA. 2061-2126.
- Ojeda SR., Urbanski HF. (1994).Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil J.O Neill (Edits). Vol.1.Segunda edición, Raven Press, New York EUA, 363-409.

- O'Shea E., Cloraro MI. (2008). Serotonina y Fármacos antiserotoninérgicos, Purinas. En: Farmacología Básica y Clínica. LP. Velázquez, A. Moreno (Edits). 18ª Edición. Ed. Panamericana. Madrid, España. 479-484.
- Palkovits M., Saavedra JM., Jacobowitz DM., Kiser JS., Záborsky L., Brownstein MJ. (1977). Serotonergic innervation of the forebrain: effect of lesions on serotonin and tryptophan hydroxylase levels. *Brain Research*, 130; 121-134.
- Rang HP. (2003). Farmacología, 5ª edición, Elsevier, Madrid, España. 184-190.
- Rauchenwald M., Steers WD., Desjardins C. (1995). Efferent innervation of the rat testis. *Biology of Reproduction*, 52; 1136-1143.
- Reyes A., Chavarría ME. (1998). Regulación neuroendocrinológica del hipotálamo-Hipófisis-Gónada en el varón En: *Biología de la Reproducción*. J. Velázquez (Edit.). Universidad Autónoma Metropolitana. 27-42.
- Reyes A., Chavarría ME. (1998). Bioquímica de la capacitación y la reacción acrosomal en los mamíferos. En: *Biología de la Reproducción*. J. Velázquez (Edit.). Universidad Autónoma Metropolitana. 151-171.
- Reyes A., Chavarría ME. (1998). Biología molecular del espermatozoide de mamíferos. En: *Biología de la Reproducción*. J. Velázquez (Edit.). Universidad Autónoma Metropolitana. 193-214.
- Ross H., Wojciech P. (2003) *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular*, 5ª edición, Ed. Panamericana. Madrid, España; 782-813.
- Robaire B., Hinton BT., Orgebin-Crist MC. (2006). Male reproductive system En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil J.O Neill (Edits). Vol.1. 3ª Edición, Elsevier Inc., New York EUA. 771-1173.
- Sanders-Bush E., Hazelwood L. (2012). 5-Hidroxitriptamina (serotonina) y Dopamina En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Goodman & Gillman (Edits.) 12ª edición, McGraw-Hill, 335-342.
- Schlegel PN., Hardy M., Goldstein M. (2007). Fisiología Reproductiva Masculina. En: *Urología*. Campbell W. (Edit.) Tomo 1. 9a Edición. Médica Panamericana. 577-607.

- Selvage DJ., Rivier C. (2003). Importance of the paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway between the brain and the testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary. *Endocrinology*, 144; 594-598.
- Setchell BP., Breed WG. (2006). Male reproductive system En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil J.O Neill (Edits). Vol.1.Tercera edición, Elsevier Inc., New York EUA. 771-1173.
- Shalender B., Benson GS. (2006). Male reproductive system En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil J.O Neill (Edits). Vol.1.Tercera edición, Elsevier Inc., New York EUA. 771-1173.
- Shishkina GT., Borodin PM. (1998). Involvement of brain serotonin in regulation of sexual maturity in male rats. *Laboratory of the Genetic basic of neuroendocrine regulation: Institute of cytology and genetics. Academy of sciences of the URRS*, 74; 118-123.
- Shishkina GT., Dygalo NN. (2000). Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rets selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comparative Biochemistry and physiology part C. Toxicology & Pharmacology*, 125; 45-51.
- Siervo G.EML., Vieira HR., Ogo FM., Fernandez CDB., Goncalves GD. (2015). Spermatic and testicular Damage in rats exposed to etanol: Influence of lipid peroxidation but no testosterone. *Toxicology*, 330; 1-8.
- Sinhababu A., Ghosh A., Borchardt RT. (1984). Molecular Mechanism of Action of 5, 6-Dihydroxytryptamine. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Methyl-, 7-Methyl-, and 4, 7-Dimethyl-5, 6-dihydroxytryptamines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 28; 1273-1279.
- Sirotkin AV., Schaeffer HJ. (1997). Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *Journal of Endocrinology*, 154; 1-5.
- Sofikitis N., Giotitsas N., Tsounapi P., Baltogiannis D., Giannakis O., Pardalidis N. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology*, 109; 323-330.

- Stocco DM, McPhaul MJ. (2006). Male reproductive system En: The Physiology of Reproduction. Knobil J.O Neill (Edits). Vol.1.Tercera edición, Elsevier Inc., New York EUA. 771-1173.
- Strasinger SK., Schaub Di LM. (2008). Semen. En: Análisis de orina y líquidos corporales. Quinta Edición, Panamericana, Madrid, España. 206-211.
- Suresh CS. (1996), Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1; 78-86.
- Tinajero JC., Fabbri A., Ciocca DR., Dafau ML. (1993). Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology*, 133; 3026-3029.
- Tresguerres JF. (2010). Aparato reproductor masculino. En: *Fisiología Humana*. Ed McGraw Hill, Madrid, España; 1033-1042.
- Utrilla P. (2000). Aspectos farmacológicos de las anfetaminas, *Ars Pharmaceutica*, 41; 67-77.
- Velázquez L. (2008). *Farmacología básica y clínica*. 18ª edición. Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires; 593-597.
- Velázquez DE. (2008). Análisis del efecto de la lesión química del núcleo medial del rafé en la etapa juvenil sobre las funciones del testículo de la rata. Tesis de Licenciatura, Fes Zaragoza UNAM.
- Wada K., Hu L., Mores N., Navarro CE., Fuda H., Krsmanovic LZ., Catt KJ. (2006). Serotonin (5-HT) receptor subtypes mediate specific modes of 5-HT induced signals and regulation of neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Molecular Endocrinology*, 20(1); 125-135.
- Walker WH. (2010). Non classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the royal society*. 365, 1557–1569.

- Walker WH. (2011). Testosterone signaling and regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 1; 116-120.
- Welsch U. (2010). *Histología*, 2ª edición. Ed. Panamericana. Madrid, España. 13-25
- Wenyu F., Le Maître E., Fabre V., Bernard JF. (2010). Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 518: 3464-3494.
- White BA., Porterfield SP. (2013). The male reproductive system. En: *Endocrine and reproductive physiology*. 4a edición. Elsevier. EUA. 196-210.
- Wiklund L., Bjorklund A., Nobin A. (1978). Regeneration of serotonin neurons in the rat brain after 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. *Annals of the new York Academy of Sciences*. 305, 370-385.
- Yamamoto Y., Yamamoto K., Hayase T. (1999). Effect of methamphetamine on male mice fertility. *Journal of obstetrics and Gynecology Research*, 25; 353-358.
- Yamamoto Y., Yamamoto K., Hayase T., Abiru H. (2002). Methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 178; 155–160
- Zieher LM., Debeljuk L., Iturriza F., Mancini RE. (1970). Biogenic amine concentration in testes of rats different ages. *The Endocrine Society*, 88; 351-354.

