



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRATESTICULAR DE P-CLOROANFETAMINA O 5,6-DIHI-DROXITRIPTAMINA EN EL TESTÍCULO Y LA REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JUAN ANTONIO DÍAZ RAMOS**

**TUTORA:** Dra. María Elena Ayala Escobar (FES ZARAGOZA, UNAM)

**COMITÉ TUTOR:** Dra. María Esther Cruz Beltrán (FES ZARAGOZA, UNAM)  
Dr. Benjamín Florán Garduño (CINVESTAV, IPN)



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**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRATESTICULAR DE P-CLOROANFETAMINA O 5,6-DIHI-DROXITRIPTAMINA EN EL TESTÍCULO Y LA REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JUAN ANTONIO DÍAZ RAMOS**

**TUTORA:** Dra. María Elena Ayala Escobar (FES ZARAGOZA, UNAM)

**COMITÉ TUTOR:** Dra. María Esther Cruz Beltrán (FES ZARAGOZA, UNAM)  
Dr. Benjamín Florán Garduño (CINVESTAV, IPN)



OFICIO CPCB/470/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 18 de febrero de 2019, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **DÍAZ RAMOS JUAN ANTONIO** con número de cuenta **302132270** con la tesis titulada **"EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRATESTICULAR DE P-CLOROANFETAMINA O 5,6-DIHDROXITRIPTAMINA EN EL TESTÍCULO Y LA REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR**:

Presidente: DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ  
Vocal: DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO  
Secretario: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO  
Suplente: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA  
Suplente: DR. JUAN MANUEL MANCILLA DÍAZ

Sin otro particular, me es grado enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx. a 23 de abril de 2019.

**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitir la realización de la presente tesis doctoral.

Al apoyo otorgado para la realización del presente proyecto, registrado bajo la clave DGAPA-PAPIIT, convenios IN223714 y IN226017.

Al CONACyT, por el apoyo económico, para la realización del presente estudio, con número de CVU/becario 385060/313786

Al PAEP por el apoyo para asistir al 46th annual meeting of the society for neurosciences 2016.

A la Dra. María Elena Ayala Escobar

Por su valioso apoyo en la formulación y realización de este trabajo, por sus comentarios enriquecedores y la paciencia con mi persona, que permitieron culminar la presente tesis doctoral.

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. María Esther Cruz Beltrán (UIBR, UMIEZ, FES-Zaragoza UNAM)

Dr. Benjamín Florán Garduño (CINVESTAV Zacatenco, IPN)

A los miembros del presidium:

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dra. Rosa Angelica Lucio Lucio

Dr. Benjamin Florán Garduño

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dr. Juan Manuel Mancilla Díaz

Por sus aportaciones, que permitieron enriquecer el presente trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A la unidad de investigación en biología de la reproducción (UIBR) y al laboratorio de pubertad, en la UMIEZ, FES-Zaragoza UNAM.

Al laboratorio de hormonas esteroides y al Dr. Roberto Chavira; así como al laboratorio de hormonas proteicas y al doctor Mario Cárdenas, del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, por el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización de las mediciones hormonales del presente estudio.

Al Dr. Andrés Aragón Martínez por compartir su valioso tiempo personal, materiales y conocimiento científico, los cuales apoyaron teórica y metodológicamente la planeación de este proyecto y todo lo que de él se derivó y especialmente el análisis de las muestras espermáticas y citometría de flujo.

A la secretaria administrativa del PCB en FES Zaragoza Maricela Cabrera García por su amistad y apoyo invaluable, debo decir el mejor apoyo de todo alumno en el posgrado.

A la doctora Lourdes García y el Dr. Roberto Mora y la Dra. Christian Azucena Don López del laboratorio de inmunología diferenciación y cáncer de la UMIEZ, por su apoyo en la parte de cultivo celular y manejo de sustancias especiales.

A la responsable del bioterio de la FES Zaragoza la Dra. Adriana Altamirano por proveer los animales ocupados en el desarrollo del presente proyecto.

A las Dra.(s) Consuelo Lomas Soria, Guadalupe Leticia Rodríguez González, Andrea Olmos, y el biólogo David Ordaz del INCMN Salvador Zubirán; la Dra. Isabel Arrieta Cruz del INR y al biólogo Raúl Alejandro Librado Osorio, por el gran apoyo teórico, logístico y metodológico en la realización de las pruebas de biología molecular realizadas en el presente estudio.

Al jefe de la UIBR, el Dr. Roberto Domínguez Casalá por su apoyo aval en la difusión de los resultados de la presente en los congresos nacionales e internacionales y los laboratorios de la UIBR, que son mi centro de desarrollo y apoyo, en mi formación profesional.

A las amistades que en el camino quedaron y a las que ahí mismo encontré, por ellas, la vida es más ligera. A mi mejor amigo Cesar, por tu apoyo y por tu paciencia en mis traumas personales.

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

**Si se siente gratitud y no se expresa es como envolver un regalo y no darlo**

**William Arthur Ward**

**Si haces el bien para un hombre, haces el bien para todo el mundo**

**Talmud**

**Quien conversa con un rostro amable, llena de alegría los rostros de los demás**

**Proverbio israelí**



## DEDICATORIAS

ESTA TESIS ESTA DEDICADA A MI PEQUEÑA FAMILIA.

A TI CRIS, TU ME HAS HECHO VER MIS ERRORES Y MIS VIRTUDES, PERO EN TODO MOMENTO CREES EN MI.

A MIS HIJOS, POR DEJARME SER SU "TRANSFORMER" AL QUE MÁS AMAN Y ASÍ MISMO YO A ELLOS. MI MOTOR EN LA VIDA DESDE HACE 4 AÑOS.

A MI MADRE MARIA CRISTINA RAMOS, YO NO SERIA NI UN DECIMO DE LO QUE SOY SIN TU APOYO.

A MI MADRE LIDIA RAMOS, AUNQUE NO CRECI EN TU VIENTRE, SIEMPRE CRECI EN TU CORAZON Y AUNQUE NADIE ENTIENDA, "MAMÁ" TE DEBO MI VIDA.

Y MUY ALLÁ ARRIBA DONDE QUIERA QUE ESTES, ESTE ULTIMO PASO LO EMPECE GRACIAS A QUE TU ESTABAS ORGULLOSO DE MI; HOY YO LO ESTOY POR HABERTE TENIDO COMO MAESTRO EN MI VIDA. JAMAS ME OLVIDARE QUE TODO LO APRENDI DE TI.

MARTIN GALINDO RAMOS. (OSITO) Q.E.P.D

---

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	iii
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	9
<b>EI TESTÍCULO</b> .....	9
ESTRUCTURA TESTICULAR.....	9
FUNCIONES TESTICULARES .....	13
ESTEROIDOGÉNESIS.....	13
ESPERMATOGÉNESIS.....	17
<b>REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL TESTÍCULO</b> .....	24
<b>SEROTONINA</b> .....	31
PARTICIPACIÓN DE LA SEROTONINA EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL TESTÍCULO.....	35
<b>ANFETAMINAS</b> .....	37
EFECTO DE LAS ANFETAMINAS EN LAS FUNCIONES REPRODUCTIVAS.....	38
<b>CALIDAD ESPERMÁTICA</b> .....	39
<b>MUERTE CELULAR APOPTOSIS</b> .....	40
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	42
<b>HIPÓTESIS</b> .....	43
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	44
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	44
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	45
<b>RESULTADOS</b> .....	53
EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRATESTICULAR DE PCA O 5,6-DHT EN EL	

---

PESO CORPORAL Y DE LOS ÓRGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR.....	53
EFFECTO DE LA INYECCIÓN INTRATESTICULAR DE PCA O 5,6-DHT EN LA CONCENTRACIÓN DE GONADOTROPINAS Y TESTOSTERONA.....	54
PARÁMETROS DE CALIDAD ESPERMÁTICA.....	56
NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZOIDES.....	56
ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DEL ESPERMATOZOIDE.....	57
MOVILIDAD ESPERMÁTICA.....	60
VIABILIDAD ESPERMÁTICA.....	61
INTEGRIDAD MEMBRANAL.....	61
ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.....	62
CASPASAS ACTIVAS 3 Y 7 EN ESPERMATOZOIDES.....	63
CASPASAS ACTIVAS 3 Y 7 EN EL TESTÍCULO.....	64
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
<b>CONGRESO INTERNACIONAL.....</b>	<b>90</b>
<b>PUBLICACIÓN.....</b>	<b>92</b>

---

## ABREVIATURAS

AMPC .....	Mono fosfato cíclico de adenosina
ABP .....	Proteína transportadora de andrógenos
Acetil Co-A.....	Acetil Coenzima A
ArKO .....	Cepa de ratones “Knock Out” específicos el receptor a andrógenos
Bax .....	Proteína proapoptótica derivada del grupo BH3
Bcl-2 .....	Células b del linfoma dos
Bid .....	Proteína proapoptótica de la familia de proteína Bcl-2
Ca <sup>2+</sup> .....	Ión calcio
CD59R .....	Receptor CD59 perteneciente a la familia de receptores FADD
CRF .....	Factor liberador de corticotropina
CYP17a1.....	Enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa
DAG .....	Diacilglicerol
DHEA .....	Dehidro-epiandrosterona
DHT .....	Dihidroxitestosterona
ERK1/2 .....	Proteínas cinasas reguladoras de señales externas tipo 1 y 2
E <sub>2</sub> .....	Estradiol
FADD .....	Receptor asociado a la proteína FAS con dominio de muerte
FAS .....	Citosina o factor de necrosis tumoral codificado en el gen FAS
FDA .....	Federación Americana de la Administración de Alimentos y Drogas
FSH .....	Hormona estimulante del folículo
FSH $\beta$ KO .....	Cepa de ratones “Knock Out” específicos para la subunidad beta del receptor a hormona estimulante del folículo
FSHrKO .....	Cepa de ratones “Knock Out” específicos para la proteína(s) del receptor a hormona estimulante del folículo
FSH-/- .....	Cepa de ratones “Knock Out” que no expresan la hormona estimulante del folículo
GnRH .....	Hormona liberadora de las gonadotropinas
hCG .....	Gonadotropina coriónica humana
HDL .....	Lipoproteínas de alta densidad
HHG .....	Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

---

IP3	.....	Trifosfato de inositol
JNK	.....	Proteínas cinasas del extremo terminal c-JUNK, pertenecientes a un grupo de enzimas generadas a partir del gen JNK
LDL	.....	Lipoproteínas de baja densidad
LH	.....	Hormona luteinizante
LHrKO	.....	Cepa de ratones “Knock Out” específicos para la proteína(s) del receptor a hormona luteinizante
LH $\beta$ KO	.....	Cepa de ratones “Knock Out” específicos para la subunidad ( $\beta$ ) del receptor a hormona luteinizante
MAO	.....	Enzima monoamino oxidasa
MAPK	.....	Proteína cinasa tipo MAP (activadas mitogénicamente)
MDMA	.....	3,4-metilendioximetanfetamina (éxtasis)
NADPH+H	.....	Fosfato di nucleótido de nicotín amida
Narc	.....	Núcleo arcuato
NDR	.....	Núcleo dorsal del rafé
NES	.....	Nervio espermático superior
NEI	.....	Nervio espermático inferior
NMR	.....	Núcleo medial del rafé
NPev	.....	Núcleo peri ventricular
NPR	.....	Núcleo del puente del rafé
NPV	.....	Núcleo paraventricular
NPY	.....	Neuropéptido Y
pCA	.....	Para-cloro anfetamina
pCPA	.....	Para-cloro fenilalanina
PIP <sub>2</sub>	.....	Di fósforo de fosfaditil inositol
PKA	.....	Proteína cinasa A
PKC	.....	Proteína cinasa C
PLC	.....	Fosfolipasa C
p38	.....	Enzima de la subfamilia de MAPK, involucrada en el desarrollo de procesos apoptóticos
P450sc	.....	Enzima citocromo p450 de corte de la cadena lateral del colesterol

---

---

P <sub>4</sub> .....	Progesterona
RIA .....	Radioinmunoanálisis
RNAm .....	Ácido ribonucleico mensajero
SNC .....	Sistema nervioso central
SERT .....	Proteína transportadora de serotonina
SR-B1 .....	Receptores b1 tipo "pala"
StAR .....	Enzima reguladora de la esteroidogénesis aguda
TPH .....	Enzima triptófano hidroxilasa
VIP .....	Péptido intestinal vaso activo
VMAT2.....	Proteína vesicular transportadora de mono aminas
3β-HSD.....	Enzima hidroxiesteroide deshidrogenasa del carbono 3 posición beta de la Molécula de colesterol
5-HT .....	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
5,6-DHT.....	5,6- dihidroxitriptamina
5-HIAA .....	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT1-7.....	Receptores a serotonina tipo 1-7
5-HT2A .....	Receptor a serotonina familia 2 subtipo A
5-HT1A .....	Receptor a serotonina familia 1 subtipo A
5-HTP .....	5-hidroxitriptofano
5-HT2 .....	Receptor a serotonina tipo 2
17β-HSD.....	Enzima hidroxioesteroide deshidrogenasa del carbono 17 posición beta de la molécula de colesterol
Δ4 y Δ5.....	Rutas de la esteroidogénesis

---

---

## RESUMEN

Las funciones del testículo, esteroidogénesis y la espermatogénesis son reguladas por el hipotálamo, vía la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) por la hipófisis que sintetiza las hormonas estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH) y por la testosterona secretada por el propio testículo.

La secreción de estas hormonas es regulada por la serotonina (5-HT), que se encuentra en el Sistema nervioso central (SNC) y en órganos periféricos como el testículo. La administración sistémica del inhibidor de la síntesis de 5-HT, p-cloroanfetamina (pCA), a la rata macho de 30 días de edad disminuye tanto la concentración de 5-HT en el hipotálamo, como el número, movilidad y viabilidad de los espermatozoides e incrementa el porcentaje de espermatozoides anormales. Tales efectos no se acompañaron de modificaciones en la secreción de gonadotropinas. Estos resultados indican que la acción de pCA en el sistema serotoninérgico produce la disminución de la espermatogénesis.

Actualmente no existen estudios acerca de la participación del sistema serotoninérgico del testículo en la modulación de la espermatogénesis y en la calidad espermática, por lo que en el presente estudio se decidió estudiar la participación de la 5-HT intratesticular en los aspectos antes mencionados. Para ello, se analizaron los efectos de la inyección intratesticular de inhibidores del sistema serotoninérgico, pCA o 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT), en la concentración de testosterona (T) y de gonadotropinas; en la estructura del testículo y parámetros de calidad espermática y marcadores de la apoptosis (caspasas 3 y 7).

A ratas macho de la cepa CII-ZV, de 30 días de edad se les inyectó en ambos testículos, una dosis de pCA [0.03mg (pCA1x), 0.06mg (pCA2x) o 0.12mg (pCA4x)] o 5,6-DHT [(10µg (5,6-DHT1x), 20µg (5,6-DHT2x) o 40µg (5,6-DHT4x)]. A los 65 días de edad se terminaron, se extrajo el suero y se cuantificó la concentración de testosterona por ELISA y de FSH y LH por radio inmunoanálisis (RIA). Se registró el peso corporal, de los testículos, epidídimos, próstata y

---

vesícula seminal. En el tejido testicular se cuantificaron las proteínas pro apoptóticas, Caspasa 3 y 7 por Western Blot. En los espermatozoides extraídos del conducto deferente se evaluó número, movilidad y formas anormales de espermatozoides, así como la viabilidad por citometría de flujo (integridad de la membrana y actividad mitocondrial).

En los animales con la inyección intratesticular de pCA, la concentración de FSH disminuyó cuando se administraron las diferentes concentraciones de pCA y la de T únicamente con la dosis más alta de pCA (4x). Un efecto similar se observó en la concentración de este andrógeno, en los animales con la inyección de la dosis más baja de 5,6-DHT, mientras que la concentración de FSH se incrementó.

El porcentaje de espermatozoides anormales se incrementó en los animales inyectados con pCA o 5,6-DHT (2x y 4x). En los animales con la inyección intratesticular de las dosis más altas de pCA4x o 5,6-DHT4x disminuyó la movilidad y la viabilidad espermática, integridad de la membranal (pCA o 5,6-DHT) y actividad mitocondrial (pCA).

En el tejido testicular no se observaron cambios en la expresión de la proteína de la caspasa 7, mientras que la caspasa 3, se incrementó en los espermatozoides de los animales inyectados con la dosis más baja de pCA1x y en el testículo con la dosis más alta de pCA4x.

Los resultados del presente estudio evidencian que en ratas prepúberes la inhibición del sistema serotoninérgico por administración intratesticular de pCA o 5,6DHT, induce la desregulación de las funciones del testículo, que se acompaña de la modificación de los parámetros de calidad espermática.

Con base en los resultados se propone que la disminución de la actividad serotoninérgica del testículo, resulte en la menor producción de testosterona, disminución en la proliferación, maduración y diferenciación de los espermatozoides. O bien sea resultado de la desregulación



---

de las células de Sertoli y Leydig en el mantenimiento de las condiciones necesarias para el desarrollo de las espermatogonias o la espermiogénesis.

---

## ABSTRACT

Testicular function, spermatogenesis and steroidogenesis are regulated by gonadotrophins LH and FSH, stimulated by hypothalamic GnRH secretion. Gonadotrophins exert their action on Leydig and Sertoli cells respectively. Testosterone is produced in Leydig cells, Inhibin and activin are produced in Sertoli cells, together act as modulators for spermatogenesis and feedback hypothalamus pituitary gonadotrophic axis (HPG) secretions.

In turn HPG axis is modulated by neurotransmitters as serotonin (5-HT) described in Central nervous system (CNS), hypothalamus and pituitary. Serotonin regulate GnRH secretion, gonadotrophins and testosterone (T).

5-HT acts through 5-HT<sub>2</sub> receptor in Leydig cells, promoting corticotropin release factor (CRF) inhibiting T synthesis. The 5-HT also stimulates Sertoli Cells, they express 5-HT receptors mRNA, through these mechanisms 5-HT is related to steroidogenesis control and specific spermatogenic molecules.

Together gonadotrophins, testosterone and additional Sertoli factors as androgen binding protein, transferrin, ceruloplasmin, ion transporter proteins, hormones and proteases, regulates tissue remodeling essential processes which are essential to spermatogonial cell proliferation and differentiation<sup>2</sup>. During prepubertal development lack or diminution of spermatogenesis can be seen as Sertoli and spermatogonial cells proliferation.

In our work group results has been reported administration of amphetamine derivative p-chloro amphetamine (pCA) to 30 days old male rats, results in hypothalamic 5-HT decrease related to diminution in number, motility and spermatid viability as well as increase of cell germinal death in seminiferous epithelium and abnormal spermatozoa. This results let us suggest a 5-HT possible modulation of testicular functions. In support of this idea Nunmamud-Thanoi y Thanoi (2011) observed Methamphetamine (MAMP) administration it's related to spermatogenesis in

---

mice, seen as number and abnormal spermatozoa percentage. Same as Dickerson (2008) who show that methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration to adult rats decrease GnRH mRNA and Testosterone, but had no effect on LH levels, suggesting amphetamine derivate acts through hypothalamus and testicle androgen secretion. Also it has been described male rats exposition to MDMA or MAMP can cause sperm DNA damage and apoptosis, related to less motility and sperm numbers, which means sperm quality can be modified.

In this regard sperm quality can be defined as the sum of necessary characteristics that allows sperm to fertilize an oocyte, it can be seen as concentration, motility and morphology. Just a few cases sperm viability is analyzed. In the present this analyses are considered very important, due to less fertilization index, implantation capacity and embryo survival in In vitro fertilization (IVF).

There are actually a few reports about serotonergic system in testicle and spermatogenic or sperm quality modulation, reason why in this research intratesticular 5-HT role was analyzed in 30 days old male rats, by pCA or its metabolite 5,6 dihydroxytryptamine (5,6-DHT), on serum gonadotrophins and testosterone levels, testicular morphology, spermatogenesis (number, motility and abnormal sperm morphology) and sperm quality (membrane integrity, mitochondrial activity) and pro apoptotic proteins (active caspases 3 and 7).

Thus male 30 day old rats were administered with pCA or 5,6-DHT and analyzed in adult stage (65 days old), terminated by decapitation, trunk blood collected and serum recollected, testosterone Radio Immuno Analyses (RIA) and gonadotrophins ELISA were performed. Testicle, epididymis and accessory glands weight measured. A sample of testicular tissue was collected, storage until posterior Western blot analysis. Also vas deferens spermatozoa were collected, solubilized in culture medium, sperm morphology, number and motility were analyzed, sperm viability seen as membrane integrity, mitochondrial activity and active caspases 3 and 7 were performed by flow cytometry assays and were expressed as sperm quality display.

---

The present results allow to suggest inhibition of serotonergic system by intratesticular pCA or 5,6-DHT administration on prepuberal rats, deregulates testicle functions on adult stage.

---

## INTRODUCCIÓN

Las funciones del testículo son reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis, vía la secreción de GnRH y de las gonadotropinas FSH y LH, que estimulan la producción de hormonas y factores de crecimiento en las células de Sertoli y de Leydig, necesarias para la multiplicación y diferenciación de las células germinales. Entre estos productos, la testosterona secretada por las células de Leydig, favorece la espermatogénesis.

La actividad del eje hipotálamo-hipófisis es modulada por neurotransmisores como la 5-HT, la que regula la secreción de GnRH (Wada et al. 2006; Dickerson et al. 2008) y de las gonadotropinas (Justo 1989; Ayala 2009; Ayala et al. 2015). Esta amina también se le encuentra en el testículo (Tinajero, et al. 1993; Aragón et al. 2005) y cuyas fuentes son: 1) el nervio espermático superior; 2) las plaquetas en el torrente sanguíneo; 3) los mastocitos y 4) la sintetizada por el propio órgano en las células de Leydig (Kalla 1978; Tinajero et al. 1993; Csaba et al. 1998).

En células GnRH érgicas inmortalizadas del hipotálamo de ratas de 17 días de gestación (GT17), la serotonina vía su unión a los receptores 5-HT1A; 5-HT2C; 5-HT4 y 5-HT7, modula la secreción de GnRH vía la activación de  $\text{InsP}_3/\text{Ca}^{2+}$  y la formación de mono fosfato de adenosina cíclico (AMPC). La participación es de tipo inhibitorio cuando se une al receptor 1A, y estimulante cuando se une a los receptores 2C, 4 y 7 (Wada et al. 2006). La administración intraperitoneal de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) precursor de la síntesis de serotonina, a ratas macho de 16, 26, 30 ó 60 días de edad incrementa la concentración de FSH (Justo 1989). Con base en estas evidencias se sugiere que la 5-HT regula la secreción de GnRH y de las gonadotropinas.

En relación a la serotonina intratesticular, Csaba y colaboradores (1998), mostraron que en la rata macho prepúber la administración intratesticular de ketanserina, antagonista específico de los receptores a serotonina tipo 2 (5-HT2) disminuye la producción de testosterona. Un efecto inverso se observa en el animal adulto cuando se administra 5-HT o ketanserina. Estos

---

resultados llevaron al autor a proponer que la 5-HT intratesticular participa en la regulación de la producción de testosterona, y que su efecto es estimulante en el animal prepúber e inhibitorio en el adulto (Csaba et al. 1998). En la rata adulta, la 5-HT vía su unión al receptor 5-HT<sub>2</sub> en la célula de Leydig, promueve la producción del factor liberador de corticotropina (CRF) que inhibe la síntesis de testosterona (Tinajero, et al. 1992). También es posible que la 5-HT participe en la modulación del funcionamiento de la célula de Sertoli, ya que se describe la presencia del RNAm para los receptores de 5-HT en esta célula (Syed et al. 1999).

Entre los estudios que muestran la partición de la serotonina en la modulación de las funciones del testículo, se encuentran los resultados de Shishkina y Dygalo, (2000), quienes mostraron que en la rata macho de 30-38 días de edad, la estimulación del sistema serotoninérgico vía la inyección de 5-HTP, incrementa la concentración de testosterona en la etapa adulta. Efecto inverso se observa cuando se inhibe al sistema vía la administración sistémica de p-cloro fenilalanina (pCPA) a rata macho de 40-44 días de edad, debido a que disminuye la concentración de testosterona en suero y el número de espermatozoides en el epidídimo. Además, cuando se administra la pCA, otro inhibidor del sistema serotoninérgico, en la rata macho de 30-55 días, disminuye la concentración de 5-HT en el hipotálamo, el número, movilidad y viabilidad de los espermatozoides y se incrementa la muerte de las células germinales en el epitelio seminífero y el porcentaje de espermatozoides anormales (Aragón et al. 2005). Estos eventos pueden ser el resultado de la acción de la pCA en los tres componentes del eje reproductivo, hipotálamo-hipófisis-testículo.

Al día de hoy no existen reportes sobre la participación de la serotonina intratesticular en la regulación de la espermatogénesis. Por ello, en el presente estudio se analizó el efecto de la administración intratesticular de pCA o 5,6-DHT en la rata macho de 30 días de edad, en la concentración sérica de gonadotropinas y testosterona, en parámetros de calidad espermática y la presencia de marcadores de muerte celular por apoptosis (caspasas 3 y 7 activas) en el testículo en la etapa adulta.

---

## MARCO TEÓRICO

### El Testículo

El testículo es el órgano primario del aparato reproductor masculino (Figura 1A), cuyas funciones son la esteroidogénesis y la espermatogénesis (Carreau et al. 2007), son órganos pares de forma ovoide localizados dentro del escroto fuera de la cavidad abdominal (Köning y Liebich. 2005). Poseen una cubierta de tejido conectivo, denominada túnica albugínea, formada por una capa externa de mesotelio y una interna de células musculares lisas, fibras de colágena, vasos sanguíneos, conductos linfáticos y fibras nerviosas (Middendorff et al. 2002).

En mamíferos dependiendo de la especie, a partir de la túnica albugínea se forman el mediastino testicular y los septos que se extienden radialmente y dividen al testículo en compartimentos llamados lobulillos (Figuras 1B). En la rata no se observa tales septos, en cada lobulillo se ubican de 1 a 4 túbulos seminíferos que desembocan en los túbulos rectos, que conducen hacia la rete testis, estructura que se comunica con el epidídimo (Russell et al. 1990; Köning y Liebich. 2005).

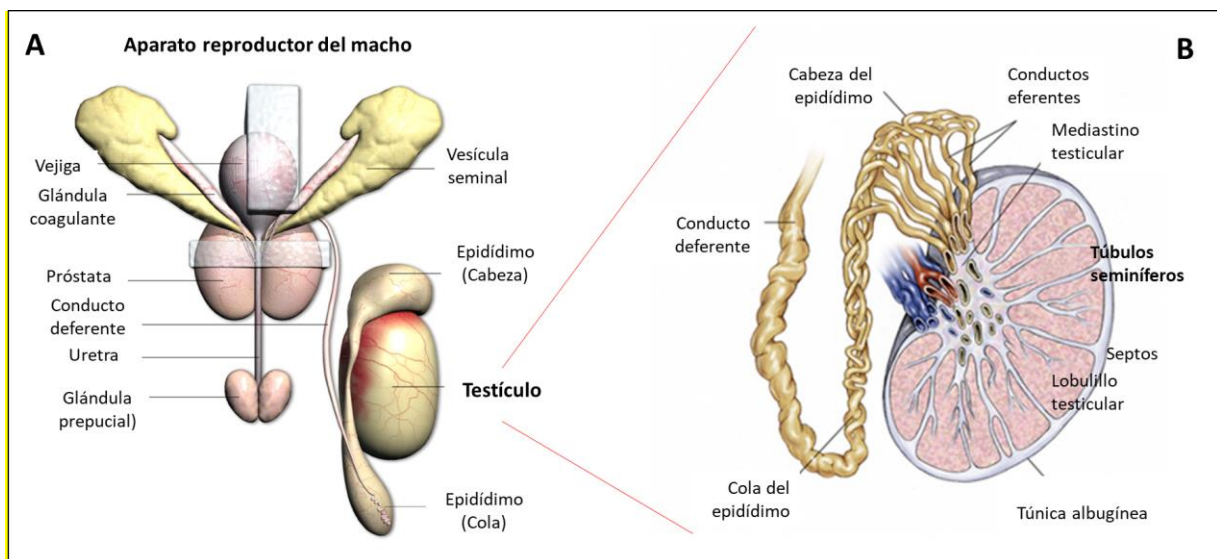
### Estructura testicular

El testículo está conformado por dos unidades anatómica y funcionalmente relacionadas, los túbulos seminíferos donde ocurre la espermatogénesis y rodeando a estos, el tejido intersticial donde se produce la esteroidogénesis. A los túbulos seminíferos los conforma una membrana basal, compuesta de sustancia fundamental, fibras de colágena, glicosaminoglicanos y proteoglicanos, así como varias capas de células mioideas y fibroblastos (Figura 2C) (Ungefroren et al. 1995; Holstein et al. 1996; Griswold 2006).

Los túbulos seminíferos (Figura 2A) están rodeados por una capa de células aplanadas poligonales, las células mioideas o contráctiles peritubulares, que se unen para formar una

lámina de epitelio y son las responsables de las contracciones de los túbulos seminíferos (Russell et al. 1990).

En el interior de los túbulos se distinguen dos tipos de células, las germinales y de Sertoli, estas se apoyan en la membrana basal del túbulo seminífero (Figura 2B). Las células de Sertoli tienen forma columnar que se proyecta hacia el lumen del túbulo. Presentan un núcleo grande y alargado que se localiza cerca de la región basal de la célula, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico liso y rugoso que se distribuyen en la base de la célula y las mitocondrias localizadas en la región apical. Tienen prolongaciones citoplasmáticas que se comunican entre sí por uniones estrechas. Esta comunicación entre las células de Sertoli forma dos compartimentos en el interior del túbulo. El basal, por debajo de las uniones y sobre estas, el adluminal (Hess y De França 2005; Johnson, et al. 2008; Hess y De Franca 2008).



**Figura 1. A) Aparato reproductor de la rata macho B) Estructura general del testículo Tomado en línea 2018 y modificado de (National Institute of Environmental Health Sciences 2019; N.M.A. 2018).**

Las células de Sertoli actúan como nodriza de las germinales, les proporcionan soporte estructural y nutricional. Participan en la fagocitosis de las células germinales en degeneración y de los cuerpos residuales. Intervienen en la liberación de las espermátidas en el proceso de espermiación, así como en la producción de proteínas que regulan y/o



---

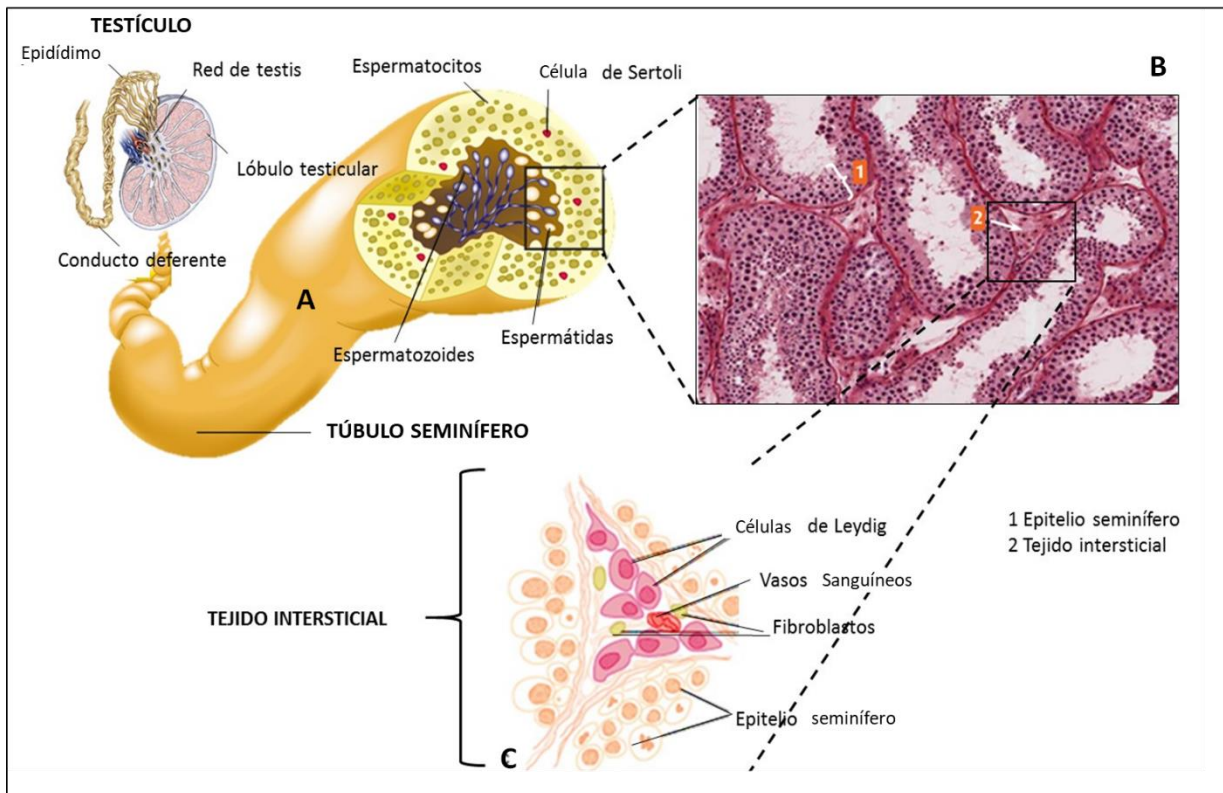
responden a la liberación de las hormonas hipofisarias que estimulan la actividad mitótica de las espermatogonias (Johnson et al. 2008).

Las células de Sertoli secretan hormonas y factores de crecimiento esenciales en la regulación de la espermatogénesis (Griswold 2006), por ejemplo la proteína transportadora de andrógenos (ABP) que incrementa la concentración de T en los túbulos seminíferos; los inhibidores de las proteasas, los cuales favorecen la remodelación tisular durante la espermiogénesis; la ceruloplasmina y transferrina, proteínas transportadoras de iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , que actúan como cofactores en el proceso de diferenciación de las espermátidas. También secreta inhibina y activina, que modulan la secreción de la FSH en conjunto favorecen la multiplicación de las espermatogonias (Griswold 2006; Xiong et al. 2006).

Las células germinales (espermatogonias, espermaticitos primarios y secundarios, espermátidas redondas y alargadas así como los espermatozoides) se encuentran entre las células de Sertoli (Hermo et al. 2010). Las germinales se organizan, en el interior del túbulo seminífero de forma concéntrica, las más inmaduras, son las espermatogonias o células precursoras localizadas en el compartimento basal, son esféricas y están situadas junto a la lámina basal que rodea a los túbulos seminíferos (Figura 2B). Conforme maduran adquieren más heterocromatina y disminuye el tamaño nuclear y los nucléolos son más prominentes (Kerr et al. 2006; Hermo et al. 2010).

Por encima de las espermatogonias se localizan los espermaticitos primarios, cuyo citoplasma es más voluminoso. Por encima de estas en una tercera capa, se encuentran los espermaticitos secundarios, más pequeños que los primarios, de la división de estos se originan las espermátidas que se localizan en las porciones apicales de la célula de Sertoli. Cada espermátida se transforma en un espermatozoide (Cobb y Handel 1998; Kerr et al. 2006).

Ubicado entre los túbulos seminíferos se localiza el tejido intersticial (Figura 2C). Se compone de vasos sanguíneos y linfáticos, terminaciones nerviosas, tejido conjuntivo laxo (sustancia fundamental), fibroblastos, macrófagos, células cebadas y de Leydig (Breed y Setchell. 2006).



**Figura 2. Estructuras y componentes testiculares, A) Túbulo seminífero B) Micrografía del tejido testicular y C) Componentes del tejido intersticial. Tomado y modificado en línea de (Guyton y Hall 2006; N.M.A. 2018).**

El testículo recibe información hormonal vía el torrente sanguíneo que procede de la arteria testicular. Esta arteria en conjunto con la vena testicular forma el plexo pampiniforme que se localiza en el cordón espermático. Los capilares en el testículo se ubican en el tejido intersticial, están rodeados por las células de Leydig y conducen sangre hacia y desde los testículos (Rerkamnuaychoke et al. 1991; Köning y Liebich 2005).

El testículo es innervado vía el nervio espermático superior (NES) e inferior (NEI). El NES se origina en los ganglios mesentérico y caudal; plexo celiaco y aórtico (Köning y Liebich 2005;

---

Breed y Setchell 2006). El NES se compone principalmente de fibras dopaminérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas. La inervación en el testículo se identifica en la glándula intersticial (Campos et al. 1990a; Campos et al. 1990b; Prince 1992; Campos et al. 1993; Mayerhofer et al. 1996; Csaba et al. 1998) y en las células mioideas que rodean a los túbulos seminíferos. Esta inervación se asocia con la regulación de la esteroidogénesis (Davidoff et al. 1993; Frungieri et al. 1999; Frungieri et al. 2000; Davidoff et al. 2005; Gong et al. 2009).

El NEI se origina en el plexo pélvico y conduce información peptidérgica, el neuropéptido Y (NPY) y péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Gong et al. 2009). Se localiza a lo largo del conducto deferente e inerva la cola del epidídimo y el extremo caudal del testículo (Sato y Kihara 1998; Gerendai et al. 2000; Gerendai et al. 2001; Gerendai et al. 2003; Köning y Liebich 2005; Breed y Setchell 2006), se asocia a la periferia de los vasos sanguíneos testiculares y participa en la regulación de su flujo sanguíneo (Miyake et al. 1986) y en menor grado con las células de Leydig en la regulación de la esteroidogénesis (Lacombe et al. 2007).

## **Funciones testiculares**

En el testículo se llevan a cabo dos funciones, la esteroidogénesis en las células de Leydig y la espermatogénesis en los túbulos seminíferos (Amory y Bremner 2001; Sofikitis et al. 2008).

## **Esteroidogénesis**

La síntesis y liberación de hormonas esteroideas se define como esteroidogénesis, la T es el principal producto de su secreción, puede ser convertida a androstenediona, Dihidrotestosterona (DHT) o aromatizado a estradiol ( $E_2$ ) por las células de Sertoli u otros órganos (Stocco y McPhaul 2006).

Las hormonas esteroideas se forman a partir del colesterol, molécula formada por tres anillos derivados del fenantreno (A, B y C), uno derivado del ciclo pentano, dos radicales metil en posición C10 y C13, un radical hidroxil en C3 y una cadena alifática (8 carbonos) en C17 (Baynes 2006) (Figura 3). El colesterol se obtiene de tres fuentes: i) síntesis de novo a partir de la acetil

---

coenzima A (Acetil Co-A); ii) lipoproteínas de alta densidad (HDL), que se unen a su receptor específico tipo “scavenger” (SR-B1), o lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se unen a su receptor acoplado a clatrina que son endocitadas; iii) hidrólisis de ésteres de colesterol almacenados como gotas de lípidos en el interior de las células (Stocco y McPhaul 2006)(Figura 3).

El colesterol que ingresa a la célula de Leydig es transportado por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) hacia el interior de la mitocondria, la translocación del colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna es el paso limitante en la esteroidogénesis. La enzima citocromo p450 (p450<sub>scc</sub>) hidroliza la cadena lateral de la molécula y forma pregnenolona, esta reacción limita la producción de hormonas esteroides (Stocco y McPhaul 2006) (Figura 4).

La pregnenolona es transportada al retículo endoplásmico liso y biotransformada en progesterona (P<sub>4</sub>), por dos vías enzimáticas, la  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$  (Figura 4). En la  $\Delta 4$  (rata y ratón), llamada vía de las cetonas, es la ruta de las moléculas que poseen un enlace de insaturación entre la posición del C4 y C5 y presentan un radical ceto en C3, donde a partir de pregnenolona se sintetiza 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (Berg et al. 2008).

En esta ruta es necesaria la acción de dos complejos de enzimas que se encuentran en el retículo endoplásmico, el primer complejo, es la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) y una enzima isomerasa (4-5 isomerasa), que forma un doble enlace entre la posición del C4 y C5, juntas convierten la pregnenolona en P<sub>4</sub>. El segundo complejo, por acción de la 17 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP17a1) convierte la P<sub>4</sub> en 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona (Figura 4), ésta experimenta posteriormente el efecto de la 17, 20 liasa para formar DHEA y acetaldehído, y posteriormente es oxidada en el C3 por la 3 $\beta$ -HSD en presencia de NADPH+H; posteriormente se produce la isomerización del doble enlace en posición C5-C6, por la enzima isomerasa (Sanderson 2006; Gómez-Chang et al. 2012).

En la ruta  $\Delta 5$  (perro, conejo, primates superiores y humano), la molécula esteroide posee un enlace de insaturación entre el C5 y C6, un radical hidroxilo en C3 (Berg et al. 2008).

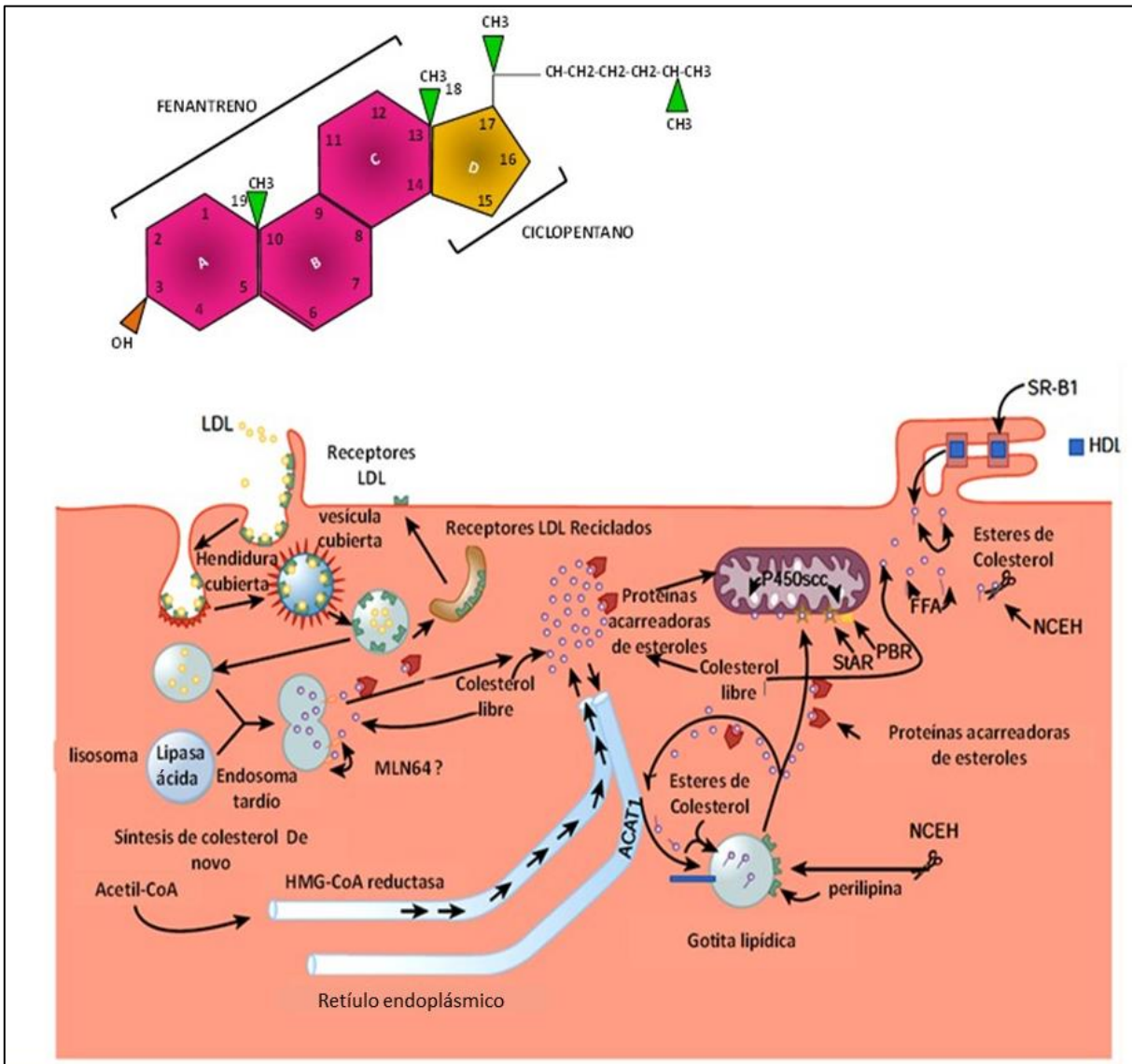


Figura 3. Esteroidogénesis testicular, incorporación del colesterol transformación a pregnenolona en la mitocondria y transporte al retículo endoplásmico liso para la formación de testosterona Tomado de (Yen y Jaffe 2009).

La pregnenolona es convertida en 17-OH pregnenolona por acción de la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa y posteriormente en 17-OH progesterona por la  $3\beta$ -HSD, o por medio de la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa (liasa) en dehidroenpiandrosterona (DHEA). Ambas moléculas son sustrato para la biosíntesis de androstenediona, punto convergente de ambas rutas metabólicas a

partir de las cuales la enzima 17  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) incorpora un radical hidroxilo en el carbono 17 y la transforma en testosterona (Sanderson 2006), que es 5 $\alpha$  reducida por acción de la 5 $\alpha$ -reductasa y forma DHT (Stocco y McPhaul 2006).

La LH regula la esteroidogénesis vía su unión al receptor membranal en la célula de Leydig, por medio de la disociación de la subunidad alfa de la proteína G. Esta activa la adenilato ciclasa y favorece la formación de AMPc, segundo mensajero que estimula al sistema de cinasas y genera la fosforilación de la proteína StAR e incrementa la actividad de las enzimas esteroidogénicas (Stocco y McPhaul 2006; Gómez-Chang et al. 2012)(Figura 4).

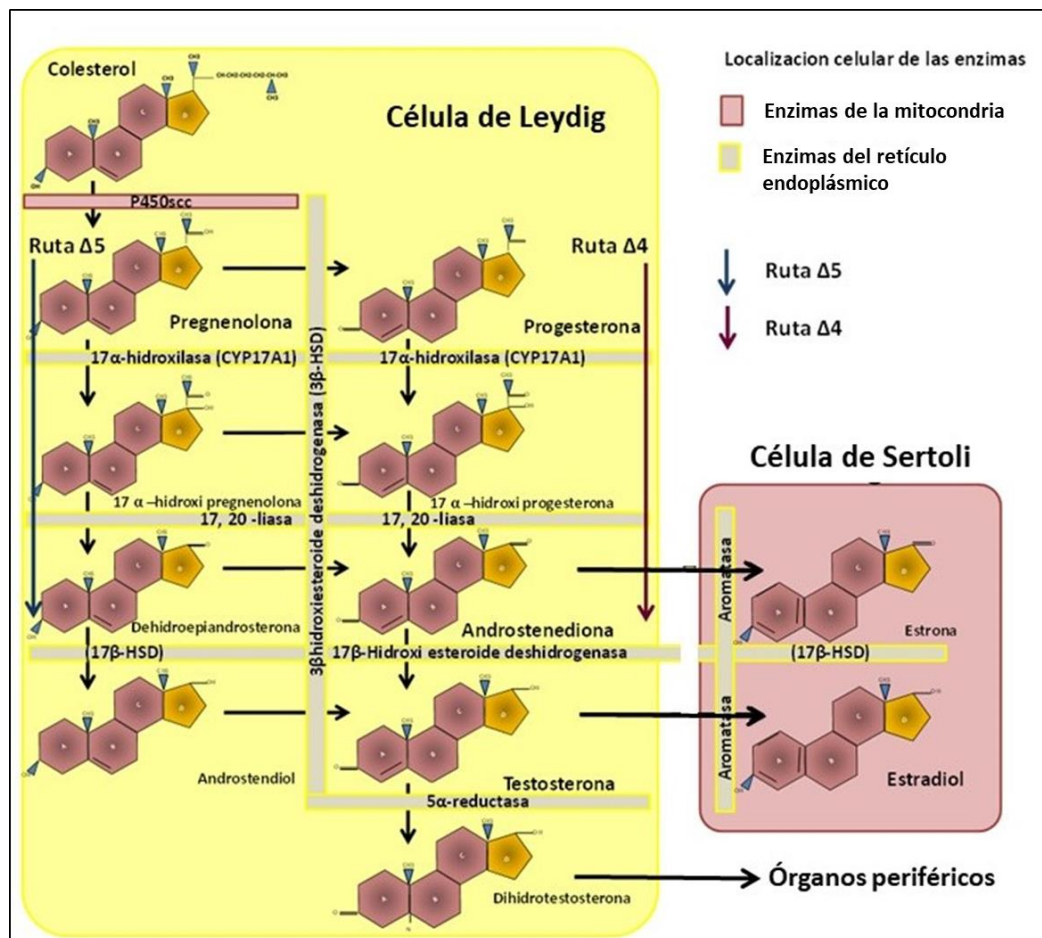


Figura 4. Rutas de síntesis de hormonas esteroides Tomada y modificada de (Yen y Jaffe 2009).



---

## Espermatogénesis

La espermatogénesis es la secuencia de eventos citológicos y funcionales que ocurren al interior de los túbulos seminíferos. Durante los cuales las células germinales se dividen, diferencian y transforman, para dar lugar a la formación de espermatozoides ( O'Donnell et al. 2001; Meachem et al. 2006;).

En el túbulo seminífero de la rata se observan asociaciones celulares divididas en 19 etapas, agrupadas en 14 estadios (Figura 5). Estas se presentan en cada sección determinada de los túbulos seminíferos (Herms et al. 2010) y aparecen repetidamente cada 12-13 días aproximadamente (Gonzales et al. 2006) y se denomina ciclo del epitelio seminífero. Las espermatogonias completan su diferenciación en un periodo aproximado de cinco ciclos, es decir, 65 días, antes de ser liberadas como espermatozoides (Herms et al. 2010).

Se describen cuatro etapas: I) Renovación de las espermatogonias por mitosis, II) Duplicación del ADN y el entrecruzamiento de las cromátidas (células tetraploides) III) Dos divisiones celulares, meióticas, que involucran la reducción de los cromosomas a la mitad y IV) Transformación de la espermatida a un espermatozoide, proceso que se denomina espermiogénesis (Hess y De França 2005).

En la primera etapa, las espermatogonias diploides localizadas en la base del túbulo seminífero se multiplican por mitosis. A medida que éstas se desarrollan dan origen a dos tipos de células, las espermatogonias tipo A) que se dividen en dos subtipos, "A oscuras" (A1) (Figura 6), consideradas no proliferativas porque solo renuevan constantemente la población de espermatogonias A1, y el segundo las "A pálidas" (A2), proliferativas (Figura 6), que se dividen y dan origen a las tipo A2, A3 y A4, que se caracterizan por tener el núcleo elongado y prominente. Las A4 (más diferenciadas) acumulan más cromatina en la membrana nuclear y el núcleo adquiere forma ovoide (Hess y De França 2005).

---

En la segunda etapa, aproximadamente la mitad de la población de las espermatogonias A4 se diferencian a las tipo B (Figura 6). Mientras que la otra mitad de la población de células no pierde sus características progenitoras, lo cual les permite conservar la población de reserva (Meachem et al. 2006; Hermo et al. 2010; Fallis 2013).

Las espermatogonias tipo B originan a los espermatoцитos primarios, que se localizan en la porción superior del compartimiento basal del túbulo seminífero. Son células diploides grandes que migran a través de las uniones estrechas de las células de Sertoli. En el momento que se encuentran por encima de la barrera hematotesticular han finalizado la síntesis de ADN y dan paso a la tercera etapa de la espermatogénesis, la división meiótica (Hermo et al. 2010; Meachem et al. 2006).

Al finalizar la primera división meiótica se generan dos células, los espermatoцитos secundarios, que experimentan la meiosis II, y como resultado se forman cuatro células haploides, las espermátidas redondas. Éstas se transforman en espermátidas elongadas y se desplazan a la región inferior del compartimiento adluminal del túbulo. Conjuntamente a las divisiones mitóticas y meióticas que se llevan a cabo se denomina espermacitogénesis (O'Donnell et al. 2001; Meachem et al. 2006).

En la cuarta etapa o espermiogénesis, en la espermátida se produce compactación de la cromatina, reacomodo de las mitocondrias en la pieza media, formación del acrosoma y del flagelo, para dar origen al espermatozoide.

Durante la espermiogénesis se describen cuatro fases: I) Golgi, II) capuchón, III) acrosómica y IV) maduración:

- I) En la fase de Golgi la posición del aparato de Golgi se invierte, la cara trans se orienta al núcleo, la cromatina se condensa, las mitocondrias se desplazan a la periferia y se forma la vesícula acrosómica. En el lado opuesto a esto ocurre una deformación en la membrana nuclear que forma la foseta de implantación a donde migran los centriolos.



- 
- II) En la fase de capuchón, la vesícula acrosómica forma un ángulo mayor de 45° con el centro del núcleo. Inicia la formación del flagelo, se desarrolla el “annulus” estructura en forma de anillo de donde salen las columnas que recorren la zona principal del flagelo (Figura 5). También se forma el manguito (manchette), un anillo que rodea al núcleo y actúa como centro organizador de microtúbulos que ayudaran al desplazamiento de los organelos hacia esa zona, excepto al aparato de Golgi, que lo hará sin necesidad de ellos, y la vesícula acrosómica que se une al núcleo.
  - III) En la fase acrosómica, la orientación en la célula cambia y el flagelo se dirige hacia la luz del túbulo seminífero. La cromatina se condensa en láminas y en la unión del flagelo con el núcleo se forma el capítulo, estructura de refuerzo. Al final de esta fase el manchette desaparece y las mitocondrias se agrupan entre el núcleo y el annulus, cerca de los microtúbulos que forman el axonema del flagelo (Figura 6).
  - IV) En la fase de maduración, el núcleo se condensa, las mitocondrias se agrupan en hélices alrededor de los microtúbulos entre el annulus y el núcleo. Se pierde la mayor parte del citoplasma y los orgánulos a excepción de las mitocondrias que formen la hélice y el par de centriolos que son necesarios para el desarrollo del flagelo (Langman 2004).

Los espermatozoides completamente formados, se localizan en los estadios VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero. En consecuencia, si se examinan las asociaciones celulares en todos los segmentos de un túbulo seminífero, se comprobará una progresión ordenada desde un estadio del ciclo hacia el siguiente (Cobb y Handel 1998).

El espermatozoide maduro está formado por las siguientes regiones: Cabeza, pieza media y flagelo. En los roedores incluidos la rata, la cabeza es de forma falciforme (gancho). La cabeza contiene el núcleo que alberga el ADN y el acrosoma que almacena las enzimas que degradan las proteínas de la zona pelúcida del ovocito durante la fertilización (Figura 7 A) (Cummins y Woodall 1985; Eddy. 2006; Meachem et al. 2006).

---

Entre la pieza media y la cabeza se encuentra adyacente la pieza de conexión, formada por fibras de anclaje y la fosa (Figura 7B). Esta estructura es responsable del anclaje del flagelo a la cabeza del espermatozoide. La pieza media alberga las mitocondrias que proveen de energía a los microtúbulos del flagelo, esencial en el batido del flagelo y la movilidad de esta célula (Figura 7 B) (Eddy 2006).

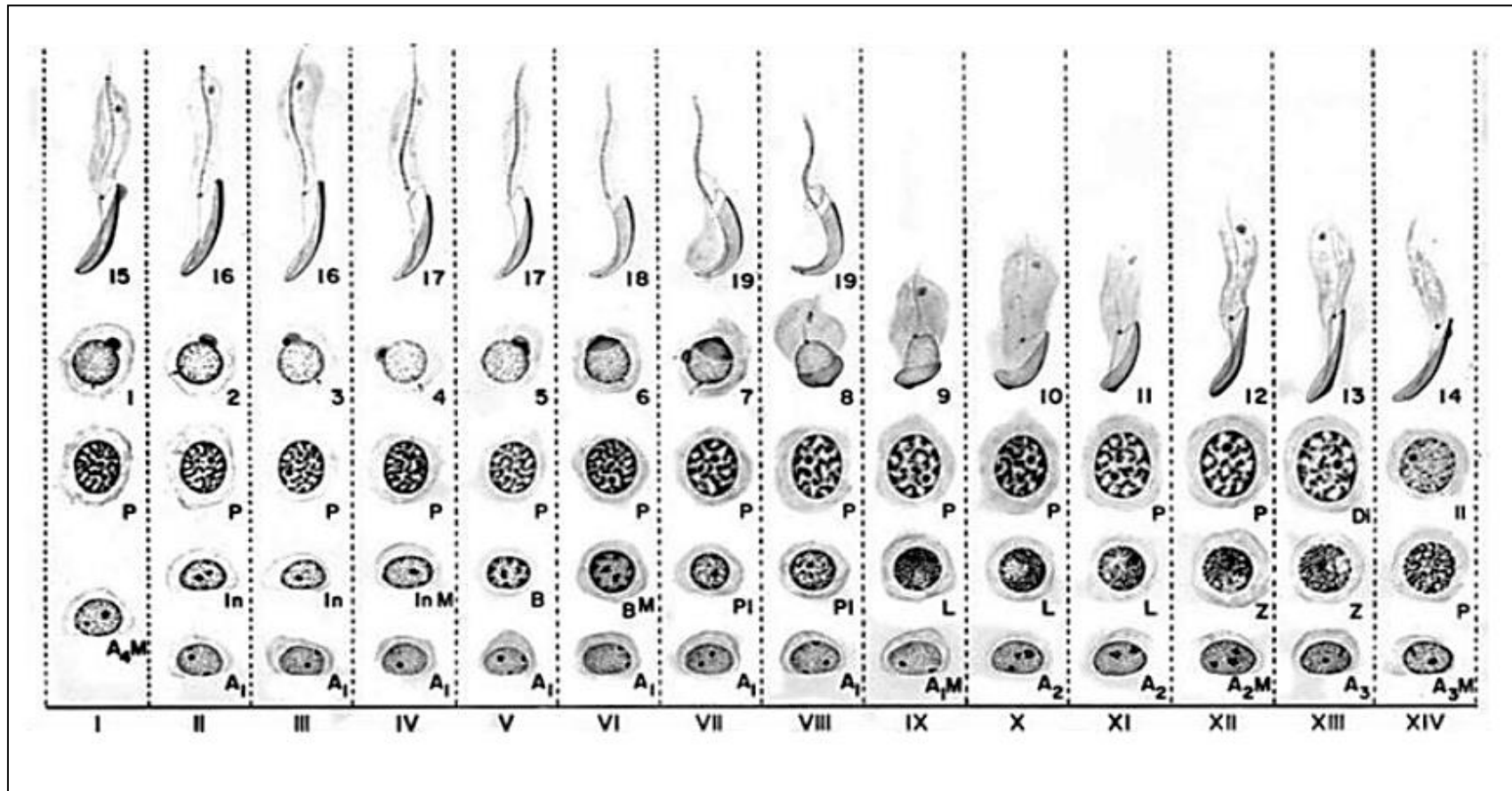


Figura 5. Estadios del ciclo del epitelio seminífero en la rata macho adulta. Los estadios son indicados en números romanos del I-XIV. Las columnas verticales indican los diferentes tipos de células presentes en cada estadio Tomado de (Dym y Clermont 1970).

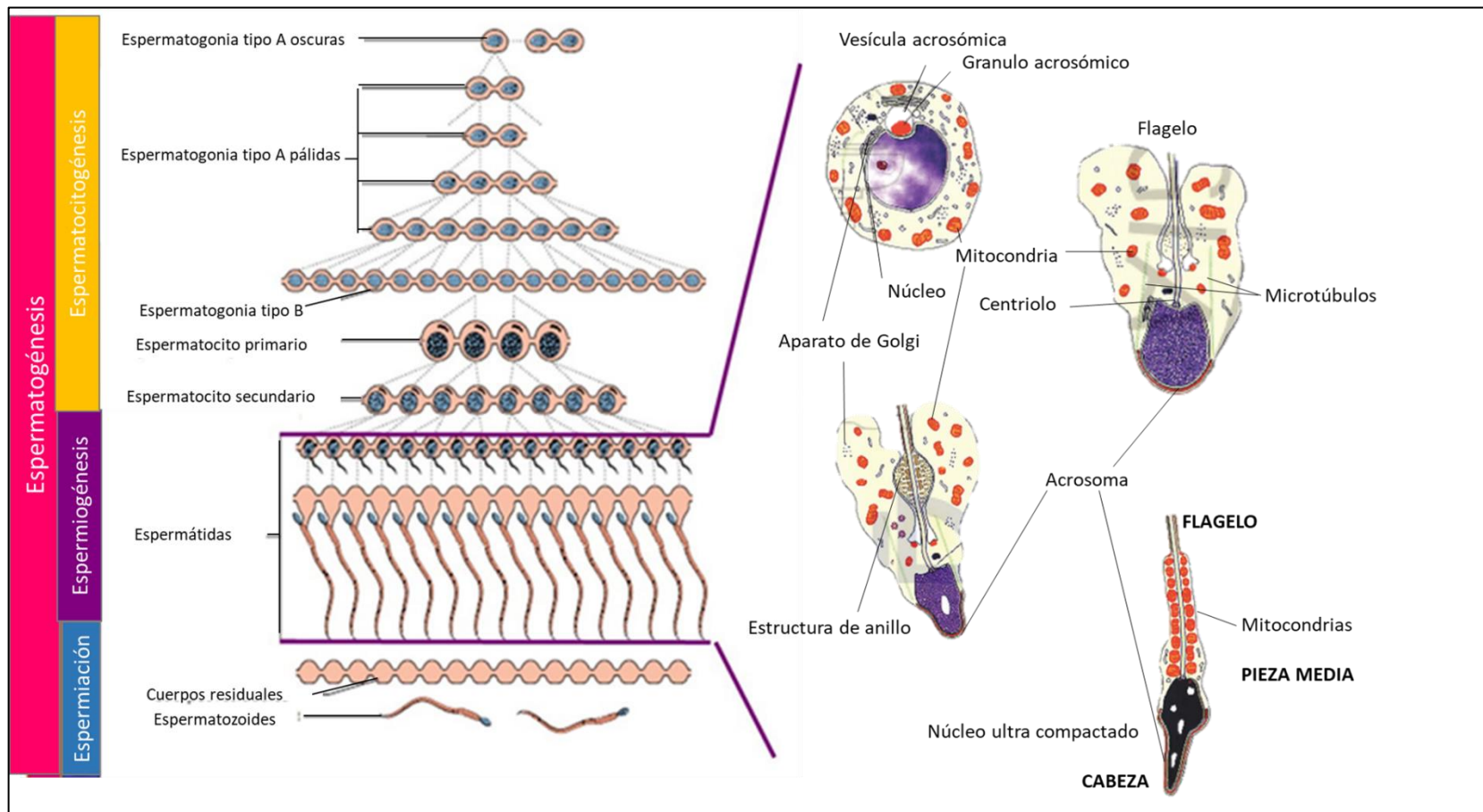


Figura 6. Etapas de la espermatogénesis: espermatocitogénesis y espermiogénesis Tomado y modificado de (Langman 2004).

En la región más caudal de la pieza de conexión se encuentra el axonema, constituido por dos microtúbulos centrales y nueve microtúbulos periféricos formados por dos subunidades de tubulina (A y B), que conforman el flagelo en un arreglo (9+2). El flagelo es rodeado por anillos circunferenciales desde la pieza media a la principal que le proporcionan rigidez (Figura 7 C)(Eddy 2006).

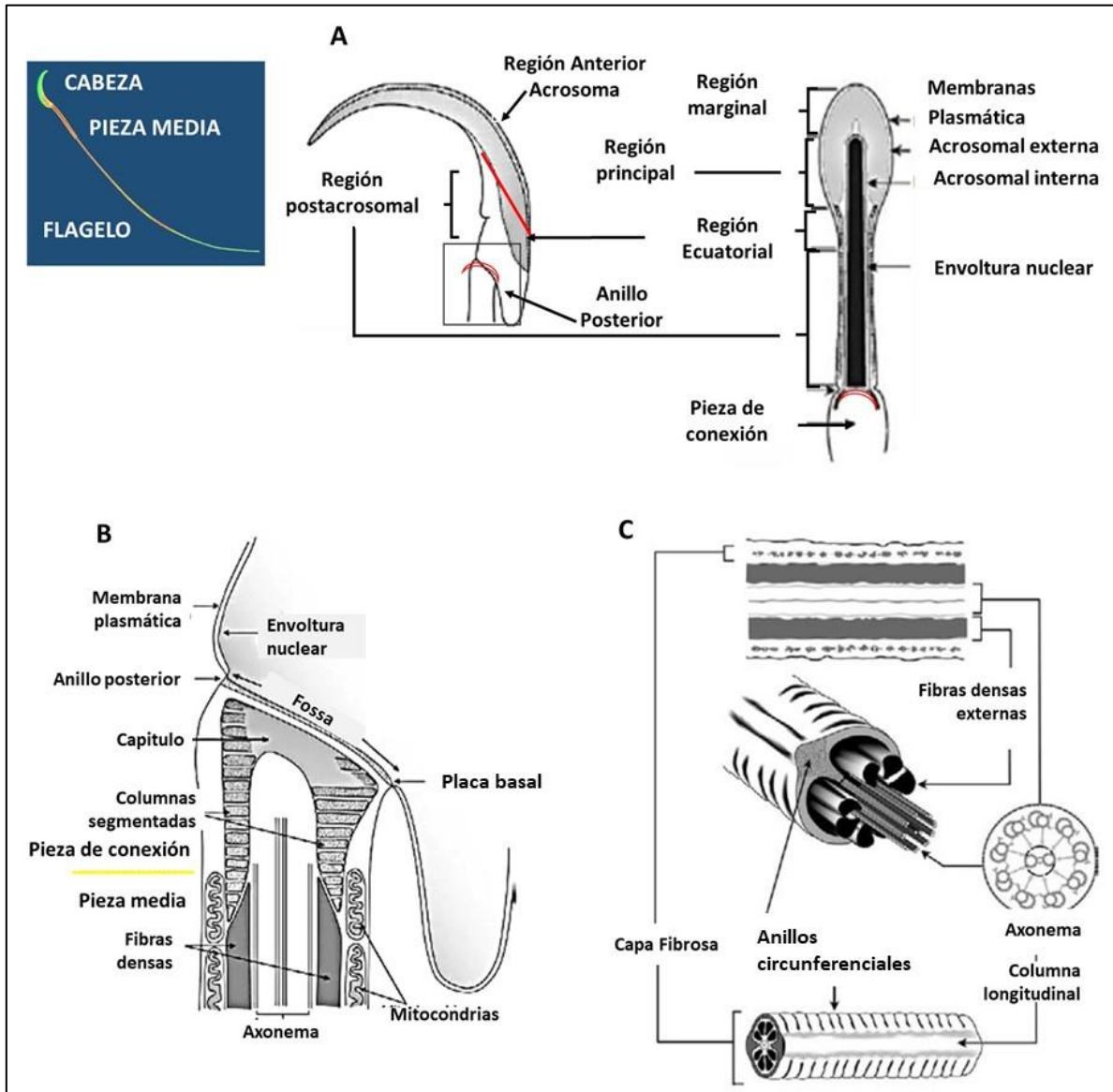


Figura 7. Estructuras del espermatozoide de rata A) región de la cabeza vista lateral y frontal B) pieza de conexión y pieza media C) flagelo Tomado y modificado de (Eddy 2006).

---

Cuando culmina la espermiogénesis, los espermatozoides son liberados de las células de Sertoli y pierden el contacto con estas (espermiación). Durante este proceso los espermatozoides de la luz del túbulo seminífero son transportados hacia los túbulos rectos, la rete testis y el epidídimo donde completan su maduración (Köning y Liebich 2005; Breed y Setchell 2006; Meachem et al. 2006; Sullivan y Mieuxset 2016).

El epidídimo es un conducto plegado, de gran longitud, posee tres regiones anatómicas, la cabeza, el cuerpo y la cola. La cabeza recibe los espermatozoides y el fluido en el que son transportados, es la primera zona donde maduran los espermatozoides. En el cuerpo del epidídimo se reabsorbe el exceso de fluido tubular y en la cola se almacenan los espermatozoides ( Fallis 2013; Sullivan y Mieuxset 2016).

La maduración espermática que ocurre en la cabeza y cuerpo del epidídimo, incluye: a) el incremento en el vigor de la movilidad y el cambio de un movimiento circular a progresivo; b) el desplazamiento de la gota citoplásmica del cuello a la pieza media del flagelo. En la cola del epidídimo se producen: c) cambios en la carga de membrana del espermatozoides debido a cambios en las proteínas; d) modificación en la composición de lípidos de la membrana. En algunas especies también se presenta la remodelación masiva de la forma del acrosoma. Conjuntamente estos cambios contribuyen a que el espermatozoide adquiera su capacidad de fertilizar al ovocito (Sullivan y Mieuxset 2016).

Los espermatozoides se almacenan en la cola del epidídimo hasta la eyaculación, se encuentran en estado de quiescencia como resultado de cuatro factores i) La disminución de la concentración del ion  $\text{Na}^+$  en el lumen del túbulo epididimario; ii) La alta concentración de espermatozoides y la subsecuente disminución de la concentración de  $\text{O}_2$  y aumento de  $\text{CO}_2$  *in situ*; iii) la secreción de mucoproteínas por las células epiteliales que actúan como factores decapacitantes que mantienen a los espermatozoides en quiescencia hasta su expulsión (Fallis 2013).

---

## Regulación de las funciones del testículo

Las funciones gonadales del macho son reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHG) (Ulloa-Aguirre y Timossi 2000; Padmanabhan y Sharma 2001) (Figura 8). El hipotálamo secreta la GnRH, neurohormona que estimula la secreción de FSH y LH, esenciales en la regulación de la espermatogénesis y esteroidogénesis (Amory y Bremner 2001; Clarke y Pompolo 2005; Ramaswamy y Weinbauer 2014; Kunimura et al. 2017)(Figura 8).

La GnRH es un decapeptido cuya secuencia es pyro Glu-Su-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly CONH<sub>2</sub> (Amoss et al. 1971). Es producida por neuronas localizadas en la banda diagonal, septum medial y el hipotálamo rostral (Jennes et al. 1997; Plant et al. 2015; Herbison 2016), las neuronas GnRH érgicas forman parte de los núcleos arcuato (Narc), núcleo peri ventricular (NPev), núcleo paraventricular (NPV) y el área preóptica, que envían proyecciones hacia la eminencia media, en donde se libera y transporta por el sistema portal hipotalámico (Clarke y Pompolo 2005) hacia la adenohipófisis y estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas (Pawson y McNeilly 2005; Thompson y Kaiser 2014).

Las gonadotropinas FSH y LH son glicoproteínas heterodiméricas conformadas por dos subunidades, la subunidad  $\alpha$  de 92 aminoácidos común para ambas proteínas y una subunidad  $\beta$  específica para cada hormona, (124 aminoácidos para FSH y 110 para la LH). Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están unidas entre ellas por un enlace no covalente. Las subunidades específicas para FSH o LH son expresadas en 70-90% de los gonadotropos de la hipófisis anterior (McNeilly et al. 2003; Abel et al. 2013). Solo una pequeña fracción de las gonadotropinas puede ser sintetizada en las células que sintetizan tirotropina (Das y Kumar 2018). Las gonadotropinas son liberadas a la circulación y en los testículos regulan la esteroidogénesis y gametogénesis (Figura 8) (Yellon, et al. 1990; McCann et al. 2001; Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua 2002; Holdcraft y Braun 2004; Herbison 2016).

En el testículo la FSH y LH actúan vía su unión a sus receptores en las células de Sertoli y de Leydig respectivamente (Simoni et al. 1999). La FSH regula la proliferación y maduración de las

---

células germinales (Huhtaniemi 2015; Haywood et al. 2003; Holdcraft y Braun 2004) y favorece la síntesis de inhibina y activina, entre otros factores. La LH estimula la secreción de Testosterona (Costa et al. 2010) que difunde al interior de los túbulos seminíferos y también actúa en las células de Sertoli, favoreciendo la espermatogénesis (Ulloa-Aguirre y Timossi 2000; Walker y Cheng 2005; Huhtaniemi 2015).

Ambas gonadotropinas al unirse a sus receptores específicos, interactúan con el extremo amino terminal en el dominio extracelular, solo la subunidad  $\beta$  específica para cada hormona reconoce a su propio receptor, produce cambios conformacionales en el receptor, estos se encuentran acoplados a proteínas G, que al activarse, la subunidad  $\alpha$  se separa e interactúa con la enzima adenilato ciclasa e incrementa las concentraciones de AMPc, segundo mensajero que activa las protein cinasas A (PKA) (Ulloa-Aguirre y Timossi 2000; Costa et al. 2010; Huhtaniemi 2015). La FSH se une con menor intensidad a su receptor en comparación con la LH. La activación de las PKA y protein cinasas c (PKC) fosforila proteínas e inicia los eventos que conducen a la síntesis de proteínas y la posterior proliferación celular (Ulloa-Aguirre y Timossi 2000; Walker y Cheng 2005).

La unión de la FSH a su receptor activa en las células de Sertoli al menos 5 vías de señalización: (AMPc/PKA; MAPK/ERK;  $Ca^{2+}$ ; IP3-K/PKB; PLA<sub>2A</sub>). En todas las vías de señalización excepto la de  $Ca^{2+}$ , el cambio conformacional del receptor produce la activación de la proteína G, posterior a esto ocurre la activación de las diferentes proteínas.

En la vía AMPc/PKA, como resultado de la unión de la FSH a su receptor en la célula de Sertoli, se disocia la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, se activa a la adenilato ciclasa y se incrementa el AMPc, éste activa la enzima PKA y favorece la fosforilación de proteínas o la activación del factor transcripción CRE/CREB/CREM, esta vía se relaciona con la transcripción de proteínas y la sobrevivencia de las células de Sertoli y de las células germinales (Walker y Cheng 2005). Una segunda ruta de formación de AMPc es la vía de señalización IP3-K/ PKB, la cual conduce



---

a la formación de fosfolípidos específicos y la transformación de glucosa en lactato, principal fuente de energía para las células germinales (Walker y Cheng 2005).

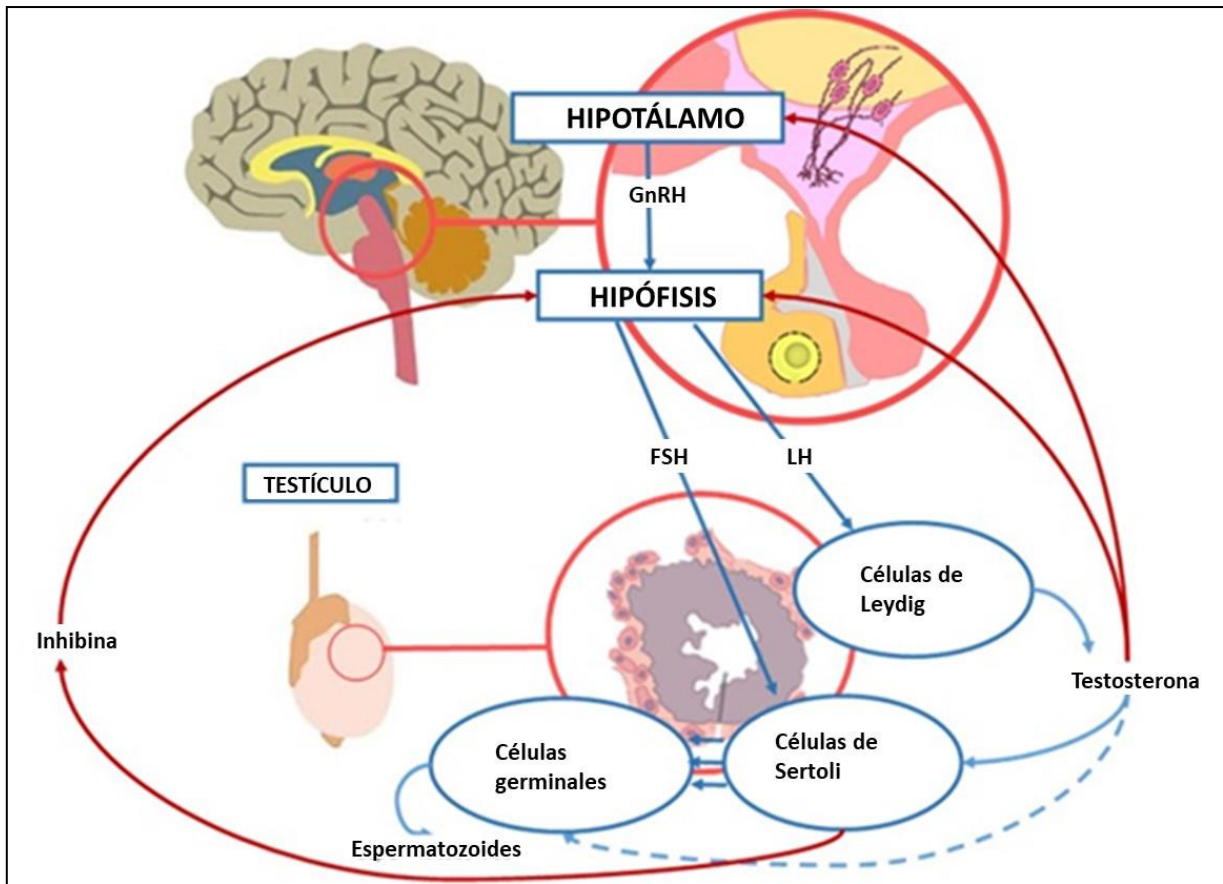
En la vía MAPK/ERK, la unión de la FSH a su receptor, conduce a la activación de ciclinas D1 y EF2, relacionadas a la progresión de la mitosis en las células germinales (Walker y Cheng 2005).

El Calcio es una molécula necesaria para el funcionamiento y activación de enzimas relacionadas con el movimiento e interacción entre células, incluidas las células de Sertoli, en esta vía la interacción de la FSH a su receptor produce un cambio en el potencial de membrana, y en consecuencia la apertura de canales de calcio al medio interno (Walker y Cheng 2005).

En la célula de Leydig la interacción de la LH con su receptor de membrana acoplado a proteínas G activa las vías de señalización AMPc/ PKA, ó PIP2/DAG. En la primer vía la PKA fosforila las enzimas esteroidogénicas y activa la trascricpción de factores que promueven la expresión de las enzimas StAR y CYP17a1 (Zhang et al. 2018), en la segunda como resultado de la PIP2/DAG, favorecen la liberación de  $Ca^{2+}$  en el retículo endoplásmico que actúa como segundo mensajero, y activa a la PKC, la cual estimula también la esteroidogénesis (Costa et al. 2010; Zhang et al. 2018).

La T producida en el testículo es liberada a la circulación sanguínea, actúa en el interior de los túbulos seminíferos, en las células de Sertoli, estas en respuesta sintetizan proteínas y factores de crecimiento que promueven la maduración y diferenciación de las células germinales adyacentes. La actividad de las células de Sertoli depende de la testosterona y la FSH, aunque en modelos animales donde la testosterona está ausente la FSH es capaz de mantener la espermatogénesis ( Abel et al. 2014; Oduwole et al. 2014).

En la pubertad ambas gonadotropinas estimulan el desarrollo de las células de Sertoli, de Leydig y germinales, propician las condiciones necesarias en el inicio y desarrollo de la espermatogénesis (Das y Kumar 2018).



**Figura 8. Eje hipotálamo hipófisis testículo.** La GnRH secretada por el hipotálamo estimula la síntesis y liberación de FSH y LH por la adenohipófisis, hormonas que actúan en las células de Sertoli y Leydig respectivamente y regulan las funciones del testículo, la espermatogénesis y síntesis de testosterona Tomado y modificado de (Jovcev 2018).

La espermatogénesis se encuentra bajo control de la T, debido a que regula la meiosis y la espermiogénesis, así como la sobrevivencia del espermatocono y la espermátida (Ruwanpura, et al. 2010).

La testosterona también participa en la regulación de la espermatogénesis (Walker y Cheng 2005; Walker 2010; Smith y Walker 2014b). Durante el desarrollo de la rata las concentraciones de testosterona en la circulación sistémica alcanzan su concentración máxima alrededor de los 30-55 días de edad (Ketelslegers et al. 1978), la concentración intratesticular es 50-100 mayor que en el suero (Awoniyi et al. 1990).

---

En el testículo, las células de Leydig, de Sertoli y peritubulares expresan el receptor a testosterona (Walker y Cheng 2005). En la rata macho los receptores a andrógenos están presentes desde el quinto día de vida después del nacimiento e incrementan del día 35 al 60 (Buzek 1988; Walker y Cheng 2005), el número de receptores varía durante el ciclo del epitelio seminífero, existe mayor número de receptores en las etapas II-VII y disminuye posteriormente durante IX-XIII (Smith y Walker 2014b; Smith y Walker 2014a), por lo que la ausencia de testosterona induce degeneración de las células germinales (Walczak-Jędrzejowska et al. 2007).

La testosterona mediante la unión a su receptor, permite la interacción con coactivadores y factores promotores de la transcripción de ADN (Tsai y O'Malley 1994). Existen más de 200 genes modulados vía la acción de los andrógenos en las células de Sertoli (Lindsey y Wilkinson 1996; Sadate-Ngatchou et al. 2004).

Los andrógenos ejercen sus efectos mediante dos vías de señalización: 1) Favorecen el influjo e incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular (Lyng et al. 2000; Walker 2010); 2) Activa la vía tirosin cinasa SRC/Sbc, que a su vez lo hace con las proteínas RAS/MAP cinasas, hasta unirse con los coactivadores de transcripción del ADN (p90rsk; MSK), los cuales modulan la unión de CREB y transcripción del ADN; 3) También activan la adenilato ciclasa, la formación del AMPc y la activación de PKA, las cuales intervienen en la fosforilación del factor de transcripción CREB, ejerciendo un efecto sinérgico en la modulación de la transcripción del ADN (Fix et al. 2004; Walker y Cheng 2005).

La falta o disminución de estas hormonas (FSH y/o LH) repercute en el desarrollo de las funciones testiculares (Ruwanpura et al. 2010; Sofikitis et al. 2008; Ramaswamy y Weinbauer 2014). Se ha descrito en la rata macho prepúber con hipofisectomía (Matikainen et al. 1994) o inmunizada contra GnRH (Mclachlan et al. 1995), disminuye el peso de los testículos y altera la progresión de la espermatogénesis, estos eventos se acompañan de la disminución del diámetro del túbulo seminífero. Cuando a estos animales se les administra FSH, el peso de los

---

testículos y el diámetro de los túbulos seminíferos se incrementa y la espermatogénesis se reactiva, lo cual se refleja en el incremento en el número de espermátidas y espermátidas redondas.

La FSH favorece la proliferación de las espermatogonias, espermátidas y modula indirectamente la espermiogénesis. En la rata adulta se propone que la FSH no es un regulador esencial en el inicio de la espermatogénesis pero si es requerido para su mantenimiento (O'Shaughnessy et al. 2010; 2014). Mientras que en el animal prepúber es un factor determinante en el inicio de la espermatogénesis (Huhtaniemi 2015).

La participación de la FSH en la espermatogénesis se ha analizado mediante el uso de diferentes modelos, el ratón knock out para la subunidad Beta (FSH $\beta$ KO), o del receptor a FSH (FSHRKO) y en animales transgénicos que sobre expresan la subunidad  $\beta$  de la FSH. Cuando la FSH no está presente (FSH $\beta$ KO) disminuye la concentración de FSH y testosterona, el peso de los testículos y el número de espermatozoides. En los que no se expresa el receptor (FSHRKO) disminuye la espermatogénesis (Layman y McDonough 2000), el número y la movilidad de los espermatozoides y el volumen de los túbulos seminíferos (Abel 2014), mientras que aumenta el número de formas anormales (Dierich et al. 1998). En contraste los ratones expuestos a metalotioneina-1 un factor promotor de la expresión de la subunidad beta de la FSH, aumenta la concentración de esta gonadotropina, de testosterona, del número de espermatozoides y el peso de los órganos sexuales y no se modifica la fertilidad de estos animales. Con base en estos resultados se propone que la desregulación en la producción o acción de FSH, modifica la la producción de espermatozoides (Dierich et al. 1998; Layman y McDonough 2000).

En relación a la LH, en ratones que no expresan el receptor a LH (LHRKO; LH/HcGR), se incrementa la concentración de LH y disminuye la de testosterona en el suero (Lei et al. 2001), la espermatogénesis se detiene en la etapa de espermátidas redondas y disminuye el diámetro del túbulo seminífero (Abel et al. 2014), se presenta desorganización de los túbulos seminíferos, disminución del tamaño de células de Leydig (Lei et al. 2001) y del desarrollo de

---

los órganos sexuales masculinos (Oduwole et al. 2014). Resultados similares se observan cuando la LH no es biológicamente activa debido a un cambio en su estructura, en ratones con deficiencia o falta en la expresión de la LH (LH $\beta$ +/-; LH $\beta$  null), disminuye el peso de los testículos, el número y tamaño de las células de Leydig, la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la esteroidogénesis y de la concentración de testosterona. Estos eventos se acompañan por arresto de la espermatogénesis debido a que la espermatida redonda no se diferencia a espermatozoide (Ma et al. 2004).

Con base en estas evidencias se propone que la desregulación en la producción o de la actividad de la LH, modifica el funcionamiento del testículo, disminuye la síntesis de andrógenos y la progresión de la espermatogénesis (Abel et al. 2014; Oduwole et al. 2014).

En respuesta a la LH, las células de Leydig sintetizan diversos factores incluida la testosterona, hormona que regulan la espermatogénesis (Oduwole et al. 2014; Pakarainen et al. 2005). Este andrógeno es esencial para que los espermátocitos completen la meiosis y se diferencien las espermatidas redondas a espermatozoides. En los animales con falta o disminución de la acción de los andrógenos, no se observan células germinales postmeióticas y son infértiles (O'Shaughnessy et al. 2010; 2014). Efecto similar se presenta en ratones knock out para el receptor a andrógenos (ArKO) (Chang et al. 2004; De Gendt et al. 2004). Cuando en ratones LH/HcGR se les administra testosterona, aumenta la concentración de FSH, el tamaño de las células de Sertoli y el número de células germinales postmeióticas (Oduwole et al. 2014).

En conjunto las evidencias antes descritas muestran que la LH es esencial en la regulación de la esteroidogénesis, mientras que la FSH y la testosterona, son los principales reguladores de la espermatogénesis, debido a que estimulan la proliferación y diferenciación de las células germinales respectivamente.

---

## Serotonina

La 5-HT se sintetiza a partir del aminoácido esencial, triptófano, vía la acción de dos enzimas: la triptófano hidroxilasa (TPH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (Mohammad-Zadeh, y Moses 2008) (Figura 9A). La 5-HT sintetizada se almacena en vesículas, acoplada a la proteína vesicular transportadora de serotonina (VMAT2) (Gaspar et al. 2003; Murphy y Lesch 2008). En el SNC, la 5-HT se libera en la neurona pre sináptica y se une a sus receptores de membrana en la neurona post sináptica. El exceso de la amina es recapturado y transportado por la proteína transportadora de serotonina (SERT) al interior de la neurona presináptica, en donde por acción de la monoamino oxidasa (MAO) forma el metabolito, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)(Figura 9B) (Sur et al. 1996; Muller y Jacobs 2010; Mohammad-Zadeh y Moses 2008).

La 5-HT ejerce sus efectos vía la unión a sus receptores específicos (Figura 9B). Estos se clasifican en siete familias (5-HT1-7) y se subdividen en 14 subtipos. Todos excepto el 5-HT3 (Canal iónico) están acoplados a proteínas G (GPCR) (Jørgensen 2007; Mohammad-Zadeh y Moses, L. 2008). Únicamente el receptor 5-HT1A y el 1B, se localizan en la neurona postsináptica. La unión de 5-HT a los receptores 5-HT1 y 5-HT5 inhibe la síntesis de AMPc, mientras que su unión a los receptores 5-HT4, 5-HT6 y 5-HT7 estimulan la producción de éste mensajero intracelular. La interacción de la amina con el receptor 5-HT2 activa la Fosfolipasa C (PLC), en consecuencia la formación de trifosfato de inositol (IP3) y diacil glicerol (DAG). La unión de la 5-HT al receptor 5-HT3 despolariza la membrana plasmática lo que genera un intercambio de iones  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Jørgensen 2007; Nichols y Nichols 2008).

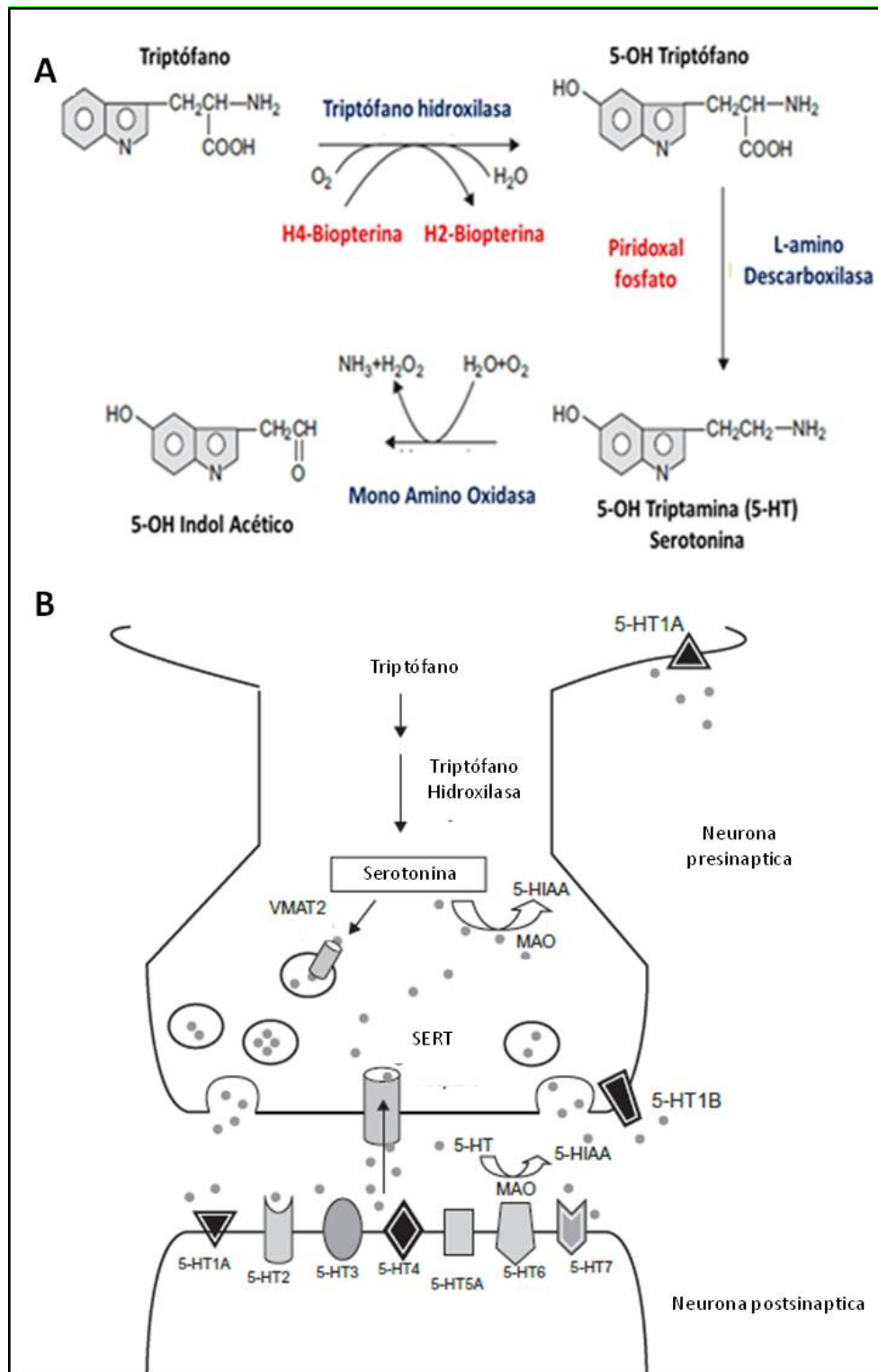


Figura 9. A) Ruta de síntesis y B) Sinápsis serotoninérgica donde se observa la síntesis y el metabolismo de la serotonina Tomado y modificado de (Muller y Jacobs 2010).

---

En el sistema nervioso central la 5-HT es producida por neuronas serotoninérgicas que conforman el núcleo del rafe, organizado en 9 paquetes celulares (B1-B9)(Dahlström y Fuxe 1964; Lesch y Waider 2012). Este núcleo se divide en núcleo dorsal (NDR), medial (NMR) y del puente (NPR). Los núcleos NDR y NMR proyectan hacia el hipotálamo y la eminencia media (Azmitia 1999; Muller 2010; Calizo et al. 2011; Lesch y Waider 2012;). El NMR también proyecta sus fibras a la hipófisis (Westlund et al. 1982).

Existen evidencias de la presencia de componentes del sistema serotoninérgico en los órganos que conforman el eje HHG (Piezzi et al. 1970; Frungieri et al. 1999).

Además de la inervación serotoninérgica que se origina en el rafe, también se han descrito algunos marcadores serotoninérgicos en el hipotálamo, como el RNAm a 5-HT (Wright y Jennes 1993), la enzima TPH (Saland et al. 1993; Vanhatalo et al. 1995), los receptores 5HT<sub>1A</sub>, 2C, 4 y 7 (Wada et al. 2006; Zhang et al. 1999) y su metabolito 5HIA (López-Doval et al. 2015). En el lóbulo anterior de la hipófisis se han identificado fibras serotoninérgicas que se originan en el núcleo del rafe y 5-HT en los gonadotropos que secretan LH (Payette et al. 2015; Westlund et al. 1982; Quirk y Siegel 2005). Con base en estas evidencias anatómicas se sugiere que la 5-HT participa en la regulación del funcionamiento del hipotálamo y la hipófisis (Justo 1989).

La administración del precursor de la 5-HT, el 5-HTP, en ratas macho de 30 días de edad, incrementa la concentración de serotonina en el cerebro y la de FSH en suero (Justo 1989). La inyección intra ventricular de 5,6-DHT, neurotóxico selectivo de neuronas serotoninérgicas, a ratas prepúberes, disminuye la concentración de 5-HT en el hipotálamo, efecto que se acompaña por la disminución del contenido de FSH en la hipófisis y en la concentración de esta hormona en el suero, así como el peso de testículos (Collu 1978). En la rata macho prepúber de 30 días de edad, la micro inyección de este neurotóxico en el NDR induce la disminución en la concentración de 5-HT en el hipotálamo y la desregulación de la espermatogénesis en la etapa adulta (Ayala et al. 2015).



---

En las ratas macho prepúberes de 40-44 días de edad, la administración sistémica de p-cloro fenilalanina (PCPA), un inhibidor de la actividad serotoninérgica disminuye la concentración de T y el peso de los testículos. Cuando la sustancia se administra a los 30-34 días de edad, se observa un efecto similar en la etapa adulta. El restablecimiento de la actividad serotoninérgica por la inyección del precursor de 5-HT, el 5-HTP, induce aumento en las concentraciones de testosterona y del peso de los testículos y epidídimos (Shishkina y Dygalo 2000). Conjuntamente los resultados antes expuestos sustentan la idea que la serotonina participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y como consecuencia en la esteroidogénesis.

La serotonina y algunos de los marcadores del sistema serotoninérgico también se han identificado en el testículo (Campos et al. 1990; Tinajero et al. 1993; Syed, et al. 1999; Haider 2004; Ayala et al. 2015).

En el testículo del hámster dorado (Frungieri et al. 2002) y de rata (Zieher et al. 1971) se encuentra 5-HT, en el citoplasma de las células de Leydig se identificaron; la TPH, enzima limitante en la síntesis de 5-HT (Frungieri et al. 2002) y la MAO que metaboliza a la amina (Ellis et al. 1972). En la célula de Sertoli de rata adulta se reporta el RNAm de los receptores a 5-HT (Syed, et al. 1999). Por estudios farmacológicos se propone que en la célula de Leydig de rata se encuentra el receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Tinajero et al. 1993).

La fuente de 5-HT en el testículo son los mastocitos, las plaquetas, la inervación que transcurre por el nervio espermático y la que se sintetiza en el órgano por las células de Leydig (Dufau et al. 1993). Se encuentra en la cápsula de la gónada (Campos et al. 1990; Frungieri et al. 2002), en el fluido intersticial (Campos et al. 1990), en las terminales nerviosas que arriban a la túnica albugínea y túnica vascular (Campos et al. 1990). La denervación farmacológica inducida por la administración de un neurotóxico selectivo de las fibras serotoninérgicas (5,6-DHT)

---

(Gerendai et al. 1996) o la sección quirúrgica unilateral del NES, disminuye la concentración de 5-HT (Campos et al. 1990).

La concentración de serotonina en el testículo varia durante el desarrollo, en la rata es mayor en el nacimiento y disminuye en la etapa adulta (120 días de edad) (Zieher et al. 1971). En el hámster dorado se identifica 5-HT y 5-HIAA en la cápsula y tejido intersticial de la gónada y la concentración de la amina aumenta a los 36 días y posteriormente disminuye a los 46 días de edad (Frungeri et al. 1999). La actividad de la enzima (MAO) que degrada la serotonina y la transforma en 5-HIAA también varía durante el desarrollo, es mayor en ratas macho de 90 días de edad y disminuye en las seniles (410 días de vida) (Ellis et al. 1972).

A la serotonina intratesticular se le asocia con la regulación de la secreción de testosterona (Dufau et al. 1993; Tinajero et al. 1993) y del flujo sanguíneo (Piner et al. 2002). Se ha mostrado que la manipulación de alguna de las fuentes de serotonina de la gónada del macho altera la estructura de la gónada, el aporte sanguíneo o la síntesis de testosterona. En la rata macho adulta la administración intraperitoneal o directamente en el testículo de ritanserina, ketanserina, histamina o sustancia 48/80, antagonistas específicos del receptor 5-HT<sub>2</sub>, disminuye la concentración de 5-HT y el flujo sanguíneo del testículo como resultado de la vasoconstricción (Collin 1996).

### **Participación de la serotonina en la regulación de las funciones del testículo**

Las funciones del testículo son reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis y por mensajeros químicos producidos en el testículo, como la serotonina. Esta amina actúa como modulador intratesticular en la secreción de testosterona y vía esta hormona en la espermatogénesis (Dufau et al. 1993; Tinajero et al. 1993; Csaba et al. 1998).

La acción de la 5-HT en los vasos sanguíneos se asocia con vasoconstricción y en consecuencia disminuye el aporte de gonadotropinas al testículo (Burger et al. 2004; Collin 1996; Hedger et

---

al. 1995) y se relaciona con el desarrollo de varicocele e isquemia testicular (Tinajero et al. 1993).

Cuando se utilizan células de Leydig mantenidas en cultivo, obtenidas previamente de rata adulta y son expuestas a diferentes concentraciones de hCG, se incrementa la concentración de 5-HT de forma dosis dependiente. La amina vía su unión al receptor 5-HT<sub>2</sub> estimula la secreción de CRF y disminuye la secreción de testosterona (Tinajero et al. 1992). Cuando se añade al cultivo un anticuerpo específico a CRF o un antagonista a CRF se incrementa la concentración de testosterona. Este efecto inhibitorio de la 5-HT en la esteroidogénesis es mediado por su unión al receptor 5-HT<sub>2</sub>, ya que la adición del antagonista a este receptor, ketanserina, disminuye la síntesis de CRF inducida por 5-HT e incrementa la producción de testosterona (Tinajero et al. 1992). Con base en esto los autores sugieren que la 5-HT disminuye la secreción de andrógenos, vía la producción de CRF.

El efecto de la 5-HT en la regulación de la esteroidogénesis varía con la edad del animal. Hedger y colaboradores (1995) observaron que en el animal adulto la inyección intraperitoneal de 5-HT disminuye la concentración de LH e inhibina 2 horas post tratamiento, sin afectar la producción de FSH y T, mientras que a las 18 hrs disminuye la concentración de este andrógeno. Un efecto similar en la concentración de testosterona, se observó cuando tejido testicular de rata adulta inyectado previamente en las gónadas con 5-HT, se mantienen en cultivo. Mientras que en el animal prepúber con el mismo tratamiento, la concentración de testosterona aumenta (Csaba et al. 1998). En ambas edades la administración de ketanserina, antagonista de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, restableció las concentraciones de testosterona.

Cuando se adiciona 5-HT a células de Sertoli mantenidas en cultivo se induce la expresión del RNAm del receptor a 5-HT, la adición de los antagonistas de los receptores a 5-HT, ketanserina o espiperona, inhiben este efecto, lo que sugiere que la 5-HT actúa en la célula de Sertoli (Syed et al. 1999).

---

El CRF también estimula la secreción de  $\beta$ -endorfina que actúa en las células de Sertoli disminuyendo su respuesta a la FSH, la producción de ABP y con ello la acción de los andrógenos, y la desregulación de la espermatogénesis (Dufau et al. 1993). Con base en lo anterior se considera que el CRF es una hormona anti reproductiva, debido a que inhibe la producción de testosterona intratesticular (Tinajero et al. 1992).

## **Anfetaminas**

La actividad serotoninérgica es modificada por las anfetaminas o sus derivados (Barenys et al. 2009; 2010). La primera vez que se sintetizaron fue en 1887 por L. Edelano. Posteriormente se descubrió el sulfato de anfetamina y su dextroisomero (Dextro anfetamina; aún más activo) que tiene la capacidad de estimular al SNC. En 1931 la compañía Smith Kline la nombró benzedrina y formó parte de la lista de sustancias controladas por la Oficina federal de administración de drogas de estados unidos (FDA) (Gilman 1996; Robledo 2008).

Las anfetaminas inducen incremento de las concentraciones extracelulares de 5-HT (Kankaanpää et al. 1998), por desplazamiento del neurotransmisor y de su transportador pre sináptico específico, evita que la 5-HT entre en la terminal e invierte el mecanismo de recaptura propiciando que la 5-HT se libere al espacio sináptico (Seiden y Sabol 1996; McCann y Ricaurte 2004; Robledo 2008; Ricaurte y McCann 2000). En rata la administración de metanfetamina disminuye la concentración y la recaptura de 5-HT en el SNC, así como la actividad de la enzima implicada en su síntesis (TPH). También induce alteraciones morfológicas (varicosidades) en los axones de las neuronas serotoninérgicas (McCann y Ricaurte 2004).

Entre los derivados de las anfetaminas se encuentra el 3,4 metilen dioximetanfetamina (MDMA) y la pCA, neurotóxicos selectivos de las células serotoninérgicas (Ricaurte y McCann 2000; Kalant 2001; Baumgarten y Lachenmayer 2004). A corto plazo, 24 hrs posteriores a su administración, induce la liberación de la 5-HT por las terminales nerviosas. Posteriormente inhibe a la enzima TPH y como consecuencia disminuye la concentración de 5-HT en SNC

---

(Huether et al. 1997; Kalant, 2001; Baumgarten y Lachenmayer 2004). También disminuye la actividad de la enzima MAO, lo que se refleja en menor concentración del metabolito, el 5-HIAA. La pCA a largo plazo (30 días), induce degeneración de las terminales serotoninérgicas (Baumgarten 2004). Los efectos en el sistema serotoninérgico que ejerce este derivado de las anfetaminas, son mediados por la formación de metabolitos, entre los que se encuentran la 5,6-DHT (Commins et al. 1987).

La 5,6-DHT se ha utilizado ampliamente en estudios farmacológicos por su selectividad para destruir las terminales nerviosas serotoninérgicas. Esta propiedad se asocia a su alta afinidad para ser capturada por la neurona. El mecanismo por el cual ejerce sus efectos inicia con su transporte a las neuronas y su auto-oxidación intra neuronal. Posterior se proponen dos vías por las cuales la sustancia oxidada induce degeneración de la neurona serotoninérgica: 1) actúa como agente alquilante que daña las proteínas de membrana; 2) Induce la formación de especies reactivas de oxígeno,  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , y HO, que dañan los lípidos y proteínas de la membrana neuronal (Sinhbababu y Ghosh 1985; Singh et al. 1990).

### **Efecto de las anfetaminas en las funciones reproductivas**

La inyección intraperitoneal de metanfetamina, disminuye el número de espermatozoides y su movilidad e incrementa el porcentaje de anomalías morfológicas en el espermatozoide y de células en apoptosis en el túbulo seminífero (Nudmamud-Thanoi y Thanoi 2011; 2016).

Las anfetaminas y sus derivados también modifican las funciones reproductivas del macho debido a su acción en el sistema serotoninérgico del SNC y en los componentes del eje reproductivo HHG. La inyección del metabolito de la pCA, la 5,6-DHT, en el NDR o NMR disminuye la concentración de 5-HT en el hipotálamo (Ayala et al. 2015), de FSH en suero, el peso de los testículos, el número y movilidad de los espermatozoides (Collu 1978; Ayala et al. 2015). Estas evidencias llevaron a proponer que el sistema serotoninérgico del hipotálamo es esencial en la regulación de la espermatogénesis.

---

La administración sistémica aguda o crónica de uno de los derivados de las anfetaminas, el MDMA a ratas macho adultas disminuye el RNAm para la GnRH y la secreción de testosterona, sin modificar la concentración de LH (Dickerson et al. 2008). También el tratamiento crónico disminuye el número total y porcentaje de espermatozoides móviles; induce desorganización y apoptosis de las células germinales en el túbulo seminífero; incrementa la expresión de la caspasa 3, marcador de apoptosis y produce daño en el ADN de los espermatozoides (Barenys et al. 2009). Estos resultados permitieron a los autores sugerir que el MDMA interrumpe la comunicación entre los componentes del eje HHG y altera los mecanismos de regulación del testículo.

Cuando en la rata macho prepúber se administra por vía sistémica la pCA, disminuye el peso corporal, de los testículos, la concentración de serotonina y su metabolito 5-HIAA en el hipotálamo anterior y medio, la movilidad y el número de espermatozoides. Estos eventos se acompañan del incremento en el número de células germinales en apoptosis (Aragón et al. 2005; Méndez Palacios et al. 2016). Conjuntamente estos resultados, permiten sugerir que la inhibición del sistema serotoninérgico, modifica el funcionamiento del eje HHG, lo que se refleja en la disminución de la espermatogénesis y de la calidad espermática.

### **Calidad espermática**

Se ha reportado que 50% de los casos de infertilidad corresponde al factor masculino. Esta puede deberse a condiciones físicas, defectos congénitos, enfermedades o la exposición a productos químicos, tóxicos que causan bajo número de espermatozoides o calidad de estos. El 30% de los casos tiene su origen en los testículos, y el 5% se relaciona con anomalías endocrinas (Gimeno 2014). Con base en lo establecido por la OMS en el análisis de muestras de semen incluyen aspectos macroscópicos y microscópicos, como el número de espermatozoides, movilidad, viabilidad, morfología y presencia de elementos celulares distintos a los espermatozoides. El conjunto de estos parámetros define la calidad (Gimeno 2014). La disminución en la concentración de espermatozoides, la movilidad y el aumento de

---

formas anormales, se asocia con disminución de la capacidad de fertilización (Marnet et al. 2000) y en consecuencias de la fertilidad (Bonde et al. 1998; Donnelly et al. 1998).

Las pruebas que evalúan la integridad de la membrana y actividad metabólica del espermatozoide se utilizan como indicador de la capacidad de los espermatozoides de presentar maduración adecuada (capacitación y reacción acrosomal) y el potencial de fecundar al ovocito. Hoy en día nuevas metodologías permiten evaluar la calidad espermática, mediante análisis de la fragmentación del ADN (Garner et al. 1994), actividad metabólica y la presencia de marcadores celulares de procesos relacionados con degeneración y muerte celular por apoptosis, como las caspasas (Sabes-Alsina et al. 2016).

### **Muerte celular: Apoptosis**

La apoptosis se define como un patrón de muerte celular programada que permite mantener el equilibrio entre la proliferación y muerte celular. Se caracteriza por un conjunto de cambios bioquímicos y morfológicos que incluyen la formación de burbujas en la membrana, la condensación de la cromatina, el encogimiento celular, la pérdida de adhesión con células periféricas y la formación de cuerpos apoptóticos (Majno y Joris 1995; Hetts 1998).

En las células somáticas y germinales del testículo se ha descrito la apoptosis. En la gónada del macho es un proceso de remoción del exceso de espermatogonias, que resulta necesario para el desarrollo de la espermatogénesis (Dunkel et al. 1997; Tres et al. 2004b) y la eliminación de células dañadas (Tres et al. 2004a).

Las caspasas, proteínas clave en la iniciación y ejecución de la apoptosis, son proteasas de cisteína y ácido aspártico, se encuentran en su forma inactiva. Durante su activación, forman hetero tetrámeros (Dos pro caspasas unidas por interacción del grupo amino en las subunidades cortas) con dos sitios activos (Grunewald et al. 2009).

---

Con base en su función, las caspasas se clasifican dependiendo del tipo de función que desarrollan en iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) (Grunewald et al. 2009). Se localizan en el citosol de células y son activadas por dos vías, la extrínseca e intrínseca. La primera depende del ligando Fas (apoproteína tipo 1 de la familia de TNF's) o CD95, que se une a un receptor FADD (receptor o dominio de muerte asociado a Fas) o CD95R (receptor a CD95), y promueve la activación de la caspasa 8. La segunda vía se produce por factores estresantes que promueven la liberación de citocromo C de la membrana interna de la mitocondria hacia el citosol, en cooperación con las proteínas Bax (proteína x asociada a Bcl-2/Bid (proteína parecida a Bax) o la proteína Bcl-2 (proteína de las células b de linfoma 2). El citocromo c se une a la proteína Apaf-1 (Factor activador de apoptosis 1) y se asocia a la Caspasa 9 la cual en su forma activa promueve la formación del apoptosoma. En donde al igual que la vía extrínseca converge en este punto y resulta en la activación de las caspasas 3,6 y 7. Esta etapa es un punto irreversible del procesos de muerte celular en donde la célula está condenada a morir (Grunewald et al. 2009; Majno y Joris 1995; Hetts 1998)



---

## JUSTIFICACIÓN

Las funciones del testículo, esteroidogénesis y espermatogénesis, son reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis, vía la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas. Conjuntamente con estas hormonas, las proteínas y la testosterona secretadas por las células testiculares, Sertoli y Leydig respectivamente, modulan la multiplicación de las espermatogonias y su diferenciación a espermatozoide. Además, las aminos como la serotonina participan en la modulación de las funciones del testículo vía su acción en los componentes del eje hipotálamo-hipófisis o directamente en el testículo.

En la actualidad se usa indiscriminadamente a las anfetaminas o sus derivados, como drogas recreacionales, con fines médicos para el tratamiento de la narcolepsia o en el trastorno por déficit de atención e hiperactividad en niños. Estos fármacos o sus metabolitos modifican la actividad del sistema serotoninérgico. Se ha mostrado que la serotonina se encuentra en el testículo y es esencial en la modulación de la secreción de testosterona y en el mantenimiento de la estructura de la gónada en la rata prepúber (30 días de edad).

Aunado a esto se conocen ampliamente los efectos de las anfetaminas en el SNC. Sin embargo, hasta el momento no se han estudiado los efectos secundarios que estos fármacos pueden generar en el aspecto reproductivo.

Por ello, en el presente trabajo se analizaron los efectos de la administración intratesticular de un derivado de las anfetaminas, la pCA, o de su metabolito, la 5,6-dihidroxitriptamina en la rata de 30 días, en la concentración de gonadotropinas y testosterona en el suero, en marcadores de calidad espermática y de apoptosis en el testículo.

---

## **HIPÓTESIS**

En la rata prepúber, de 30 días de edad, el sistema serotoninérgico del testículo es esencial en la modulación de sus funciones, por lo que la inhibición de este sistema inducirá la disminución en la producción de testosterona y alteraciones en la espermatogénesis, que se acompañarán de los parámetros de calidad espermática y marcadores de apoptosis en el testículo.

---

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar en la rata macho prepúber los efectos de la inhibición del sistema serotoninérgico del testículo en la espermatogénesis (evaluada por número, movilidad, viabilidad y formas anormales de los espermatozoides) y marcadores de apoptosis en el testículo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analizar el efecto de la inyección intratesticular de pCA o de la 5,6-dihidroxitriptamina en:

- La espermatogénesis (número, movilidad y anomalías morfológicas de los espermatozoides).
- La viabilidad espermática (integridad de la membrana y actividad mitocondrial)
- La concentración de testosterona y de gonadotropinas en suero.
- La presencia de caspasas 3 y 7 en el testículo.
- El peso de los órganos del aparato reproductor (testículos, epidídimos, próstata y vesículas seminales).

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho de 30 días de edad de la cepa CII- ZV, mantenidos en condiciones controladas de luz (05:00 a 19:00 hrs) y temperatura ( $22\pm 2$  °C), con acceso al agua y el alimento *ad libitum* siguiendo lo establecido por La Ley Mexicana de Protección de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999), especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, así como por el comité de ética de la facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM en su carta del (03/01/2012).

Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos experimentales: 1) Sin tratamiento o control absoluto (CA); 2) Animales con inyección intratesticular de solución salina al 0.9% (SS); 3) con inyección intratesticular de ácido ascórbico (ASC); 4) con inyección intratesticular con pCA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), en tres concentraciones (0.3 mg, pCA; 0.6 mg, pCA2X o 12 mg, pCA4X); 5) animales con inyección intratesticular de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), en tres concentraciones (10 µg, 5,6-DHT; 20 µg, 5,6-DHT2X o 40 µg, 5,6-DHT4X).

### Inyección Intratesticular

Los animales se anestesiaron, se lavó la piel del escroto con jabón quirúrgico y en la región caudal del testículo se procedió a introducir una aguja (30G, 22mm) a una profundidad de 5 mm y acoplada a una bomba de microinyección (CMA microdialysis, North Chelmsfor MA, USA). El flujo de inyección fue de 20 µl/minuto. Concluida la inyección, la aguja se mantuvo en la misma posición por dos minutos para permitir la difusión de la solución y posteriormente se retiró. El mismo procedimiento se realizó en ambos testículos. El volumen de solución salina, ácido ascórbico o de las diferentes dosis de pCA o 5,6-DHT que se inyectaron por testículo fue de 20 µl.

---

## **Procedimiento de Autopsia**

Todos los animales se sacrificaron a los 65 días de edad por decapitación, se colectó la sangre del tronco, se extrajeron, disecaron y pesaron los testículos, epidídimos, próstata y vesículas seminales. El peso de los órganos se expresó en gramos.

## **Cuantificación de Gonadotropinas y Testosterona**

En el día de la autopsia, la sangre se dejó coagular a temperatura ambiente, se centrifugó a 1000 g x 15 minutos. Se separó el suero y se almacenó a -20°C hasta la cuantificación de hormonas.

La concentración de gonadotropinas se evaluó por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo. Se emplearon los anticuerpos NIAMDD-Rat-LH-RP3 y NIAMDD-Rat-FSH-RP2 para LH y FSH respectivamente, proporcionados por la National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). Los coeficientes intra e inter ensayo fueron: 5.74 y 7.91% para FSH; 6.82 y 9.32% para LH. La concentración de las gonadotropinas se expresó en nanogramos por mililitro (ng/ml).

La concentración de testosterona en el suero se cuantificó por la técnica de ELISA, con el Kit AccuBind (Monobind Inc. Lake Forest, Ca, USA) y se expresó en picogramos por mililitro (pg/ml).

## **Evaluación de Parámetros de Calidad Espermática**

Se disecaron y extrajeron los conductos deferentes y el contenido de ambos conductos se colocaron en 2500 µl de solución de Hank's (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). La solución espermática se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos, para la posterior evaluación de los diferentes parámetros de calidad espermática (número, movilidad y anomalías de los espermatozoides).

---

## Movilidad espermática

Se colocó una gota de la solución espermática en un portaobjetos y se contaron 200 espermatozoides a 400X en un microscopio de contraste de fases (Motic Europe Wetzlar Deutschland) con cámara integrada (Stingray allied Exton, PA, USA). El porcentaje de espermatozoides móviles se expresaron como la media de los espermatozoides móviles respecto del número de células x 100.

## Número espermático

Se tomó una gota de solución espermática, se diluyó en glutaraldehído y PBS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), se resuspendieron los espermatozoides y se colocaron 15µl aprox en cámara de Neubauer, (PROPER Lumycite 1/100mm profundidad). Se contó el número de espermatozoides, se multiplicó por el factor de dilución de la alícuota preparada y del factor de dilución de la cámara, se calculó la densidad ( $\times 10^6$ / ml) y el número total de espermatozoides, los resultados se expresaron en millones totales de espermatozoides ( $\times 10^6$ ).

**Densidad relativa = conteo X factor dilución de la muestra X factor de dilución de la cámara de Neubauer**

**Número total de espermatozoides = densidad relativa X volumen final de la solución espermática.**

## Anormalidades Morfológicas del Espermatozoide

Una gota de 20 µl de la solución espermática se colocó en un portaobjetos, se realizó un frotis deslizando la gota de solución espermática con ayuda de otro portaobjetos. La preparación se dejó secar, y se tiñó con la técnica de hematoxilina-eosina. Con ayuda de un microscopio de campo claro (Nikon Melville, N.Y USA) a un aumento de 100x se contaron 200 espermatozoides y se registró el número de espermatozoides con morfología normal y anormal. Se consideraron las siguientes anomalías en la cabeza, pieza media y flagelo:

- Sin cabeza
- Cabeza plana
- Cabeza doble
- Cabeza de alfiler
- Pieza media doblada
- Gota citoplásmica
- Flagelo doblado
- Flagelo corto
- Flagelo enroscado

---

También se evaluaron los espermatozoides que presentaron más de una anomalía. Los datos se expresaron como porcentajes del total de espermatozoides contados.

## **Viabilidad espermática**

### **Integridad de la Membrana**

Los espermatozoides se tiñeron con los fluorocromos, SYBR14/yoduro de propidio (IP) (Kit Live dead sperm viability; Eugene, Oregon, USA). En tubos eppendorf se colocó 100 µL de solución espermática, a la que se le agregó SYBR14 (2 µmol) más IP (12 µmol) y la solución se incubó a 37°C por 5 minutos. Posteriormente se realizó la lectura del porcentaje de células positivas para cada fluorocromo, se contaron diez mil eventos (espermatozoides) en un citómetro FACS Aria II (Becton Biosciences, San José CA, USA). Los espermatozoides viables con membrana plasmática intacta presentan fluorescencia verde (SyBR-14 +), mientras que los espermatozoides con membrana plasmática dañada (muertos) se tiñen de color rojo por acción del IP.

### **Actividad Mitocondrial**

Los espermatozoides se tiñeron con los fluorocromos Resazurin/SYTOX (Live dead sperm viability kit L-34951 Molecular Probes, Eugene, OR, USA), siguiendo la metodología propuesta por Zrimsek et al., 2006, los reactivos se prepararon y almacenaron hasta su uso. En tubos eppendorf se colocó 100 µl de solución espermática, a las que se les agregaron Resazurin (50mmol)/SYTOX [1mmol] y se incubaron a 37°C por 15 minutos. Posteriormente se realizó la lectura del porcentaje de células positivas para cada fluorocromo, se contaron diez mil eventos (espermatozoides) en un citómetro FACS Aria II (Becton Biosciences, San José CA, USA). Los espermatozoides viables con actividad mitocondrial intacta presentan fluorescencia verde (Resazurin +), mientras que los espermatozoides con daño (muertos) se tiñen de color rojo por acción del Sytox.

---

### **Caspasas activas 3 y 7 en Espermatozoides**

Se realizó la tinción con FLICA/SYTOX (Kit Vybrant FAM Caspase-3 and 7 assay, Eugene, OR, USA), el fluorocromo FLICA es una fluorometil-cetona (FMK) acoplada a una secuencia de aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, valina, ácido aspártico (DEVD) y a una molécula de carboxifluoresceína (FAM), nombrada como FLICA, como herramienta para la detección específica de caspasas 3 y 7 activas. Se colocaron en un tubo eppendorff 14.5 µL de solución espermática a la que se le agregó FLICA (30x) más SYTOX (1mmol) y se incubaron a 37°C por 60 minutos.

Posteriormente, se realizó la lectura del porcentaje de células positivas para cada fluorocromo, se contaron diez mil eventos (espermatozoides) en un citometro FACS Aria II (Becton Biosciences, San José CA, USA).

Los análisis de las citometrías de flujo se realizó con el software BD FACS Diva versión 6.0 (Becton Dickinson). Previo a la digitalización se realizó la compensación de la fluorescencia, para identificar las subpoblaciones. Por cada archivo los eventos positivos se procesaron con el software WiList 3.2 (Verity Software House Inc. Topsham, Maine, USA). Se consideró la región con fluorescencia más alta como la subpoblación positiva para cada fluorocromo, dicha región se digitalizó en función del total de eventos registrados, los valores se agruparon y analizaron. El porcentaje de eventos positivos obtenidos se expresó como la media  $\pm$  SD.

### **Evaluación de Caspasas 3 y 7 por Western Blot en testículo**

Se prepararon alícuotas del contenido total de proteína extraída del tejido testicular, para ello se tomó una muestra de tejido la cual se congeló a -20°C hasta su procesamiento. Se tomaron 150mg muestra, los cuales se solubilizaron en 500µl aprox, de buffer de lisis complementado con inhibidores de proteasas, la muestra se maceró con un sonicador (MSE United kingdom) en frío, el producto de la sonicación reposó por 10 min en nitrógeno líquido y posterior a ello se centrifugaron a 15000 rpm durante 30-45 minutos a 4°C, se extrajo el sobrenadante, se colectó el sobrenadante y se conservaron los pellets generados y se almacenaron a -20°C.



---

El contenido total de proteína, producto de la extracción de proteína testicular se cuantificó mediante el kit de cuantificación con ácido bicinónico BCA (Thermo Scientific protein, Waltham, MA USA) y se analizó según las especificaciones del fabricante en un lector de placas de ELISA (Thermo Scientific Multiskan Go; Waltham, MA USA).

## **Electroforesis en Condiciones Desnaturalizantes SDS-PAGE**

Se realizó la electroforesis SDS-PAGE, para ello se agregó solución de laemlli a las alícuotas de proteína total de testículo, se desnaturalizaron por ebullición posterior a ello las muestras se colocaron en hielo y centrifugaron durante 25-30 minutos a 4 °C.

Se cargaron los geles de gradiente de poliacrilamida prefabricados (Miniprotean TGX, BIO-RAD laboratorios Hércules CA, USA). Se colocaron en una cámara de electroforesis (miniprotean tetracell BIO-RAD laboratorios Hércules CA, USA), se corrieron a voltaje constante y posteriormente se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia (Transblot BIO-RAD laboratorios Hercules CA, USA), al término, la membrana de nitrocelulosa se colocó en cajas para WB con tris buffer+ tween al 1% (TBS-T).

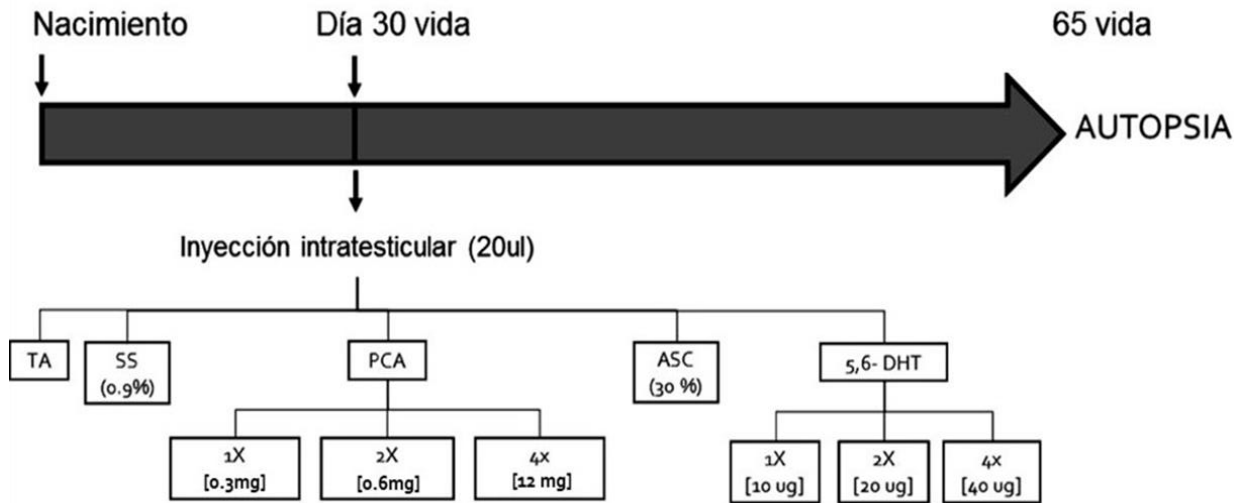
## **Western Blot**

Se bloquearon las interacciones inespecíficas con TBS-T más albumina sérica bovina BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Se realizaron lavados con TBS-T. Las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos para Caspasa 3 (abcam 13585 Cambridge, MA USA) o 7 activa (abcam 2323 Cambridge, MA USA) a 37°C, posteriormente las membranas se lavaron con TBS-T, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) 7076 y 7074 respectivamente (Cell Signaling Boston MA. USA). Las membranas se lavaron con TBS-T y se revelaron por quimioluminiscencia con un kit de luminol+peróxido de hidrogeno (super signal pico west thermo sienctific Walthman MA USA) y con ayuda de un fotodocumentador (C-Digit Blot scanner Licor Lincon NE USA). Las imágenes adquiridas se analizaron con el software Image studio lite 5.3.2 (Licor Lincon NE USA).

---

## **Análisis Estadístico**

El peso de los órganos del aparato reproductor, la concentración de gonadotropinas y testosterona y número y densidad de los espermatozoides se analizaron por la prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. La movilidad, viabilidad, anormalidades morfológicas de los espermatozoides y densidades ópticas relativas se analizaron con la prueba exacta de Fisher o una prueba de  $\chi^2$ . Se consideraron significativas las diferencias si el valor de P fue igual o menor de 0.05. Todos los análisis se realizaron con el software SigmaStat 3.5 (San José CA. USA).



Pesado del animal

Colecta sangre y recolecta de suero  
CUANTIFICACION DE HORMONAS

- Testosterona
- Gonadotropinas

OBTENCIÓN/PESADO DE ÓRGANOS

- Testículos
- Epidídimos
- Próstata
- Vesículas seminales

Obtención de conductos deferentes  
Extracción de paquete espermático

ANÁLISIS DE CALIDAD ESPERMÁTICA

- Cuantificación del número total de espermatozoides
- Análisis de movilidad espermática
- Análisis de anomalías morfológicas de los espermatozoides

Preparación de muestras para CITOMETRIA DE FLUJO

- Integridad membranal y ADN
- Actividad mitocondrial
- Presencia de caspasas 3 y 7 activas

Preparación de muestras para WESTERN BLOT

- Cuantificación total de proteína por ELISA
- SDS-PAGE
- WB
- ECL

Figura 8, Diseño experimental al día 30 se aplicó la inyección intratesticular de pCA o 5-6 DHT y a los 65 días de edad se realizó la autopsia, durante la cual se analizaron los parámetros mencionados

---

## RESULTADOS

### Efecto de la inyección intratesticular de pCA o 5,6-DHT en el peso corporal y de los órganos del aparato reproductor.

En los animales con inyección de solución salina se incrementó el peso corporal, mientras que en los que se les administró ácido ascórbico no se modificó este parámetro. El peso de los testículos, el epidídimo, la próstata o la vesícula seminal fueron similares en comparación al grupo de animales testigo absoluto (Cuadro 1).

**Cuadro 1. (Media ± e.e.m.) del peso corporal y de los órganos del aparato reproductor (gramos) de ratas macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA), ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad.**

Grupo	Peso corporal	Testículos	Epidídimos	Próstata	Vesícula Seminal
Testigo Absoluto	290±7.45	1.54±0.03	0.29±0.013	0.26±0.015	0.43±0.03
Solución Salina	314±6.88 a	1.63±0.02	0.32±0.012	0.26±0.012	0.36±0.02
pCA	312±4.96	1.72±0.02	0.32±0.002	0.27±0.018	0.45±0.02
pCA 2x	312±5.77	1.59±0.03	0.30±0.008	0.24±0.020 b	0.37±0.02
pCA 4x	289±11.4	1.56±0.03	0.29±0.010	0.22±0.014 b	0.39±0.02
Ácido Ascórbico	304±6.79	1.53±0.02	0.31±0.01	0.26±0.017	0.39±0.03
5,6-DHT	300±10.14	1.48±0.04	0.33±0.003	0.24±0.016	0.31±0.01
5,6-DHT 2x	291±9.08	1.49±0.01	0.29±0.005 b	0.19±0.020 b	0.38±0.02
5,6-DHT 4x	304±2.8	1.49±0.01	0.30±0.005	0.21±0.011 b	0.38±0.01

a, P<0.05 vs. TA; b, P<0.05 vs. SS o ASC (Prueba de ANOVA seguida de Tukey).

En comparación con su respectivo grupo con vehículo, en los animales que fueron inyectados con las diferentes dosis de pCA o 5,6-DHT no se modificó el peso corporal, el de los testículos, del epidídimo y la vesícula seminal. En los animales con inyección intratesticular de 5,6-DHT2X, el peso de los epidídimos fue menor en comparación con su grupo vehículo (Cuadro 1).

El peso de la próstata no se modificó en los animales que se trataron con la menor dosis de pCA o 5,6-DHT en comparación con sus respectivos grupos vehículo. Mientras que si disminuyó cuando los animales se trataron con las dosis mayores de pCA2X, pCA 4X o 5,6-DHT2X o 5,6-DHT4X (Cuadro 1).

### **Efecto de la inyección intratesticular de pCA o 5,6-DHT en la concentración de gonadotropinas y testosterona**

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en los que se inyectaron con solución salina no se modificó la concentración de FSH en el suero, pero la de LH disminuyó, mientras en los inyectados con ácido ascórbico disminuyó la concentración de FSH y la de LH no se modificó (Cuadro 2).

**Cuadro 2. (Media  $\pm$  e.e.m.) de la concentración de FSH y LH (ng/ml) en el suero de ratas macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA), ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad.**

<b>Grupo</b>	<b>FSH</b>	<b>LH</b>
<b>Testigo Absoluto</b>	1.63 $\pm$ 0.25	0.78 $\pm$ 0.14
<b>Solución Salina</b>	1.78 $\pm$ 0.18	0.32 $\pm$ 0.12 <b>a</b>
<b>pCA</b>	0.79 $\pm$ 0.10 <b>b</b>	0.43 $\pm$ 0.05
<b>pCA 2x</b>	1.09 $\pm$ 0.14 <b>b</b>	0.92 $\pm$ 0.09 <b>b</b>
<b>pCA 4x</b>	0.65 $\pm$ 0.11 <b>b</b>	0.73 $\pm$ 0.10 <b>b</b>
<b>Ácido Ascórbico</b>	0.89 $\pm$ 0.09 <b>a</b>	0.86 $\pm$ 0.48
<b>5,6-DHT</b>	1.51 $\pm$ 0.2 <b>b</b>	0.99 $\pm$ 0.2
<b>5,6-DHT 2x</b>	0.83 $\pm$ 0.15	0.63 $\pm$ 0.14
<b>5,6-DHT 4x</b>	0.73 $\pm$ 0.12	0.82 $\pm$ 0.17

**a, P<0.05 vs. TA; b, P<0.05 vs. SS o ASC (Prueba de ANOVA seguida de Tukey).**

Los animales inyectados con las diferentes dosis de pCA la concentración de FSH disminuyó y con la dosis más baja de 5,6-DHT, la concentración de FSH fue mayor en relación con su respectivo grupo vehículo. (Cuadro 2).

En los animales que se les inyectó la 5,6-DHT la concentración de LH no se modificó en comparación con su grupo con vehículo, cuando se inyectaron las dosis más altas de pCA la concentración de esta hormona se incrementó (Cuadro 2).

En los animales que se les inyectó solución salina o ácido ascórbico, la concentración de testosterona disminuyó significativamente en comparación con los animales testigo absoluto.

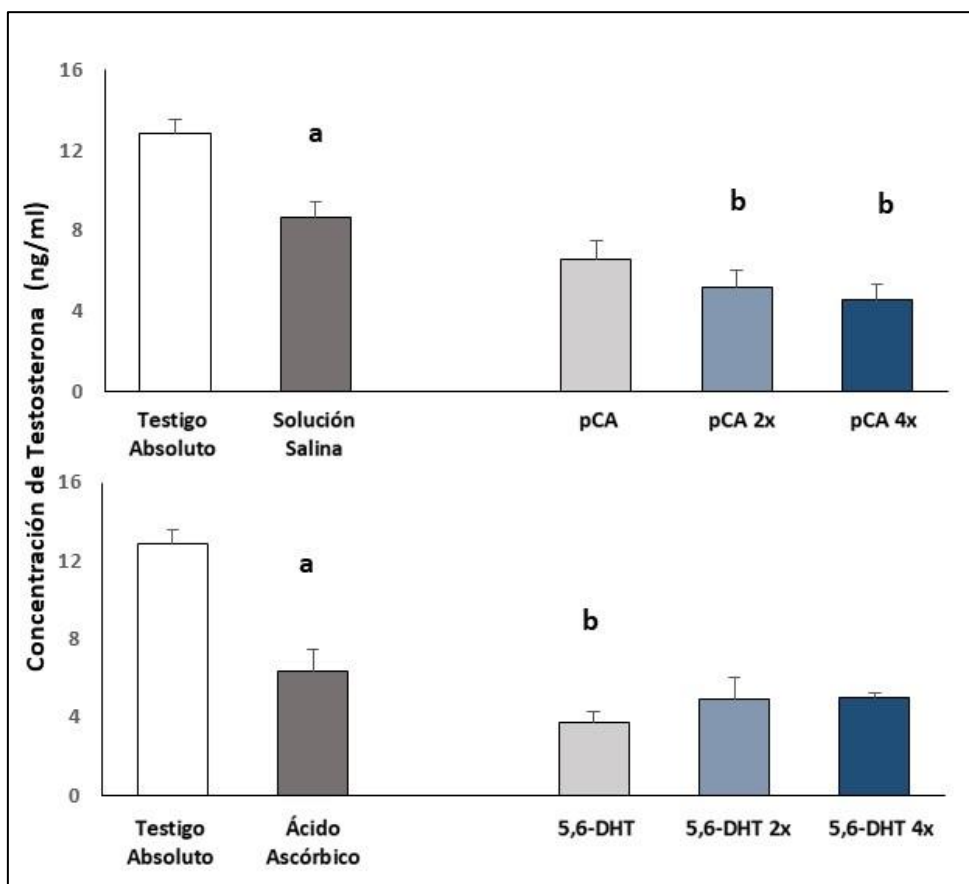


Figura 11. (Media  $\pm$  e.e.m.) de la concentración de testosterona (ng/ml) en el suero de ratas macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA), ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad, a,  $P < 0.05$  vs TA; b,  $P < 0.05$  vs SS o ASC. (Prueba de ANOVA seguida de Tukey).

En comparación con su respectivo grupo con vehículo, en los animales que se les inyectó la dosis de pCA2x y 4X la concentración de testosterona disminuyó. Este efecto se observó con la dosis más baja de 5,6-DHT (Figura 11).

## Parámetros de Calidad Espermática

### Número total de espermatozoides

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto la inyección de solución salina o de ácido ascórbico no modificó el número de espermatozoides. Un efecto similar se observó en los animales que se trataron con las diferentes dosis de 5,6-DHT o con las dosis más bajas de pCA cuando se comparó con sus respectivos grupos inyectados con vehículo (Cuadro 3).

**Cuadro 3. (Media  $\pm$  e.e.m.) del número total de espermatozoides ( $\times 10^6$ ) y porcentaje de espermatozoides anormales de ratas macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA), ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad.**

Grupo	Número	Anormales
Testigo Absoluto	9.57 $\pm$ 1.51	6.28
Solución Salina	11.01 $\pm$ 1.55	10.14
pCA	11.49 $\pm$ 1.84	12.36
pCA 2x	10.25 $\pm$ 0.89	29.84 <b>b</b>
pCA 4x	15.93 $\pm$ 3.02 <b>b</b>	31.58 <b>b</b>
Ácido Ascórbico	9.34 $\pm$ 1.86	5.36
5,6-DHT	5.38 $\pm$ 0.67	8.04
5,6-DHT 2x	11.55 $\pm$ 1.82	27.49 <b>b</b>
5,6-DHT 4x	8.55 $\pm$ 0.96	34.11 <b>b</b>

**b, P<0.05 vs. SS o ASC (Prueba de ANOVA seguida de Tukey para número de espermatozoides; Chi cuadrada para espermatozoides anormales).**

---

## Anormalidades Morfológicas del Espermatozoide

En los animales con inyección de solución salina o de ácido ascórbico, no se modificó el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas en relación con el grupo de animales testigo absoluto (Cuadro 3).

En comparación con los animales inyectados con solución salina o con ácido ascórbico, en los que se les inyectaron las dos dosis más altas de pCA o 5,6-DHT (2X o 4X), se observó el aumento en el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas (Cuadro 3).

Los cambios en la morfología del espermatozoide en función de su localización se clasificaron en espermatozoides sin cabeza, cabeza plana o cabeza de alfiler; espermatozoides con la pieza media doblada; gota citoplasmática en esta región o en el flagelo, así como flagelo doblado, corto o enroscado (Figura 12).

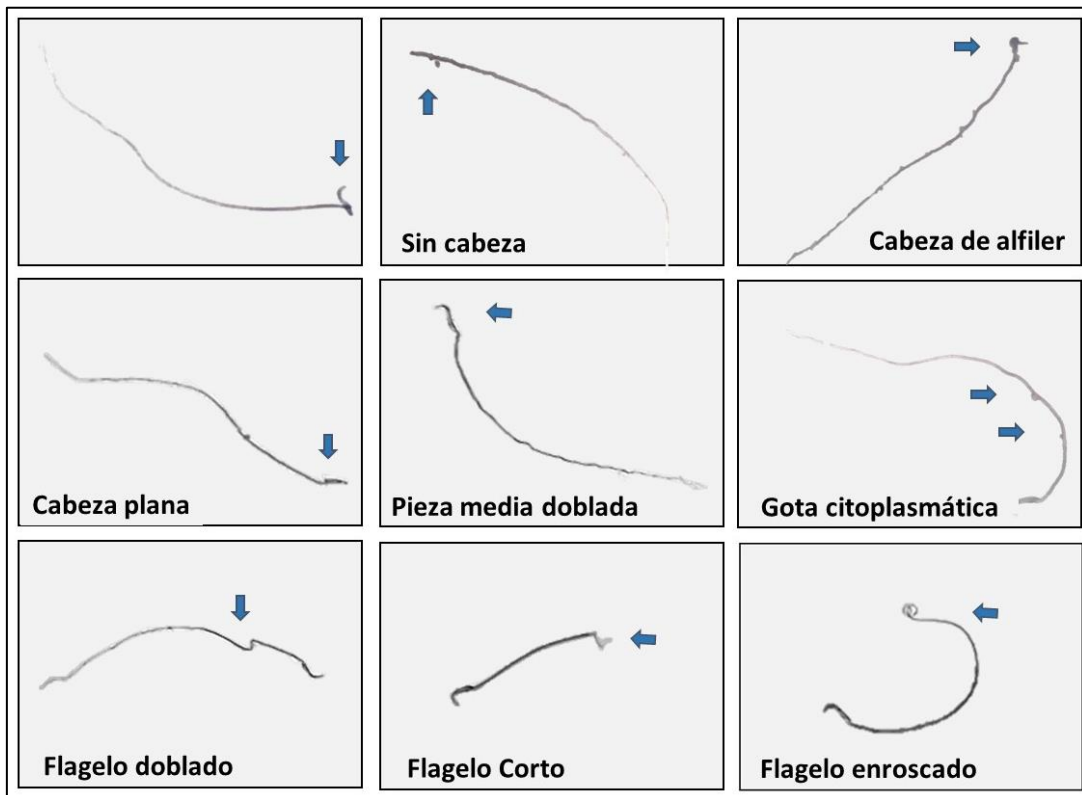


Figura 12. Microfotografías de espermatozoides de rata con anomalías morfológicas tomadas a 1000x.



En los animales inyectados con solución salina no se modificó ninguno de los tipos de anomalías morfológicas (Figuras 13, 14 y 15). Mientras que la inyección de ácido ascórbico incrementó el porcentaje de espermatozoides sin cabeza, en relación con el grupo testigo absoluto (Figura 13).

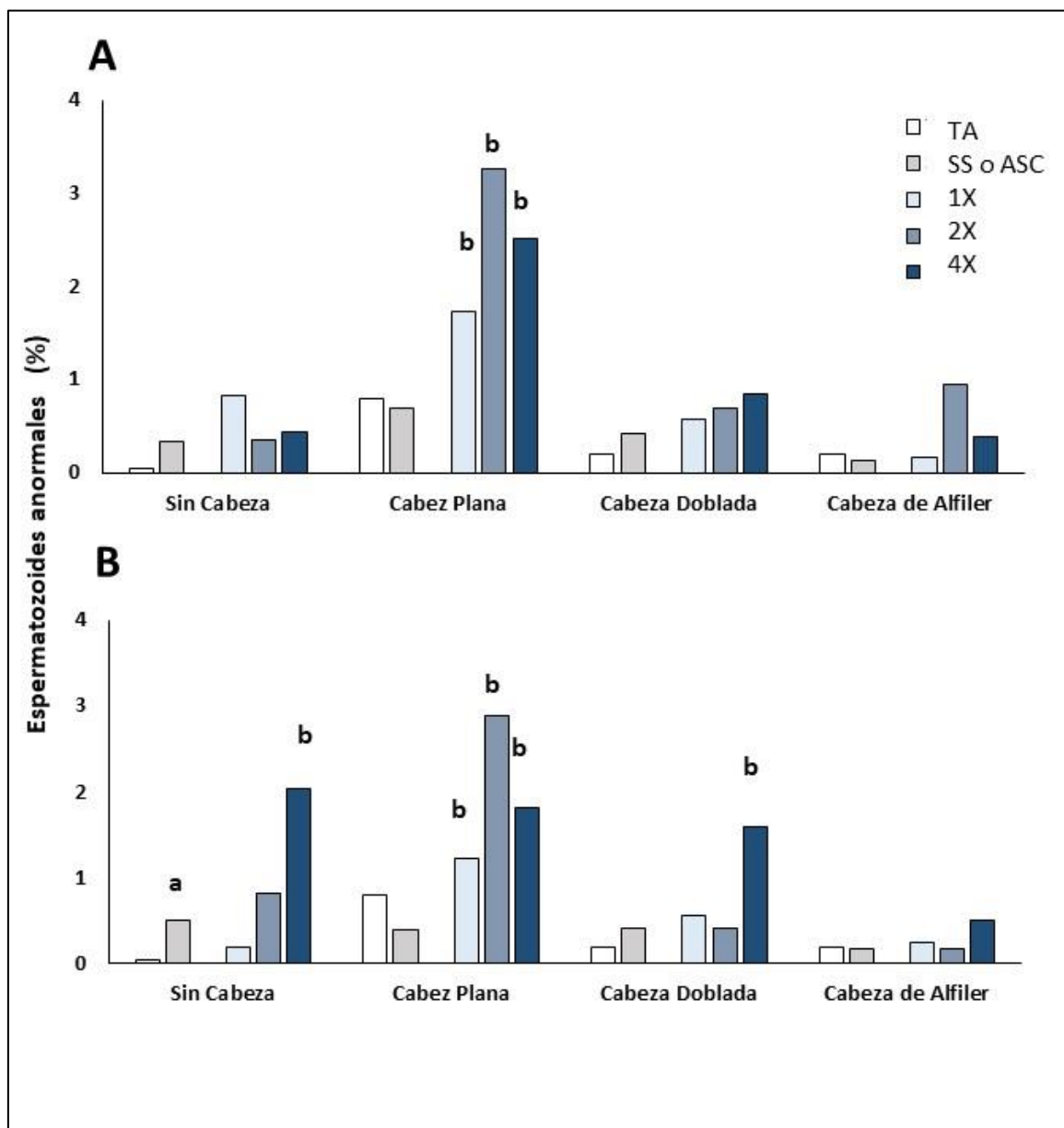
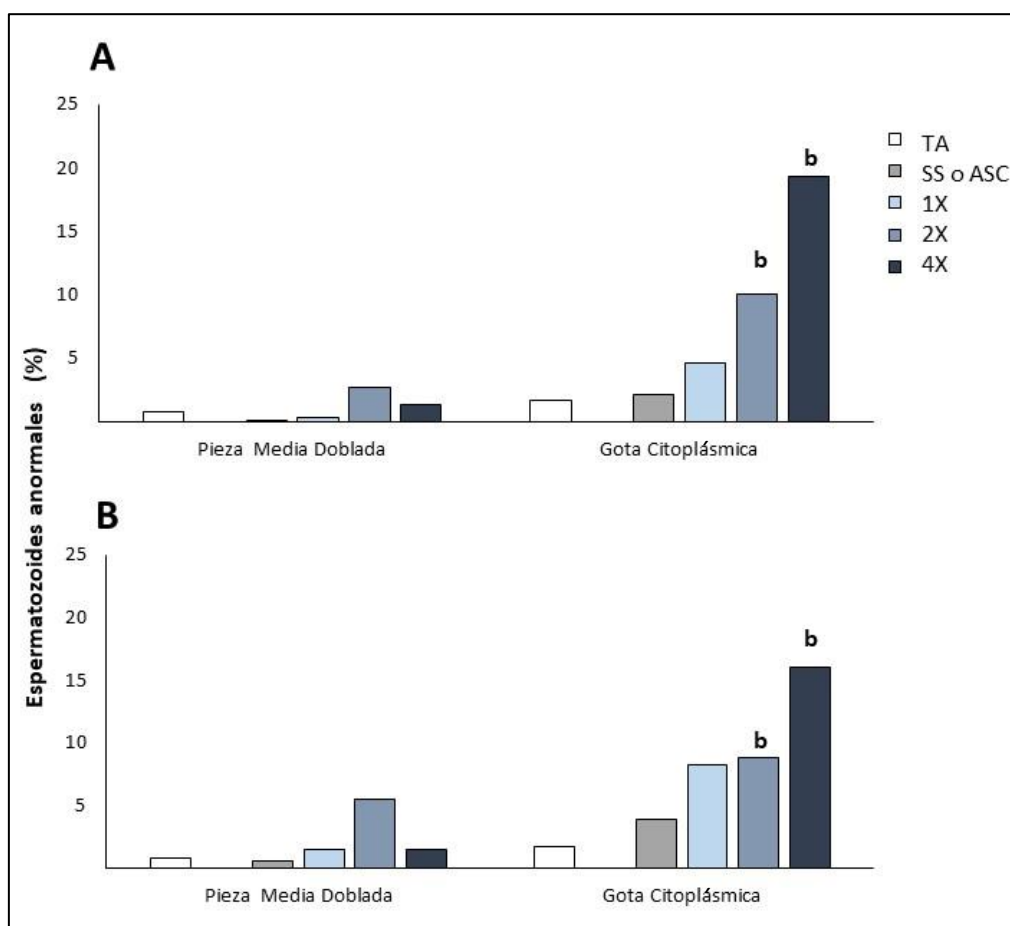


Figura 13. Anormalidades morfológicas (%) de la cabeza de espermatozoides en ratas macho testigo absoluto (TA) inyectados a los 30 días de edad con A) solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA); B) ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad. a,  $P < 0.05$  vs Testigo absoluto; b,  $P < 0.05$  vs SS o ASC. Prueba exacta de Fisher.

En los animales inyectados con las diferentes dosis de pCA o 5,6-DHT se incrementó el porcentaje de espermatozoides con cabeza plana, en comparación con su respectivo grupo con vehículo (Figura 13). Cuando se administró 5,6-DHT4X fue mayor el porcentaje de espermatozoides con cabeza doblada (Figura 13).

En comparación con sus respectivos grupos con vehículo, en los animales con inyección de las dosis más altas de pCA (2X, 4X) o 5,6-DHT (2X, 4X), se incrementó el porcentaje de espermatozoides con gota citoplásmica (Figura 14). Un efecto similar se observó en el porcentaje de espermatozoides con flagelo doblado (Figura 15).



**Figura 14. Anormalidades morfológicas de la pieza media de espermatozoides de ratas macho testigo absoluto (TA) inyectados a los 30 días de edad con A) solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA); B) ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad. b, P < 0.05 vs SS o ASC. Prueba exacta de Fisher.**

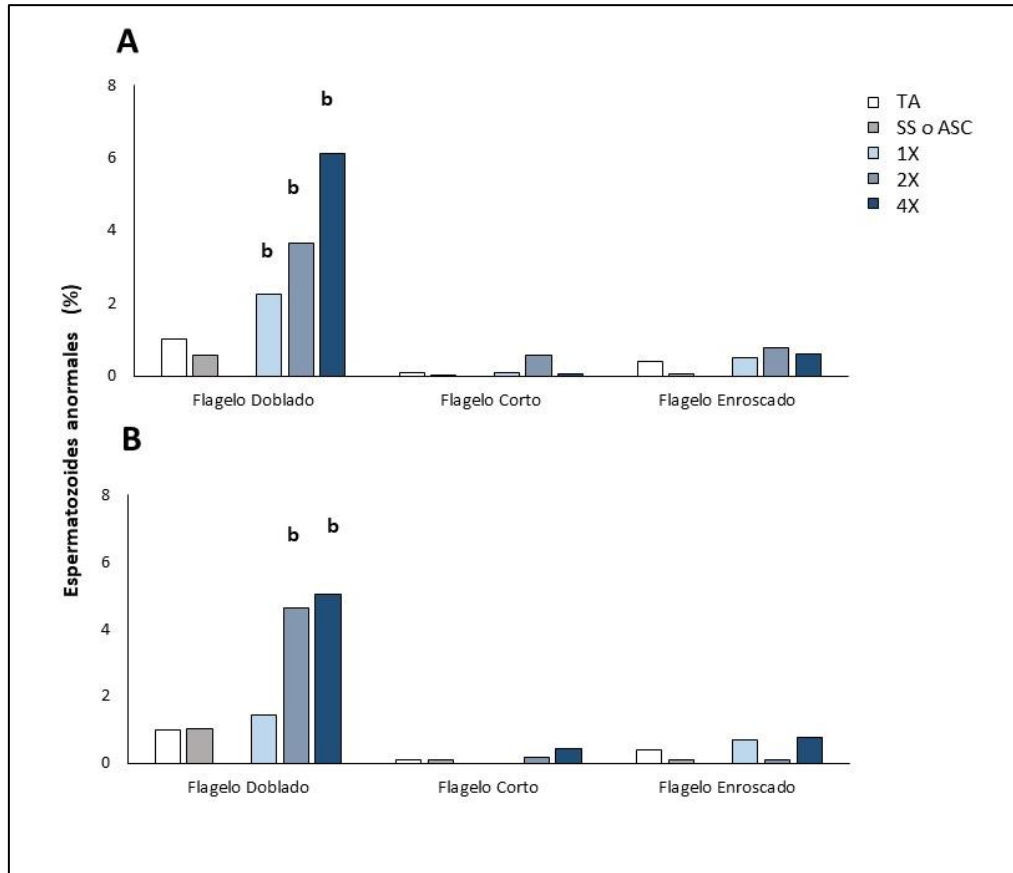


Figura 15. Anormalidades morfológicas (%) del flagelo de espermatozoides de ratas macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con A) solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA); B) ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad b,  $P < 0.05$  vs SS o ASC. Prueba exacta de Fisher.

## Movilidad espermática

La inyección de solución salina o ácido ascórbico no modificó el número de espermatozoides móviles en relación con el grupo de animales testigo absoluto. Los que fueron inyectados con las dosis más altas de pCA (2X, 4X) o 5,6-DHT (2X, 4X) disminuyó el número de espermatozoides móviles en comparación con su respectivo grupo con vehículo (Cuadro 4).

**Cuadro 4. (Media  $\pm$  e.e.m.) del porcentaje de espermatozoides móviles de ratas macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA), ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad.**

<b>Grupo</b>	<b>Móviles</b>
Testigo Absoluto	35.97 $\pm$ 3.98
Solución Salina	35.31 $\pm$ 3.06
pCA	30.54 $\pm$ 5.17
pCA 2x	22.74 $\pm$ 3.74 <b>b</b>
pCA 4x	23.76 $\pm$ 4.74 <b>b</b>
Ácido Ascórbico	41.33 $\pm$ 5.02
5,6-DHT	44.16 $\pm$ 3.56
5,6-DHT 2x	28.21 $\pm$ 2.9 <b>b</b>
5,6-DHT 4x	16.53 $\pm$ 2.4 <b>b</b>

**b, P<0.05 vs. SS o ASC (Prueba de ANOVA seguida de Tukey).**

## **Viabilidad de los Espermatozoides**

### **Integridad de la Membrana**

La inyección de solución salina no modificó el porcentaje de espermatozoides SyBR14+, mientras que la de ácido ascórbico lo incrementó en relación con el grupo de animales sin tratamiento (Figura 16).

En los animales inyectados con pCA 2X o 4x, el porcentaje de espermatozoides SyBR14 + disminuyó en comparación con el grupo de animales inyectados con solución salina (Figura 16 A). Un efecto similar se observó en los grupos de animales inyectados con 5,6-DHT 2X y 4X (Figura 16 B).

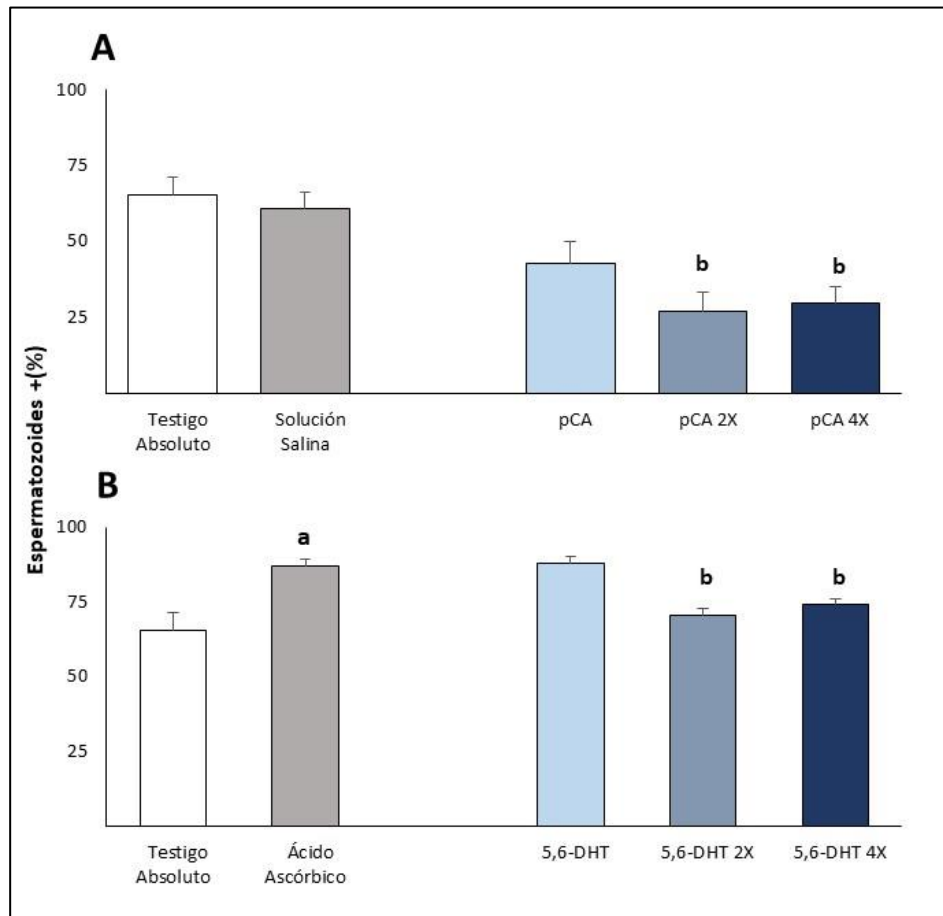


Figura 16. (Media  $\pm$  e.e.m.) del porcentaje de espermatozoides SyBR14 + de ratas macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA), ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad. a,  $P < 0.05$  vs Testigo absoluto; b,  $P < 0.05$  vs SS o ASC (Prueba de ANOVA seguida de Tukey).

## Actividad Mitocondrial

En los animales inyectados con solución salina o ácido ascórbico no se modificó el porcentaje de espermatozoides Resazurin+, en comparación con el grupo testigo absoluto.

En comparación con su grupo con vehículo, en los que se inyectó pCA 2x o 4x disminuyó el porcentaje de espermatozoides Resazurin+ (Figura 17 A). Mientras que la inyección de 5,6-DHT no modificó este parámetro en relación con el grupo tratado con ácido ascórbico (Figura 17 B).

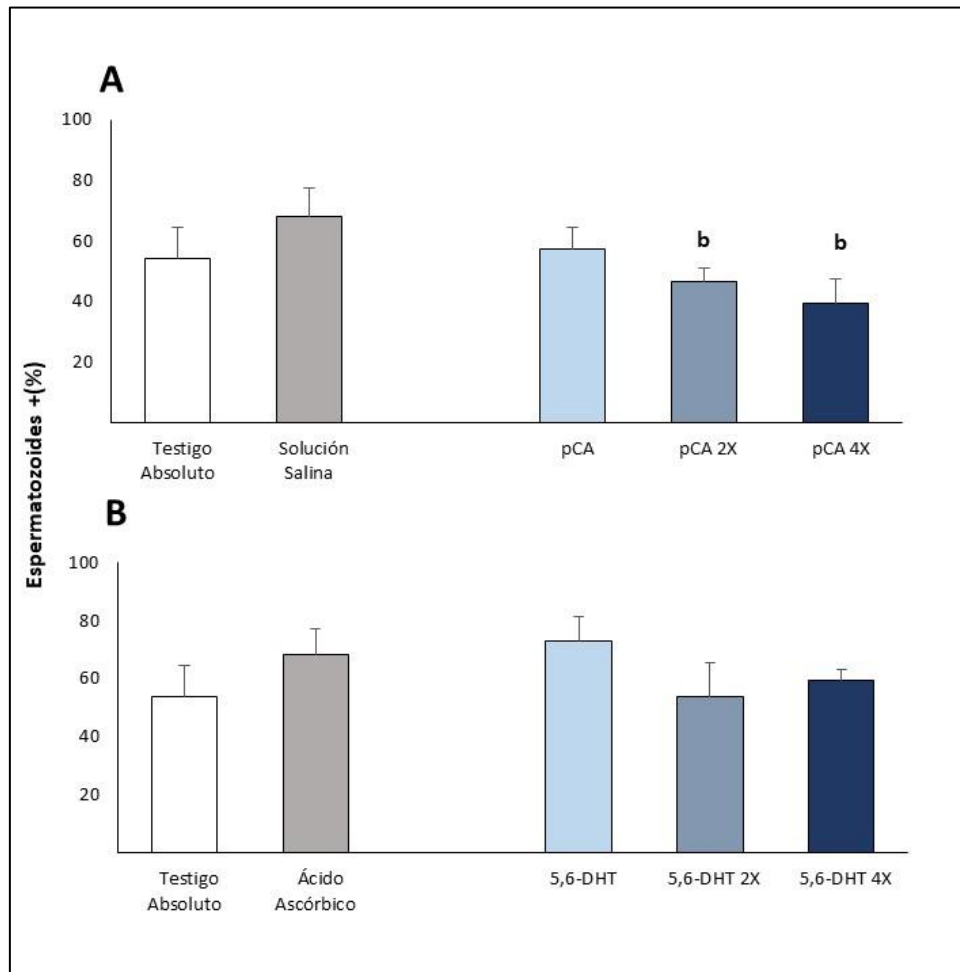


Figura 17. (Media  $\pm$  e.e.m.) del porcentaje de espermatozoides Resazurin + de ratas macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA), ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad. b,  $P < 0.05$  vs SS o ASC (Prueba de ANOVA seguida de Tukey).

### Caspasas activas 3 y 7 en Espermatozoides

La inyección de solución salina o con ácido ascórbico no modificó el porcentaje de espermatozoides con Caspasas 3 y 7 activas (Flica+). En los animales con la inyección de la dosis más baja de pCA incrementó el porcentaje de células positivas al marcador de caspasas activas mientras que la inyección de 5,6-DHT en cualquiera de sus concentraciones no modificó el porcentaje de espermatozoides Flica + (Figura 18).

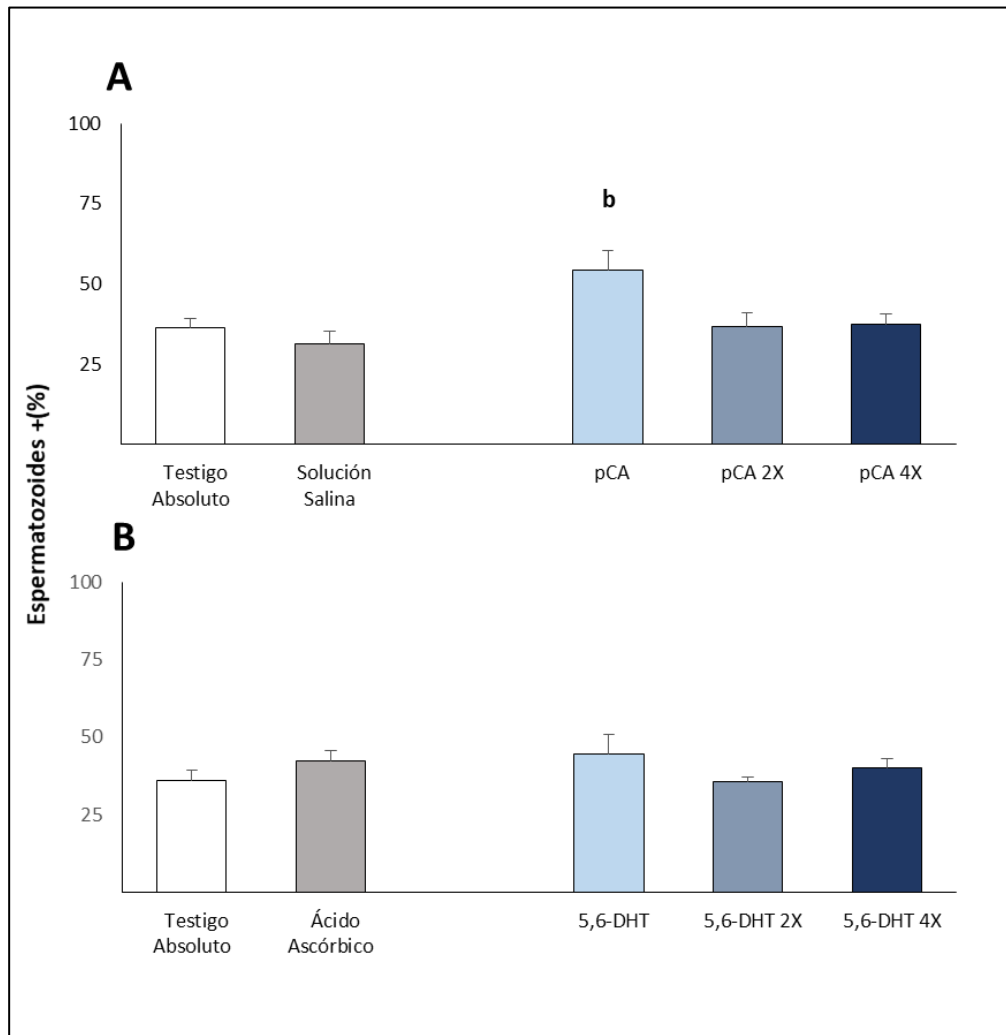


Figura 18. (Media  $\pm$  e.e.m.) de porcentaje de espermatozoides FliC + de ratas macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA), ácido ascórbico (ASC) o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad. b,  $P < 0.05$  vs SS o ASC (Prueba de ANOVA seguida de Tukey).

## Caspasas activas 3 y 7 en el testículo

### Western Blot

Los testículos de los animales Testigo Absoluto o inyectados con los vehículos (solución salina o ácido ascórbico), expresan las proteínas Caspasa 3 (14kDa) y Caspasa 7 (21kDa)(Figura 19A).

Con base en el análisis densitométrico y considerando como referencia la expresión de una proteína constitutiva,  $\beta$ -actina (51kDa), no se modificó la expresión de Caspasas 3 y 7 en los testículos de animales inyectados con solución salina o ácido ascórbico (Figura 19B y 19C).

En el tejido testicular de los animales 5,6-DHT4X se observó incremento de la expresión de la Caspasa 7 (Figura 19C).

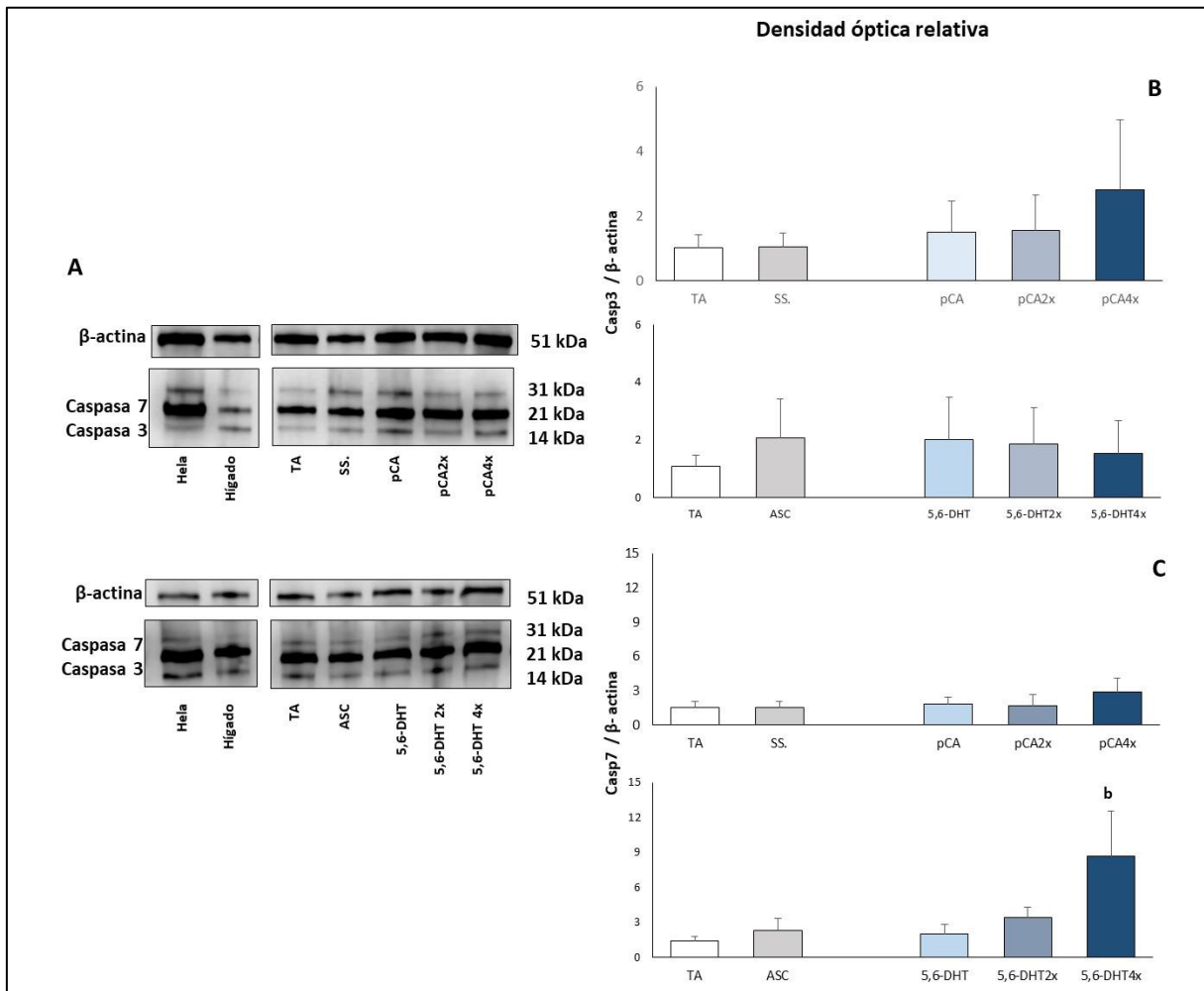


Figura 19. Caspasas 3 y 7 activas en espermatozoides de ratos macho testigo absoluto (TA), inyectados a los 30 días de edad con solución salina (SS), p-cloroanfetamina (pCA), ácido ascórbico (ASC), o con 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y sacrificados a los 65 días de edad. A). Western Blot B). Densidad óptica relativa de caspasas 7 activa / $\beta$ actina), C). Densidad óptica relativa de caspasas 3 activa / $\beta$ actina) (media  $\pm$  e.e.m.), n=3 ensayos por triplicado. b,  $P < 0.05$  vs SS o ASC (Prueba de ANOVA seguida de Tukey).



---

## DISCUSION DE RESULTADOS

La inhibición de la actividad serotoninérgica del testículo, inducida por la administración de pCA o su metabolito, la 5,6-DHT disminuye la secreción de testosterona y los parámetros de calidad espermática. La disminución en la concentración de testosterona en suero y la movilidad; el incremento del número de los espermatozoides con anomalías morfológicas y del porcentaje de estos con daño en la membrana y en la actividad mitocondrial apoya esta interpretación.

La disminución de la concentración de testosterona en los animales con inyección intratesticular de solución salina o ácido ascórbico, podría ser atribuido al ingreso del volumen de líquido producto de la manipulación experimental, se ha reportado que un volumen de hasta 50  $\mu$ l no produce daño en el túbulo seminífero de ratas adultas (Russell et. 1987) por el contrario, en casos de varicocele o hematoma en donde se acumula líquido en el interior del testículo se puede acompañar de la disminución en la concentración de testosterona (Sharpe y Cooper 1983), con base en estos resultados es posible relacionar en los animales con inyección de SS o ASC, disminuyera la concentración de testosterona.

A diferencia de lo reportado en bibliografía, en nuestro estudio, la inyección de 20 $\mu$ l de solución salina en el testículo de rata prepúber disminuyó la concentración de testosterona, existe la posibilidad que al realizar la manipulación a los 30 días de edad se afectara la estructura del testículo, particularmente a la población de células de Leydig, ya que Picut y colaboradores (2014) han descrito que en el periodo de 30-35 días del desarrollo postnatal el número de células de Leydig inmaduras es máximo y ocurre un recambio por células de Leydig maduras, que concluye en el día 45 del desarrollo postnatal. Aunado a esto la capacidad de síntesis de las células de Leydig inmaduras es menor.

La disminución en la concentración sérica de testosterona que se observó en los animales tratados con pCA, puede ser resultado de la desregulación del sistema serotoninérgico del

---

testículo. En apoyo a esta idea se ha mostrado que cuando en la rata macho prepúber se administra pCA por vía sistémica (Aragón et al. 2005) disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo. Aunado a esto se ha observado que la pCA inhibe la actividad de las enzimas limitante en su síntesis y metabolismo, la triptófano hidroxilasa (Costa 1972; Sanders-Bush y Gallager 1974) y monoamino oxidasa (Ellis et al., 1972), respectivamente; disminuyen la concentración de 5-HT (Costa 1972; Sanders-Bush y Gallager 1974) y de su metabolito, el 5-HIAA. Efectos que se mantiene por hasta por 30 días (Baumgarten y Lachenmayer 2004). Conjuntamente estas evidencias nos permiten plantear que en los animales con inyección intratesticular de pCA se modificó la síntesis de serotonina por la célula de Leydig y como consecuencia se afectó la esteroidogénesis.

El hecho de que en los animales con inyección de 5,6-DHT<sub>2x</sub> y 4x, la disminución de testosterona en suero no fuera significativa, no se descarta la posibilidad de que la concentración intratesticular de este andrógeno disminuyera. Si bien el primer punto de modulación de la espermatogénesis es el eje hipotálamo-hipófisis, es muy importante considerar el nivel de regulación intratesticular, donde se establecen mecanismos de comunicación paracrina entre el túbulo seminífero y el intersticio. Se reporta que la concentración de testosterona testicular es 10 veces mayor a la del suero (Turner et al., 1984). Además, el éxito de la espermatogénesis depende principalmente de la testosterona intratesticular y cuando en la gónada disminuye esta hormona, se producen efectos adversos en la espermatogénesis (Awoniyi et al., 1990).

Si bien la pCA y 5,6-DHT en principio ambas inhiben al sistema serotoninérgico, es factible que tal acción la ejerzan por mecanismos diferentes. Es posible que en los animales tratados con 5,6-DHT, la disminución de los parámetros de calidad espermática sea el resultado de la modificación de la información neural que transcurre por el nervio espermático superior. Principalmente de las fibras serotoninérgicas que arriban al testículo, vía el nervio espermático, fuente importante de serotonina para el órgano (Collu 1978; Campos et al.

---

1990a; Gerendai et al. 2000). La 5,6-DHT es una neurotóxina selectiva de las fibras serotoninérgicas. En el SNC, la administración intraventricular de 5,6-DHT induce la formación de especies reactivas de oxígeno que dañan las proteínas y los lípidos de la membrana (Jimenez del rio y Velez-pardo 2007) y como consecuencia las degeneración de las fibras serotoninérgicas (Ayala et al. 2015; Collu 1978; Commins et al. 1987; Kalla et al. 1978), lo que ocasionó la desregulación del funcionamiento del túbulo seminífero y de la espermatogénesis.

El daño en las fibras serotoninérgicas posiblemente se acompañó de la desregulación del sistema serotoninérgico del testículo. En relación a esto, cuando en la rata adulta se realiza la sección del nervio espermático, la concentración de 5-HT en la cápsula del testículo disminuye (Campos et al., 1990), un efecto similar se observa cuando se induce la denervación farmacológica por la administración de 5,6-DHT (Gerendai et al. 1996), o por 5,7-DHT (Csaba et al. 1998). En este sentido, se reporta que la sección del nervio espermático superior induce daño en las células del epitelio seminífero sin cambios en la concentración de testosterona (Chow et al. 2000).

En relación a la pCA, también es posible que dañara las fibras serotoninérgicas por un mecanismo similar, ya que se reporta que los efectos tóxicos de la pCA son mediados por la formación endógena de 5,6-DHT (Commins et al. 1987).

La posibilidad de que la modificación del sistema serotoninérgico del testículo modificara el funcionamiento de la célula de Leydig, se sustenta en la evidencia que muestra que la 5-HT en las células de Leydig modula la esteroidogénesis (Tinajero et al. 1993). En el animal prepúber se le atribuye un papel estimulante en la regulación de la producción de testosterona vía la activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> (Csaba et al. 1998). Por lo tanto es posible que en los animales que se les administró pCA o 5,6-DHT se modificó la actividad de las enzimas esenciales que participan en la esteroidogénesis y como consecuencia disminuyó la concentración de testosterona. Un efecto similar en la producción de testosterona se observa en la rata macho cuando se administra, un derivado de las anfetaminas, el 3,4-

---

metilenedioximetanfetamina (éxtasis) (Dickerson et al., 2008), que comparte propiedades en su estructura y acción con la pCA (Ayala 2009).

En relación a la posibilidad de que las anfetaminas modifican la actividad de las enzimas de la esteroidogénesis, se encuentran los resultados de Tsai y colaboradores (1997), quienes mostraron que en el cultivo de células de Leydig de rata, la adición al medio, de anfetamina disminuye la producción de testosterona y la actividad de la enzima citocromo P450<sub>SCC</sub>, que escinde la cadena lateral del colesterol para producir pregnenolona y de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), que participa en la transformación de progesterona a testosterona (Tsai et al. 1996; 1997).

También es posible que el daño que ocasionaron las neurotoxinas en las fibras serotoninérgicas que transcurren por el nervio espermático, modificara la esteroidogénesis y como consecuencia la concentración de testosterona. En la rata prepúber, la sección del nervio espermático superior (Huo et al. 2010) o la denervación quirúrgica o farmacológica inducida por la administración de 5,6-DHT (Gerendai et al. 1996), disminuye la producción de testosterona. Otra posibilidad es que el daño en la inervación que llega al testículo inducido por la pCA o 5,6-DHT, reduce la respuesta del testículo a la acción de la LH, hormona que al unirse a sus receptores de membrana en la célula de Leydig regula la producción de andrógenos (Roser 2008), ya que se ha observado que cuando se secciona el nervio espermático superior, disminuye el número de receptores a la LH (Campos et al. 1993).

La desregulación del sistema serotoninérgico del testículo inducido por la inyección intratesticular de pCA o 5,6-DHT generó cambios diferenciales en la secreción de FSH por la hipófisis, debido a que la concentración de esta gonadotropina disminuye en los animales que se les administró pCA y se incrementa en los que se inyectaron con 5,6-DHT. No se tiene una explicación a este hecho, sin embargo, se piensa que en estos animales, se modificó la actividad de la célula de Sertoli y como consecuencia la secreción de inhibina y activina, hormonas que actúan en la hipófisis y modulan la secreción de FSH (Winters y Moore 2004).

---

La posibilidad de que en estos animales se modificó la actividad de la célula de Sertoli se sustenta en los resultados de Syed y colaboradores (1999), quienes plantean que la célula de Sertoli es blanco de la serotonina.

En el presente estudio, la inhibición del sistema serotoninérgico del testículo se acompañó de modificaciones en los parámetros de calidad espermática, debido a que disminuyó el porcentaje de espermatozoides móviles y se incrementó el número de espermatozoides con anomalías morfológicas. Estos efectos en la mayoría de los casos pueden ser consecuencia de la disminución de la concentración de testosterona, hormona esencial en el mantenimiento de la espermatogénesis, vía su acción en la célula de Sertoli, que expresa los receptores para ambas hormonas (Walker y Cheng 2005). Además cuando se dañan selectivamente las células de Leydig o se interrumpe la producción de testosterona y la interacción con su receptor en la célula de Leydig, se generan daños en la maduración de la célula germinal (Ruey-sheng et al. 2009).

Es posible que el incremento en el porcentaje de formas anormales y la disminución de espermatozoides móviles que se observó en los animales con inyección intratesticular de pCA o 5,6-DHT, tienen su origen durante la espermiogénesis en el epitelio seminífero o en su maduración cuando migra el espermatozoide a través del epidídimo.

En los animales que se les administraron pCA o 5,6-DHT, la menor concentración de testosterona sérica, o la intratesticular, se asocia con la disminución de espermatozoides móviles. Este efecto posiblemente se relaciona con la modificación de la función del epidídimo, órgano en el cual los espermatozoides adquieren la movilidad (Robaire y Hinton 2014). Esta idea se plantea debido a que la actividad del epidídimo es andrógeno dependiente (Elkis et al. 2013; Falvo et al. 2015). En apoyo a esta idea, cuando en la rata disminuye la producción de testosterona, los espermatozoides son inmóviles y pierden su capacidad fertilizante (Dyson, y Orgebin-crist 1973).

---

El incremento en las formas anormales de los espermatozoides que se observó en los animales que se les inyectó pCA o 5,6-DHT, también se asocia a la disminución en la producción de testosterona. La concentración de este andrógeno es alta y viaja al epidídimo vía los conductos eferentes (Turner 1991), para mantener su funcionamiento. La proteína  $\beta$ -defensina 126 (Fernandez-Fuertes et al. 2016) y los lípidos de membrana (Kim et al. 2017) son moléculas relacionadas con la diferenciación de los espermatozoides y su disminución se asocia con el incremento de espermatozoides con anomalías morfológicas.

La menor producción de testosterona es posible que generara la desregulación del funcionamiento del epidídimo e impactará negativamente el desarrollo de los espermatozoides, ya que se reporta que casi todos los espermatozoides que se encuentran en la cabeza del epidídimo tienen una gota citoplásmica y durante su tránsito por éste, la gota migra desde la porción proximal a la distal para posteriormente eliminarse (Hermo et al. 1988; Robaire y Hinton 2014). Este proceso de migración de la gota no se completó en los animales tratados con pCA (2X o 4X) o 5,6-DHT (2X o 4X), debido a que en un alto porcentaje de espermatozoides se observó la gota citoplásmica en la región media del flagelo, lo que indica un estadio de maduración incompleta como resultado de la alteración de la función epididimal. Aunado a esto, cuando en la rata disminuye la actividad androgénica se incrementa el porcentaje de espermatozoides que retienen la gota citoplásmica (Henderson et al. 2005).

En los animales con inyección intratesticular de pCA (2X o 4X) o 5,6-DHT (2X o 4X), se observó una relación entre el incremento de formas anormales de los espermatozoides y la disminución de la movilidad. Entre las anomalías morfológicas que se observaron fue el flagelo doblado y gota citoplásmica, eventos que posiblemente impactaron negativamente la movilidad de los espermatozoides. La anomalía en el flagelo es importante ya que estos espermatozoides no pueden desplazarse. En bibliografía se sustenta que existe correlación entre las anomalías morfológicas con la motilidad, particularmente en la pieza media y el flagelo doblado o enroscado (Varner 2008).

---

La disminución en el porcentaje de espermatozoides SyBR14+ en los animales inyectados con pCA (2X o 4X) o 5,6-DHT (2X o 4X), indica que en tales células la integridad de la membrana está dañada y no son viables, debido a que este fluorocromo tiene la capacidad de atravesar membranas intactas y de unirse al ADN de los espermatozoides vivos o viables (Garner et al. 1994). Es posible que este daño a la membrana de los espermatozoides sea el resultado de la modificación del microambiente del epidídimo asociado a la disminución en la producción de testosterona. En apoyo a esta idea se ha mostrado que el espermatozoide es vulnerable a las especies reactivas de oxígeno, debido a que su membrana plasmática tiene una alta proporción de ácido grasos poli-insaturados, susceptibles a los efectos de las especies reactivas de oxígeno (Storey 1997); el espermatozoide al carecer de citoplasma pierde enzimas antioxidantes que evitan el daño por este mecanismo (Williams et al. 1998); en el epidídimo se proporcionan moléculas enzimáticas y no enzimáticas cuyas funciones son la protección contra el daño oxidativo (Chabory et al. 2009), una de ellas es la glutatión peroxidasa 5, que protege del estrés oxidativo y se expresa bajo el control androgénico en la cabeza del epidídimo (Ghyselinck et al. 1993).

Tales eventos posiblemente contribuyeron a la disminución de la movilidad de los espermatozoides en estos animales, ya que se plantea que la integridad y adecuado funcionamiento de la membrana del espermatozoide se correlaciona positivamente con la movilidad. Así mismo, la disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles posiblemente se asocie a la modificación de la actividad mitocondrial, como se observó en los animales con inyección intratesticular de pCA (2x o 4 X), ya que la movilidad de los espermatozoides depende de la función mitocondrial.

Se ha descrito que en el testículo la falta o disminución de factores endocrinos o interacción entre las células adyacentes promueve el desarrollo de la apoptosis (Tres et al. 2004 a), Se ha mostrado en el estudio de Tesarik y colaboradores 2002, la disminución de FSH o testosterona, incrementa el porcentaje de células germinales o de Sertoli que presentan activación de las caspasas 3 y 7, ejecutoras de la apoptosis, estos estudios nos permiten proponer que la

---

desregulación endocrina generada por sérica o intratesticular genere el incremento de la expresión de caspasas 3 y 7.

Se ha demostrado que la inhibición de la actividad serotoninérgica disminuye la concentración sérica de testosterona y esto se relaciona con mayor porcentaje de células germinales en el túbulo positivas para túnel, indicativo de muerte celular (Aragón et al. 2005; Méndez-Palacios et al. 2016).

La disminución de la concentración de testosterona sérica o intratesticular puede ser la causa de la expresión de las proteínas caspasa 3 y 7 debido a que los andrógenos, vía su receptor pueden modular vías de señalización genómicas o no genómicas que conllevan a la activación de procesos apoptóticos (Vasconsuelo et al. 2011), ejemplo de esto se describió en un modelo de ratón donde la falta de andrógenos produce supresión de la espermatogénesis, relacionada con la activación de la apoptosis de los espermatozoides (Sinha-hikim et al. 2005).

Con base en lo expuesto acerca de la testosterona y la movilidad y anormalidades morfológicas, es posible que la disminución de testosterona también sea reflejo del incremento en la activación de proteínas relacionadas con la apoptosis, en las células del tejido testicular, y posiblemente en los espermatozoides de los animales inyectados con pCA o 5,6-DHT.

Reportes en bibliografía sugieren que la falta o disminución de la testosterona puede generar en las células de Sertoli la falta de activación de las proteínas relacionadas con la mitosis y respuesta a AMPc, por tanto producir indirectamente el desarrollo de las células germinales (Fix et al. 2004). O directamente en alguna enzima o proteína en los espermatozoides, por ejemplo la actividad de la enzima glutatión 5-peroxidasa y afectar la integridad del ADN en los espermatozoides (Chabory et al. 2009).



---

Incluso pudo afectar el funcionamiento de órganos anexos al testículo, como el epidídimo, Elkis 2013, propone que la disminución de testosterona altera la proteína TMF en el epidídimo. O el aminoácido d-aspartato, molécula relacionada con la formación de receptores a andrógenos en el epidídimo (Falvo et al. 2015), alterando el funcionamiento del epidídimo y el desarrollo de los espermatozoides en el ratón.

Sinha-hikim y colaboradores (2005) menciona que solo la eliminación de la testosterona produce la eliminación de la espermatogénesis por la activación de la apoptosis. En el presente estudio solo los grupos tratados con las dosis más elevadas de pCA (4x) o 5,6-DHT (4x) tuvieron mayor expresión de las caspasas 3 y 7 respectivamente, cuando se analizó el tejido testicular. No así en los espermatozoides, posiblemente porque la disminución de la concentración de testosterona no fuera suficiente para incidir sobre estos directamente.

Existe la posibilidad que la disminución de la concentración de testosterona afectara las células de Sertoli o Leydig y de este modo afectar la espermatogénesis, en el presente estudio la inyección de pCA (4x) o 5,6-DHT (4x) incrementó la expresión de caspasas 3 o 7 en diferente magnitud, posiblemente como resultado de la vía de activación del proceso de apoptosis que cada fármaco estimula en las células de Leydig o de Sertoli en el testículo.

Se ha descrito que la expresión de caspasa 3 se relaciona con la fragmentación del ADN (Wolf et al. 1999) y la caspasa 7 con el desarrollo de estrés oxidativo (Grunewald et al. 2009). Tomando en consideración esto, es posible que en el presente estudio, la administración de pCA haya producido la activación de las caspasa 3 y en consecuencia la fragmentación de ADN. Mientras que la 5,6-DHT produjo principalmente estrés oxidativo por la formación de especies reactivas a oxígeno (Sinhababu y Ghosh 1985; Singh et al. 1990). Incrementando la expresión de la caspasa 7 (Wolf et al. 1999).

---

## **CONCLUSIONES**

Conjuntamente los resultados permiten plantear que la administración de pCA o 5,6-DHT, disminuye la producción de testosterona y modifica los parámetros de calidad espermática, como resultado de la desregulación de la espermatogénesis o del funcionamiento del epidídimo, donde se llevan a cabo eventos de maduración del espermatozoide.

---

## PERSPECTIVAS

1. En el presente estudio se observó disminución de las funciones del testículo y de la calidad espermática, el incremento de proteínas proapoptóticas debe ser analizado posteriormente.
2. Con base en los resultados obtenidos, se propone incrementar el tiempo de exposición y/o la dosis administrada de los inhibidores serotoninérgicos, con el objetivo de comprobar la idea que la inhibición serotoninérgica se relaciona con el incremento de la actividad de caspasas activas.
3. Así mismo se propone analizar la expresión y actividad de:
  - A) Proteínas relacionadas con la esteroidogénesis y la maduración de los espermatozoides, para describir la relación entre las células de Leydig y de Sertoli con el desarrollo de las células germinales.
  - B) Proteínas apoptóticas para discriminar cuál de las dos vías se activa y de esta forma proponer un mecanismo específico en la disminución de la calidad espermática.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abel M. H., Charlton H.M., Huhtaniemi I. Pakarinen P., Kumar T. R. y Christian H. C. 2013. "An Investigation into Pituitary Gonadotrophic Hormone Synthesis, Secretion, Subunit Gene Expression and Cell Structure in Normal and Mutant Male Mice." *Journal of Neuroendocrinology* 25: 863–75.
- Abel M. H., Wootton A.N., Wilkins V., Huhtaniemi I., Knight Ph.G. Charlton H. M. 2014. "The Effect of a Null Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene on Mouse Reproduction " 141 : 1795–1803.
- Aminsharifi A., Monsef A., Noorafshan A., Karbalay-Doust S., Jafarinezhad Z., Koohi-Hosseiniabadi O., y Molaei A. Effects of Intratesticular Hematoma on Testis Microstructure, Spermatogenesis, and Testosterone Production: Defining a Cutoff Point for Significant Intratesticular Hematoma. *Urology* 118:80-86.
- Amory J. K., y Bremner W. 2001. "Endocrine Regulation of Testicular Function in Men: Implications for Contraceptive Development." *Molecular and Cellular Endocrinology* 182: 175–79.
- Amoss M., Burgus R., Blackwell R., Vale W., Fellows R., y Guillemin R. 1971. "Purification, Amino Acid Composition and N-Terminus of the Hypothalamic Luteinizing Hormone Releasing Factor (LRF) of Ovine Origin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44: 205–10.
- Aragón M. A., Ayala M. E., Marín M., Avilés A., Damián-Matsumura P.G.y Domínguez R. 2005. "Serotonergic System Blockage in the Prepubertal Rat Inhibits Spermatogenesis Development." *Reproduction* 129: 717–27.
- Awoniyi C. A., Santulli R., Sprando R.L., Ewing L.L., y Zirkin B. R. 1990. "Restoration of Advanced Spermatogenic Cells in the Experimentally Regressed Rat Testis: Quantitative Relationship to Testosterone Concentration within the Testis." *Endocrinology* 124: 1217–23.
- Ayala, M. E., Velázquez D., Mendoza J., Monroy J., Domínguez R., M Cárdenas, and A Aragón. 2015. "Dorsal and Medial Raphe Nuclei Participate Differentially in Reproductive Functions of the Male Rat." *Reproductive Biology and Endocrinology* 13: 1–12.
- Ayala M. E., 2009. "Brain Serotonin, Psychoactive Drugs, and Effects on Reproduction." *Central Nervous System Agents in Medicinal* , 258–76.
- Azmítia E. Ch. 1999. "Serotonin Neurons, Neuroplasticity, and Homeostasis of Neural Tissue." *Neuropsychopharmacology* 21: 33S–45S.
- Barenys M. Gómez-Catalan J., Camps L., Teixido E., de Lapuente J., González-Linares J. Serret J., Borrás M., Rodamilans M., Llobet . 2010. "MDMA (Ecstasy) Delays Pubertal Development and Alters Sperm Quality after Developmental Exposure in the Rat." *Toxicology Letters* 197. Elsevier Ireland Ltd: 135–42.
- Barenys M., Macia N., Camps L., de Lapuente J., Gómez-Catalan, González-Linares J., Borrás M. Rodamilans M., y Llobet J. M. 2009. "Chronic Exposure to MDMA (Ecstasy) Increases DNA Damage in Sperm and Alters Testes Histopathology in Male Rats." *Toxicology Letters* 191: 40–46.
- Baumgarten H.G., Lachenmayer L. 2004. "Serotonin Neurotoxins--Past and Present." *Neurotox Res* 6 : 859–614.
- Baynes J.W., Dominczack M.H. 2006. *Bioquímica*. 2da ed. madrid españa: Medica Elsevier.
- Berg J.M., Stryer I., Tymoczko J., Macarulla J.M. 2008. *Bioquímica*. 8va ed. España: Revertè.

---

Bonde, J. P. E., Ernst E., Jensen T. K, Hjollund N.H., Kolstad H., Henriksen T. B. Giwercman Th. Sch. A., Olsen J., y Skakkebaek N. E. 1998. "Relation between Semen Quality and Fertility: A Population-Based Study of 430 First-Pregnancy Planners." *Lancet* 352: 1172–77.

Breed W.G., y Setchell B.P. 2006. "Anatomy, Vasculature and Innervation of the Male Reproductive Tract." In *Physiology of Reproduction*, edited by Knobil y Neill, 3rd ed., 771–826. Elsevier Academic Press.

Burger, L. L., Haisenleder D. J., Dalkin A.C., y Marshall J.C. 2004. "Regulation of Gonadotropin Subunit Gene Transcription." *Journal of Molecular Endocrinology* 33: 559–84.

Buzek S.W., Sanborn B.M. 1988. "Increase in Testicular Androgen Receptor during Sexual Maturation in the Rat." *Biol Reprod* Aug 39: 39–49.

Calizo L. H., Akanwa A., Ma X., Pan Y. Zh., Lemos J. C. , Craige C., Heemstra L. A., y Beck Sh. G. 2011. "Raphe Serotonin Neurons Are Not Homogenous: Electrophysiological, Morphological and Neurochemical Evidence." *Neuropharmacology* 61. Elsevier Ltd: 524–43.

Campos M. B., Vitale M. L., Calandra R. S., y Chiocchio S. R. 1990. "Serotonergic Innervation of the Rat Testis." *Journal of Reproduction and Fertility* 88: 475–79.

Campos M. B., Vitale M. L., Ritta M. N., Calandra R. S., y Chiocchio S. R. 1990. "Catecholamine Distribution in Adult Rat Testis Catecholamin-Verteilung Im Hoden Erwachsener Ratten" 250: 247–50.

Campos M.B., Chiocchio S.R., Calandra R.S., Ritta M.N. 1993. "Effect of Bilateral Denervation of the Immature Rat Testis on Testicular Gonadotropin Receptors and in Vitro Androgen Production." *Neuroendocrinology*, 57: 189–94.

Carreau, S., Silandre, Bourguiba S., Hamden K., Said L., Lambard S., Galeraud-Denis I., y Delalande C. 2007. "Estrogens and Male Reproduction: A New Concept." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40: 761–68.

Chabory, E., Damon C., Lenoir A., Kauselmann G., Kern H., Zevnik B., y Garrel Ch. 2009. "Epididymis Seleno-Independent Glutathione Peroxidase 5 Maintains Sperm DNA Integrity in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 119: 2074–85.

Chang C., Chen Y.-T., Yeh S.-D., Xu Q., Wang R.-S., Guillou F, Lardy H., y Yeh S. 2004. "Infertility with Defective Spermatogenesis and Hypotestosteronemia in Male Mice Lacking the Androgen Receptor in Sertoli Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 6876–81.

Chow S-H., Giglio W., Anesetti R., Ottenweller J.E., Pogach L.M., y Huang H.F.S 2000. "The effects of testicular denervation on spermatogenesis in the Sprague-Dawley rat. *Neuroendocrinology* 72: 37-45.

Clarke I. J.,y Pompolo S. 2005. "Synthesis and Secretion of GnRH." *Animal Reproduction Science*. 8: 29-55.

Cobb J., y Handel M. A., 1998. "Dynamics of Meiotic Prophase I during Spermatogenesis: From Pairing to Division." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9: 445–50.

Collin O. Damber J.E., Bergh A. 1996. "Testicular Blood Flow and Testosterone Concentrations in the Spermatic Venous Blood in Rats With Experimental Cryptorchidism." *Journal of Reproduction and Fertility* 106: 17–22.

Collu R. 1978. "Endocrine Effects of Brain Serotonin Depletion by 5,6-Dihydroxytryptamine in Prepubertal Male Rats 469: 411-422.

Commins D.L.I., Axt J.K., Vosmer G., y Seiden L.S., 1987. "5,6-Dihydroxytryptamine, a Serotonergic Neurotoxin, Is Formed Endogenously in the Rat Brain." *Brain Research* 403: 7–14.

---

Costa E., y Revuelta A. 1972. "P-Chloroamphetamine and Serotonin Turnover in Rat Brain." *Neuropharmacology* mar.11: 291–95.

Costa R. R., Varanda W. A., y Rodrigues- Franci C. 2010. "A Calcium-Induced Calcium Release Mechanism Supports Luteinizing Hormone-Induced Testosterone Secretion in Mouse Leydig Cells." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 299: 316–23.

Csaba Zs., Csernus V., y Gerendai I. 1998. "Intratesticular Serotonin Affects Steroidogenesis in the Rat Testis." *Journal of Neuroendocrinology* 10: 371–76.

Cummins J. M., y Woodall P. F. 1985. "On Mammalian Sperm Dimensions." *Journal of Reproduction and Fertility* 75: 153–75.

Dahlström, A., y Fuxe K. 1964. "Localization of Monoamines in the Lower Brain Stem." *Experientia* 20: 398–99.

Das N., y Rajendra T.K. 2018. "Molecular Regulation of Follicle-Stimulating Hormone Synthesis , Secretion and Action." *Journal of Molecular Endocrinology* 60: 131–55.

Davidoff M. S., Schulze W., Middendorff R., y Holstein A. F. 1993. "The Leydig Cell of the Human Testis -A New Member of the Diffuse Neuroendocrine System." *Cell & Tissue Research* 271: 429–39.

Davidoff M. S., Ungefroren H., Middendorff R., Koeva Y., Bakalska M., Atanassova N., Holstein A.F., Ježek D., Pusch W., y Müller D. 2005. "Catecholamine-Synthesizing Enzymes in the Adult and Prenatal Human Testis." *Histochemistry and Cell Biology* 124: 313–23.

De Gendt K., Swinnen J. V., Saunders P. T. K., Schoonjans L., Dewerchin M., Devos A., Tan K., 2004. "A Sertoli Cell-Selective Knockout of the Androgen Receptor Causes Spermatogenic Arrest in Meiosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 1327–32.

Dickerson S. M., Walker D. M., Reveron M.E., Duvauchelle C.L., y Gore A. C. 2008. "The Recreational Drug Ecstasy Disrupts the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Reproductive Axis in Adult Male Rats." *Neuroendocrinology* 88: 95–102.

Dierich A., Sairam M. R., Monaco L., Fimia G.M., Gansmuller A., Lemeur M., y Sassone-Corsi P. 1998. "Impairing Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Signaling in Vivo: Targeted Disruption of the FSH Receptor Leads to Aberrant Gametogenesis and Hormonal Imbalance." *Cell Biology* 95: 13612–17.

Donnelly E. T., Lewis Sh. E.M., McNally J. A., y Thompson W. 1998. "In Vitro Fertilization and Pregnancy Rates: The Influence of Sperm Motility and Morphology on IVF Outcome." *Fertility and Sterility* 70: 305–14.

Dufau M. L., Tinajero J. C., y Pabbri A. 1993. "Corticotropin-Releasing of the Testis Factor:" *The FASEB Journal* 7: 299–307.

Dunkel L., Hirvonen V., y Erkkilä K. 1997. "Clinical Aspects of Male Germ Cell Apoptosis during Testis Development and Spermatogenesis." *Cell Death and Differentiation* 4: 171–79.

Dym M., Clermont Y. 1970. "Role of Spermatogonia in the Repair of the Seminiferous Epithelium Following X-irradiation of the Rat Testis." *American Journal of Anatomy* 128: 265–81.

Dyson M. B., Orgebin-crist M. C. 1973. "Effect of Hypophysectomy, Castration and Androgen Replacement upon the Fertilizing Ability of Rat Epididymal Spermatozoa." *Endocrine* 93: 391–402.

Eddy E.M. 2006. "The Spermatozoon." In *Physiology of Reproduction*, editado por Knobil y Neill, 3–54. Elsevier Academic Press.

---

Elkis Y., Lerer-Goldstein Sh. B. T., Nyska A., Creasy D.M., Shpungin S. y Nir U. 2013. "Testosterone Deficiency Accompanied by Testicular and Epididymal Abnormalities in TMF-/- Mice." *Molecular and Cellular Endocrinology* 365. Elsevier Ireland Ltd: 52–63.

Ellis L.C., Jaussi A.W., Baptista M.H., y Urry R.L. 1972. "Correlation of Age Changes in Monoamine Oxidase Activity and Androgen Synthesis by Rat Testicular Minced and Teased-Tubular Preparation in Vitro 1," *Endocrinology* 90: 1610–18.

Fallis A.G. 2013. *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration.* Journal of Chemical Information and Modeling. Vol. 53. Cambridge University Press editorial 2006, primera edición

Falvo S., Di Fiore M. M., Burrone L., Chieffi Baccari G., Longobardi S., y Santillo A. 2015. "Androgen and Oestrogen Modulation by D-Aspartate in Rat Epididymis." *Reproduction, Fertility and Development* 28: 1865–72.

Fernandez-Fuertes B., Narciandi F., O'Farrelly C., Kelly A. K., Fair S., Meade K. G., y Lonergan P. 2016. "Cauda Epididymis-Specific Beta-Defensin 126 Promotes Sperm Motility but Not Fertilizing Ability in Cattle." *Biology of Reproduction* 95: 122–122.

Fix Ch., Jordan C., Cano P. y Walker W. H. 2004. "Testosterone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase and the CAMP Response Element Binding Protein Transcription Factor in Sertoli Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 10919–24.

Frungieri M. B., Gonzalez-Calvar S.I., Rubio M., Ozu M., Lustig L., y Calandra R. S. 1999. "Serotonin in Golden Hamster Testes: Testicular Levels, Immunolocalization and Role during Sexual Development and Photoperiodic Regression-Recrudescence Transition." *Neuroendocrinology* 69: 299–308.

Frungieri M. B., Urbanski H. F., Höhne-Zell B. y Mayerhofer A. 2000. "Neuronal Elements in the Testis of the Rhesus Monkey: Ontogeny, Characterization and Relationship to Testicular Cells." *Neuroendocrinology* 71: 43–50.

Frungieri M. B., Zitta K., Pignataro O. P., Gonzalez-Calvar S.I. y Calandra S.R. 2002. "Interactions between Testicular Serotonergic, Catecholaminergic, and Corticotropin-Releasing Hormone Systems Modulating CAMP and Testosterone Production in the Golden Hamster." *Neuroendocrinology* 76: 35–46.

Garner, D. L., Johnson L. A., Yue S. T., Roth B. L. y Haugland R. P. 1994. "Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide." *Journal of Andrology* 15: 620–29.

Gaspar, P., Cases O., y Maroteaux L. 2003. "The Developmental Role of Serotonin: News from Mouse Molecular Genetics." *Nature Reviews Neuroscience* 4: 1002–12.

Gerendai I., Toth I. E., Boldogkoi Z., Medveczky I. y Halasz B. 2000. "Central Nervous System Structures Labelled from the Testis Using the Transsynaptic Viral Tracing Technique." *J. Neuroendocrin.* 12: 1087–95.

Gerendai, I., Csaba Z., y Valér Csernus. 1996. "Testicular Injection of 5,6-Dihydroxytryptamine or Vasectomy Interferes with the Local Stimulatory Effect of Oxytocin on Testicular Steroidogenesis in Immature Rats." *Neuroendocrinology* 63: 284–89.

Gerendai I., Tóth I.E., Kocsis K., Boldogkoi Z., Rusvai M. Y Halász B. 2001. "Identification of CNS Neurons Involved in the Innervation of the Epididymis: A Viral Transneuronal Tracing Study." *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 92: 1–10.

Gerendai I., Wiesel O., Tóth I.E., Boldogkői Z., Rusvai M., y Halász B. 2003. "Identification of Neurons of the Brain and Spinal Cord Involved in the Innervation of the Ductus Deferens Using the Viral Tracing Method." *International Journal of Andrology* 26: 91–100.

---

Ghyselinck N. B., Rigaudibre N., y Cedex A. 1993. "Structural Organization and Regulation of the Gene for the Glutathione Protein Specific the Mouse Epididymi" *Mol. Endocrinol.* 7: 258–72.

Gilman y Goodman. 1996 *Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica*. Edited by Limbird LE Hardman J.G. 8.a ed. : México: McGraw-Hill interamericana.

Gimeno I. 2014. "Morfología Espermática y Parametros Seminales Basicos En Varones Normo y Oligoastenoteratozoospermicos." Valencia, 53. URL: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/46241/TFG\\_Isabel\\_Gimeno.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/46241/TFG_Isabel_Gimeno.pdf?sequence=1).

Gómez-Chang E., Larrea F., Martínez-Montes F. 2012. "Vías De Señalización Asociadas a La Esteroidogénesis." *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas* 15: 24–36.

Gong Y. G., Feng M.M., Hu X.N., Wang Y. Q., Gu M., Zhang W., y Shan R. G. 2009. "Peptidergic Not Monoaminergic Fibers Profusely Innervate the Young Adult Human Testis" *Journal of Anatomy* 214: 330–38.

Gonzales C., Rubio J., Gasco M., Nieto J., Yucra J. y Gonzales G. F. 2006. "Effect of Short-Term and Long-Term Treatments with Three Ecotypes of *Lepidium Meyenii* (MACA) on Spermatogenesis in Rats." *Journal of Ethnopharmacology* 103: 448–54.

Griswold M.D., y McLean D. 2006. "The Sertoli Cell." In *Physiology of Reproduction*, edited by Knobil y Neill, 3rd ed., Elsevier editorial. 949–76..

Grunewald S., Sharma R., Paasch U., Hans-Juergen G., y Agarwal A. 2009. "Impact of Caspase Activation in Human Spermatozoa." *Microscopy Research and Technique* 72: 878–88.

Guyton, A. C., y Hall. J.E. 2006. *Effect of Estrogen on Bone*. *Textbook of Medical Physiology*.

Haider, S. G. 2004. "Cell Biology of Leydig Cells in the Testis." *International Review of Cytology* 233: 181–241.

Haywood, M., Spaliviero J., Jimenez M., King N. J.C., Handelsman D. J., y Allan Ch. M. 2003. "Sertoli and Germ Cell Development in Hypogonadal (Hpg) Mice Expressing Transgenic Follicle-Stimulating Hormone Alone or in Combination with Testosterone." *Endocrinology* 144: 509–17.

Hedger M. P., Khatab S., Gonzales G. y de Kretser D.M. 1995. "Acute and Short-Term Actions of Serotonin Administration on the Pituitary-Testicular Axis in the Adult Rat." *Reproduction, Fertility, and Development* 7: 1101–9.

Henderson N. A., Robaire B. 2005. "Effects of PNU157706, a Dual 5-Reductase Inhibitor, on Rat Epididymal Sperm Maturation and Fertility." *Endocrinology* 143: 436–43.

Herbison A. E. 2016. "Control of Puberty Onset and Fertility by Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons." *Nature Reviews Endocrinology*, Nature Publishing Group 12: 452–66.

Hermo L., Dworkin J. y Richard O.K. 1988. "Role of Epithelial Clear Cells of the Rat Epididymis in the Disposal of the Contents of Cytoplasmic Droplets Detached From Spermatozoa" *American Journal of Anatomy* 183: 107–24.

Hermo L., Marc Pelletier R., Cyr D.G. y Smith Ch. E. 2010. "Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatozoa." *Microscopy Research and Technique* 73 (4): 243–78.

Hess, R. A. y De Franca L. R. 2008. "CHAPTER 1 Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium," Part of the *Advances in Experimental Medicine and Biology* book series (volume 636):1–15.

Hess, R.A. y De França L. R. 2005. "Structure of the Sertoli Cell." *Sertoli Cell Biology*, no. January 2005: 19–40.



- 
- Hetts S. W. 1998. "To Die or Not to Die: An Overview of Apoptosis and Its Role in Disease." *J. Am. Med. Assoc.* 279 (4): 300–307.
- Holdcraft, R. W., y Braun R. E. 2004. "Hormonal Regulation of Spermatogenesis." *International Journal of Andrology* 27 (6): 335–42.
- Holstein A. F., Maekawa M., Nagano T., y Davidoff M.S. 1996. "Myofibroblasts in the Lamina Propria of Human Semi-Niferous Tubules Are Dynamic Structures of Heterogeneous Phenotype." *Archives of Histology and Cytology* 59: 109–25.
- Huhtaniemi, I. 2015. "A Short Evolutionary History of FSH-Stimulated Spermatogenesis." *Hormones* 14: 468–78.
- Huo S, Xu Z., Zhang X., Zhang J., y Cui S. 2010. "Testicular Denervation in Prepuberty Rat Inhibits Seminiferous Tubule Development and Spermatogenesis." *J Reprod Dev* 56: 370–78.
- Jennes L., Eyigor O., Janovick J.A., Conn P.M. 1997. "Brain Gonadotropin Releasing Hormone Receptors: Localization and Regulation." *Recent Prog Horm Res.* 52: 475–90.
- Johnson L., Thompson D.L., y Varner D. D. 2008. "Role of Sertoli Cell Number and Function on Regulation of Spermatogenesis." *Animal Reproduction Science* 105: 23–51.
- Jørgensen H. S. 2007. "Studies on the Neuroendocrine Role of Serotonin." *Danish Medical Bulletin* 54: 266–88..
- Jovcev D. 2018. "Hipofiza Hormoni." Thinglink. URL:<https://www.thinglink.com/scene/939600672297320449>.
- Justo S. Rossano G., Szwarcfarb B., Rubio M. y Moguilevsky J. 1989. "Effect of Serotonergic System on FSH Secretion in Male and Female Rats: Evidence for Stimulatory and Inhibitory Actions." *Neuroendocrinology* 50:382-386.
- Kalant H. 2001. "The Pharmacology and Toxicology of 'Ecstasy' (MDMA) and Related Drugs Harold" 165: 917-928.
- Kalla N.R. 1978. "Demonstration of Direct Effect of Serotonin on Rat Leydig Cells." *Andrologia* 11: 259–62.
- Kankaanpää A., Meririnne E., Lillsunde P. y Seppälä T. 1998. "The Acute Effects of Amphetamine Derivatives on Extracellular Serotonin and Dopamine Levels in Rat Nucleus Accumbens." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 59: 1003–9.
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H. y Currie A. R. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue Kinetics." *Journal of Internal Medicine* 258: 479–517.
- Kerr J.B., Loveland K.L., O'Bryan M.K., De Kretser D.M. 2006. "Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms." In *Physiology of Reproduction*, 3rd ed., 827–948. Elsevier Academic Press.
- Ketelslegers, J. M., Hetzel W. D., Sherins R. J. y Catt K. J. 1978. "Developmental Changes in Testicular Gonadotropin Receptors: Plasma Gonadotropins and Plasma Testosterone in the Rat." *Endocrinology* 103: 212–22.
- Kim N., Nakamura H., Masaki H., Kumasawa K., Hirano K.I. y Kimura T. 2017. "Effect of Lipid Metabolism on Male Fertility." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 485. Elsevier Ltd: 686–92.
- Köning H.E. y Liebich H.G. 2005. *Anatomia de Los Animales Domésticos*. 1st ed. editorial medica panamericana.
- Kunimura Y., Iwata K., Ishigami A., y Ozawa H. 2017. "Age-Related Alterations in Hypothalamic Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Neurons and in Pulsatile LH Release in Female and Male Rats." *Neurobiology of Aging* 50. Elsevier Inc: 30–38.
-

---

Lacombe A., Lelievre V., Roselli Ch. E., Muller J. M., Waschek J. A. y Vilain E.. 2007. "Lack of Vasoactive Intestinal Peptide Reduces Testosterone Levels and Reproductive Aging in Mouse Testis." *Journal of Endocrinology* 194: 153–60.

Langman A. 2004. *Embriologia Medica Con Orientacion Clinica*. Edited by Sadler T.W. 8va edicion. Madrid: Editorial medica panamericana.

Layman L. C., y McDonough P. G. 2000. "Mutations of Follicle Stimulating Hormone-Beta and Its Receptor in Human and Mouse: Genotype/Phenotype." *Molecular and Cellular Endocrinology* 161: 9–17.

Lei Z. M., Mishra S., Zou W., Xu B., Foltz M., Li X. y Rao C. V. 2001. "Targeted Disruption of Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptor Gene." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15: 184–200.

Lesch K. P., y Waider J. 2012. "Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders." *Neuron* 76. Elsevier Inc. 175–91.

Lindsey J. S., Y Wilkinson M. F. 1996. "Pcm: A Testosterone- and LH-Regulated Homeobox Gene Expressed in Mouse Sertoli Cells and Epididymis." *Developmental Biology* 179: 471–84.

López-Doval S., Salgado R., Fernández-Pérez B. y Lafuente A. 2015. "Possible Role of Serotonin and Neuropeptide Y on the Disruption of the Reproductive Axis Activity by Perfluorooctane Sulfonate." *Toxicology Letters* 233. Elsevier Ireland Ltd: 138–47.

Lyng F.M., Jones G.R., Rommerts F.F. 2000. "Rapid Androgen Actions on Calcium Signaling in Rat Sertoli Cells and Two Human Prostatic Cell Lines: Similar Biphasic Responses between 1 Picomolar and 100 Nanomolar Concentrations." *Biol Reprod.* sept 63: 736–47.

Ma X., Dong Y., Matzuk M. M. y Kumar T. R. 2004. "Targeted Disruption of Luteinizing Hormone  $\beta$ -Subunit Leads to Hypogonadism, Defects in Gonadal Steroidogenesis, and Infertility." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 17294–99.

Majno G., Joris. I. 1995. "Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death." *The American Journal of Pathology* 146: 3–15.

Marnet B., Vieitez G., Milhet P., Richoilley G., Lesourd, F. y Parinaud J.. 2000. "Computer-Assisted Assessment of Sperm Morphology: Comparison with Conventional Techniques." *International Journal of Andrology* 23: 22–28.

Matikainen T. J. Toppari Vihko H., y Huhtaniemi I. 1994. "Effects of Recombinant Human FSH in Immature Hypophysectomized Male Rats: Evidence for Leydig Cell-Mediated Action on Spermatogenesis." *Journal of Endocrinology* 141: 449–57.

Mayerhofer A., Danilchik M., Francis Pau K. Y., Lara H. E., Russell L. D. y Ojeda S. R. 1996. "Testis of Prepubertal Rhesus Monkeys Receives a Dual Catecholaminergic Input Provided by the Extrinsic Innervation and an Intragonadal Source of Catecholamines1." *Biology of Reproduction* 55: 509–18.

McCann U. D., Samel M, Karanth S., Mastronardi C. A., Les Dees W., Childs G., Miller, y Wen H Yu. 2001. "Control of Gonadotropin Secretion by Follicle-Stimulating Hormone- Releasing Factor , Luteinizing Hormone-Releasing Hormone, and Leptin" 32: 476–85.

McCann, U D., y Ricaurte G. A. 2004. "Amphetamine Neurotoxicity: Accomplishments and Remaining Challenges." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27: 821–26.

Mclachlan I., Robertson D. M.y Clayton H. 1995. "The Effects of Recombinant Hormone." *Society*, no. November.

---

McNeilly A.S., Crawford J.L., Taragnat C., Nicol L., y McNeilly J.R. 2003. "The Differential Secretion of FSH and LH: Regulation through Genes, Feedback and Packaging." *Reprod Suppl*.

Meachem S.L. Stanton P. McLachlan R.I. O'Donnell L. 2006. "Endocrine Regulation of Spermatogenesis." In *Physiology of Reproduction*, edited by Knobil & Neill, 3rd ed., 1017–70. Elsevier Academic Press.

Méndez Palacios N., Escobar M.E., Mendoza M.M., Crispín R.H., Andrade O.G., Meléndez J.H., Martínez A. A. 2016. "Prepubertal Male Rats with High Rates of Germ-Cell Apoptosis Present Exacerbated Rates of Germ-Cell Apoptosis after Serotonin Depletion." *Reprod Fertil Dev*. Apr;28: 806–14.

Middendorff R., Müller D., Mewe M, Mukhopadhyay A. K, Holstein A. F., y Davidoff M.S. 2002. "The Tunica Albuginea of the Human Testis Is Characterized by Complex Contraction and Relaxation Activities Regulated by Cyclic GMP." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 3486–99.

Miyake K., Yamamoto M., Narita H., Hashimoto J., Mitsuya H.. 1986. "Evidence for Contractility of the Human Seminiferous Tubule Confirmed by Its Response to Noradrenaline and Acetylcholine." *Fertility and Sterility* 46. Elsevier Masson SAS: 734–37.

Mohammad-Zadeh, I.F., Moses, L., y Gwaltney-Brant S.M. 2008. "Serotonin : A Review." *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 31, 31 (1957): 187–99.

Muller C.H.P., y Jacobs B. 2010. *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. Edited by Elsevier Sabre Foundation. 1st ed. USA.

Murphy D. L., Y Lesch K. P. 2008. "Targeting the Murine Serotonin Transporter: Insights into Human Neurobiology." *Nature Reviews Neuroscience* 9: 85–96.

Perera N.M.A.,. 2018. "The Sunday Leader." URL: <http://www.thesundayleader.lk/2014/02/02/abcdef-of-testicular-cancer/>.

National Institute of Environmental Health Sciences. 2019. "Male Reproductive and Urinary System Revised Guides for Organ Sampling and Trimming in Rats and Mice." Accessed last time January 28. URL:<https://www.niehs.nih.gov/research/resources/visual-guides/guides/male-repro/index.cfm>.

Nichols, David E, and Charles D Nichols. 2008. "Serotonin Receptors." *Chem Rev* 108 (5): 1614–41. doi:10.1021/cr078224o.

Nudmamud-Thanoi, S., y Thanoi S. 2011. "Methamphetamine Induces Abnormal Sperm Morphology, Low Sperm Concentration and Apoptosis in the Testis of Male Rats." *Andrologia* 43: 278–82.

Nudmamud-Thanoi, S., Tangsriskada N., y Thanoi S. 2016. "Changes of Androgen Receptor Expression in Stages VII-VIII Seminiferous Tubules of Rat Testis after Exposure to Methamphetamine." *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 38: 275–79.

O'Donnell L., Robertson K. M., Jones M. E., Simpson E.R. 2001. "Estrogen and Spermatogenesis." *Endocrine Reviews* 22: 289–318.

Ogata T., Matsuo N., Saito M., y Prader A. "The testicular lesion and sexual differentiation in congenital lipid adrenal hyperplasia" *Helv Paediatr Acta*. 43:531-8.

O'Shaughnessy P. J., Monteiro A., Verhoeven G., De Gendt K., y Abel M. H. 2010. "Effect of FSH on Testicular Morphology and Spermatogenesis in Gonadotrophin-Deficient Hypogonadal Mice Lacking Androgen Receptors." *Reproduction* 139: 177–84.

---

O'Shaughnessy P. J. 2014. "Hormonal Control of Germ Cell Development and Spermatogenesis." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 29. Elsevier Ltd: 55–65.

Oduwole O. O., Vydra N., Nicholas E.M., Luna S., Owen L., Keevil B., Donaldson M., Naresh K., y Huhtaniemi I.T. 2014. "Overlapping Dose Responses of Spermatogenic and Extragonadal Testosterone Actions Jeopardize the Principle of Hormonal Male Contraception." *FASEB Journal* 28: 2566–76.

Padmanabhan V., y Sharma T. P. 2001. "Neuroendocrine vs. Paracrine Control of Follicle-Stimulating Hormone." *Archives of Medical Research* 32: 533–43.

Pakarainen T., Zhang F. P., Mäkelä S., Poutanen, M. y Huhtaniemi I. 2005. "Testosterone Replacement Therapy Induces Spermatogenesis and Partially Restores Fertility in Luteinizing Hormone Receptor Knockout Mice." *Endocrinology* 146: 596–606.

Pawson A. J., and McNeilly A.S. 2005. "The Pituitary Effects of GnRH." *Animal Reproduction Science. Animal Reproduction Science* 88: 75–94.

Payette R. F, Gershon M.D., y Nunez E.A. 2015. "Serotonergic Elements of the Mammalian Pituitary" *Endo* 116: 1933-1943.

Pérez C. J. 2006. Efectos del bloqueo del sistema serotoninérgico en la modulación de las funciones del testículo de la rata macho prepúber. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.

Piezzi R., Larin F., Wurtman RJ. 1970. "Serotonin, 5-Hydroxyindoleacetic Acid (5-HIAA), and Monoamine Oxidase in the Bovine Median Eminence and Pituitary Gland." *Endocrinology* 86 (November): 1460–62.

Piner J., Sutherland M., Millar M., Turner K., Newall D., y Sharpe R.M. 2002. "Changes in Vascular Dynamics of the Adult Rat Testis Leading to Transient Accumulation of Seminiferous Tubule Fluid after Administration of a Novel 5-Hydroxytryptamine (5-HT) Agonist." *Reproductive Toxicology* 16: 141–50.

Plant T., Zeleznik V., Albertini D., Goodman R., Herbison A., McCarthy M., Muglia L., y Richards J. 2015. *Physiology of Reproduction*.

Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua. 2002. "Fisiología de La Reproducción: Hormona Liberadora de Gonadotrofinas." *Rev Fac Med UNAM* Noviembre-Diciembre 45: 254–59. En URL:<http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no45-6/RFM45605.pdf>.

Prince F. P. 1992. "Ultrastructural Evidence of Indirect and Direct Autonomic Innervation of Human Leydig Cells: Comparison of Neonatal, Childhood and Pubertal Ages." *Cell Tissue Research* 269: 383–90.

Quirk P. L, y Siegel R. E. 2005. "The Serotonin Type 3A Receptor Facilitates Luteinizing Hormone Release and LHbeta Promoter Activity in Immortalized Pituitary Gonadotropes." *Endocrine* 27: 37–43.

Ramaswamy S., y Weinbauer G.F. 2014. "Endocrine Control of Spermatogenesis: Role of FSH and LH/ Testosterone." *Spermatogenesis* 4: e996025.

Rerkamnuaychoke W., Nishida T., Kurohmaru M., y Hayashi Y. 1991. "Evidence for a Direct Arteriovenous Connection (A-V Shunt) between the Testicular Artery and Pampiniform Plexus in the Spermatic Cord of the Tree Shrew (*Tupaia Glis*)." *Journal of Anatomy* 178: 1–9.

Ricaurte G. A., y McCann U. D. 2000. "( ' Ecstasy ' ) -Induced Serotonin Neurotoxicity : Studies in Animals" *Neuropsychobiology* 10: 5–10.

Ricaurte, G.A.; Yuan, J.; McCann, U.D. (+/-)3,4-Methylenedioxy- methamphetamine ( ' Ecstasy ' )-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. *Neuropsychobiology*, 2000, 42(1), 5-10.

- 
- Robaire B., y Hinton B.T. 2014. The Epididymis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set. Fourth Edi. Vol. 1. Elsevier.
- Robledo P. 2008. "Las Anfetaminas." *Trastornos Adictivos* 10: 166–74.
- Roser J. F. 2008. "Regulation of Testicular Function in the Stallion : An Intricate Network of Endocrine , Paracrine and Autocrine Systems" 107: 179–96..
- Ruey-Sheng W., Shuyuan Y., Chii-ruey T., y Chawnshang Ch. 2009. "Androgen Receptor Roles in Spermatogenesis and Fertility : Lessons from Testicular Cell-Specific Androgen Receptor Knockout Mice" 30: 119–32.
- Russell L.D., Saxena N.K., y Weber J.E. 1987 "Intratesticular injection as a method to assess the potential toxicity of various agents and to study mechanisms of normal spermatogenesis" *Gamete Res* 17:43-56.
- Russell L.D. Etlin R.A. Sinha Hikim A.P. y Clegg E.D. 1990. "Histological and Histopathological Evaluation of the Testis." In *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, edited by Clearwater FL., 1–286. River Press.
- Ruwanpura S. M., McLachlan R.I., y Meachem S. J. 2010. "Hormonal Regulation of Male Germ Cell Development." *Journal of Endocrinology* 205: 117–31.
- Sabes-Alsina M., Planell N., Gil S., Tallo-Parra O., Maya-Soriano J.M., Taberner E., Piles M., Manel S., y Lopez-Bejar M. 2016. "Metabolic Activity of Sperm Cells: Correlation with Sperm Cell Concentration, Viability and Motility in the Rabbit." *Zygote* 24: 707–13.
- Sadate-Ngatchou P. I., Derek J. P., y Griswold M.D. 2004. "Identification of Testosterone-Regulated Genes in Testes of Hypogonadal Mice Using Oligonucleotide Microarray." *Molecular Endocrinology* 18: 422–33. doi:10.1210/me.2003-0188.
- Saland L.C., Samora A., Sanchez P. y Chavez G. 1993. "Immunocytochemical Studies of Tryptophan Hydroxylase, Tyrosine Hydroxylase, and Serotonin Innervation in the Aging Rat Neurointermediate Pituitary." *Experimental Neurology* 121: 119–26.
- Sanders-Bush E., Gallager D.A., Sulser F. 1974. "On the Mechanism of Brain 5-Hydroxytryptamine Depletion by p-Chloroamphetamine and Related Drugs and the Specificity of Their Action." *Adv Biochem Psychopharmacol.* 10: 185-194.
- Sanderson, J. Thomas. 2006. "The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals." *Toxicological Sciences* 94 (1): 3–21.
- Sato K., y Kihara K. 1998. "Spinal Cord Segments Controlling the Canine Vas Deferens and Differentiation of the Primate Sympathetic Pathways to the Vas Deferens." *Microscopy Research and Technique* 42: 390–97.
- Seiden. K.E., y Sabol. L.S. 1996. "Methamphetamine and Methylenedioxy-Methamphetamine Neurotoxicity: Possible Mechanisms of Cell Destruction." *NIDA Res Monogr.* 163: 251–76.
- Sharpe R.M., y Cooper I. Testicular interstitial fluid as a monitor for changes in the intratesticular environment in the rat. *J Reprod Fertil.* 69:125-35.
- Shishkina, G. T., y Dygalo N. N. 2000. "Role of the Serotonergic System in the Acceleration of Sexual Maturation in Wild Norway Rats Selected for Reduced Aggressiveness toward Humans." *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 125: 45–51.
- Simoni M., Weinbauer G.F., Gromoll J., Nieschlag E. 1999. "Role of FSH in Male Gonadal Function." *Ann Endocrinol (Paris).* jul;60: 102–6.
-

---

Singh S., Jen J-F., Dryhurst G. 1990. "Autoxidation of the Indolic Neurotoxin 5,6-Dihydroxytryptamine." *J. Org. Chem* 55: 1484–89.

Sinhababu A.K., Ghosh A.K., Borchardt R.T. 1985. "Molecular Mechanisms of Action of 5,6-Dihydroxytryptamine. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Methyl-, 7- Methyl and 4,7- Dimethyl- 5,6- Dihydroxytryptamine." *Journal of Medicinal Chemistry* 28: 1273–79.

Smith, L. B., y Walker W.H. 2014. "The Regulation of Spermatogenesis by Androgens." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 30. Elsevier Ltd: 2–13.

Smith L. B., y Walker W.H. 2014. *Hormone Signaling in the Testis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set. Fourth Edi. Vol. 1. Elsevier.*

Sofikitis N., Giotitsas N., Tsounapi P., Baltogiannis D., Giannakis D., y Pardalidis N. 2008. "Hormonal Regulation of Spermatogenesis and Spermiogenesis." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 109 (3–5): 323–30.

Stocco D.M. McPhaul M.J. 2006. "Physiology of Testicular Steroidogenesis." In *Physiology of Reproduction*, edited by Knobil y Neill, 3rd ed., 977–1016. Elsevier Academic Press.

Storey B.T., 1997. "Biochemistry of the Induction and Prevention of Lipoperoxidative Damage in Human Spermatozoa." *Mol Hum Reprod. Mar*;3: 203–13.

Sullivan R., y Mieusset R. 2016. "The Human Epididymis: Its Function in Sperm Maturation." *Human Reproduction Update* 22: 574–87.

Sur C., Betz H., y Schloss P.. 1996. "Immunocytochemical Detection of the Serotonin Transporter in Rat Brain." *Neuroscience* 73: 217–31.

Syed V., Gomez E., y Hecht N. B. 1999. "Messenger Ribonucleic Acids Encoding a Serotonin Receptor and a Novel Gene Are Induced in Sertoli Cells by a Secreted Factor(s) from Male Rat Meiotic Germ Cells." *Endocrinology* 140: 5754–60.

Thompson I. R., y Kaiser U.B. 2014. "GnRH Pulse Frequency-Dependent Differential Regulation of LH and FSH Gene Expression." *Molecular and Cellular Endocrinology* 385. Elsevier Ireland Ltd: 28–35.

Tinajero J.C., Fabbri A., Ciocca D.R. y Dufau M.L. 1993. "Serotonin Secretion from Rat Leydig Cells." *Endocrinology* 133: 3026–29.

Tinajero J.C., Fabbri A., Dufau M.L. 1992. "Regulation of Corticotropin-Releasing Factor Secretion from Leydig Cells by Serotonin." *Endocrine* 130: 1780–78.

Tres L. L., Rosselot C., y Kierszenbaum A.L. 2004a. "Primordial Germ Cells: What Does It Take to Be Alive?" *Molecular Reproduction and Development* 68: 1–4.

Tres L.L., Rosselot C., y Kierszenbaum A.L. 2004b. "Caspase Activity Inhibition Delays Programmed Spermatogenic Cell Death in Vitro." *Archives of Histology and Cytology* 67: 315–24.

Tsai M., y O'Malley B.W. 1994. "Molecular Mechanisms of Action of Steroid / Thyroid Receptor Superfamily Members." *Annual Review of Biochemistry* 63: 451–86.

Tsai S. C., Chen J. J., Chiao Y. C., Lu C .C., Lin H., Yeh J. Y., Lo M. J., Kau M. M., Wang S. W., y Wang P S. 1997. "The Role of Cyclic AMP Production, Calcium Channel Activation and Enzyme Activities in the Inhibition of Testosterone Secretion by Amphetamine." *British Journal of Pharmacology* 122: 949–55.

---

Tsai S. C., Chiao Y. C., Lu C. C., Doong M. L., Chen Y. H., Shih H. C., Liaw C., Wang S.W., y Wang P.S. 1996. "Inhibition by Amphetamine of Testosterone Secretion through a Mechanism Involving an Increase of Cyclic AMP Production in Rat Testes." *British Journal of Pharmacology* 118: 984–88.

Turner T T. 1991. "Spermatozoa Are Exposed to a Complex Microenvironment as They Traverse the Epididymis." *In Ann N Y Acad Sci*, 637:364–383.

Ulloa-Aguirre A., y Timossi C.. 2000. "Biochemical and Functional Aspects of Gonadotrophin-Releasing Hormone and Gonadotrophins." *Reproductive BioMedicine Online* 1. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK: 48–62.

Ungefroren H., Ergün S., Krull N. B., y Holstein A.F. 1995. "Expression of the Small Proteoglycans Biglycan and Decorin in the Adult Human Testis." *Biology of Reproduction* 52: 1095–1105.

Vanhatalo S., Soinila S., Kaartinen K., y Bäck N. 1995. "Colocalization of Dopamine and Serotonin in the Rat Pituitary Gland and in the Nuclei Innervating It." *Brain Research* 669: 275–84.

Varner D. D. 2008. "Developments in Stallion Semen Evaluation" 70: 448–62.

Velez-Pardo M. Jimenez del Rio C. 2007. "Lymphocytes as Cell Model to Study Oxidative Stress-Induced Apoptosis and Cytoprotection in Alzheimer and Parkinson`s Disease." *In Focus on Cell Apoptosis*, edited by daniel W. Cho, 1st ed., 81–103. new york: nova biomedical books.

Wada K., Hu L., Mores N., Navarro C.E., Fuda H., KrsmanovicL.Z., y Catt K.J. 2006. "Serotonin (5-HT) Receptor Subtypes Mediate Specific Modes of 5-HT-Induced Signaling and Regulation of Neurosecretion in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons." *Molecular Endocrinology* 20: 125–35.

Walczak-Jędrzejowska R., Słowikowska-Hilczler J., Marchlewska K., Oszukowska E., y Kula K. 2007. "During Seminiferous Tubule Maturation Testosterone and Synergistic Action of FSH with Estradiol Support Germ Cell Survival While Estradiol Alone Has Pro-Apoptotic Effect." *Folia Histochemica et Cytobiologica* 45 (SUPPL. 1): 59–64.

Walker W. H. 2010. "Non-Classical Actions of Testosterone and Spermatogenesis." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 1557–69.

Walker, W.H., y Cheng J. 2005. "FSH and Testosterone Signalling in Sertoli Cells." *Reproduction* 130: 15–28.

Westlund, K. N., y Childs G.V., Vol III. 1982. "Vol. III, No. 5 Printed in U.S.A.," no. August: 1761–63.

Williams K., Frayne J., Hall L. 1998. "(1998). Expression of Extracellular Glutathione Peroxidase Type 5 (GPX5) in the Rat Male Reproductive Tract." *Mol. Hum. Reprod.* 4: 841–848.

Winters, S. J., y Moore J.P. 2004. "Intra-Pituitary Regulation of Gonadotrophs in Male Rodents and Primates." *Reproduction* 128: 13–23.

Wolf B. B., Schuler M., Echeverri F., y Green D.R. 1999. "Caspase-3 Is the Primary Activator of Apoptotic DNA Fragmentation via DNA Fragmentation Factor-45/Inhibitor of Caspase-Activated DNase Inactivation." *Journal of Biological Chemistry* 274: 30651–56.

Wright D. E., y Jennes L. 1993. "Lack of Expression of Serotonin Receptor Subtype -1a, 1c, and -2 MRNAs in Gonadotropin-Releasing Hormone Producing Neurons of the Rat." *Neuroscience Letters* 163: 1–4.

Xiong X.Zh., Wang A.G., Liu G.H, Liu H.K., Wang Ch, Xia T., Chen X.M., y Yang K.D. 2006. "Effects of p,P'-Dichlorodiphenyldichloroethylene on the Expressions of Transferrin and Androgen-Binding Protein in Rat Sertoli Cells." *Environmental Research* 101: 334–39.

---

Yellon S. M., Lehman M.N., y Newman S.W. 1990. "The Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal System of the Male Djungarian Hamster: Distribution from the Olfactory Tubercle to the Medial Basal Hypothalamus." *Neuroendocrinology* 51: 219–25.

Yen y Jaffe. 2009. *Reproductive Endocrinology*. Edited by Strauss & Barbieri. 6th ed. Philadelphia USA: Saunders Elsevier.

Zhang B., Ma W., Zhu Q., Xu W., Gao L., Xu B., y Xu S., 2018. "The SET Protein Promotes Androgen Production in Testicular Leydig Cells." *Andrology* 6: 478–87.

Zhang L., W. Ma, J. L. Barker, y Rubinow D. R.. 1999. "Sex Differences in Expression of Serotonin Receptors (Subtypes 1A and 2A) in Rat Brain: A Possible Role of Testosterone." *Neuroscience* 94: 251–59.

Zieher L. M., Debeljuk L., Iturriza F., y Mancini R. E.. 1971. "Biogenic Amine Concentration in Testes of Rats at Different Ages." *Endocrinology* 88: 351–54.

Zirkin B.R., Caleb R. S. A., Awoniyi C. A., y Ewing L.L. "Maintenance of Advanced Spermatogenic Cells in the Adult Rat Testis: Quantitative Relationship to Testosterone Concentration within the Testis". *Endocrinology*, 124:1; 3043–3049.



---

## ANEXOS

### Congreso internacional



June 02, 2016

Juan Antonio Diaz Ramos, MS  
Student  
UNAM  
FES zaragoza  
Batalla 5 de mayo esq. fuerte de loreto S/n, Iztapalapa Mexico DF.  
mexico city, distrito federal 09230  
iztapalapa, Mexico

Name as it Appears on Passport: Juan Antonio Diaz Ramos  
Title: Student  
Institution: UNAM  
Date of Birth: 07/27/1986  
Passport Number: G20813558  
Country of Passport: Mexico

Dear Consular Officer,

This is an official invitation for Juan Antonio Diaz Ramos to present "Intrastriatal administration of p-chloroamphetamine (pca) alters sperm quality." at Neuroscience 2016, the 46th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN), being held November 12 - 16, 2016, in San Diego, CA.

SfN is a nonprofit membership organization of nearly 40,000 basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by 30,000 scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the global neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues from top institutions around the world.

This invitation does not include any financial support for this presenter's travel, registration fees, or local expenses once they arrive at the meeting.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads 'Kyle Hayden'.

Kyle Hayden, CMP  
Assistant Director of Annual Meeting Programs  
Society for Neuroscience

1121 14th Street NW, Suite 1010, Washington, DC 20005 | Phone: (202) 962-4000 • [sfn.org](http://sfn.org)

# Intratesticular administration of P-Chloroamphetamine (PCA) alters sperm quality.

J.A. Díaz\_Ramos<sup>1</sup>, C.A. Don López<sup>1</sup>, A.L. Rodríguez-Gutiérrez<sup>1</sup>, M. Flores-Flores<sup>1</sup>, \*R. Domínguez<sup>2</sup>, M.F. Ayala Escobar<sup>1</sup>, A. Aragón-Martínez<sup>2</sup>. <sup>1</sup> FES Zaragoza UNAM, Mexico City DF, Mexico; <sup>2</sup> Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, Tlaxcala, México. [jan27diaz07ramos86@gmail.com](mailto:jan27diaz07ramos86@gmail.com)



## Introduction

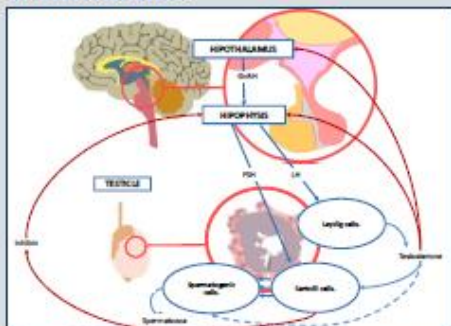


Figure 1. Regulation Mechanisms of Testis Functions

This study was supported by CONACyT number 254403; UNAM-DGAPA-PAPIIT, IN223714.

The functions of the testis, spermatogenesis and steroidogenesis, are regulated by the gonadotropins and other factors, as serotonin. In testis, Leydig cells synthesize serotonin, which in turn acts as an autocrine regulator of testosterone secretion. Amphetamine derivative, p-chloro amphetamine (PCA), has neurotoxic effects on the serotonergic system.

The chronic administration of PCA to prepubertal male rats results in lower concentrations of serotonin in the hypothalamus and diminution in the spermatogenesis. In addition, a single injection of PCA to prepubertal male rats decreases testosterone secretion 72 hours after the treatment and this changes in testosterone did not correlate with modifications in LH secretion, suggesting a direct effects of the drug on the testis.

## Objectives

Therefore, we analyzed the effects of PCA injection on the sperm quality by analyzing: i) Sperm number, ii) Morphological abnormalities, iii) Sperm quality markers on:

- Mitochondrial activity
- DNA fragmentation
- Active Caspases 3 and 7 presence.

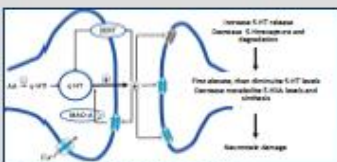


Figure 2. Effect of PCA SNC administration

## Methods

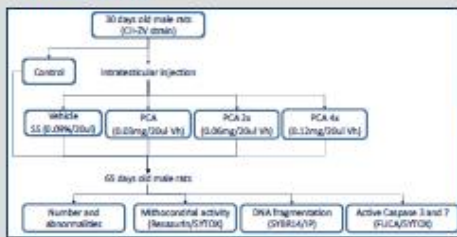
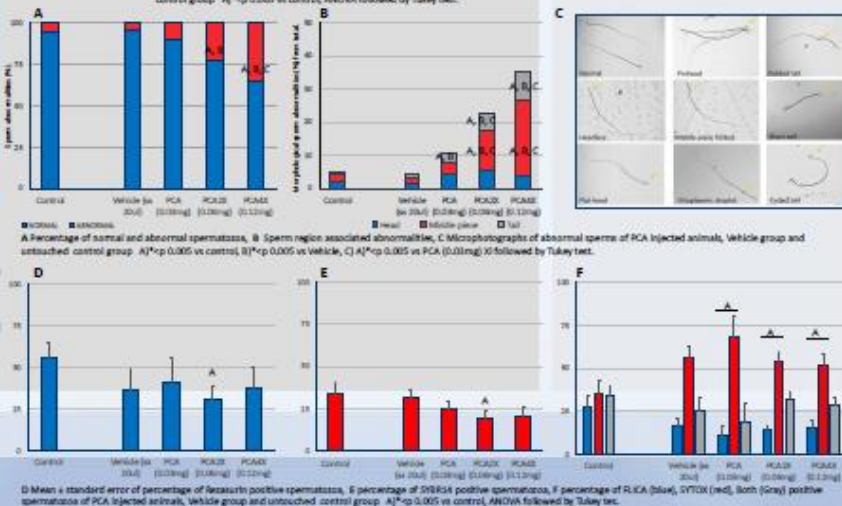


Figure 3. Experimental design for intratesticular administration

## Results

Group	Control (untouched)	Vehicle (20ul ul)	PCA(0.03mg)	PCA 2h (0.06mg)	PCA (0.12mg)
Body weight (gno)	285.4±66.86	311.72±68.79	314.88±15.00	296.68±41	254.68±85
Testicular mass (gno)	1.55±0.026	1.60±0.03	1.63±0.04	1.53±0.02	1.53±0.05
Total number of spermatozoa (x10 <sup>6</sup> )	11.25±2.32	9.807±1.88	6.78±2.93 A	11.06±1.827	18.73±3.83

Table 1. Mean ± standard error of body weight, testicular mass and total number of spermatozoa of PCA injected animals, Vehicle group and untouched control group. A) \*p < 0.005 vs control, ANOVA followed by Tukey test.



## Conclusions

Present results suggest that serotonin participates in the modulation spermatogenesis, both in sperm quality and quantity.

PCA administration alters sperm quality by conducting morphological abnormalities, related primary to defects in middle piece and tail.

It's possible this could reflect on membrane and DNA integrity, as well as, Caspases 3 and 7 activation.

## References

1. Bhat, R. et al. Serotonergic system changes in the prepubertal rat testis spermatogenesis development. *Reproduction* 2006; 131: 61-67.
2. Bhat, R. et al. Ghrelin exposure in MRL (prone) increases DNA damage in sperm and alters testis histopathology in male rats. *Toxicol Lett* 2006; 169: 13-20.
3. Ayala, M.F. et al. Brain serotonin, 5-HT<sub>2A</sub> receptor, and effects on reproduction. *Current Science (Open Access in Medline Chemistry)* 2006; 81: 288-293.



## Impaired serotonin communication during juvenile development in rats diminishes adult sperm quality

Juan Díaz-Ramos, Maribel Flores-Flores, María E. Ayala & Andrés Aragón-Martínez

To cite this article: Juan Díaz-Ramos, Maribel Flores-Flores, María E. Ayala & Andrés Aragón-Martínez (2018): Impaired serotonin communication during juvenile development in rats diminishes adult sperm quality, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, DOI: [10.1080/19396368.2018.1472825](https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1472825)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1472825>



Published online: 22 May 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=laan20>

---



## Impaired serotonin communication during juvenile development in rats diminishes adult sperm quality

Juan Díaz-Ramos<sup>a</sup>, Maribel Flores-Flores<sup>a</sup>, María E. Ayala<sup>a</sup>, and Andrés Aragón-Martínez<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Laboratorio de Pubertad, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Distrito Federal, México; <sup>b</sup>Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Estado de México

### ABSTRACT

Spermatogenesis and steroidogenesis are testicular functions regulated by gonadotrophins as well as other factors, including serotonin. Testicular serotonin acts as an autocrine regulator of testosterone secretion, but studies on its role in spermatogenesis and sperm quality are scarce. Here, we analyzed the effects of intratesticular inhibition of serotonin synthesis on gonadotrophins, testosterone, and sperm quality. Both testicles of 30-day-old rats were injected once with saline solution (SS) or distinct concentrations of *p*-chloroamphetamine (PCA) (0.03, 0.06, or 0.12 mg). At 65 days of age, rats were euthanized and sperm density, motility, membrane integrity, mitochondrial function, and abnormalities were evaluated in gametes from the vas deferens. Inhibition of synthesis of intratesticular serotonin by PCA diminished the concentrations of testosterone and follicle-stimulating hormone (FSH) but luteinizing hormone (LH) levels were unaltered. Sperm density was not modified in animals injected with the different concentrations of PCA. In contrast, the percentage of sperm with abnormalities increased and the sperm membrane integrity decreased in animals injected at higher PCA concentrations. The functionality of sperm mitochondria in PCA-injected animals decreased only at the highest PCA dose. Our results indicate that testicular serotonin plays a role in testosterone synthesis and in the normal development of sperm, and blocking its effects disrupts the hormonal communication between the testis and hypophysis.

**Abbreviations:** SS: saline solution; PCA: *p*-chloroamphetamine; FSH: follicle-stimulating hormone; LH: luteinizing hormone; TPH: tryptophan hydroxylase; MAO: monoamine oxidase; AC: absolute control group; PI: propidium iodide; FLICA: fluorescence inhibitor of caspase; 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; 17-KSR: 17-ketosteroid reductase; DHT: 5-dihydrotestosterone

### ARTICLE HISTORY

Received 24 December 2017  
Revised 7 April 2018  
Accepted 10 April 2018

### KEYWORDS

*P*-chloroamphetamine; serotonin; testis; sperm quality; testosterone



### Introduction

Testicular functions, spermatogenesis and steroidogenesis, are regulated by gonadotrophins. LH and FSH exert their effects on Leydig cells in the testicular interstice and Sertoli cells in seminiferous epithelium, respectively. Testosterone produced by Leydig cells and growth factors produced by Sertoli cells are needed for proliferation and differentiation of germ cells (Wang et al. 2009; O'Shaughnessy et al. 2010; O'Shaughnessy 2014).

Serotonin is a neurotransmitter produced by neurons in the central nervous system and is also present in organs such as the testis (Campos et al. 1990; Tinajero et al. 1993; Frungieri et al. 1999; Gerendai et al. 2007). Serotonin, serotonin receptors, and enzymes involved in serotonin biosynthesis and metabolism, are present in distinct locations of the testis. Serotonin is present in the capsule, mastocytes, platelets, and Leydig cells (Aguilar et al. 1995; Campos et al. 1990; Tinajero et al. 1993; Frungieri et al. 1999); testicular serotonin also arises

from the spermatic nerve (Campos et al. 1990; Frungieri et al. 1999). Serotonin receptors 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> are present in Leydig cells (Tinajero et al. 1992; Frungieri et al. 2002). The enzyme tryptophan hydroxylase (TPH) is the limiting factor in the serotonin biosynthetic pathway and is located in the Leydig cells (Tinajero et al. 1992). Monoamine oxidase (MAO) metabolizes serotonin and is present in the wall of seminiferous tubules (Ellis et al. 1972).

Serotonin plays a role in testicular steroidogenesis, as demonstrated by *in vivo* and *in vitro* studies (Dufau et al. 1993; Tinajero et al. 1993; Csaba et al. 1998; Frungieri et al. 2002; Gerendai et al. 2007). In Leydig cells, the coupling of serotonin to the receptor 5-HT<sub>2</sub> stimulates the production of corticotropin-release factor and inhibits the synthesis of testosterone (Tinajero et al. 1992; Dufau et al. 1993). In male rats, the effects of serotonin on testosterone production are related to age; for example, serotonin stimulates testosterone production in

**CONTACT** María E. Ayala  marayalamx@yahoo.com.mx  Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Laboratorio de Pubertad, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. AP 9-020, C.P. 15000, Distrito Federal, México.

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



prepubertal animals but is inhibited in adults (Tinajero et al. 1993; Csaba et al. 1998). Some reports indicate that testicular serotonin levels could be dysregulated in distinct ways. For example, in the rat, anatomical section of the superior spermatic nerve caused a 34% reduction in serotonin concentrations in the capsule and interstitial fluid (Campos et al. 1990), whereas the chemical destruction of serotonergic neurons by 5,7-dihydroxytryptamine (Csaba et al. 1998) or 5,6-dihydroxytryptamine (Gerendai et al. 1996) reduced secretion of testosterone.

Despite detailed knowledge of serotonin and steroidogenesis, information on the role of serotonin in spermatogenesis is scarce. The experimental induction of continuous serotonin release in adult male rats by a subcutaneous implant diminished testicular weight (Niaraki et al. 1982), whereas exposure to increased serotonergic activity, induced by the administration of inhibitors of the serotonin reuptake, induced degeneration of seminiferous tubules (De Oliveira et al. 2013). Thus, increased serotonin activity could have an inhibitory effect on testicular functions. Intraperitoneal administration of, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, an inhibitor of the serotonergic system, in adult male rats, induced damage in the seminiferous epithelium and decreased the number of testicular spermatids but did not affect either sperm motility or sperm morphology (Barenys et al. 2009). In contrast, we have observed that administration of PCA, another inhibitor of the serotonergic system, from 30 days of age to 45 or 65 days of age, induced damage to seminiferous tubules due to the apoptotic death of germ cells, diminished sperm motility and increased the presence of morphological abnormalities in sperm (Aragón et al. 2005). These opposing effects of serotonin in the testes could be due to the model used. The effects observed could be due to a direct action of the substances in the testes as we proposed (Aragón et al. 2005). In the studies by Barenys et al. (2009) and Aragón et al. (2005), serotonergic inhibitors were administered by a systemic route, thus testicular effects occurred as a result of their action on components of the hypothalamus–hypophysis–testicle axis.

Information on the role of local serotonin in spermatogenesis and sperm quality is scarce. Evaluation of sperm quality, using measures such as motility and viability, is routinely performed to determine the potential fertilizing ability of an individual. The quality of this evaluation is improved when objective assessments, such as those from automated methods, were employed. The objective of this work was to investigate the effect of intratesticular injection of PCA on hormones regulating testicular function and sperm quality.

## Results and discussion

We and others previously demonstrated that systemic administration of inhibitors of the serotonergic system induced deleterious effects in the hypothalamus–hypophysis–testicle axis (Aragón et al. 2005; Barenys et al. 2009). Gross parameters, such as body weight and organ weight were also affected by PCA (Aragón et al. 2005). In this work body weight and organ weight were affected by PCA (Table 1). No changes were observed in the weight of testicles or seminal vesicles; however, body weight was reduced at PCA4X ( $p = 0.0116$ ), prostate weight was decreased in PCA2X and PCA4X treatment groups ( $p = 0.0048$  and  $p = 0.0039$ , respectively). The weight of the right epididymis was reduced in the PCA4X group ( $p = 0.0190$ ). Testosterone is necessary for growth and function of the prostate (Mirosevich et al. 1999). It stimulates cell proliferation and inhibits cell death (Wright et al. 1996; Liu et al. 2018), thus the diminution in testosterone levels induced by PCA could lead to impaired prostate function.

Hormone concentrations were perturbed at a high dosage of PCA. Gonadotrophin concentrations were less sensitive to the effects of PCA: FSH was reduced at PCA4X ( $p = 0.0234$ ) but LH levels were not modified. Low concentrations of testosterone were detected after treatment with PCA2X and PCA4X ( $p = 0.0014$  and  $p = 0.0025$ , respectively) (Table 2).

**Table 1.** Effects of intra-testicular injection of distinct concentrations of PCA on body weight and testicles organs weight, grams, mean  $\pm$  SD.

Treatment	Body weight	Left testis	Right testis	Average testis	Left epididymis	Right epididymis	Average epididymis	Prostate	Seminal vesicle
TA	297.60 $\pm$ 21.99	1.54 $\pm$ 0.15	1.54 $\pm$ 0.14	1.54 $\pm$ 0.14	0.29 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.05	0.27 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.12
SS	310.33 $\pm$ 32.36	1.63 $\pm$ 0.11	1.61 $\pm$ 0.11	1.62 $\pm$ 0.11	0.28 $\pm$ 0.09	0.34 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.09
PCA	308.14 $\pm$ 16.33	1.68 $\pm$ 0.11	1.68 $\pm$ 0.13	1.68 $\pm$ 0.12	0.32 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.07
PCA2x	308.12 $\pm$ 21.94	1.48 $\pm$ 0.29	1.59 $\pm$ 0.14	1.60 $\pm$ 0.14	0.30 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.03 (0.005)	0.39 $\pm$ 0.12
PCA4x	279.44 $\pm$ 34.33 (0.0116)	1.56 $\pm$ 0.13	1.52 $\pm$ 0.12	1.54 $\pm$ 0.12	0.29 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.03 (0.019)	0.28 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.03 (0.004)	0.38 $\pm$ 0.05

Values in parenthesis indicate the significant  $p$ -value from the test.



**Table 2.** Effects of intra-testicular injection of distinct concentrations of PCA on hormone concentrations and sperm parameters (mean  $\pm$  SD).

Treatment	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)	Testosterone (ng/ml)	Sperm density ( $\times 10^6$ )	Motility (%)	Abnormalities (%)
TA	3.75 $\pm$ 2.63	0.57 $\pm$ 0.27	12.3 $\pm$ 2.63	10.16 $\pm$ 6.02	35.97 $\pm$ 12.6	6.09 $\pm$ 3.08
SS	4.63 $\pm$ 4.24	0.67 $\pm$ 0.37	8.33 $\pm$ 2.24	9.44 $\pm$ 4.28	35.31 $\pm$ 9.25	6.66 $\pm$ 1.51
PCA	1.71 $\pm$ 1.55	0.63 $\pm$ 0.28	6.57 $\pm$ 2.57	11.5 $\pm$ 4.87	30.54 $\pm$ 13.74	12.98 $\pm$ 5.18
PCA2x	1.10 $\pm$ 0.35	0.92 $\pm$ 0.33 (0.039)	4.29 $\pm$ 3.65 (0.001)	11.53 $\pm$ 2.62	22.74 $\pm$ 10.61	22.56 $\pm$ 5.97 (0.0033)
PCA4x	0.65 $\pm$ 0.36 (0.023)	0.73 $\pm$ 0.33	4.60 $\pm$ 2.25 (0.002)	15.94 $\pm$ 9.06 (0.022)	23.76 $\pm$ 14.22	31.52 $\pm$ 12.24 (0.0027)

Values in parenthesis indicate the significant  $p$ -value from the test.

The functionality of Sertoli cells depends on FSH levels. Testosterone and FSH are widely recognized as regulators of spermatogenesis (Abel et al. 2008; Ramaswamy and Weinbauer 2014). The fact that FSH and testosterone concentrations were significantly reduced after treatment with PCA indicates a clear deregulation of communication in the hypothalamus–hypophysis–testicle axis.

Testosterone is produced in Leydig cells in response to stimulation with LH. *In vitro*, serotonin stimulates testosterone synthesis (Tinajero et al. 1993). The low concentrations of testosterone observed in our work could be attributed to a direct effect of PCA on Leydig cells, which diminished testosterone synthesis, thus lowering circulating concentrations of this hormone. Two observations support our idea; first, the bilateral intra-testicular injection of ketanserin, an antagonist of the 5-HT<sub>2</sub> serotonin receptor, to prepubertal male rats diminished testosterone concentrations (Csaba et al. 1998). Second, we have observed that the systemic and chronic administration of PCA to prepubertal male rats diminished the concentrations of testicular serotonin (unpublished observations). Furthermore, our concept is supported by the fact that in this work PCA treatment did not concomitantly diminish the concentrations of LH and testosterone.

The mechanism underlying the reduction of testosterone levels by PCA is not clear. However, there is evidence pointing to a direct effect of PCA on factors involved in the synthesis of testosterone. Leydig cells in rats exposed to amphetamines *in vitro* showed diminished activity of the enzymes 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD), p450 c17, and 17-ketosteroid reductase (17-KSR), resulting in reduced testosterone synthesis (Tsai et al. 1997).

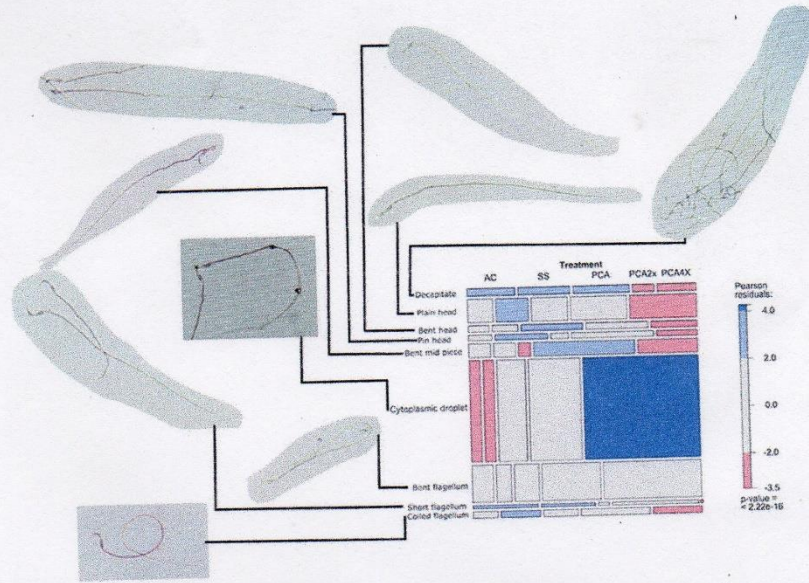
The administration of amphetamines has been shown to reduce distinct parameters of sperm quality. The intraperitoneal administration of methamphetamine induces deleterious changes in sperm quality of adult male mice (Sabour et al. 2017). Previously, we demonstrated that intraperitoneal administration of PCA to prepubertal rats reduced sperm quality at the adult stage (Aragón et al. 2005).

Here, we observed a reduction in sperm quality in groups of rats treated with direct testicular injection of PCA. Neither sperm density nor motility changed significantly; although motility was slightly reduced at PCA2X and PCA4X ( $p = 0.1020$  and  $p = 0.1610$ , respectively) (Table 2). The percentage of sperm abnormalities increased after treatment with PCA2X and PCA4X ( $p = 0.0033$  and  $p = 0.00273$ , respectively). Cytoplasmic droplets and bent flagella were the most common abnormalities observed in the groups treated with PCA (Figure 1).

The predominant sperm abnormality induced by PCA was the presence of cytoplasmic droplet. Post-testicular maturation of sperm occurs during traverse along the epididymis, where the cytoplasmic droplet is displaced toward a distal position in the flagellum, until its complete removal from the maturing spermatozoa (Cooper 2011). The fact that the treatment with PCA diminished the concentrations of testosterone and also increased the percentage of sperm with retention of the cytoplasmic droplet, suggest a role for the lack of testosterone in the induction of this abnormality. The epididymis is an organ dependent on testosterone (Robaire et al. 2006), where the metabolite of testosterone, 5-dihydrotestosterone (DHT), maintains epididymal structure and functionality (Henderson et al. 2006; Robaire and Hamzeh 2011). Furthermore, when DHT is inhibited the proportion of sperm retaining the cytoplasmic droplet increased (Henderson et al. 2006).

Testicular germ cells are a less differentiated form of sperm. To identify whether germ cells are sensitive to the effects of PCA, we calculated the time elapsed between the administration of PCA and sperm maturation, on the basis of the known cycle of seminiferous epithelium. The map of the cycle of seminiferous epithelium in the rat has 14 stages and 3.5 rows (Russell et al. 1990). Considering 12.9 days as the length of the cycle of seminiferous epithelium (the sum of all stages) (Russell et al. 1990) and 9.3 days from stage I to stage VIII (in stage VIII sperm are released from the seminiferous epithelium) plus 10 days during which the sperm traverse the epididymis





**Figure 1.** Effects of distinct concentrations of PCA on the proportion of morphological abnormalities. Each tile of the mosaic plot represents the proportion of each abnormality in a treatment group. The width of each tile is proportional to the marginal frequency  $n_{+j}$  in each column of the table (Treatment), and the height is proportional to the conditional frequency  $n_{ij}$  for each row (types of abnormalities) for a given column (Treatment), so the area is proportional to cell frequency, and complete independence is shown when all tiles in a row have the same height (Friendly 1994). Tiles with positive, negative, or no deviation from independence are filled with blue, red, or gray color, respectively (see the table at the right side of the mosaic). Micrographs (400X) signaled by the lines, to the left of the mosaic plot, are representative of each sperm abnormality.

(Robaire et al. 2006), then the germ cells exposed to PCA were pachytene spermatocytes and spermatogonia, in rats exposed at 30 days of age and euthanized at 65 days of age. Given the effects on sperm quality parameters, our results highlight the point that pachytene spermatocytes represent a sensitive stage that requires serotonin signaling to continue normal development toward a normal mature sperm.

In this study, we observed that high concentrations of PCA diminished sperm quality in terms of membrane

integrity, mitochondrial functionality and presence of active caspases. The percentage of sperm with membrane integrity, measured with SYBR14, decreased at PCA2X and PCA4X ( $p = 0.0018$  and  $p = 0.0051$ , respectively) (Table 3), whereas the percentage of sperm with mitochondrial functionality were significantly reduced in the PCA4X group ( $p = 0.0032$ ). The presence of sperm with active caspases was greater in the PCA group ( $p = 0.0231$ ).

Our results show clearly that administration of PCA reduced the permeability of the cytoplasmic membrane and altered sperm mitochondrial functionality. The negative effects of intratesticular injection of PCA on sperm quality could have distinct origins: (1) Deregulation of Sertoli cells, which leads to altered communication with developing germ cells; (2) An inhibitory effect on the steroidogenic function of Leydig cells, which leads to diminished testosterone production; (3) A possible alteration in the epididymal environment, which could alter sperm maturation; (4) Multiple effects as the result of a combination of all or some of these factors. It is possible that the low sperm quality observed in PCA groups was due to diminished

**Table 3.** Effects of intra-testicular injection of distinct concentrations of PCA on sperm membrane integrity, mitochondrial functionality and expression of active caspases (mean  $\pm$  SD).

Treatment	FLICA + (%)	Resazurin + (%)	SyBR 14 + (%)
AC	36.20 $\pm$ 9.70	53.97 $\pm$ 18.69	65.21 $\pm$ 19.55
SS	31.36 $\pm$ 11.68	68.17 $\pm$ 18.97	60.66 $\pm$ 16.74
PCA	54.29 $\pm$ 16.13 (0.023)	57.72 $\pm$ 17.52	42.54 $\pm$ 19.64
PCA2X	36.61 $\pm$ 12.04	46.38 $\pm$ 9.48	26.76 $\pm$ 13.98 (0.0018)
PCA4X	37.58 $\pm$ 9.81	39.58 $\pm$ 14.42 (0.0032)	29.51 $\pm$ 15.78 (0.005)

Values in parenthesis indicate the significant  $p$ -value from the test.



testosterone production, which primarily affected the Sertoli cells, which in turn affected the developing germ cells. Evidence supporting our idea comes from the fact that binding of testosterone to its receptors in Sertoli cells promotes the survival of germ cells (Hill et al. 2004). In addition, testosterone is recognized as an essential factor for the elongation of round sperm during their differentiation toward sperm (O'Shaughnessy 2014).

The fact that the lower concentration of PCA increased the percentage of FLICA positive sperm cannot be explained at this time. However, some reports have pointed out the possibility that the FLICA reagent could associate with substances in addition to active caspases (Pozarowski et al. 2003; Kuzelová et al. 2007).

In summary, our results show that inhibition of testicular serotonin by PCA alters endocrine communication, diminishes circulating concentrations of testosterone and FSH, and leads to a decrease of sperm quality parameters. Substances affecting serotonin synthesis or serotonergic communication are broadly used in children and adolescents (Dobry et al. 2013; Sessa 2017), thus information generated in this work is relevant due to possible long-term effects in the adult stage.

## Materials and methods

### Ethical considerations

All experiments were performed following the guidelines established by the Mexican Guidelines for Animal Protection and Treatment. The Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, approved the experimental protocols (Letter 03/01/2012).

### Experimental design

#### Animals and treatment

Thirty-day-old male rats of the CII-ZV strain ( $n = 8$ ), from our own breeding stock, were maintained under controlled light conditions (lights on from 05:00 to 19:00), with free access to food (Nutri-cubes, Purina S.A., Mexico) and tap water. The males were randomly allocated to different groups: The absolute control group (AC), received a single injection of 20  $\mu$ l of saline solution (0.9%) (SS) or PCA at a concentration of 0.03 mg (PCA), 0.06 mg (PCA2X) or 0.12 mg (PCA4X) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 20  $\mu$ l of SS.

The PCA dose was calculated taking into account the testicular weight in 30-day-old rats and the total dosage of 100 mg/kg of total body weight. We have not observed

a reduction in testicular serotonin content after systemic administration of a dose of 10 mg/kg body weight of PCA, but serotonin content diminished after 8–10 systemic injections (unpublished data). The previous data and the fact that isoform 1 of TPH, present in peripheral tissues, is more resistant to the effects of amphetamines (Walther and Bader 2003) led us to an approach using dosages two (PCA2X) or four times (PCA4X) greater than the initial 0.03 mg dose of PCA. PCA inhibits TPH by decreasing the concentration of serotonin and its principal metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), 4 hours after its administration (Sanders-Bush and Sulser 1970) and this effect remains for a duration of 14 days (Rothman et al. 2003) or more than a month (Sanders-Bush et al. 1972). All animals were euthanized at the age of 65 days. The evaluation of different parameters was performed at 65 days of age because that is the age at which sperm are found in the vas deferens (Aragón et al. 2005).

### Intratesticular injection

For intratesticular injection, rats were anesthetized with sodium ether (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The scrotal skin was cleaned with surgical soap, and PCA or saline solution was injected into both testes using a 28-gauge needle connected via tubing to a 100  $\mu$ l Hamilton syringe mounted on a microinjection pump (CMA Microdialysis, North Chelmsford, MA, USA). Another group of rats was injected with the same volume of saline solution into both testes. Injection was carried out at infusion rates of 10  $\mu$ l/min. To allow diffusion of the PCA into the testicular tissue, the injection needle was held in the testis for one minute.

### Autopsy procedure

The animals were euthanized by bleeding under ether anesthesia. The testes, epididymis, prostate, and seminal vesicles were dissected and individually weighed on a precision balance.

### Measurement of gonadotrophins and sex steroid hormones

Trunk blood from each animal was collected, allowed to clot at room temperature and centrifuged at 1000 g for 15 min. The serum was separated and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed. FSH and LH concentrations were measured by radioimmunoanalysis (RIA) and expressed as ng/mL as previously reported (Aragón et al. 2005). Intra- and interassay coefficients were 5.74% and 7.91% for FSH, and 6.82% and 9.32% for LH, respectively. Serum



testosterone concentrations were measured using enzyme-linked immunoassays Kit (AccuBind cat 3725-300, USA) and according to the manufacture protocol. The sensitivity of the assay was 0.038 ng/mL. Testosterone hormone concentrations were expressed in ng/mL. Results are expressed as mean  $\pm$  SD.

### Sperm quality

#### Motility, morphology, and sperm density

The vas deferens and its contents were obtained and placed in 2 mL Hank's buffered salt solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), supplemented as previously reported (Seed et al. 1996), at 37°C during 30 min and mixed to homogenize the sperm suspension. For sperm motility, 15  $\mu$ L of sperm suspension was put on a prewarmed slide and observed at 10X magnification in a phase-contrast microscope B3 CLINLAB (Motic, British Columbia, Canada) equipped with a customized stage prewarmed at 37°C. For each sperm sample, three or four image sequences were taken at 100X magnification (200 spermatozoa (Linder et al. 1992; Seed et al. 1996). Image sequences were captured with a Stingray model F 033B camera (Allied Vision Technologies Inc., Exton, PA, USA) and stored in a computer until analysis. Each image sequence was taken at 60 frames per second with a duration of one second; image sequences were captured with Micro-Manager version 1.4 software and analyzed with ImageJ version 1.50d (Rasband 2005) in a MacBook with Mac OS X version 10.11.5. The percentage of motile sperm was defined as the ratio of sperm showing movement to the total number of cells  $\times$  100 (Meyer et al. 2014). Data are presented as the percentage of motile sperm by treatment.

Fifteen microliters of sperm suspension were placed on a slide, stained with hematoxylin, washed with running water and air dried. For each animal, 200 sperm were evaluated under a light microscope at 100X and 400X magnification. The morphological abnormalities in the head, mid piece, and flagellum were recorded and included the following features: decapitated sperm, plain head, bent head, pin head, bent mid piece, presence and location of the cytoplasmic droplet, bent flagellum, short flagellum, and coiled flagellum. Bright-field micrographs were captured with the App Camera of an Apple iPhone (A1549), attached to the eyepiece of the microscope with a customized adapter. Sperm density was determined in a Neubauer chamber (PROPER Lumicyte 1/100 mm depth).

#### Mitochondria functional assessment

Metabolic function of sperm was evaluated by measuring mitochondrial dehydrogenase activity. Briefly, 100  $\mu$ L of sperm suspension were incubated with 1  $\mu$ L of 50 mM

resazurin for 15 min at 37°C. Resazurin was from the LIVE/DEAD cell viability assay kit (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Just before evaluation, samples were adjusted to 500  $\mu$ L with FACS Flow buffer.

#### Membrane integrity assay

Membrane integrity was evaluated using the SYBR14 dye in conjunction with propidium iodide (PI). Aliquots of 25  $\mu$ L of sperm suspension were stained with SYBR14 and PI contained in the LIVE/DEAD<sup>®</sup> Sperm Viability Kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. Final concentrations of SYBR14 and PI were 100 nmol/L and 12  $\mu$ mol/L, respectively, and samples were incubated for 10 min before measurement by flow cytometry.

#### Caspase activity measurement

Caspase-3 and -7 activity was evaluated in aliquots of sperm samples with the Fluorescence Inhibitor of Caspase Assay (FLICA), provided in the Image-iT LIVE Red Caspase-3 and -7 Detection Kit (Molecular Probes), according to the manufacturer's instructions.

#### Flow cytometry evaluation of sperm

Sperm mitochondria function and membrane integrity were assessed using a FACSria II flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry BioSciences, San Jose, CA, USA). Flow cytometer settings were as previously reported (Ajf et al. 2015). Results are presented as mean  $\pm$  SD.

#### Statistics

The normality of the data was corroborated graphically by checking residuals. Hormone concentrations and parameters of sperm quality in experimental groups were compared with controls using one-way ANOVA for unbalanced models. Orthogonal contrasts of means were performed for each ANOVA model. Results are presented as mean  $\pm$  SD.  $P < 0.05$  was considered significant. The proportion of each type of morphological abnormality in each treatment was tested for independence by the Pearson Chi-squared test. Statistical analyses were performed with R base and the VCD package version 1.3-2 (Meyer et al. 2014) and car version 2.1-0 (Fox and Weisberg 2011). All analyses were performed with R version 3.2.4 (Team 2011) running on a MacBook with Mac OS X version 10.10.5. Results are expressed as mean  $\pm$  SD.

#### Acknowledgments

This work was supported by grant [grant number UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN226017]. The gift of reagents for FSH



and LH RIA measurements by the National Institutes of Health (Bethesda MD, USA) is gratefully acknowledged. We want to thank the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM and CONACyT, México for the support given in the realization of this study. This work is a requirement for obtaining the degree of Doctor of Biological Sciences.

#### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

#### Funding

This work was supported by grant [grant number UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN226017].

#### Notes on contributors

Devised the study, planned the experiments, participated in the analysis and discussion of the results: MEA-E, AA-M; Participated in the evaluation of sperm quality, analysis of the results, and the measurement of hormones: JAD-R; Participated in the measurement of hormones: MF-F. All authors read and approved the final manuscript.

#### References

- Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Guillou F, O'Shaughnessy PJ. 2008. Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology*. 149:3279–3285.
- Aguilar R, Antón F, Bellido C, Aguilar E, Gaytan F. 1995. Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. *J Endocrinol*. 146:15–21.
- Vázquez AJF, Cedillo MJ, Quezada VJ, Rivas AC, Morales ECL, Ayala EME, Hernández MJ, González RA, Aragón MA. 2015. Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. *Anim Reprod Sci*. 154:29–38.
- Aragón MA, Ayala ME, Marín M, Avilés A, Mensumura D, Domínguez R. 2005. Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction*. 129:717–727.
- Barrens M, Macia N, Camps L, de Lapuente J, Gomez-Catalan J, Gonzalez-Linares J, Borrás M, Rodamilans M, Llobet JM. 2009. Chronic exposure to MDMA (ecstasy) increases DNA damage in sperm and alters testes histopathology in male rats. *Toxicol Lett*. 191:40–46.
- Campos MB, Vitale ML, Calandra RS, Chiochio SR. 1990. Serotonergic innervation of the rat testis. *J Reprod Fertil*. 88:475–479.
- Cooper TG. 2011. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl*. 13:130–138.
- Csaba Z, Csernus V, Gerendai I. 1998. Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis. *J Neuroendocrinol*. 10:371–376.
- De Oliveira WM, de Sá IR, de Torres SM, de Morais RN, Andrade AM, Maia FCL, Tenorio BM, da Silva Junior VA. 2013. Perinatal exposure to fluoxetine via placenta and lactation inhibits the testicular development in male rat offspring. *Syst Biol Reprod Med*. 59:244–250.
- Dobry Y, Rice T, Sher L. 2013. Ecstasy use and serotonin syndrome: a neglected danger to adolescents and young adults prescribed selective serotonin reuptake inhibitors. *Int J Adolesc Med Health*. 25:193–199.
- Dufau ML, Tinajero JC, Fabbri A. 1993. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 7:299–307.
- Ellis LC, Jaussi AW, Baptista MH, Urry RL. 1972. Correlation of age changes in monoamine oxidase activity and androgen synthesis by rat testicular minced and teased-tubular preparations in vitro. *Endocrinology*. 90:1610–1618.
- Fox J, Weisberg S. 2011. An R companion to applied regression [Internet]. 2nd edn. Thousand Oaks (CA, USA): Sage. <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>.
- Friendly M. 1994. Mosaic displays for multi-way contingency tables. *Journal of the American Statistical Association*. 89:190–200.
- Frungeri MB, Gonzalez-Calvar SI, Rubio M, Ozu M, Lustig L, Calandra RS. 1999. Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology*. 69:299–308.
- Frungeri MB, Zitta K, Pignataro OP, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. 2002. Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic, and corticotropin-releasing hormone systems modulating cAMP and testosterone production in the golden hamster. *Neuroendocrinology*. 76:35–46.
- Gerendai I, Banczerowski P, Csernus V, Halász B. 2007. Innervation and serotonergic receptors of the testis interact with local action of interleukin-1beta on steroidogenesis. *Auton Neurosci Basic Clin*. 131:21–27.
- Gerendai I, Csaba Z, Csernus V. 1996. Testicular injection of 5,6-dihydroxytryptamine or vasectomy interferes with the local stimulatory effect of oxytocin on testicular steroidogenesis in immature rats. *Neuroendocrinology*. 63:284–289.
- Henderson NA, Cooke GM, Robaire B. 2006. Region-specific expression of androgen and growth factor pathway genes in the rat epididymis and the effects of dual 5alpha-reductase inhibition. *J Endocrinol*. 190:779–791.
- Hill CM, Anway MD, Zirkin BR, Brown TR. 2004. Intratesticular androgen levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat Sertoli cells. *Biol Reprod*. 71:1348–1358.
- Kuzelová K, Grebenová D, Hrkal Z. 2007. Labeling of apoptotic JURL-MK1 cells by fluorescent caspase-3 inhibitor FAM-DEVD-fmk occurs mainly at site(s) different from caspase-3 active site. *Cytom A*. 71:605–611.
- Linder RE, Strader LF, Slott VL, Suarez JD. 1992. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*. 6:491–505.
- Liu R-F, Fu G, Li J, Yang Y-F, Wang X-G, Bai P-D, Chen Y-D. 2018. Roles of autophagy in androgen-induced benign prostatic hyperplasia in castrated rats. *Exp Ther Med*. 15:2703–2710.
- Meyer D, Zeileis A, Hornik K. 2014. *vcd: visualizing categorical data*. Thousand Oak (CA, USA): Sage.



- Mirosevich J, Bentel JM, Zeps N, Redmond SL, D'Antuono MF, Dawkins HJ. 1999. Androgen receptor expression of proliferating basal and luminal cells in adult murine ventral prostate. *J Endocrinol.* 162:341–350.
- Niaraki MA, Subramanian MG, Moghissi KS. 1982. Effects of serotonin on reproductive hormone levels and testis morphology in adult male rats. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 170:464–470.
- O'Shaughnessy PJ. 2014. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 29:55–65.
- O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Abel MH. 2010. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reprod Camb Engl.* 139:177–184.
- Pozarowski P, Huang X, Halicka DH, Lee B, Johnson G, Darzynkiewicz Z. 2003. Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation. *Cytom A.* 55:50–60.
- Ramaswamy S, Weinbauer GF. 2014. Endocrine control of spermatogenesis: role of FSH and LH/testosterone. *Spermatogenesis.* 4:e996025.
- Rasband WS. 2005. ImageJ (computer program). Bethesda (MD): US National Institutes of Health.
- Robaire B, Hamzeh M. 2011. Androgen action in the epididymis. *J Androl.* 32:592–599.
- Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist M-C. 2006. The epididymis. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Physiology of reproduction.* 3rd ed. Vol. 2. New York (USA): Elsevier, Inc; p. 1071–1148.
- Rothman RB, Jayanthi S, Wang X, Dersch CM, Cadet JL, Prisinzano T, Rice KC, Baumann MH. 2003. High-dose fenfluramine administration decreases serotonin transporter binding, but not serotonin transporter protein levels, in rat forebrain. *Synap N Y N.* 50:233–239.
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. 1990. *Histological and histopathological evaluation of the testis.* Clearwater (FL, USA): Cache River Press.
- Sabour M, Khoradmehr A, Kalantar SM, Danafar AH, Omidi M, Halvaei I, Nabi A, Ghasemi-Esmailabad S, Talebi AR. 2017. Administration of high dose of methamphetamine has detrimental effects on sperm parameters and DNA integrity in mice. *Int J Reprod Biomed Yazd Iran.* 15:161–168.
- Sanders-Bush E, Bushing JA, Sulser F. 1972. LongTerm effects of p-cl-amphetamine on the tryptophan hydroxylase activity and on the levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic in brain. *Eur J Pharmacol.* 20:385–388.
- Sanders-Bush E, Sulser F. 1970. P-chloroamphetamine: in vivo investigations on the mechanism of action of the selective depletion of cerebral serotonin. *J Pharmacol Exp Ther.* 175:419–426.
- Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, et al. 1996. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI risk science institute expert working group on sperm evaluation. *Reprod Toxicol.* 10:237–244.
- Sessa B. 2017. Why psychiatry needs 3,4-methylenedioxy-methamphetamine: a child psychiatrist's perspective. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* 14:741–749.
- Team RDC. 2011. R: a language and environment for statistical computing [internet]. Vienna (Austria). <http://www.R-project.org/> (Accessed on 18 October 2016).
- Tinajero JC, Fabbri A, Ciocca DR, Dufau ML. 1993. Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology.* 133:3026–3029.
- Tinajero JC, Fabbri A, Dufau ML. 1992. Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. *Endocrinology.* 130:1780–1788.
- Tsai SC, Chen JJ, Chiao YC, Lu CC, Lin H, Yeh JY, Lo MJ, Kau MM, Wang SW, Wang PS. 1997. The role of cyclic AMP production, calcium channel activation and enzyme activities in the inhibition of testosterone secretion by amphetamine. *Br J Pharmacol.* 122:949–955.
- Walther DJ, Bader M. 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol.* 66:1673–1680.
- Wang R-S, Yeh S, Tzeng C-R, Chang C. 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 30:119–132.
- Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Rittmaster RS. 1996. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J Clin Invest.* 98:2558–2563.