

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD TESTICULAR EN UN MODELO
FARMACOLÓGICO DE MANÍA EN RATAS**

por

Emiliano GONZÁLEZ MILANO

Alenka SILVA DÍAZ PÉREZ

Laura SIRI ROSSI



FV-34451

TESIS DE GRADO presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias.

Orientación: Tecnología de los Alimentos / Medicina.

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

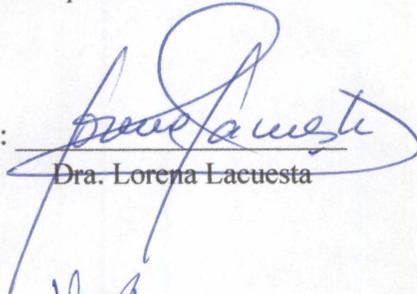
URUGUAY

2020

PÁGINA DE APROBACIÓN.

Tesis de grado aprobada por:

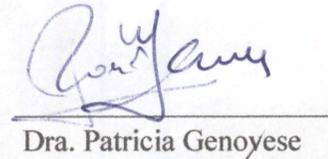
Presidente de Mesa:


Dra. Lorena Lacuesta

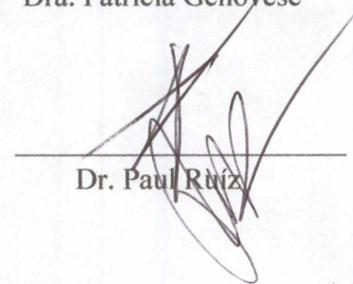
Segundo Miembro:


Dra. Jessika Urbanavicius

Tutor:

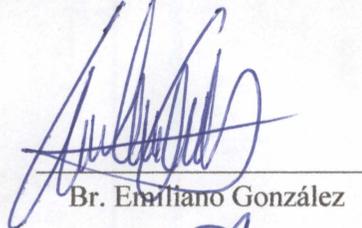

Dra. Patricia Genoyese

Co-Tutor:

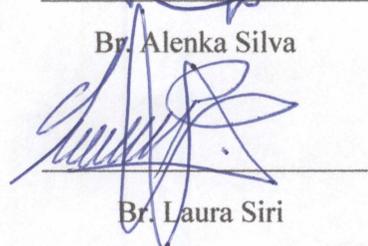

Dr. Paul Rúa

Fecha: 11 de diciembre de 2020.

Autores:


Br. Emiliano González


Br. Alenka Silva


Br. Laura Siri

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a nuestras familias por el apoyo incondicional a lo largo de la carrera tanto monetario como anímico.

En la parte académica, agradecer a profesores, profesionales y funcionarios que fueron parte de este proceso infinito de aprendizaje, a la Facultad de Veterinaria que nos dio la oportunidad de formarnos como profesionales, así como personas.

A nuestra tutora Dra. Patricia Genovese y co-tutor Dr. Paul Ruiz por la dedicación, colaboración permanente, calidad humana y excelente ambiente de trabajo.

A los amigos y compañeros de Facultad que hemos ido ganando en el transcurso de toda nuestra formación, con los que compartimos horas de estudio, risas, nervios y mates, muchos mates.

A nosotros mismos, porque, aunque no ha sido un camino fácil, acá estamos, por decisión vocación y por sobre todo nunca bajar los brazos y lograr sobreponernos a las adversidades.

A nuestras mascotas, las que están y a las que les tocó partir, las cuáles supieron colaborar en estudios como por ejemplo semiología entre otras materias.

A este tribunal, por su tiempo, respeto, atención e interés.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	9
-Trastornos del ánimo en humanos y animales	9
-Trastornos del estado de ánimo y hormonas sexuales	9
-Testículos y su estructura	10
-Apoptosis y proliferación celular	11
-Modelos animales de trastornos de estado de ánimo	11
-Anfetamina como modelo farmacológico de manía y posibles efectos reproductivos	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
- Animales, diseño experimental y tratamiento farmacológico	14
- Obtención de diámetros de túbulo seminífero	14
- Detección de células en proliferación (PCNA) y en apoptosis (Caspasa3)	16
- Análisis estadístico	18
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Lista de tablas

Tabla 1 Diferencia entre pesos corporales y testiculares entre grupos tratados y controles..... Página 18

Lista de figuras

Figura 1: Imágenes obtenidas a mediano aumento de testículo de rata a los 30 días de vida coloreados con hematoxilina-eosina. En A se observan marcadas con flechas dos células de Leydig. En B se observa la representación de dos medidas de diámetro de túbulos seminíferos..... Página 15

Figura 2: Imágenes histológicas obtenidas de preparados tratados con la técnica de inmunohistoquímica para PCNA. En A se observa un corte tratado con el primario anti PCNA. Con flecha se señala un CL positiva. En B se observa la imagen del control negativo. Las barras representan 50 μmPágina 16

Figura 3: Imágenes histológicas obtenidas de preparados tratados con la técnica de inmunohistoquímica para caspasa 3. En A se observa un corte tratado con el primario anti caspasa 3. Con flecha negra se señala una CL positiva y con flecha roja una CL negativa. En B se observa la imagen del control negativo. Las barras representan 50 μm Página 16

Gráfico 1. Porcentaje de células de Leydig positivas a la PCNA..... Página 18

Gráfico 2. Porcentaje de células de Leydig positivas a caspasa 3..... Página 19

Gráfico 3. Diámetro de túbulos seminíferos de testículos de ratas expresados en micrómetros..... Página 19

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar cómo afecta la anfetamina la histofisiología testicular en ratas adolescentes. Esta es una droga sintética, adrenérgica y estimulante del sistema nervioso central. Se trabajó con 14 ratas Wistar macho de 30 días de edad. Se dosificó a los animales con anfetamina, 4 mg/kg durante 5 días. La anfetamina se dio en solución fisiológica y se administró de manera intraperitoneal. Se estudió por inmunohistoquímica, como afecta esta droga, la expresión de las proteínas indicadoras de proliferación celular o apoptosis, PCNA y Caspasa-3, respectivamente, en células de Leydig, y se midió los diámetros de los túbulos seminíferos. Los resultados mostraron que la administración de anfetaminas en ratas adolescentes generó ($p=0,1$) a la disminución del marcador molecular PCNA, indicativo. Por otro lado, no se encontraron diferencias en el porcentaje de células de Leydig positivas a la Caspasa 3, ni en los diámetros de los túbulos seminíferos entre los grupos experimentales. Si bien los resultados no son contundentes en términos estadísticos se hace necesario seguir estudiando el efecto visto de la anfetamina sobre PCNA testicular dado su amplio uso en medicina humana y animal.

SUMMARY

The aim of this work is to study how amphetamine affects testicular histophysiology in adolescents rats. This drug is a central nervous system stimulant substance and is commonly utilized for Attention Deficit Hyperactivity Disorder treatment. Fourteen male 30-day-old Wistar rats were used. Animals were administered an intraperitoneal injection of 4mg/kg amphetamine in saline solution. Immunohistochemistry was performed to study how this drug affects PCNA and Caspase-3 expression in Leydig cells. Seminiferous tubules diameter were measured too. Results showed that amphetamine administration in adolescents rats tended ($p=0,1$) to decrease PCNA expression. No differences were found between Caspase-3 positive cells percentage nor in the diameter of the seminiferous tubules between experimental groups. Although the results are not conclusive in statistical terms, it is necessary to continue studying the amphetamine effect on testicular PCNA since it is widely used in human and animal medicine.

INTRODUCCIÓN

Varios estudios han demostrado un aumento de la liberación de dopamina (DA) asociado con el comportamiento de activación, cuando un animal se introduce en un entorno no familiar, la novedad desencadena una serie de rasgos de comportamiento como caminar, retroceder en las extremidades posteriores, apoyarse contra las paredes y olfatear, similar a un comportamiento maniaco (Viggiano *et al.*, 2003).

Uno de los neurotransmisores catecolaminérgicos más importantes del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos es la DA y actúa a nivel de éste regulando diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad, así como en la regulación neuroendócrina. Existen mecanismos que regulan de manera muy precisa su síntesis y liberación. Las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación de 5 tipos de receptores dopaminérgicos. Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas del SNC (aunque de manera diferencial de acuerdo al subtipo) donde son responsables de diversas acciones fisiológicas de la DA. El estudio de los sistemas y receptores dopaminérgicos del SNC ha generado gran interés, debido a que diversas alteraciones en la transmisión dopaminérgica han sido relacionadas, directa o indirectamente, con trastornos severos como la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia, así como con la adicción a drogas (anfetaminas y cocaína, por ejemplo) (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

Las amfetaminas son aminas simpaticomiméticas, cuya fórmula química estructural es similar a la adrenalina.

Los estimulantes tales como amfetaminas y metilfenidato solo son adecuados para el tratamiento de agresión cuando ésta forma parte del trastorno por déficit de atención (TDAH) (Dodman, 1999). Por otro lado, se sabe que en el mundo un 5% de los niños son diagnosticados con TDAH (síndrome de déficit de atención con hiperactividad), éste afecta la atención y la performance escolar. El tratamiento actual para el TDAH es con psicoestimulantes como metilfenidato y amfetaminas (Ruiz *et al.*, 2017). El tratamiento de TDAH con o sin agresión asociada es un síndrome bien descrito en medicina humana, aunque aún no ha sido bien documentado en medicina veterinaria. Estudios en animales, sugieren que la exposición constante a estimulantes puede sensibilizar la respuesta neuronal y comportamental en los siguientes desafíos frente a la exposición a drogas aumentando el riesgo de consumo problemático (Mannuzza *et al.*, 2008; Schenk & Davidson, 1998), pero en este sentido no abunda la bibliografía que estudie los efectos de estos tratamientos sobre los efectos sobre la histofisiología testicular cuando los animales están en la pubertad.

Está aceptada la utilización de animales de experimentación -ya sea para- modelar patologías del comportamiento humano, como para entender aspectos patológicos en la conducta de animales de compañía e incluso animales que por distintas razones se encuentran en confinamiento y desarrollan trastorno del comportamiento (Caorsi & Redes, 2020).

Trastornos del ánimo en humanos y animales

Los trastornos del estado de ánimo afectan a humanos y animales, entre ellos se incluye los estados depresivos y los maníacos. (Ruiz *et al.*, 2017, 2018; Caorsi & Redes, 2020). En el presente estudio pretendemos hacer énfasis en el estado maníaco.

En humanos los estados los episodios maníacos se caracterizan por un estado anímico permanentemente elevado, expansivo o irritable. Los síntomas que presentan son: grandiosidad, verbosidad, disminución de la necesidad de dormir, fuga de ideas, aumento de actividad o agitación psicomotora, conductas excesivas (APA-DSM-IV, 2002).

En animales, en cambio las manifestaciones de manía pueden ser subjetivase los síntomas incluyen sobreactividad, hipersexualidad, irritabilidad y reducción de la necesidad de dormir, con déficit cognitivos recientemente vinculados al resultado funcional (Young *et al.*, 2011).

Para poder comprender y estudiar las bases neurobiológicas de los trastornos de estado de ánimo, se han desarrollado varios modelos animales. Si bien han sido de gran utilidad, hay que conocer sus limitaciones como la de reproducir exactamente la sintomatología que presentan los humanos, manteniendo siempre una distancia entre la información que nos brindan los modelos en animales y la realidad subjetiva propia de la enfermedad, pero desde el punto de vista del entendimiento fisiopatológico, la utilización de dichos modelos sigue siendo de importante utilidad, por la imposibilidad de emplear técnicas invasivas sobre el SNC de los seres humanos (Escorihuela & Fernández-Teruel, 1998; Overmier, 2007; Laborda, 2009). Dichos modelos deben cumplir determinados criterios como ser la similitud entre los síntomas observados clínicamente y los observados en los animales, deben tener valor predictivo. Hay modelos que se basan en la conducta espontánea que presentan los animales (respuestas incondicionadas) y algunos otros en el condicionamiento de ciertas respuestas (Cruz –Morales 2003)

Trastornos del estado de ánimo y hormonas sexuales

La función reproductiva en humanos puede alterarse por factores externos o ambientales, como ejemplos la exposición a ambientes hipóxicos, trastornos nutricionales como la anorexia de origen nerviosa, el consumo crónico de alcohol, consumo de agroquímicos que ocasionaron la destrucción del epitelio germinal, modificaron la estructura tubular seminífera, alteraron el transporte de los espermatozoides y la maduración de los gametos, entre otras cosas (Bernardi *et al.*, 2010). Otros autores, mostraron que en hámster adultos o prepúberes mantenidos en periodos de iluminación cortos, disminuye de manera significativa la concentración de la Hormona Luteinizante (LH), el tamaño y peso de los testículos (Steger *et al.*, 1990). Esta función se ha visto vinculada con las variaciones de estado de ánimo, particularmente en la depresión, existiendo muy poca información sobre que sucede en los estados maníacos ni como se da la causalidad con las variaciones anímicas.

Testículo y su estructura

El testículo es la gónada sexual masculina que produce desde el punto de vista endócrino hormonas como la testosterona entre otras y a su vez espermatozoides de forma exócrina, es decir que es una glándula mixta (Dyce, 2012).

La actividad esteroideogénica en las ratas Wistar, comienza cuando el feto llega a 15,5 días de gestación y por lo tanto produce testosterona (Jost *et al.*, 1981; Huhtaniemi & Pelliniemi, 1992). Ya en la pubertad es que el órgano adquiere la capacidad de producir espermatozoides; esto ocurre en la rata, pasados los 30 días de vida (Abd El-Meseeh *et al.*, 2016), y mantiene estas funciones endócrinas y exócrinas a lo largo de toda la vida. El desarrollo de la rata macho se caracteriza por presentar cuatro fases: periodo neonatal, periodo infantil, periodo juvenil y periodo peripuberal, comprendido este último entre los días 35 a 60 postnatal. La pubertad se presenta aproximadamente a los 40-42 días de edad, es decir, dentro del periodo peripuberal. La pubertad se define como un proceso fisiológico caracterizado por el inicio de la actividad de las glándulas reproductoras y la manifestación de los caracteres secundarios (Rivera, 2003). El parénquima testicular está constituido por un intersticio y túbulos seminíferos (estructuras huecas revestidas por un epitelio estratificado muy particular), es en el epitelio seminífero donde se producen los espermatozoides (Bergh, 1982). Este órgano cumple con funciones endócrinas y exócrinas. La espermatogénesis, es el proceso por el cual las espermatogonias se transforman en espermatozoides (Jones, 1997; McLachlan, 2002, Sanchez, 2005) y se ha visto que este proceso está alterado en trastornos del estado de ánimo (Cassano & Argibay, 2009). En él se producen los espermatozoides a lo largo de toda la vida del macho. Entre los parámetros que pueden describir la capacidad de producir espermatozoides de una especie es el diámetro de este túbulo (Kotsampasi *et al.*, 2009). Entre los túbulos seminíferos se encuentra el intersticio testicular, donde se encuentran las células de Leydig (CL) (ver fig.1). Como se menciona anteriormente, el testículo es una glándula mixta (exócrina y endócrina), de hecho es la principal glándula productora de andrógenos en el macho y son estas células las responsables de producirlos desde etapas fetales (Smith & Walker, 2014). Las CL se encuentran en el intersticio y pueden dividirse durante toda la vida del animal (Vornberger *et al.*, 1994). Se sabe que las CL fetales y pos natales constituyen poblaciones celulares diferentes (Roosen-Runge & Anderson, 1959). Las CL funcionales en el adulto comienzan a aparecer luego que se diferencian a partir de precursoras fetales en la prepubertad. En la rata este proceso comienza de forma sostenida a las dos semanas de vida (revisión: Mendis- Handagama & Ariyaratne, 2001). El testículo conserva en el intersticio una población de células progenitoras con alta capacidad mitótica toda la vida y recurre a ellas en caso de necesitar CL (Benton *et al.*, 1995; Stanley *et al.*, 2012).

En las ratas macho las células intersticiales fetales se comienzan a diferenciar en el día 13,5 de gestación a partir de células mesenquimales intersticiales (Kuopio *et al.*, 1989). En el adulto las CL responden a estímulos de la hormona LH produciendo andrógenos (Tran *et al.*, 2006), y en caso de ser necesario estas células pueden aumentar su número para aumentar la producción de hormonas (Hardy *et al.*, 2005; McKinnell & Sharpe, 1995).

Por otra parte, los andrógenos son fundamentales en el testículo para mantener la espermatogénesis (McKinnell & Sharpe, 1995; O'Shaughnessy, 2014), y en este sentido se sabe que no solo son importantes para producir los espermatozoides, sino también para los procesos de maduración que ocurren en el epidídimo, y la posterior fertilidad (Simanainen *et al.*, 2008). Por lo tanto, estas células son fundamentales para que el testículo cumpla sus funciones.

Apoptosis y proliferación celular

Todos los tejidos al menos en algún momento de la vida están sujetos a proliferación y muerte celular de forma alternada para obtener el equilibrio adecuado en las poblaciones celulares. La apoptosis es la muerte celular programada y ocurre según un patrón absolutamente predecible, el núcleo se condensa, puede fragmentarse y la célula es reabsorbida (Bray *et al.*, 1996). Este proceso tiene dos vías: la vía extracelular (la vía del receptor de la muerte) y la ruta intracelular (mediada por las mitocondrias y la vía del retículo endoplasmático), con ambas vías activando la proteína Caspasa 3. A su vez la Caspasa 3 provoca que la apoptosis entre en una etapa irreversible (Ola *et al.*, 2011). Por lo tanto, la Caspasa 3 se considera uno de los ejecutores de apoptosis más importantes en la familia de las caspasas y el principal factor de efecto en el proceso apoptótico (Fadeel *et al.*, 2008).

Por otra parte, la proliferación celular es fundamental para reponer y mantener las poblaciones celulares. Uno de estos marcadores es el antígeno nuclear de proliferación celular conocido por su sigla en inglés como PCNA. Este antígeno ha sido identificado como una proteína no histona presente en los núcleos de células en proliferación (Miyachi *et al.*, 1978; Mathews *et al.*, 1984). Es cofactor de la ADN polimerasa, que también se encuentra en las células intersticiales, entre otros tipos celulares (Chapman & Wolgemuth, 1994). La PCNA juega un papel importante en el metabolismo de los ácidos nucleicos. La proteína es esencial para la replicación del ADN, está involucrada en la reparación de ADN, en el ensamblaje de la cromatina, y en varias instancias se ha demostrado que participa en la transcripción del ARN (Kelman 1997). Actualmente se utiliza para evidenciar células en proliferación por inmunohistoquímica, y esto ya está descrito para el testículo de la rata (Shi *et al.*, 2015).

Modelos animales de manía

Antecedentes particulares

En estudios anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo se usó la Reserpina (droga antipsicótica e hipotensora arterial) depletora de monoaminas en el sistema nervioso para modelar cuadros depresivos en ratas (Seeman & Lee, 1975; Shamon & Pérez, 2009; Ruiz *et al.*, 2018). En este modelo, entre otras variables, se estudió si esta droga podría modelar lo visto en humanos deprimidos a nivel testicular estudiando la expresión de PCNA (proteínas de células intersticiales testiculares) y Caspasa-3 (enzima asociada a muerte celular) los cuales utilizamos como marcadores en células de Leydig de ratas Wistar adolescentes mediante técnica de inmunohistoquímica

En este estudio no se encontraron diferencias inherentes al tratamiento en el peso de los animales, ni en el peso de los testículos promediados, ni entre sí (derecho vs derecho, izquierdo vs izquierdo). A nivel molecular, se encontraron diferencias significativas en la positividad de las células intersticiales a PCNA. Por el contrario, los animales tratados expresaron significativamente menor proporción de células positivas a caspasa-3 que sus pares controles. En tanto, no se encontraron diferencias significativas en los diámetros de los túbulos seminíferos (Ruiz *et al.*, 2018).

Los estimulantes, como anfetamina, se han utilizado ampliamente como modelo animal de manía, porque la anfetamina induce agitación psicomotora, que se observa comúnmente durante la manía, y la actividad locomotora es medible fácilmente en ratas (Davies *et al.*, 1974; Berggren *et al.*, 1978; Gould *et al.*, 2001).

Los modelos animales de manía comenzaron con evidencia observacional en los 70, los psicoestimulantes (como en este caso lo es la anfetamina) pueden producir síntomas que se asemejan a los de la manía, tanto en sujetos normales como sanos (Meyen-dorff *et al.*, 1985; Peet y Peters, 1995; Hasler *et al.*, 2006), como también se pueden exacerbar los síntomas o inducir episodios de esta índole en pacientes en estudio. Los efectos de los agentes farmacológicos (en este caso estimulantes) en el comportamiento han sido ampliamente utilizados como modelos animales de manía (Frey *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2007). La manía se caracteriza por un amplio conjunto de síntomas, entre los cuales, no siempre está presente la hiperactividad motora, en su mayoría, los modelos utilizan dosis agudas, mientras, la manía, en cambio, es una enfermedad crónica con alteraciones a largo plazo en el comportamiento (Young *et al.*, 2011).

Anfetamina como modelo farmacológico de manía y posibles efectos reproductivos.

La manía ha sido reconocida durante mucho tiempo como comportamiento aberrante indicativo de enfermedad mental, los estados maníacos incluyen una variedad de complejos y síntomas multifacéticos que desafían las claras distinciones clínicas. Los síntomas incluyen sobreactividad, hipersexualidad, irritabilidad y la necesidad reducida de dormir, con déficits cognitivos recientemente vinculados al resultado funcional. (Young *et al.*, 2011).

La exposición repetida a metilfenidato (MFD) y anfetamina (AMPH, por sus siglas en inglés), se usa para modelar estados maníacos en animales de laboratorio (Frey *et al.*, 2006). El estudio propuesto de esta tesis surge de un experimento donde se evaluó la actividad motora, respuesta de ansiedad y el consumo de alcohol en estos modelos asociados a los niveles de monoaminas en el sistema nervioso. Pudiendo modelar con anfetamina, pero no con metilfenidato, un fenotipo comportamental de tipo maníaco homólogo al visto en humanos (Ruiz *et al.*, 2018) En este ensayo no se evaluaron variables reproductivas, como si se hizo con el modelo de depresión usado por el mismo grupo ya comentado.

Algunas citas muestran que una sola inyección de anfetamina intravenosa en ratas fue capaz de disminuir los niveles de testosterona en plasma estimulada por la hCG (human chorionic gonadotropin) y los niveles plasmáticos de LH no fueron alterados con esta inyección (Shiow-Chwen Tsai *et al.*, 1996).

En humanos de sexo masculino se evidencio como principales efectos de la droga la disminuci3n de los niveles de testosterona, en la producci3n de espermatozoides, disfunci3n er3ctil, disminuci3n del deseo sexual, impotencia, aumento del tama1o de la pr3stata, infertilidad, retardo en la eyaculaci3n, como tambi3n la disfunci3n sexual (Gonz3lez Marquetti *et al.*, 2005), sin contar con evidencias moleculares de los efectos que tiene a este nivel la anfetamina para generar estas consecuencias.

En esta propuesta utilizamos la anfetamina para modelar un cuadro man3aco en ratas Wistar machos de 30 d3as. Luego de confirmado el efecto de la droga a nivel comportamental fueron sacrificados para diseccionar los test3culos y estudiar por t3cnicas histol3gicas variables relacionadas con la funcionalidad testicular como la expresi3n de PCNA, Caspasa-3, peso corporal, testicular y di3metro de t3bulos semin3feros.

HIPÓTESIS

La administración de anfetamina en la pubertad afectará negativamente el desarrollo y función testicular de animales púberes.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si la administración de anfetaminas afecta negativamente la función testicular en ratas macho púberes.

Objetivos específicos:

1. Estudiar si la administración de anfetamina afecta la ganancia de peso de las ratas macho en el periodo de pubertad.
2. Estudiar si la administración de anfetamina afecta el peso testicular de las ratas macho en el periodo de pubertad.
3. Estudiar si la administración de anfetamina afecta el diámetro de los túbulos seminíferos de las ratas macho en el periodo de pubertad.
4. Estudiar si la administración de anfetamina modifica la tasa de proliferación de las células de Leydig estimando la proporción de estas células positivas a PCNA.
5. Estudiar si la administración de anfetamina modifica la tasa de muerte de las células de Leydig estimando la proporción de estas células positivas a caspasa 3.

Animales, diseño experimental y tratamiento farmacológico.

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de experimentación animal (LEA) de la Facultad de Veterinaria. Para este experimento se obtuvo previamente la autorización de la CEUA, protocolo número: 111130-000658-13

Se utilizaron 14 ratas Wistar machos de 30 días de edad provistos por la Unidad de Reactivos Biológicos de Experimentación de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República (URBE-Fmed-UdelaR). Los animales fueron alojados en cajas con agua y comida *ad libitum*. El ambiente del LEA se mantuvo a 22 °C y 12 horas de luz.

Los individuos fueron divididos en 2 grupos, control (GC) y tratado (GT) de forma aleatoria, ambos grupos contaron con el mismo número de animales (n= 7).

Al GT se le administró anfetamina [intraperitoneal, 4 mg/kg durante 5 días, Sigma-Aldrich, EE.UU.]. La droga se preparó en solución fisiológica. A los animales pertenecientes al GC se les administró únicamente solución fisiológica por la misma vía en volumen equivalente.

El protocolo tuvo como objetivo de otro grupo el estudio comportamental de los animales bajo el efecto de esta droga con respecto a sus controles. Luego de finalizado este experimento los animales fueron llevados al laboratorio de Histología, fueron pesados y sacrificados. Sus testículos fueron disecados, pesados y fijados por inmersión en solución fijadora de Bouin durante 24 horas. Posteriormente fueron deshidratados por inmersión sucesiva en etanol 70°, 95° y 100° e incluidos en bloques de parafina.

Se obtuvieron con micrótopo 3 cortes histológicos de 6 µm de cada animal. Los antedichos cortes se utilizaron para colorear con hematoxilina y eosina (ver fig. 1) o para aplicar la técnica de inmunohistoquímica (ver fig. 2-3).

Obtención de diámetros de túbulo seminífero.

Sobre un juego de cortes histológicos tratados con Hematoxilina y Eosina se tomaron imágenes con un sistema de análisis de imágenes: microscopio óptico Olympus BX50, (Olympus, Tokio, Japón), video cámara (SSC-C158P; Sony, Tokio, Japón) y computadora personal con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA) a un aumento de 200 x en el monitor del pc.

El diámetro de los túbulos seminíferos se determinó midiendo dos diámetros perpendiculares en 30 cortes transversales en cada animal (ver fig.1).



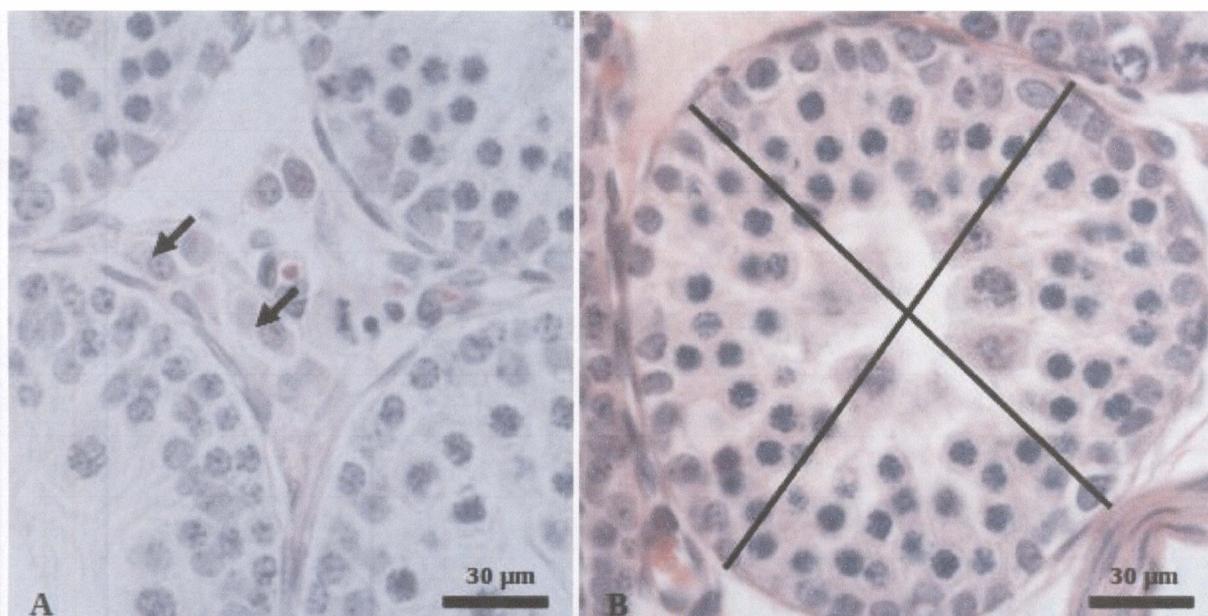


Figura 1. Imágenes obtenidas a mediano aumento de testículo de rata a los 30 días de vida coloreados con hematoxilina-eosina. En A se observan marcadas con flechas dos células de Leydig. En B se observa la representación de dos medidas de diámetros de túbulos seminíferos.

Detección de células en proliferación (PCNA) y en apoptosis (caspasa 3).

Se evidencio las células en proliferación marcando aquellas que estaban expresando la PCNA por inmunohistoquímica. Se utilizó el anticuerpo primario anti PCNA (Dako M0879, USA) en un juego de láminas separadas. La corrida incluyó un control negativo, siendo este una muestra repetida de un animal al azar al que no se le colocó primario y en su lugar se lo dejó incubar en PBS.

Para evidenciar células en apoptosis se utilizó el anticuerpo primario anti caspasa 3(ab 4051, Abcam, UK) en otro juego de laminas.

En ambas corridas de inmunohistoquímica se aplicó el kit amplificador Mach 2 Double (Mouse-HRP + Rabbit-AP, Polymer detection kit, Biocare medical, USA) con cromógeno DAB.

Posteriormente se evaluó en 300 células de Leydig la positividad para cada anticuerpo primario. Por lo tanto, se obtuvo el número de células positivas por animal (ver figura 2-3).

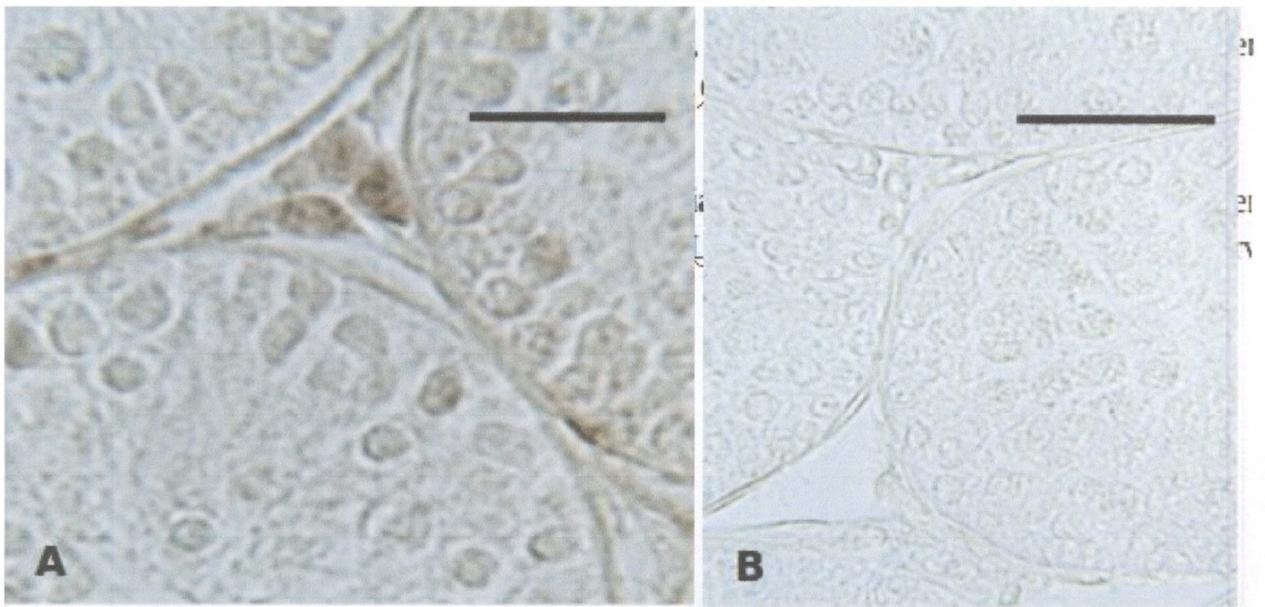


Figura 2: Imágenes histológicas obtenidas de preparados tratados con la técnica de inmunohistoquímica para PCNA. En A se observan un corte tratado con el primario anti PCNA. Con flecha se señala una CL positiva. En B se observa la imagen del control negativo. Las barras representan 50 μm .

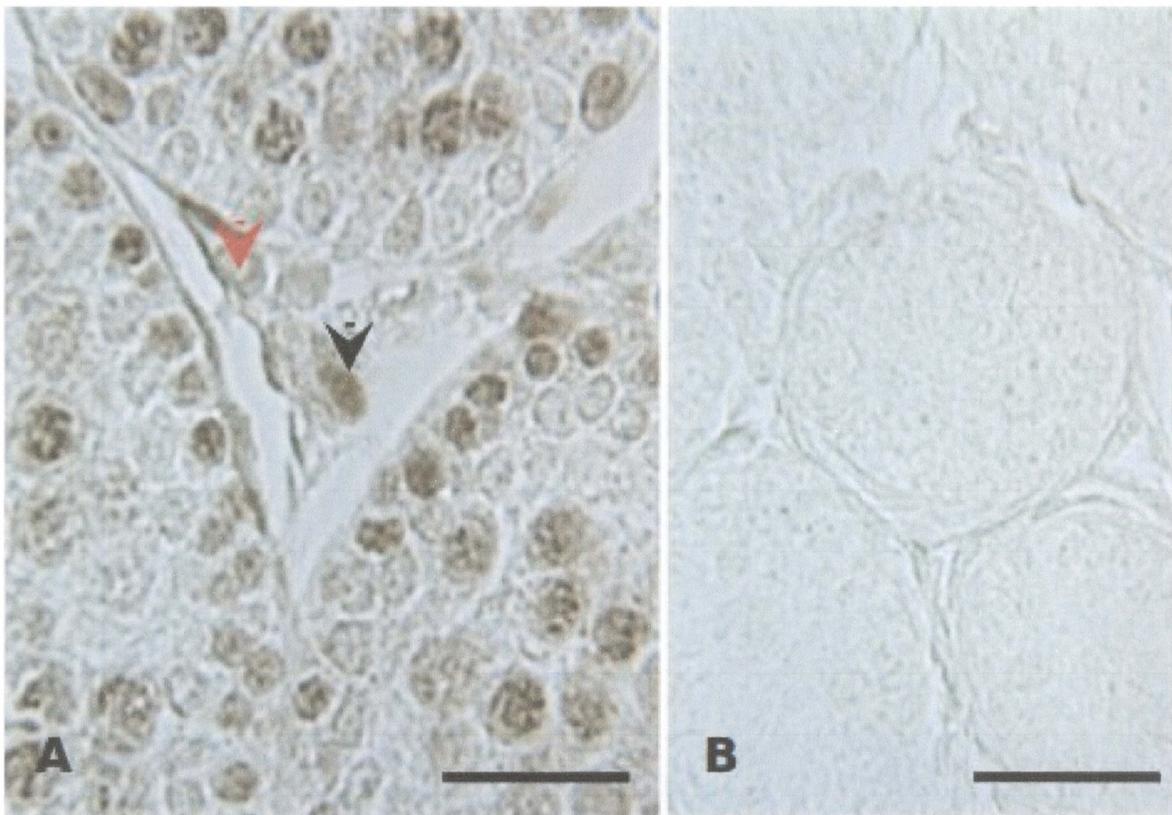


Figura 3: Imágenes histológicas obtenidas de preparados tratados con la técnica de inmunohistoquímica para caspasa 3. En A se observan un corte tratado con el primario anti caspasa 3. Con flecha negra se señala una CL positiva y con flecha roja una CL negativa. En B se observa la imagen del control negativo. Las barras representan 50 μm .

Análisis estadístico.

Todas las variables fueron expresadas como medias \pm SEM. Se constató normalidad con tests de Shapiro-Wilks. La variación entre ratas (dentro de una misma camada) dentro de un mismo tratamiento fué considerada como parte del error experimental. Las diferencias entre grupos en las variables histológicas, así como los pesos testiculares y corporales fueron comparadas por ANOVA. Los valores fueron considerados diferentes a $p \leq 0.05$. Para todos estos cálculos se utilizará el programa Statistica versión 6 (Palo Alto CA, U.S.A).

RESULTADOS

Los pesos corporales y testiculares no fueron diferentes entre grupos tratados y controles. Tampoco se encontraron diferencias en el índice somatogonadal* (Tabla 1).

Tabla 1: Variables medidas en el modelo manía en ratas macho púberes

Nombre de Variable	Control	Tratados anfetamina 4 mg/kg	p
Peso al sacrificio	102,3 ± 8,28	110,21 ± 9,21	0,13
Peso test. Izquierdo	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,95
Peso test. Derecho	0,49 ± 0,02	0,48 ± 0,05	0,8
Peso promedio testículos	0,48 ± 0,02	0,48 ± 0,05	0,87
Índice somatogonadal	0,0047± 0,0004	0,0044 ± 0,0006	0,26

*El índice somatogonadal (GSI), es el cálculo de la masa de las gónadas como proporción de la masa corporal total (Anderson *et al.*, (1983)

$$\text{GSI} = (\text{peso de las gónadas} / \text{peso total del tejido}) \times 100$$

Se encontró una tendencia a la disminución en el porcentaje de CL positivas a la PCNA en el GT comparado con el GC (GT 16,06 ± 1,00 vs GC 22,76 ± 8,09, $p=0,1$) como se observa en el gráfico 1.

Por otro lado, tal y como se observa en el gráfico 2, no se encontraron diferencias en el porcentaje de CL positivas a CASPASA-3 (GT 8,70± 0,59 vs GC 8,29 ± 0,95, $p=0,3$).

Por último, tampoco se encontraron diferencias en los diámetros de los túbulos seminíferos entre los grupos experimentales (GT 146±7,60µm vs GC 148±6,86 µm; $P=0,56$) como se observa en el gráfico 3.

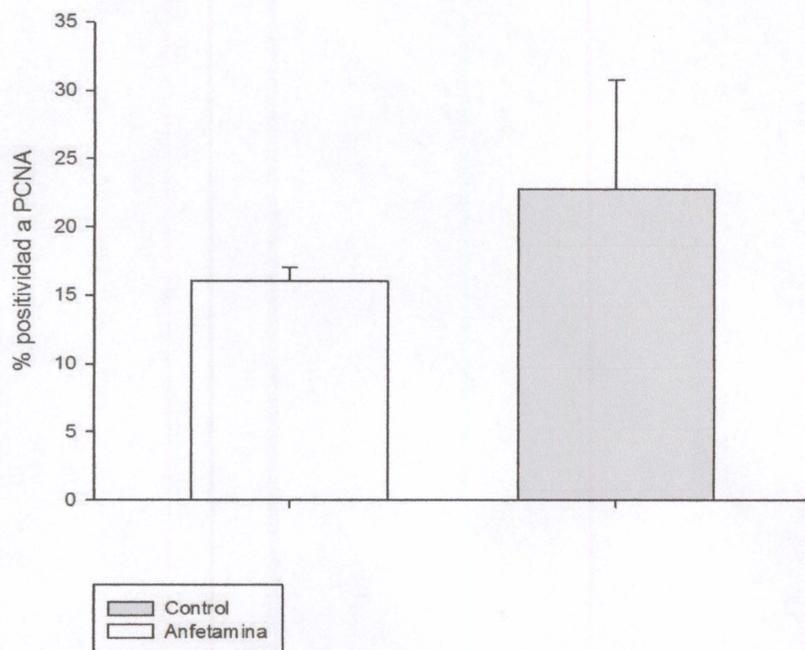


Gráfico 1. Porcentaje de células de Leydig positivas a la PCNA. Los animales tratados con anfetamina expresaron menos cantidad de células de Leydig positivas para PCNA. Los resultados se expresan como medias \pm SEM.

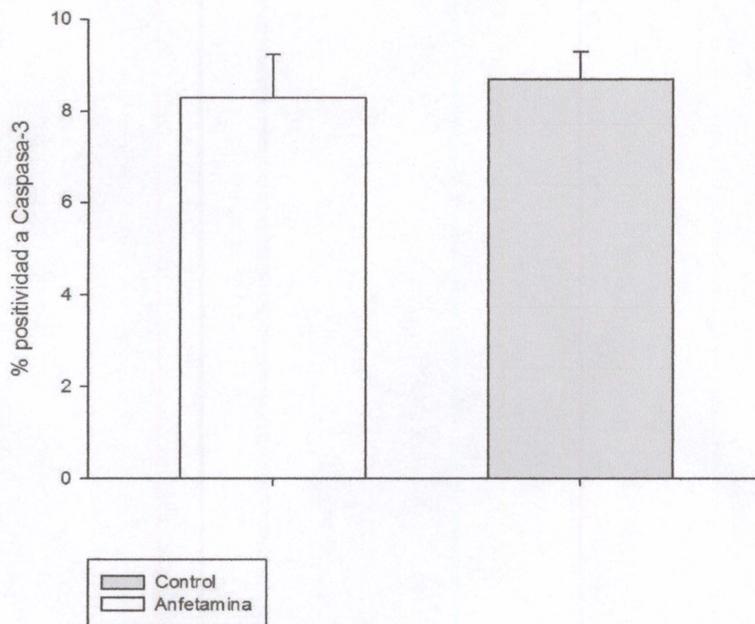


Gráfico 2. Porcentaje de células de Leydig positivas a caspasa 3. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. Los resultados se expresan como medias \pm SEM.

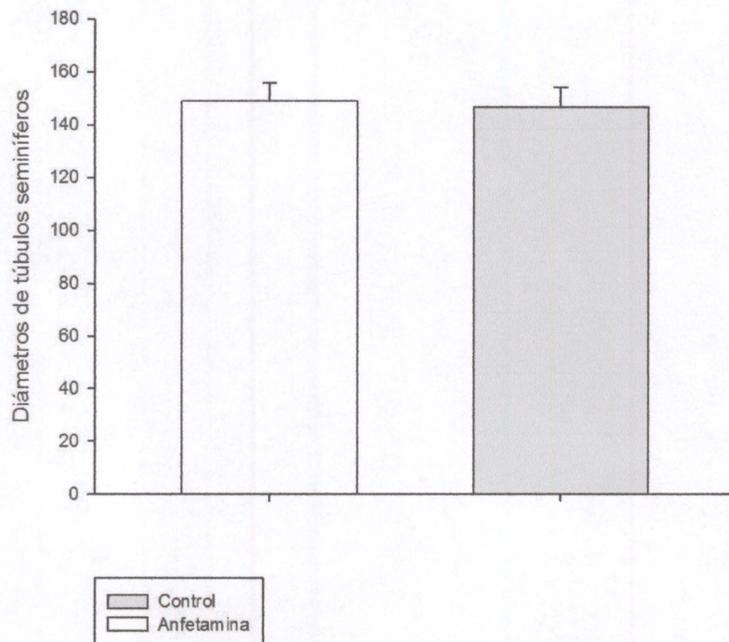


Gráfico 3. Diámetro de túbulos seminíferos de testículos de ratas expresados en micrómetros. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. Los resultados se expresan como medias \pm SEM.

DISCUSIÓN

Como fue planteado en la introducción, el objetivo principal de este trabajo consistió en estudiar cómo afecta la anfetamina (drogas sintéticas adrenérgicas que tienen un efecto estimulante del sistema nervioso central) la funcionalidad testicular en ratas Wistar adolescentes. Específicamente sobre daños en los testículos hay muy poca bibliografía, no siendo este el caso de los efectos sistémico, principalmente a nivel del SNC.

Recordemos que para este estudio se administró anfetaminas a ratas macho, con el objetivo de generar un modelo animal de manía y de esta forma estudiar el efecto que esta droga tiene sobre la funcionalidad testicular, aspecto muy poco estudiado al momento. Estos modelos en animales son importantes en la aproximación y aplicación a la medicina humana, para su mejor entendimiento a la hora de conocer los efectos de dicha droga y/o estado anímico, recordando la utilización de dicho espécimen a la hora de realizar pruebas médicas orientada a medicina humana principalmente (Cassano & Argibay, 2009).

En nuestro trabajo, para la variable peso, las ratas tratadas con anfetaminas, no demostraron cambios significativos al momento del sacrificio, como lo indica la gráfica 1. Sin embargo, la utilización de otras drogas psicoactivas pueden afectar esta variable, como es el caso de la Carbamazepina (CBZ) (droga utilizada para tratar convulsiones), que en su uso se observó una leve reducción en la ganancia de peso corporal en los sujetos tratados (Andretta, 2013), o el etanol al 15 % en el agua de beber a ratas Wistar adultas macho, durante 8, 16 y 24 semanas, provocó una disminución del consumo de líquido, del consumo de pienso y de la ganancia de peso corporal que se relaciona con el aporte de calorías vacías de esta droga (García & Dovale, 2003). Otra droga, como la conocida Cannabis Sativa es una hierba multiusos en la medicina tradicional, su extracto hidroalcohólico administrado intraperitonealmente durante 14 días consecutivos a ratas macho Wistar, donde se observó una disminución en el peso corporal del animal, y además resultó en una disminución significativa progresiva del conteo de espermatozoides, así como su motilidad y del diámetro de los túbulos seminíferos en comparación con el grupo control. Sin embargo, no afectó el peso testicular (Nahid Lotfi *et al.*, 2013).

En nuestro experimento no encontramos diferencias en el peso testicular. Diferentes drogas afectan de manera variable el peso testicular de la rata, por un lado, no se encontró diferencia en esta variable cuando las ratas Wistar adultas macho consumen etanol al 15% (García & Dovale, 2003). Sin embargo, se vio reducción del peso testicular en el grupo en un estudio para evidenciar el efecto de la CBZ en el día de destete 43, después del tratamiento con esta droga (Andretta, 2013). Siendo variable como diferentes psicoactivos impactan sobre el peso de estos órganos. Otros autores encontraron que el peso promedio de los testículos de los animales adultos expuestos a la administración de cocaína es menor en relación con el valor encontrado en su respectivo grupo de control (Zorzetto, 2007). En cuanto a nuestros resultados en peso corporal y testicular, el no haber

encontrado diferencias entre grupos nos indica que ambas variables no son sensibles a esta droga administrada de forma aguda. Por lo tanto, en estas variables es prudente realizar nuevos experimentos enfocados en el consumo crónico y en el efecto a largo plazo de la anfetamina.

En nuestro trabajo no se evidencian cambios en los diámetros de túbulos seminíferos como muestra la gráfica 3 en los resultados. Estudios hechos con etanol en ratas Wistar adultas macho, durante 8, 16 y 24 semanas, no afectó tampoco el diámetro de los tubos seminíferos, ni el volumen nuclear de las células de Leydig (García & Dovale, 2003). En este sentido otras drogas como la CBZ ha tenido efecto sobre la citoarquitectura del epitelio seminífero (Andretta, 2013). Resultando en otra variable afectada de diferente manera según el psicoactivo utilizado.

Por otra parte, los animales expuestos a crack tuvieron una reducción significativa de la cantidad promedio de células de Leydig presentes en los testículos de ratones adultos expuestos (Zorzetto, 2007). En otro trabajo encontraron que la nicotina (alcaloide líquido, oleaginoso, incoloro y tóxico presente en el tabaco) también se ha asociado con cambios degenerativos en los túbulos seminíferos revelados por una arquitectura tubular alterada, disminución del grosor de las células espermatogénicas, vacuolización de las células de Sertoli y una lámina basal engrosada, y se ha demostrado que estos cambios dependen de la dosis y la duración y son potencialmente reversibles, especialmente después de la exposición a dosis más bajas (Rego de Lima *et al.*, 2016). En este sentido, y con los resultados obtenidos, nosotros pensamos que no se puede descartar el efecto de las anfetaminas sobre el diámetro de los túbulos seminíferos puesto que la exposición a esta droga fue en un período corto de tiempo. Tal vez el diámetro de los túbulos seminíferos sea sensible a exposiciones crónicas a esta droga o incluso a dosis mayores que las trabajadas en el presente trabajo.

Con respecto a la proliferación y muerte celular, teníamos como antecedente un trabajo anterior de nuestro grupo en donde utilizamos Reserpina (droga antipsicótica e hipotensora arterial) utilizada para modelar cuadros depresivos en ratas (Seeman & Lee, 1975; Shamon & Perez, 2009). En este modelo, entre otras variables, se estudió si esta droga podría modelar lo visto en humanos deprimidos a nivel testicular estudiando la expresión y proporción de CL positivas a la PCNA (marcador de proliferación), y Caspasa-3 (marcador de apoptosis) en estas células intersticiales de ratas Wistar de edad similar a las del presente trabajo. Los animales tratados con reserpina expresaron significativamente mayor proporción de células positivas a ambas proteínas que sus pares controles. Además, los animales tratados expresaron significativamente menor proporción de células positivas a caspasa-3 que sus pares controles (Ruiz *et al.*, 2018).

Algunas citas muestran que una sola inyección de anfetamina fue capaz de disminuir los niveles de testosterona en plasma estimulada por la hCG (human chorionic gonadotropin) y los niveles plasmáticos de LH no fueron alterados con esta inyección (Shiow-Chwen Tsai *et al.*, 1996). Se evidencio como principales efectos de la droga la disminución de los niveles de testosterona, en la producción de espermatozoides, disfunción eréctil, disminución del deseo sexual, impotencia, infertilidad, retardo en la eyaculación, como también la disfunción sexual (González Marquetti *et al.*, 2005). No existen muchas investigaciones previas respecto al efecto de la anfetamina a nivel testicular, lo que hace que sea muy difícil comparar el trabajo realizado con otros autores.

La tendencia estadística encontrada en la proporción de CL expresando la PCNA de este trabajo nos marca que incluso cuando es administrada por pocos días esta droga sería capaz de afectar la proliferación de la célula estudiada. Estas células son responsables de producir

andrógenos que son fundamentales para el normal funcionamiento del aparato reproductor masculino, y las variables estudiadas relacionadas con la función testicular no mostraron diferencias (diámetros de túbulos seminíferos y peso testicular). Pensamos que es necesario un estudio específico diseñado para estudiar los efectos de las anfetaminas sobre la histofisiología testicular a corto, mediano y largo plazo, especialmente sobre la proliferación de las CL.

Por otro lado, no observamos en nuestras condiciones diferencias significativas en la expresión de CASPASA-3, el marcador indicativo de muerte celular. Por lo tanto, las anfetaminas no alterarían la tasa de apoptosis de las CL. Esto diferencia a la anfetamina de otros estimulantes como la **cocaína** dado que esta última puede inducir apoptosis en las células testiculares de animales tratados, con un aumento de la activación de caspasas-3 y 9 (Li & Zohu, 2013; Li *et al* 2003). Siendo pertinente comparar los diseños y los planes de dosificación entre estas drogas para entender como pueden afectar al testículo.

Con este trabajo pretendimos estudiar el impacto a nivel testicular de las anfetaminas, cuando se utilizan para modelar estados de manía en ratas. Es decir, ver otra perspectiva de los efectos de esta droga en el modelo en sí. Pensamos que hay suficiente información para diseñar experimentos específicos que estudien el efecto de las anfetaminas sobre la histofisiología testicular a corto, mediano y largo plazo. La mayor novedad de este estudio es la determinación que una breve exposición a anfetaminas en la adolescencia genera alteración a nivel celular testicular.



CONCLUSIONES

La administración aguda de anfetaminas en ratas Wistar adolescentes macho no afectó el peso de los animales, tampoco se vio afectado el peso testicular. No se encontraron diferencias en los diámetros de los túbulos seminíferos entre los grupos experimentales. No se encontraron diferencias en el porcentaje de CL positivas a Caspasa-3. Por otro lado, tendió a la disminución de proliferación de CL (PCNA positivas).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abd El-Meseeh, N., El-Shaarawy, E., AlDomairy, A., y Sehly, R.A. (2016). Changes in rat testis morphology and androgen receptor expression around the age of puberty. *Annals of Anatomy*, 205, 37-44.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J.D. (1996). *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega.
3. Anderson, R., Gutreuter, S., (1983). “Capítulo 15. Eslora, peso e índices estructurales asociados”
4. Bahena-Trujillo, R., Flores, G., y Arias-Montaño, J. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomedica*, 11, 39-60.
5. Benton, L., Xin Shan, M., y Hardy, P. (1995). Differentiation of adult Leydig cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53, 661-68.
6. Bergh, A. (1982). Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules. *International Journal of Andrology*, 5, 325-330.
7. Bernardi, S., Brogliatti, G., y Oyarzabal, M. (2010) Estructura Testicular y Calidad Seminal en Ratones Seleccionados por Peso. *International Journal of Morphology*, 28(3), 673-680.
8. Caorsi, O. y Redes, V. (2020), Evaluación de modelos animales de trastornos de estado de ánimo. (Tesis de grado, Universidad de la República) Recuperada de <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2733/FV-34075.pdf?sequence=1&isAllowed=y> .
9. Cassano, P., Argibay, P. (2009). La enfermedad depresiva y sus modelos animales. *Revista del Hospital Italiano de Buenos Aires*, 29(2), 117-120.
10. Cruz-Morales, S., Reyes, M. (2003). *Revista Mexicana de análisis de la conducta* 29 (1), 93-105, 2003.
11. Chapman, D., y Wolgemuth, D. (1994). Expression of proliferating cell nuclear antigen in the mouse germ line and surrounding somatic cells suggests both proliferation-dependent and -independent modes of function. *The International Journal of Developmental Biology*, 38(3), 491-497.
12. Damián, J., Ruiz, P., Diaz, M., y Acosta, E. (2012). Reasons for medical consultation and causes of euthanasia of dogs in Montevideo city (Uruguay): a survey of veterinary practitioners. Implications of behavioral problems. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 59 (2), 97-101

13. Dyce, K., Sack, W., y Wensing, C. (2012). Anatomía veterinaria. (4ª ed.). México: Manual Moderno, 952p.
14. DSM-IV, APA, (1994). Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Recuperado de <https://www.mdp.edu.ar/psicologia/psico/cendoc/archivos/Dsm-IV.Castellano.1995.pdf>
15. Escorihuela, R., y Fernández-Teruel, A. (1998). Modelos animales en psicopatología y psicofarmacología: del análisis experimental de la conducta a la neurogenética. *Psicología Conductual*, 6(1), 165-191.
16. Fadeel, B., Ottosson, A., y Pervaiz, S. (2008). Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death and Differentiation*, 15(3), 443-52.
17. Frey, B., Andrezza, A., Cereser, K., Martins, M., Valvassori, S., Reus, G., y Kapczinski, F. (2006). Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sciences*, 79(3), 281-286.
18. García Barceló, M., y Dovale Borjas, A. (2003). Efectos de la ingestión crónica de etanol sobre la estructura de los testículos de la rata albina. *Revista Habanera De Ciencias Médicas*, 2(7). Recuperado de <file:///C:/Users/Usuario/AppData/Local/Temp/668-3548-1-SM-1.pdf>
19. González Marquetti, T., Gálvez Cabrera, E., Álvarez Valdés, N., Cobas Ferrer, F., y Cabrera del Valle, Na. (2005). Drogas y sexualidad: grandes enemigos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 21(5-6). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252005000500015
20. Gould, R., Mueser, K., Bolton, E., Mays, V., y Goff, D. (2001). Cognitive therapy for psychosis in schizophrenia: An effect size analysis. *Schizophrenia Research*, 48, 335-342.
21. Hardy, M., Gao, H., Dong, Q., Ge, R., Wang, Q., Chai, WR., Feng, X., y Sottas, C. (2005). Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Research*, 322(1), 147-53.
22. Hasler, G., Drevets, W. C., Gould, T. D., Gottesman, I. I., y Manji, H. K. (2006). Toward constructing an endophenotype strategy for bipolar disorders. *Biological Psychiatry*, 60(2), 93-105.
23. Huhtaniemi, I., y Pelliniemi, L. (1992). Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proceedings of the Society for Experimental Biological Medicine*, 201(2), 125-40.
24. Jost, A., Magre, S., y Angelopoulou, R. (1981). Early stages of testicular differentiation in the rat. *Human Genetics*, 58(1), 59-63.
25. Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), 629-40.
26. Kotsampasi, B., Balaskas, C., Papadomichelakis, G., y Chadio, S. (2009). Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Animal Reproduction Science*, 114, 135-47.
27. Kuopio, T., Tapanainen, J., Pelliniemi, L., y Huhtaniemi, I. (1989). Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development*, 107(2), 213-20.
28. Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A., y Robinson, J. P. (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing

mitochondrial reactive oxygen species production. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (10), 8516–8525.

29. Lotfi, N., Khazaei, M., Shariatzadeh, S., Soleimani, M., y Ghanbari, A. (2013). The Effect of Cannabis sativa Hydroalcoholic Extract on Sperm Parameters and Testis Histology in Rats. *International Journal of Morphology*, 31(1), 82-86.

30. Mannuzza, S., Klein, K., Nhan, D., Truong, L., John, M., Castellanos, X. (2008) Age of Methylphenidate Treatment Initiation in Children With ADHD and Later Substance Abuse: Prospective Follow-Up Into Adulthood. *American Journal of Psychiatry*, 165, 604–609.

31. Mathews, M.B., Bernstein, R.M., Franza, B.R., Jr, y Garrels, J.I. (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 309(5966), 374–376.

32. McKinnell, C., y Sharpe, R. (1995). Testosterone and spermatogenesis: evidence that androgens regulate cellular secretory mechanisms in stage VI-VIII seminiferous tubules from adult rats. *Journal of Andrology*, 16, 499-509.

33. Miyachi, K., Fritzler, MJ., y Tan, E. (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *Journal of Immunology*, 121(6), 2228-34.

34. O'Shaughnessy, P. (2014). Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 29, 55-65.

35. Ola, M., Nawaz, M., y Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 351(1-2):41-58.

36. Patronek, G., y Dodman, N. (1999) Attitudes, procedures, and delivery of behavior services by veterinarians in small animal practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 215(11), 1606-11.

37. Rivera, K. (2003). *Efecto de la ingesta crónica de alcohol sobre la anatomía genital y parámetros conductuales de la rata macho alrededor de la pubertad*. (Tesis de grado, Universidad de Guadalajara).
Recuperado de http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3144/Rivera_Sanchez_Koral_Elizabeth.pdf?sequence=1&isAllowed=y

38. Roosen-Runge, E., y Anderson, D. (1959). The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. *Acta Anatomica (Basel)*, 37, 125-37.

39. Ruiz, P., Calliari, A., y Pautassi, R. (2017). Consumo de alcohol en ratas adolescentes tratadas con reserpina y fluoxetina. *Suma psicológica*, 24, 67–77.

40. Ruiz, P., Calliari, A., Genovese, P., Scorza, C., y Pautassi, R. (2018). Amphetamine, but not methylphenidate, increases ethanol intake in adolescent male, but not in female, rats. *Brain and Behaviour*, 8(4), e00939.

41. Ruiz, P., Genovese, P., Bielli, A., Herrera, E., y Pautassi, P. (2018). Reserpine increases BDNF and PCNA expression, but decreases caspase-3, in rat Leydig cells. *International Journal of Morphology*, 36(3), 895-900.

42. Sanchez, A. (2005) Efectos de la Administración de la p-Cloroanfetamina (pCA) Sobre la función Gonadal en la Rata Macho. (Tesis de grado, Universidad Nacional Autónoma de México). Recuperado de <http://132.248.9.195/pd2006/0602453/0602453.pdf>
43. Seeman, P., y Lee, T. (1975). Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science*, 188(4194):1217-9.
44. Shamon, S., y Perez, M. (2009). Blood pressure lowering efficacy of reserpine for primary hypertension. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 7(4), CD007655.
45. Shi, S., Jiang, L., Xie, H., Xu, J., Zhu, Y., y Zheng, S. (2015). The effect of secondary cholestasis on the CD68-positive and CD163-positive macrophage population, cellular proliferation, and apoptosis in rat testis. *Journal of Reproduction Immunology*, 110, 36-47.
46. Simanainen, U., McNamara, K., Davey, R., Zajac, J., y Handelsman, D. (2008). Severe subfertility in mice with androgen receptor inactivation in sex accessory organs but not in testis. *Endocrinology*, 149, 3330-8.
47. Smith, L., y Walker WH. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, 2-13.
48. Stanley, E., Lin, C., Jin, S., Liu, J., Sottas, C., Ge, R., Zirkin, B., y Chen, H. (2012). Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells. *Endocrinology*, 153(10), 5002-10.
49. Steger WR., Dennis C., VanAbbema A., Gay-Primel E. (1990). Alterations in hypothalamic serotonin metabolism in male hamsters White photoperiod-induced testicular regression. *Brain Reserch*, 514: 11-14
50. Tran, N., Servos, G., y Haider, S. (2006). Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium. *Anatomy and Embryology (Berl)*, 211(4), 273-82.
51. Tsai, S, Chiao, Y., Lu, C., Doong, M., Chen, Y., Shih, H., ... Wang, P. (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(4), 984-8.
52. Viggiano, D., Ruocco, L., y Sadile, A. (2003) Dopamine phenotype and behaviour in animal models: in relation to attention deficit hyperactivity disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 623–637
53. Vornberger, W., Prins, G., Musto, N., y Suarez-Quian, CA. (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology*, 134, 2307-16.
54. Young, J., Henry, B., y Geyer, M. (2011) Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. *British Journal of Pharmacology*, 164, 1263–1284.
55. Zorzetto, J. (2007). Avaliação dos efeitos da inalação crônica de cocaína crack na espermatogênese de camundongos. (Tesis de doctorado, Universidad de San Pablo). 10.11606/T.5.2007.tde-28082007-162742

