



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Área temática: Biotecnología Alimentaria

Facultad de Químico Farmacobiología

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas presenta:

QFB Roberto Esquivel García

Director de Tesis:

Doctor en Ciencias Rosalio Mercado Camargo

Morelia, Michoacán. Abril de 2015





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental" presentado por el QFB Roberto Esquivel García, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 03 de marzo de 2015

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Rosalio Mercado Camargo
Director

Dr. Joel Edmundo López Meza

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

Dr. Daniel Godínez Hernández

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Tesis apoyada por: CIC-UMSNH-26.2,
Becario CONACyT-285764

DEDICATORIA

Para mi familia, porque hay estrellas que guían mis pasos, iluminando el camino y hacen que esta vida me parezca maravillosa y perfecta.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Elena, gracias por escucharme, por tus consejos y paciencia, por darme lo mejor de ti, sin dobleces ni egoísmos, con alegría y dulzura; manifestándolo en nuestras hijas Vanessa e Itzi Ximena, quienes nos impulsan a mantener la determinación de alcanzar nuestros sueños. Mi orgullo por ustedes aumenta sin cesar, ¡las amo!

A mi padre Roberto†, por guiarme sobre el camino de la educación y el trabajo. A Martha mi madre; por tu amor, apoyo y ejemplo que me permiten sentir que puedo lograr lo que me proponga. A Claudia, Martha, Ana, Beatriz y Mercedes por ser excelentes hermanas y ayudarme con mis obligaciones para facilitar el cumplimiento de muchas metas, ¡los quiero mucho!

A mis suegros Lucila y Humberto, por el apoyo incondicional y la confianza que han depositado en mí, así como a Martha, Alejandra y Guadalupe, sin su ayuda la dificultad de alcanzar esta meta hubiera sido gigantesca.

A mi asesor el Dr. Rosalio Mercado; por su confianza, paciencia, consejos y permitirme ser parte de un grupo de investigación y del Laboratorio de Neurobiología.

Agradezco a mi comité tutorial: Dra. Alejandra Ochoa, Dr. Joel Edmundo López, Dr. Héctor Eduardo Martínez y Dr. Daniel Godínez, por dedicar atención y paciencia al evaluar mi proyecto, y contribuir de manera esencial para la realización del presente trabajo.

Gracias a cada uno de los profesores que han contribuido en mi formación académica y profesional, puesto que sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora. En especial a la Dra. Rosa Angélica Lucio y a la Mtra. Verónica Rodríguez de la UAT, quienes aceptaron el reto de formarme en un área del conocimiento nueva para mí; a la Dra. Esther Olvera y el Mtro. Miguel Ángel Vázquez del CIBIMI-IMSS por las facilidades prestadas para enriquecer éste y otros trabajos de investigación; al Dr. Horacio Cano de la UMSNH por marcar un hito en mi formación de investigación científica; al Dr. Jesús Conejo de la UMSNH por ayudarme a superar dificultades que se presentaron en el trabajo experimental; a las doctoras Alma Lilia Fuentes y Esperanza Meléndez de la UMSNH por su ayuda y apoyo incondicional que fortalecieron gran parte de éste trabajo de investigación; al Mtro. Cesar Adrián Gómez de la UTM por permitirme realizar pruebas experimentales esenciales en mi proyecto de investigación.

A todos mis amigos que estuvieron conmigo compartiendo tantas experiencias y triunfos. Especialmente a quienes me ayudaron a afrontar grandes retos sin dudas ni condiciones: Anai, Angélica, Antonia, Araceli, Blanca, Betsayra, Claudia, Esperanza, Eunice, Gabriela, Judith, Minoa, Noemí, Susana, Yazmín, Yvette, Edson, Francisco, Felipe, Humberto, Ildfonso, Jesús, Mario, y Omar. A todos mi más sincero agradecimiento.

A mis compañeros de posgrado y de laboratorio, no voy a olvidar sus enseñanzas y ayuda, tampoco el tiempo agradable que hemos convivido.

¡Gracias!

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | III |
| ÍNDICE DE TABLAS | IV |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | V |
| RESUMEN | VI |
| ABSTRACT | VII |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 3 |
| II.1. Gametos masculinos | 3 |
| II.1.1. Espermatogénesis..... | 4 |
| II.1.2. Producción diaria de espermatozoides | 6 |
| II.1.3. Capacitación espermática | 6 |
| II.1.4. Motilidad del espermatozoide..... | 7 |
| II.2. La Na^+/K^+ -ATPasa de las membranas plasmáticas..... | 8 |
| II.2.1. Estructura de la Na^+/K^+ -ATPasa..... | 8 |
| II.2.2. Expresión de la Na^+/K^+ -ATPasa en testículos y esperma | 9 |
| II.2.3. Na^+/K^+ -ATPasa y regulación de la motilidad espermática..... | 10 |
| II.2.4. Na^+/K^+ -ATPasa y la capacitación espermática..... | 11 |
| II.2.5. Regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa..... | 11 |
| II.3. Serotonina | 13 |
| II.3.1. Origen y metabolismo de la serotonina | 13 |
| II.3.2. Función de la 5-HT y receptores serotoninérgicos | 14 |
| II.3.3. Serotonina y el sistema reproductor masculino..... | 14 |
| II.4. Diabetes mellitus | 16 |

| | |
|---|----|
| II.4.1. Clasificación de la diabetes mellitus..... | 17 |
| II.4.2. Neuropatía diabética | 19 |
| II.4.3. Diabetes mellitus y parámetros espermáticos | 20 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| IV. HIPÓTESIS..... | 24 |
| V. OBJETIVOS..... | 25 |
| V.1. Objetivo general | 25 |
| V.2. Objetivos específicos..... | 25 |
| VI. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 26 |
| VI.1. Estrategia metodológica | 26 |
| VI.2. Animales de experimentación | 27 |
| VI.3. Obtención de muestras biológicas | 28 |
| VI.4. Cortes para análisis histológico | 29 |
| VI.5. Medición de la actividad específica de la Na^+/K^+ -ATPasa..... | 29 |
| VI.6. Análisis estadístico | 30 |
| VII. RESULTADOS..... | 31 |
| VII.1. Diabetes mellitus experimental..... | 31 |
| VII.2. Valoración de parámetros bioquímicos | 34 |
| VII.3. Peso y tamaño de testículos y epidídimos | 35 |
| VII.4. Microscopia testicular y de epidídimos | 40 |
| VII.5. Espermatobioscopia | 45 |
| VII.6. Actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa | 48 |
| VIII. DISCUSIÓN | 49 |
| IX. CONCLUSIÓN | 53 |
| X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Esquema de los 14 estadios de la espermatogénesis de la rata. | 5 |
| Figura 2. Representación gráfica de estrategia metodológica. | 26 |
| Figura 3. Niveles de glucemia en los animales con DME..... | 31 |
| Figura 4. Ingesta de alimento por los animales de experimentación..... | 32 |
| Figura 5. Consumo de agua por los animales de experimentación..... | 33 |
| Figura 6. Peso corporal de los animales de experimentación. | 33 |
| Figura 7. Peso testicular de los animales experimentales..... | 36 |
| Figura 8. Diámetro cráneo-caudal de los testículos. | 37 |
| Figura 9. Diámetro dorso-ventral de los testículos. | 37 |
| Figura 10. Peso de epidídimos en animales de experimentación. | 38 |
| Figura 11. Largo de epidídimos..... | 38 |
| Figura 12. Diámetro de la cabeza y cola de los epidídimos. | 40 |
| Figura 13. Número total de túbulos seminíferos en corte transversal de testículo. | 41 |
| Figura 14. Diámetro de túbulos seminíferos de testículo. | 41 |
| Figura 15. Micrografías representativas de cortes histológicos de testículos en animales de los diferentes grupos experimentales teñidos con hematoxilina-eosina 100X..... | 42 |
| Figura 16. Estadios VII y VIII de la espermatogénesis en los túbulos seminíferos.... | 43 |
| Figura 17. Micrografías representativas de cortes histológicos de diferentes regiones del epidídimo teñidos con hematoxilina-eosina 400X..... | 44 |
| Figura 18. Espermatozoides observados con microscopio óptico 400X. | 45 |
| Figura 19. Concentración espermática en el conducto deferente. | 46 |
| Figura 20. Micrografía de espermatozoides teñidos con azul tripano. | 46 |
| Figura 21. Viabilidad espermática. | 47 |
| Figura 22. Motilidad de los espermatozoides. | 47 |
| Figura 23. Actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogenizado de espermatozoides. . | 48 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabla 1. Grupos de animales experimentales y tratamientos administrados | 27 |
| Tabla 2. Parámetros bioquímicos de animales experimentales en la etapa temprana de estudio..... | 34 |
| Tabla 3. Parámetros bioquímicos de animales experimentales en la etapa tardía de estudio..... | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------------------|---|
| μg | – Microgramo |
| μm | – Micrómetro |
| 5-HT | – Serotonina |
| AMPc | – Adenosín monofosfato cíclico |
| ATP | – Adenosín trifosfato |
| DME | – Diabetes mellitus experimental |
| Grupo C | – Grupo control |
| Grupo CA | – Grupo control con administración de L-Trp en etapa temprana |
| Grupo CAC | – Grupo control con administración de L-Trp en etapas temprana y tardía |
| Grupo CC | – Grupo control con administración de L-Trp en etapa tardía |
| Grupo D | – Grupo diabético |
| Grupo DA | – Grupo diabético con administración de L-Trp en etapa temprana |
| Grupo DAC | – Grupo diabético con administración de L-Trp en etapas temprana y tardía |
| Grupo DC | – Grupo diabético con administración de L-Trp en etapa tardía |
| hCG | – Gonadotropina coriónica humana |
| HCl | – Ácido clorhídrico |
| IP | – Vía de administración intraperitoneal |
| K ₂ -EDTA | – Ácido etildiaminotetraacético |
| L-Trp | – L-triptófano |
| Na^+/K^+ -ATPasa | – Bomba de sodio y potasio |
| pH | – Potencial de hidrógeno |
| RCF | – Fuerza centrífuga relativa |
| STZ | – Estreptozotocina |
| TPH | – Triptófano 5-hidroxilasa |

RESUMEN

Se sabe que la diabetes mellitus (DM) está asociada con un deterioro de la función testicular. En esta patología también se ha descrito la disminución del tono serotoninérgico y de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en el organismo. Con base en lo anterior, como objetivo del presente trabajo se planteó evaluar el efecto de un tratamiento corto (5 días) de L-triptófano (L-Trp), precursor de la síntesis de serotonina, sobre la espermatogénesis y la calidad espermática de ratas macho adultas; con la finalidad de valorar si este tratamiento mejorara la producción de espermatozoides y los parámetros espermáticos, que como consecuencia de la diabetes se encuentran deteriorados. Además se determinó si en éste proceso existía una asociación con la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, enzima que está directamente relacionada con la motilidad y la viabilidad de los gametos. Para lo cual se implementó un modelo de DM en ratas macho y se administró un tratamiento de L-Trp vía intraperitoneal a la tercera y séptima semana post-inducción de DM. En las etapas temprana y tardía de estudio se sacrificaron los animales (4 y 8 semanas post-inducción). Se determinó la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, se realizó una espermatobioscopia y un análisis histológico del testículo. Los resultados obtenidos muestran que el peso y tamaño de los testículos en los animales con DM y tratados con L-Trp se incrementaron con respecto a los animales diabéticos sin tratamiento; también se observó un menor daño testicular y un incremento en el número, la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides que directamente se relacionó con un incremento de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa. Estos resultados sugieren que la administración de L-Trp en una etapa temprana de la DM es benéfica para reducir el daño testicular y mejorar la calidad de los espermatozoides en la rata.

Palabras clave: L-Triptófano, espermatogénesis, motilidad.

ABSTRACT

It is well known that diabetes mellitus (DM) is well associated with the deterioration of the testicular function. A decrease in the shade of serotonin and in the activity level of Na^+/K^+ -ATPase was described in the organism in relation to this pathology. Consequently, the objective of this research is to evaluate the effect of a short treatment of L-Tryptophan (L-Trp)- precursor to the synthesis of serotonin over spermatogenesis and the spermatic quality of male adult rats, with the finality of evaluating whether this treatment would improve the production of spermatozoids and the spermatic parameters, and which as a consequence of diabetes, are found in deterioration. Furthermore, a determination was made as to whether there existed in this process an association between the Na^+/K^+ -ATPase enzyme, and the L-Trp treatment, which are directly related to the mobility and viability of the gametes. A DM model was used on male rats and an intraperitoneal treatment of L-Trp was administered during the third and seventh weeks of DM post-induction. In the early and late stages of the study, the animals were sacrificed (4 and 8 weeks post-induction). A determination was made of Na^+/K^+ -ATPase, the spermatobioscopy, and the histological analysis of the testicle. The achieved results show that the animals with DM who were treated with L-Trp grew in testicular weight and size with respect to the diabetic animals without treatment; also noted was a lesser testicular damage and an increase in the number, viability, and motility of the spermatozoids, which were directly related to an increase in the activity of Na^+/K^+ -ATPase. These results suggest that the administration of the L-Trp in an early stage of DM is beneficial in reducing testicular damage and improves the quality of the spermatozoids in rats.

Key words: L-Tryptophan, spermatogenesis, motility.

I. INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis en mamíferos es un proceso biológico complejo que da origen a una de las células de mayor importancia en la reproducción, el espermatozoide, la cual está altamente regulada por la acción de diversas hormonas y neurotransmisores. El control estricto del proceso de espermatogénesis permite que el gameto tenga las cualidades suficientes para llevar a cabo su función y pueda realizar la fecundación del óvulo.

Debido a que la homeostasis iónica es de gran importancia para el desarrollo y la fisiología de los gametos masculinos, se ha centrado una atención considerable en los canales y transportadores iónicos que intervienen en diversas funciones del espermatozoide, ya que participan en la comunicación del gameto y su entorno.

Para que funciones como la motilidad, la quimiotaxis y la reacción acrosomal del espermatozoide se mantengan en armonía, los transportadores y canales iónicos son regulados por diversos factores intrínsecos y extrínsecos. Por ejemplo, la bomba de sodio y potasio del espermatozoide responde a la concentración de diferentes compuestos, y a su vez, regula la actividad de otras proteínas de membrana que son importantes para mantener el equilibrio iónico y energético del gameto. Evidencia reciente indica que el espermatozoide cuenta con un sistema serotoninérgico propio, pero se desconoce si dicho sistema puede regular la actividad de la bomba de sodio y potasio como ocurre en otros tipos de células. De ser así, esto sería un elemento importante para comprender un poco más la compleja fisiología espermática.

Diversas patologías pueden afectar tanto la espermatogénesis como la fisiología del espermatozoide; una de ellas es la diabetes mellitus, la cual produce cambios en la homeostasis iónica y en la comunicación celular, produciendo un descontrol que puede afectar desde la regulación hormonal, la señalización e incluso afectar la vitalidad del esperma, causando un gran daño que puede atentar contra la reproducción de los individuos que la padecen.

Es por ello que en este trabajo se planteó estudiar si un tratamiento de 5 días de L-triptófano, precursor de la síntesis de serotonina, promueve el proceso de espermatogénesis en la rata diabética, y si a través de este tratamiento se incrementa la actividad de la bomba de sodio y potasio mejora algunos parámetros espermáticos como la viabilidad y motilidad.

II. ANTECEDENTES

II.1. Gametos masculinos

En la mayoría de especies existen dos tipos de gametos distintos: 1) el óvulo, una de las células más voluminosas del organismo, la cual es inmóvil y brinda una cubierta protectora eficaz que asegura la supervivencia de los genes maternos mediante una gran cantidad de materia prima para el crecimiento y desarrollo; y 2) el espermatozoide, más pequeño que el óvulo, es móvil e hidrodinámico, está preparado para la propagación de los genes paternos utilizando las reservas maternas.

Los gametos son esenciales en la reproducción de mamíferos y deben mantener en equilibrio sus funciones para que la fusión de su carga genética sea correcta y el desarrollo del nuevo organismo sea óptimo (Barazani *et al.*, 2014). Si bien el gameto masculino porta la mitad de la carga genética, es importante estudiar a esta célula para comprender diversos fenómenos que afectan sus cualidades y causan su destrucción (Winters y Walsh, 2014).

El espermatozoide es una célula germinal con un núcleo haploide, localizado en la región anatómica denominada cabeza y contiene muchas mitocondrias ubicadas en la pieza intermedia que conecta a la cabeza con el potente flagelo que constituye la cola. Las mitocondrias proporcionan la energía necesaria para que el espermatozoide se movilice y fecunde al óvulo, además de que mantenga siempre un balance iónico adecuado satisfaciendo la demanda energética que esto implica (Visconti *et al.*, 2011).

Los estudios de salud reproductiva en seres humanos pudieran ser más acertados al realizarse en ellos mismos. Los requerimientos para trabajar diferentes esquemas patológicos son muy rigurosos, una gran limitante es el poder integrar muestras de individuos que satisfagan las demyas propias de una correcta investigación en una

población, sin afectar la ética de la ciencia. Es por ello que en la investigación científica se cuenta con diversos modelos experimentales en donde se emplean animales íntegros que permiten, aunque quizás no en su totalidad, comprender los mecanismos y funciones que se alteran en un estado de patología reproductiva que pueden presentarse de igual manera en seres humanos. Entre los animales más empleados en el laboratorio se encuentran los roedores, quienes por las cualidades que presentan y que permiten desarrollar en ellos diferentes esquemas metabólicos o patológicos que conduzcan a descifrar fenómenos o corregir paradigmas sobre la función del organismo humano (SAGARPA, 2001).

En el presente trabajo se emplearon ratas macho adultas, las cuales tienen dos testículos de forma ovoide que se caracterizan por presentar dos funciones principales: la biosíntesis de hormonas masculinas y la producción de espermatozoides (Setchell y Breed, 2006).

II.1.1. Espermatogénesis

Los gametos masculinos se producen a partir de células germinales primordiales en un proceso biológico complejo llevado a cabo en el testículo, la espermatogénesis. En los mamíferos, a diferencia de la ovogénesis que se produce antes del nacimiento, la espermatogénesis comienza durante la pubertad, y desde entonces se produce de manera continua en los túbulos seminíferos.

La espermatogénesis se ha caracterizado gracias a las diferencias morfológicas que presentan las células germinales en diferentes etapas del proceso de diferenciación, la cual sigue un programa biológico altamente regulado (Hess y Franca, 2009).

Las células germinales inmaduras, las espermatogonias, se localizan alrededor del límite externo de los túbulos seminíferos junto a la lámina basal, donde proliferan continuamente por mitosis. Algunas de las células hijas detienen su proliferación y se diferencian en espermatoцитos primarios. Éstos entran en la profase meiótica, en la

que se aparean los cromosomas homólogos y se producen los entrecruzamientos, y después continúan hasta terminar la división meiótica I, dando lugar a dos espermatocitos secundarios, cada uno de los cuales contiene 22 cromosomas autosómicos duplicados y un cromosoma X o Y duplicado. Los dos espermatocitos secundarios procedentes de un espermatocito primario entran en la segunda división meiótica, produciendo cuatro espermátidas, cada una de las cuales tiene una dotación cromosómica haploide. Las espermátidas experimentan una diferenciación morfológica que las transforma en espermatozoides, los cuales son liberados a la luz del túbulo seminífero. Los espermatozoides pasan por el epidídimo, un tubo muy sinuoso que se encuentra pegado a los testículos, donde son almacenados y donde se produce su maduración final (Cheng y Mruk, 2010).

En la Figura 1, se representa el ciclo espermatogénico de la rata, en donde se pueden ver los cambios sucesivos que experimenta una célula germinal individual, desde las espermatogonias hasta su transformación en espermatozoides. Esta asociación de células germinales forma un ciclo de 14 estadios.

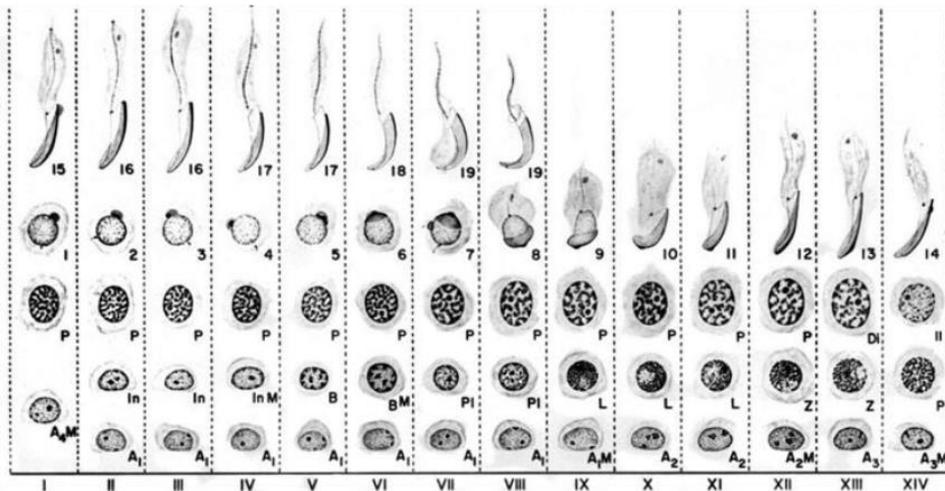


Figura 1. Esquema de los 14 estadios de la espermatogénesis de la rata.

Los estadios son indicados en números romanos I-XIV, las columnas muestran los diferentes tipos de células presentes (Tomado de Dym y Clermont, 1970).

La adecuada regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada por diferentes hormonas y neurotransmisores es crucial para mantener la función óptima de los procesos de

esteroidogénesis y espermatogénesis. La continuidad del proceso de espermatogénesis es sensible a factores intrínsecos, como el número de células precursoras, y de factores extrínsecos como los niveles hormonales (Oatley y Brinster, 2008). Es por ello que diversas patologías, entre las que se encuentra la diabetes mellitus, pueden afectar considerablemente la espermatogénesis por afecciones en la esteroidogénesis y daño del proceso de diferenciación celular (La Vignera *et al.*, 2012; Seethalakshmi *et al.*, 1987).

II.1.2. Producción diaria de espermatozoides

Mediante el empleo de algunos métodos histométricos se ha determinado la producción diaria de espermatozoides (DSP) para algunas especies, calculados como DSP/g de parénquima testicular dividido entre la proporción de espermátidas, los resultados indican para el humano una DSP de $3.1 \pm 0.5 \times 10^6$ espermatozoides/g/día, mientras que para la rata Wistar está alrededor de los $21.1 \pm 0.9 \times 10^6$ espermatozoides/g/día. El peso promedio de un testículo de humano entre 20 a 30 años de edad es de 16.6 ± 1.1 g, mientras que el de la rata es de 1.77 ± 0.08 g. Considerando lo anterior, la DSP por testículo es de $45.4 \pm 9.8 \times 10^6$ y $35.4 \pm 2.9 \times 10^6$ espermatozoides en el humano y la rata, respectivamente (Johnson *et al.*, 1980).

II.1.3. Capacitación espermática

Luego de su formación, el espermatozoide presenta diferentes etapas de maduración en el epidídimo. En seguida, el espermatozoide entra a la fase de capacitación donde sus sistemas motrices son activados; este proceso toma lugar en el tracto reproductivo femenino luego de la eyaculación (Hess y Franca, 2009).

La capacitación a la que se somete el espermatozoide es esencial para la inducción de la reacción acrosomal y para la fertilización del óvulo. Sin embargo, el mecanismo molecular de la capacitación no se conoce completamente, muchos estudios han

demostrado que en el espermatozoide están involucradas numerosas modificaciones estructurales y bioquímicas, como son: cambios en los componentes y fluidez de la membrana, incremento de Ca^{2+} intracelular, alcalinización citoplasmática, activación de canales iónicos, y la generación de especies reactivas de oxígeno. La capacitación está asociada con la fosforilación de la tirosina de proteínas, lo cual está modulada vía dependiente de AMPc en muchas especies, incluyendo la rata y humano (Salicioni *et al.*, 2007).

II.1.4. Motilidad del espermatozoide

El flagelo del espermatozoide tiene tres componentes principales: 1) un esqueleto central constituido por 11 microtúbulos, denominados en conjunto axonema, 2) una fina membrana celular que reviste al axonema, y 3) una serie de mitocondrias que rodean el axonema de la porción proximal de la cola.

El movimiento de vaivén del flagelo determina la motilidad del espermatozoide. Esta motilidad es el resultado de un movimiento rítmico de deslizamiento longitudinal entre los túbulos anteriores y posteriores que constituyen el axonema. La energía de este proceso es suministrada en forma de ATP sintetizado por las mitocondrias del cuerpo de la cola. Los espermatozoides normales se mueven en medio líquido a una velocidad de 1 a 4 mm/min. Lo que les permite moverse a través del tracto genital femenino en busca del óvulo.

Una de las necesidades clave del espermatozoide es la regulación estricta de la composición iónica para garantizar su motilidad y viabilidad, ya que durante su tránsito por el epidídimo, los espermatozoides están expuestos a condiciones osmóticas muy diferentes de las que enfrentarán en el líquido seminal y en el tracto femenino. En comparación con otros fluidos corporales, el lumen del epidídimo contiene niveles bajos de Na^+ , Cl^- , y un nivel más alto de K^+ , y se mantiene a un pH bajo de una regulación de H^+ y la absorción de HCO_3^- . En los fluidos vaginales, la concentración de K^+ se reduce, mientras que el HCO_3^- y Na^+ se incrementan; por

ejemplo, el HCO_3^- aumenta de ~ 4 a >20 mmol/l activando inmediatamente el movimiento flagelar del espermatozoide (Visconti *et al.*, 2011).

Para lograr la regulación iónica intracelular, el gameto masculino posee una serie de sistemas de transporte iónico distribuidos a lo largo de la membrana plasmática. Entre estos sistemas se encuentra la bomba de sodio y potasio, la cual tiene un papel primordial en el mantenimiento de la homeóstasis iónica requerida para la motilidad del esperma (Jiménez *et al.*, 2010b; Visconti *et al.*, 2011).

II.2. La Na^+/K^+ -ATPasa de las membranas plasmáticas

Uno de los sistemas de transporte activo ampliamente estudiado es la bomba de sodio y potasio (Na^+/K^+ -ATPasa, sodio-potasio adenosin trifosfatasa, EC 3.6.1.37) de las membranas celulares. Esta enzima se identificó por primera vez en 1957 por Jens Skou, desde entonces la investigación ha determinado muchos aspectos estructurales y funcionales (Skou y Esmann, 1992).

II.2.1. Estructura de la Na^+/K^+ -ATPasa

La Na^+/K^+ -ATPasa es una proteína integral de membrana responsable del mantenimiento de los gradientes de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática que son esenciales para la fisiología de cualquier tipo celular, tiene un papel primordial en diferentes funciones como el mantenimiento del volumen celular y pH, restauración del potencial de membrana, del balance osmótico y la generación del gradiente de Na^+ para el transporte facilitado que se acopla a este ion (Skou y Esmann, 1992).

La Na^+/K^+ -ATPasa es un tetrámero compuesto por dos subunidad α (112 kDa), esta es la parte catalítica donde se lleva a cabo la hidrólisis de ATP y el intercambio de tres iones Na^+ -citoplasmáticos por dos iones K^+ -extracelulares (Kaplan, 2002); y dos subunidades β (35-60 kDa, dependiendo de la glucosilación) que sufren glucosilación

y son esenciales para la actividad de la enzima como sistema de localización y anclaje en la membrana plasmática (Geering, 2008; Jorgensen *et al.*, 2003).

II.2.2. Expresión de la Na^+/K^+ -ATPasa en testículos y esperma

En mamíferos, se han identificado varias isoformas de la subunidad α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, y $\alpha 4$) y de la subunidad β ($\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 3$). Estas siguen un patrón de expresión y regulación tejido específico (Blanco y Mercer, 1998). Las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ son expresadas en la mayoría de las células, mientras que los otros polipéptidos tienen más restringida su expresión y pueden tener funciones propias para cada tipo celular (Mobasher *et al.*, 2000).

El testículo y el espermatozoide expresan la isoforma $\alpha 4$ y la ubicua isoforma $\alpha 1$ (Blanco *et al.*, 2000; Shamraj y Lingrel, 1994). Las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 4$ son co-expresadas en el esperma con las isoformas $\beta 1$ y $\beta 3$; la isoforma $\alpha 4$ se asocia igualmente con ambas subunidades β , y tienen propiedades cinéticas similares, a diferencia del acople del polipéptido $\alpha 1$ que muestra una diferente actividad dependiendo de su unión a las isoformas $\beta 1$ y $\beta 3$ (Sánchez *et al.*, 2006).

En función de la especie, en gametos masculinos la actividad de la isoforma $\alpha 4$ representa entre el 50% y 75% del total de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa; el porcentaje restante es aportado por la isoforma $\alpha 1$, la cual se expresa de forma ubicua (Woo *et al.*, 1999). Ambas isoformas presentan propiedades enzimáticas distintas, para distinguir estas respuestas diferenciales, se han usado herramientas farmacológicas que involucran la inhibición selectiva por ouabaína. Este enfoque farmacológico ha permitido definir que la actividad de las dos isoformas regula procesos diferentes en el espermatozoide (Sánchez *et al.*, 2006; Wagoner *et al.*, 2005).

La isoforma $\alpha 4$ de ratas y humanos presenta su punto máximo de expresión en los testículos maduros, mientras que la isoforma $\alpha 1$ disminuye paulatinamente su expresión a lo largo de la espermatogénesis (Woo *et al.*, 2002). La isoforma $\alpha 4$ en su

mayoría está presente en la pieza intermedia y la región principal del espermatozoide de la rata y en el flagelo de espermatozoides humanos, mientras que la isoforma $\alpha 1$, aunque expresada en menor proporción, está presente mayoritariamente en la cabeza del espermatozoide de rata (Wagoner *et al.*, 2005).

Pruebas recientes en ratones transgénicos, donde se expresó la isoforma $\alpha 4$ humana de la Na^+/K^+ -ATPasa, han proporcionado nueva evidencia genética y fisiológica del papel tan importante de esta enzima en procesos de motilidad e hiperactivación espermática (McDermott *et al.*, 2015).

II.2.3. Na^+/K^+ -ATPasa y regulación de la motilidad espermática

La actividad de Na^+/K^+ -ATPasa parece influir en la motilidad del espermatozoide, debido a la participación indirecta en la regulación del pH y el potencial de membrana en reposo. La enzima funciona junto con el transportador de Na^+/H^+ (NHE) regulando el pH intracelular en los espermatozoides. Por lo tanto, la inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa elimina el gradiente de Na^+ utilizado por el NHE para mover H^+ fuera de la célula. La pérdida de actividad de NHE puede dar lugar a la acidificación del compartimento intracelular, lo que reduce el movimiento de la dineína y suprime el movimiento flagelar (Woo *et al.*, 2002).

Así, la regulación de la composición iónica del espermatozoide por la Na^+/K^+ -ATPasa contribuye a la motilidad y capacitación del espermatozoide. También se ha observado que la incubación de los espermatozoides a temperatura ambiente con ouabaína, en concentraciones inhibitorias de la isoforma $\alpha 4$, inhibe la motilidad progresiva del espermatozoide de rata y humano, y al inhibir la isoforma $\alpha 1$ no hay cambio apreciable al ya ocurrido sobre la isoforma $\alpha 4$ (Jiménez *et al.*, 2010b; Sánchez *et al.*, 2006).

La sobreexpresión de la isoforma $\alpha 4$ en el espermatozoide del ratón; induce una hiperactivación de la motilidad en el espermatozoide resultante (Jiménez *et al.*,

2010a). En estudios con ratones a los que se suprimió la expresión de la isoforma $\alpha 4$ de la Na^+/K^+ -ATPasa (knockout), mostraron que sus espermatozoides eran morfológicamente anormales y que los parámetros de movimiento espermático se redujeron significativamente (Jiménez *et al.*, 2011).

II.2.4. Na^+/K^+ -ATPasa y la capacitación espermática

Durante la capacitación el espermatozoide se somete a una serie de modificaciones estructurales y funcionales en el tracto reproductor femenino, donde la influencia de la composición iónica externa en este proceso celular sugiere fuertemente la implicación de los canales iónicos (Darszon *et al.*, 1999). Estos cambios bioquímicos incluyen la fosforilación de tirosina en proteínas (Leclerc *et al.*, 1998; Visconti *et al.*, 1995), el aumento de pH (Visconti y Kopf, 1998), la hiperpolarización (Arnoult *et al.*, 1999; Muñoz-Garay *et al.*, 2001), y el aumento de Ca^{2+} intracelular (Breitbart, 2002).

La inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa puede dar lugar a la hiperpolarización y el aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} a través de su interacción con un transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que promueve la capacitación, ya que se ha observado que la ouabaína promueve la capacitación del espermatozoide de ratón y bovino (Fraser *et al.*, 1993; Thundathil *et al.*, 2006); lo que podría sugerir un papel de señalización para esta enzima en la capacitación (Xie, 2003).

También durante la capacitación hay mecanismos que involucran el aumento en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa y una movilización de enzimas hacia la membrana plasmática del espermatozoide, lo que ayuda a mantener los cambios en la motilidad que están asociados con la capacitación espermática (Jiménez *et al.*, 2012).

II.2.5. Regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa

La regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa es compleja, ya que su actividad puede ser modulada por diferentes factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores de

regulación intrínsecos son el ATP, ouabaína, las concentraciones de Na^+ y Mg^{2+} intracelulares y K^+ extracelular. Por otro lado, la regulación extrínseca de la Na^+/K^+ -ATPasa en diversos tejidos está bajo el control de una serie de hormonas y neurotransmisores que participan en el control a corto y largo plazo de su actividad (Ewart y Klip, 1995; Hernández-Rodríguez, 1992; Therien y Blostein, 2000).

La regulación a corto plazo involucra generalmente efectos directos en el comportamiento cinético de la enzima o la traslocación de las bombas entre los depósitos intracelulares y la membrana plasmática. La regulación a largo plazo induce la síntesis de la Na^+/K^+ -ATPasa o su degradación. Sustancias como la hormona de la tiroides y la aldosterona incrementan la expresión de la enzima, mientras que las catecolaminas tienen diferentes efectos sobre su actividad mediadas por la fosforilación reversible de la subunidad α ; se ha descrito un efecto inhibitorio por dopamina y uno estimulante por noradrenalina, epinefrina y glucagón (Ewart y Klip, 1995). La insulina presenta una rápida acción, estimula la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa por un incremento de la distribución intracelular de las bombas, el contenido de Na^+ -citoplasmático y la afinidad de la enzima al Na^+ (Therien y Blostein, 2000).

Algunos neurotransmisores también modulan la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa (Hernández-Rodríguez, 1992). Por ejemplo, se ha descrito que la serotonina puede modificar la cinética de la enzima en el cerebro de rata, sitio en donde el neurotransmisor ejerce dos efectos distintos dependiendo del tipo celular con que interactúe, en las células gliales incrementa la velocidad de reacción de la enzima, mientras que en neuronas se inhibe (Mercado-Camargo y Hernández-Rodríguez, 1992). Se ha sugerido que en el cerebro adulto ocurre una la regulación de la enzima por serotonina (Mercado-Camargo y Hernández-Rodríguez, 1994), y que dicho efecto está mediado por receptores específicos (Peña-Rangel *et al.*, 1999). Sin embargo, no se conoce con la misma precisión si en otros tipos de células que no sean nerviosas ocurra la interacción entre serotonina y la Na^+/K^+ -ATPasa.

II.3. Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) fue aislada y caracterizada en 1948 por Rapport y colaboradores (Rapport *et al.*, 1948). Es una molécula con diversos efectos en el sistema nervioso central así como en la periferia del organismo al actuar como hormona y/o neurotransmisor, naturaleza que tiene gran importancia en diversos procesos de control en los mamíferos, por lo cual muchos estudios se han enfocado de manera paralela a identificar su localización e investigar su función.

II.3.1. Origen y metabolismo de la serotonina

La 5-HT es una monoamina formada en dos fases. Primero, el aminoácido esencial L-triptófano (L-Trp) es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por la triptófano 5-hidroxilasa (TPH). En una segunda fase, el 5-HTP es descarboxilado a 5-HT por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Interesantemente, la conversión de L-Trp a serotonina sólo representa el 5% del metabolismo total de triptófano, cantidad que no alcanza a saturar a la TPH, considerada la enzima que limita la síntesis de 5-HT y que tiene una distribución limitada en el organismo (Walther *et al.*, 2003).

Se conocen dos isoformas de la TPH: la TPH1 localizada en la periferia del organismo y la TPH2 en el sistema nervioso central. Alrededor de un 90-95% de la serotonina del cuerpo se encuentra en la periferia, donde la síntesis de 5-HT es realizada principalmente por las células enterocromafines; su almacenaje y transporte es realizado por las plaquetas, una función importante para la estricta regulación de la concentración del neurotransmisor, ya que menos del 1% de 5-HT se encuentra libre en el organismo (Tyce, 1990).

El metabolismo por la monoamino oxidasa (MAO) es la vía catabólica primaria de la 5-HT, así como de muchas otras aminas biógenas. Hay dos isoformas de la MAO

(MAO-A y MAO-B) localizadas en el interior celular, por lo que se requiere de transportadores de serotonina (SERT) que introduzcan a la monoamina para su degradación. MAO-A es la principal inactivadora de la 5-HT, mientras que MAO-B lo hace en una porción muy pequeña, quizás por ello se localice en plaquetas (Sandler *et al.*, 1981). La acción de MAO sobre la 5-HT tiene como principal metabolito el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), el cual es excretado por la orina (Tyce, 1990).

II.3.2. Función de la 5-HT y receptores serotoninérgicos

La diversidad de efectos que la 5-HT produce es por vía de receptores, de los que se conocen al menos 14 subtipos organizados en 7 familias (5-HT₁-5-HT₇). En su mayoría son receptores acoplados a proteínas G que regulan vías de transducción de señales que incluyen a la adenilato ciclasa y fosfolipasa C, a excepción de los receptores 5-HT₃ que están acoplados a canales iónicos (Hoyer *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2004).

La amplia distribución de la 5-HT y la localización de diferentes receptores serotoninérgicos en el organismo muestran su influencia en una gran variedad de funciones biológicas, como en el control de la motilidad gastrointestinal, la contracción de la musculatura lisa, la constricción y dilatación vascular, la permeabilidad microvascular, la agregación plaquetaria y la excitación e inhibición de las neuronas en el sistema nervioso central, en donde regula una amplia variedad de procesos entre los que se incluyen: el estado de ánimo, la percepción, la atención, la ira, la agresión, el apetito, la memoria, y la conducta sexual (Berger *et al.*, 2009; Hoyer *et al.*, 2002).

II.3.3. Serotonina y el sistema reproductor masculino

En el sistema reproductor masculino, la serotonina desempeña una participación importante en la producción de testosterona (Tinajero *et al.*, 1993), sobre la regulación del flujo sanguíneo testicular (Collin *et al.*, 1996), en la secreción de

hormona liberadora de gonadotropina (Pinilla *et al.*, 1997), en la contracción de los conductos deferentes (Stafford *et al.*, 2006) y en el inicio de la maduración sexual en la rata macho (Olivier *et al.*, 2011). Además, un número de informes indican que la 5-HT está presente y actúa en los conductos deferentes (Celuch y Sloley, 1989), el epidídimo (Leung *et al.*, 1999), el espermatozoide (Fujinoki, 2011), y en el testículo (Pichardo, 2011).

En el epidídimo de la rata, se han localizado mediante inmunohistoquímica el SERT, la TPH y algunos receptores serotoninérgicos como el 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT₃, sugiriendo la existencia de un sistema serotoninérgico local en el epidídimo, lo que podría regular algunos aspectos de la función reproductiva masculina (Jiménez-Trejo *et al.*, 2006). Por ejemplo, la sibutramina un fármaco inhibidor de la recaptura de serotonina, disminuye el número de espermatozoides de reserva y acelera el tiempo de su tránsito en la cola del epidídimo en ratas (Bellentani *et al.*, 2011), mientras que, agonistas de los receptores 5-HT₂ y 5-HT₄ producen un aumento en la motilidad del espermatozoide (Fujinoki, 2011).

De manera interesante, la presencia de varios componentes del sistema serotoninérgico han sido identificados en el espermatozoide, entre ellos 5-HT, TPH, la monoamino oxidasa A, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, y 5-HTP (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012). Estos hallazgos llevaron a los autores a proponer la presencia de un sistema serotoninérgico inherente al espermatozoide, lo que apoya la idea de un papel funcional de la 5-HT en la fisiología de espermatozoides. Sin embargo, se desconoce si este sistema regula la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en el espermatozoide como ocurre con la enzima en las células gliales, donde la 5-HT regula la actividad de la enzima a través de receptores serotoninérgicos (Hernández-Rodríguez, 1992).

Hay reportes de que algunas patologías, como la diabetes mellitus, afectan el funcionamiento normal del sistema serotoninérgico. Por ejemplo, la diabetes produce una disminución en la concentración de la fracción libre de L-Trp plasmático

disponible para la síntesis de la 5-HT, lo que promueve niveles bajos del neurotransmisor en el cerebro (Crandall *et al.*, 1981).

Se ha observado que en la corteza cerebral de ratas diabéticas los niveles de 5-HT están disminuidos, a diferencia de lo que se ha detectado en el tallo cerebral, donde existe un incremento en los niveles de 5-HT a pesar de que la concentración de su precursor el L-Trp se encuentra disminuida, proponiendo que la diabetes induce un cambio cinético en la actividad de la TPH de esta región cerebral (Manjarrez-Gutiérrez *et al.*, 1999). Los animales diabéticos tratados con insulina muestran normalización en la concentración plasmática de L-Trp, a excepción de la actividad de la TPH, que mantiene los cambios cinéticos, quizás por alguna alteración conformacional por la afección de la enfermedad (Manjarrez-Gutiérrez *et al.*, 2000; Trulson y MacKenzie, 1980). Estos cambios en la concentración de 5-HT producidos por la diabetes mellitus pueden involucrar afecciones importantes en la regulación de la conducta sexual del individuo y repercutir directamente en su reproducción (Aragón *et al.*, 2005; Lesage *et al.*, 1996).

II.4. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad altamente prevalente y con múltiples implicaciones, factores de riesgo y complicaciones, de mal pronóstico tanto en su presentación aislada como con otras patologías. En México se estima que 6.4 millones de personas sufren de DM, mientras que en el mundo hay alrededor de 346 millones de enfermos, cifra que se ha duplicado en las últimas dos décadas y continuará con esta tendencia de incremento por el envejecimiento de la población, la creciente prevalencia de obesidad, sedentarismo y cambios en la dieta (Gutiérrez *et al.*, 2012; OMS, 2012).

Desde el punto de vista individual, familiar y comunitario, la DM es un estado patológico relevante, ya que produce diversos grados de incapacidad e induce cambios en la dinámica social del individuo, motivados por las incomodidades de un

tratamiento y control de por vida. Desde el punto de vista epidemiológico su frecuencia, prevalencia y mortalidad señalan con claridad que se trata de un problema de salud pública de primera magnitud a nivel mundial (OMS, 2012).

La DM es una enfermedad metabólica, caracterizada por complicaciones crónicas entre las que destaca la hiperglucemia, manifestación debida a que las células no absorben ni utilizan la glucosa de modo eficiente, por una inadecuada secreción de insulina por las células β del páncreas o la resistencia de las células a la acción de esta hormona en los diversos tejidos del organismo. Los síntomas de la hiperglucemia marcada incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia, visión borrosa, y la susceptibilidad a ciertas infecciones; y se pueden presentar, como consecuencia del progreso de la enfermedad, complicaciones crónicas entre las que se encuentran: problemas cardiovasculares, nefropatías, retinopatías, neuropatías y daños microvasculares (American Diabetes Association, 2015).

II.4.1. Clasificación de la diabetes mellitus

Uno de los elementos principales para la investigación tanto epidemiológica como clínica de la DM, es una correcta clasificación que permita conducir el diagnóstico y terapéutica de la enfermedad. Mediante datos obtenidos en investigaciones realizadas a lo largo de varios años, el comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes, propuso la clasificación de los diferentes tipos de DM en 4 grupos:

- **DM tipo 1 (DM1)**, destrucción autoinmune de las células β pancreáticas y posterior deficiencia absoluta de insulina (representa el 5% al 10% de los casos diabéticos).
- **DM tipo 2 (DM2)**, predominante resistencia a la insulina con deficiencia relativa hasta un defecto secretor de la insulina con resistencia (representa el 90% al 95% de la población diabética).

- **DM gestacional (DMG)**, se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo.
- **Otros tipos específicos de DM**, varios tipos de diabetes que se manifiestan generalmente a una temprana edad y en alrededor de 2% de los casos diabéticos, comprenden un grupo heterogéneo que abarca los casos de diabetes en los cuales su etiología y la patogénesis no están definidas o se conocen parcialmente (American Diabetes Association, 2015).

II.4.1.1. Diabetes mellitus experimental

El estudio de los diversos tipos de DM ha servido para crear modelos de diabetes mellitus experimental (DME) que permiten realizar trabajos de investigación que conduzcan al desarrollo de técnicas para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las complicaciones de la patología, las cuales ayudan a comprender la interacción de los factores hereditarios y ambientales que desencadenan esta enfermedad para lograr un control más oportuno.

La inducción de la DME se ha logrado por medio de diversas técnicas experimentales entre las que destaca la inducción química. Existen varias clases de agentes químicos empleados para inducir DME en animales de laboratorio. Se clasifican en 3 grupos principales: El primer grupo lo integran sustancias con citotoxicidad específica que destruyen a las células β del páncreas y causan un estado de deficiencia primaria de insulina. El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre las células β pero no las destruyen. Y finalmente en el tercer grupo se encuentran fármacos que incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y como consecuencias se produce la DME (Rees y Alcolado, 2005).

Entre las sustancias más utilizadas para la inducción de DME se encuentra la estreptozotocina (STZ), compuesto diabetogénico que actúa sobre las células β pancreáticas. La STZ es sintetizada por *Streptomyces achromogenes*, presenta

actividad como antibiótico de amplio espectro y anti-neoplásico, estructuralmente es análoga a la glucosa, cualidad que le ayuda a que el transportador de glucosa GLUT2 le permita el paso a la célula β de los islotes pancreáticos. Después de su absorción en las células beta, la STZ se divide en glucosa y una fracción de metilnitrosourea. La molécula metilnitrosourea tiene propiedades alquilantes, ésta modifica macromoléculas biológicas, particularmente los fragmentos del ácido desoxirribonucleico (ADN) y destruye las células β , causando un tipo de DM insulino-dependiente (Lenzen, 2008; Szkudelski, 2001).

II.4.2. Neuropatía diabética

Dentro del estadio de la patología diabética se pueden considerar diferentes etapas entre las que destacan: un periodo pre-diabético, donde comienzan a manifestarse algunos síntomas propios de la patología; un periodo de diabetes aguda, donde ya está manifiesta la patología diabética con desarrollo temprano de algunas complicaciones funcionales en el organismo; y un periodo crónico, en el cual con el transcurso del tiempo de padecer la enfermedad las complicaciones fisiológicas presentan una mayor afección.

La neuropatía diabética es una de las complicaciones a largo plazo de la DM que afectan a aproximadamente el 50% de todas las personas diabéticas. Se desarrolla en diabéticos con una amplia variedad de síntomas, patrones de afectación, variables de riesgo y mecanismos subyacentes (Teskaye *et al.*, 2010).

La neuropatía diabética es una enfermedad crónica, simétrica, dependiente de la longitud de la polineuropatía sensitiva y motora. Su desarrollo se asocia con largos periodos de hiperglucemia y trastornos metabólicos asociados como un mayor flujo de poliol, la acumulación de productos avanzados de glucación, el estrés oxidativo, entre otras anomalías metabólicas (Orchard *et al.*, 2007).

La neuropatía diabética puede modificar el funcionamiento normal del organismo, afectando diversos sistemas como: el cardiovascular, por cambios de la presión arterial, la obesidad y niveles de colesterol y triglicéridos; gastrointestinal, debido a que la hiperglucemia aguda demora el vaciado gástrico (Valensi *et al.*, 2003); la función de las glándulas sudoríparas, que están inervadas por sudomotoras amielínicas simpáticas, donde la disfunción sudomotora puede dar lugar a sequedad de la piel y se ha asociado con la ulceración del pie (Tentolouris *et al.*, 2009); el urogenital, ya que la glucosilación de las fibras elásticas y la disfunción endotelial producen incontinencia urinaria y disfunción eréctil, además los cambios hormonales pueden afectar la conducta sexual del individuo (Várkonyi y Kempler, 2009).

II.4.3. Diabetes mellitus y parámetros espermáticos

Además de la afección que la DM puede causar en el sistema urogenital, la patología induce cambios moleculares sutiles que son importantes para la calidad y la función de los espermatozoides que pueden conducir a la infertilidad (La Vignera *et al.*, 2012; Mallidis *et al.*, 2011).

Estudios en ratas con DME sugieren que la diabetes produce una disminución del número de espermatozoides, de la motilidad y un aumento de los niveles de fructosa seminal; el tratamiento con insulina a estas ratas diabéticas revierte algunos de los efectos; sin embargo, algunas afecciones en la espermatogénesis son irreversibles (Seethalakshmi *et al.*, 1987).

Las características histológicas del epidídimo durante el período crítico de la maduración sexual en ratas con DME se ven modificadas, se observa una reducción del peso y tamaño del epidídimo, además de una ausencia de espermatozoides en el lumen del epidídimo (Soudamani *et al.*, 2005), lo que se asoció con una disminución en la fertilidad en la rata macho diabética en comparación con su control (Scarano *et al.*, 2006).

Se han propuesto tres mecanismos disfuncionales que explican el daño espermático observado durante el estadio diabético:

- **Trastornos endocrinos.** La DM provoca una disminución de los niveles séricos de las hormonas luteinizante (LH), folículo estimulante (FHS) y testosterona; aumenta los niveles de gonadotropina; la producción de espermatozoides y la fertilidad se reducen debido a la disminución de FSH (Ballester *et al.*, 2004). Estos cambios están asociados con un defecto en la esteroidogénesis por la ausencia del efecto estimulador de la insulina en células de Leydig (Agbaje *et al.*, 2007).
- **Neuropatía diabética.** La DM produce una atonía funcional de las vesículas seminales, la vejiga y la uretra, y la duración de la enfermedad produce un mayor daño del rendimiento del músculo liso del tracto reproductivo que pudiera generar incluso disfunción sexual (La Vignera *et al.*, 2011).
- **El estrés oxidativo.** Se presenta un incremento del estrés oxidativo con la DM, y genera una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres, promueve la disminución en la capacidad y estabilidad del estado de los antioxidantes, lo que influye en el desarrollo de las complicaciones a largo plazo como la oxidación de lípidos, proteínas y otras macromoléculas presentes en los diversos tejidos del organismo (Mallidis *et al.*, 2009), donde cambios en la composición de los componentes de la membrana pueden influir sobre la fluidez y el espesor de la bicapa lipídica, además de afectar la función de enzimas específicas, como la Na^+/K^+ -ATPasa (Amaral *et al.*, 2006; Murphy, 1990; Ng *et al.*, 1993).

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

III. JUSTIFICACIÓN

La DM es un estado patológico que produce diversos grados de incapacidad e induce cambios en la dinámica social del individuo que la padece. Su epidemiología señala con claridad que se trata de un problema de primera magnitud a nivel mundial, del que se predice tiende a incrementarse por el envejecimiento de la población, la creciente prevalencia de obesidad, sedentarismo y cambios en la dieta. La falta de un control adecuado de la DM, principalmente de la glucemia, acelera las complicaciones crónicas de la enfermedad, manifestándose en múltiples signos y síntomas de la fisiopatología, como la neuropatía diabética.

La DM afecta la biosíntesis de 5-HT, un neurotransmisor que participa en procesos de diferenciación celular y en múltiples funciones del organismo como la regulación de los ciclos de sueño y vigilia, la conducta alimentaria y el comportamiento sexual, así como en la regulación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, donde la modulación de la actividad de la enzima por serotonina es importante para mantener el equilibrio catiónico y el potencial de membrana en células del tejido nervioso. La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa y la concentración de 5-HT disminuyen a nivel central y periférico en individuos diabéticos, este defecto tiene una participación importante en el desarrollo de las complicaciones diabéticas. El uso de precursores serotoninérgicos como el L-Trp y el 5-HTP, o de algunos fármacos que inhiben la recaptura de 5-HT se han empleado para elevar el tono serotoninérgico en individuos donde la concentración de 5-HT ha decrecido.

Sí bien la disminución del tono serotoninérgico tiene relación con algunas de las complicaciones que se presentan en la DM como la inhibición de la espermatogénesis y fenómenos asociados que involucran un deterioro en la capacidad reproductiva masculina; y ante la falta de estudios en los que se incremente la concentración de 5-HT para revertir daños producidos por la patología diabética, se planteó lo siguiente:

IV. HIPÓTESIS

La administración de L-triptófano a ratas con diabetes mellitus experimental promueve la espermatogénesis y mejora la viabilidad y motilidad de los espermatozoides por un incremento de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Determinar si la administración de L-Trp restablece la espermatogénesis y la calidad espermática por el incremento de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con DME.

V.2. Objetivos específicos

- Evaluar la morfología testicular y epididimaria, y establecer la calidad de los espermatozoides en ratas control y ratas con DME.
- Determinar la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de rata con DME.
- Valorar si la administración de L-Trp modifica las afecciones que la DME provoca en el proceso de espermatogénesis, en los parámetros espermáticos y la relación que pudiera presentarse con la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. Estrategia metodológica

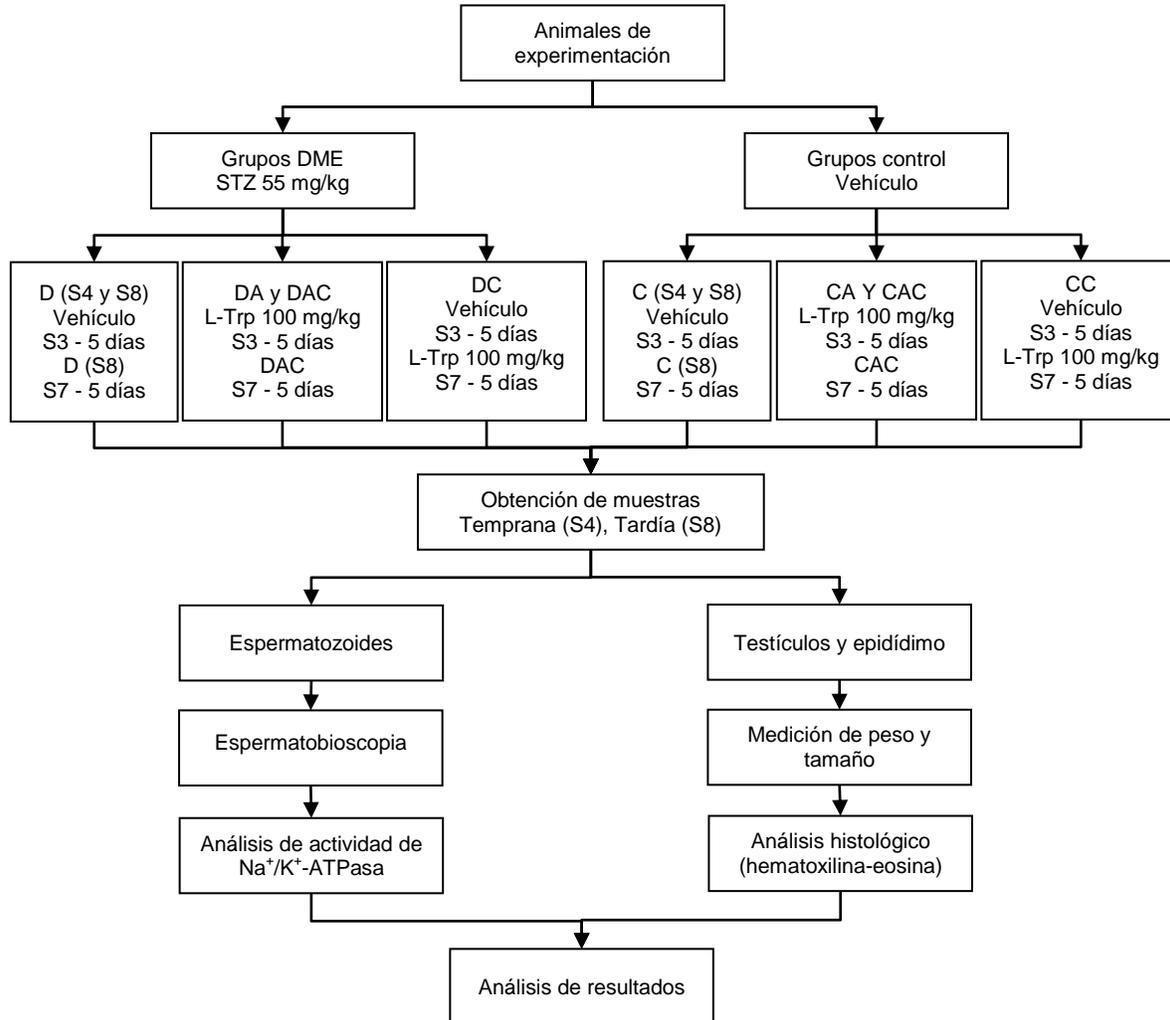


Figura 2. Representación gráfica de estrategia metodológica.
El tiempo experimental se señala en semanas (S#).

VI.2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar mantenidas en el bioterio del Laboratorio de Neurobiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, siguiendo los protocolos vigentes para el uso de animales de investigación (SAGARPA, 2001), con alimento Purina Rat Chow® y agua filtrada *ad-libitum*, ciclos de luz y oscuridad de 12 h (7-19 h), temperatura de 24 ± 2 °C y humedad relativa de 60.0 ± 5 %.

Ratas de dos meses de edad se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: un grupo con DME formado por ratas tratadas con STZ vía intraperitoneal (IP), en dosis única de 55 mg/kg de peso; y un grupo control, al cual se le administró un volumen equivalente del vehículo; se valoró la correcta implementación del modelo de DME donde animales con valores superiores a 125 mg/dl de glucosa sanguínea fueron utilizados en el experimento (Szkudelski, 2001). De estos dos grupos se evaluaron dos etapas del modelo de DME, una etapa temprana a las 4 semanas post-tratamiento y una etapa tardía que se alcanzó a la octava semana después de la administración de STZ. Los dos grupos primarios se dividieron en grupos secundarios como se muestra en la Tabla 1 y se siguió la estrategia experimental que se muestra en la Figura 2.

Tabla 1. Grupos de animales experimentales y tratamientos administrados

| Grupo* | Número de ratas | Semana de tratamiento | Tiempo de tratamiento | Etapas de sacrificio | Dosis del fármaco (vía IP) |
|------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|
| C | 6 | 3 | 5 días | Temprana | Vehículo |
| CA | 6 | 3 | 5 días | Temprana | 100 mg L-Trp/kg |
| D | 6 | 3 | 5 días | Temprana | Vehículo |
| DA | 6 | 3 | 5 días | Temprana | 100 mg L-Trp/kg |
| C | 6 | 3 y 7 | 5 días | Tardía | Vehículo |
| CAC | 6 | 3 y 7 | 10 días | Tardía | 100 mg L-Trp/kg |
| CC | 6 | 7 | 5 días | Tardía | 100 mg L-Trp/kg |
| D | 6 | 3 Y 7 | 5 días | Tardía | Vehículo |
| DAC | 6 | 3 y 7 | 10 días | Tardía | 100 mg L-Trp/kg |
| DC | 6 | 7 | 5 días | Tardía | 100 mg L-Trp/kg |

***Grupo C:** Grupo control; **Grupo CA:** Grupo control con administración de L-Trp en etapa temprana; **Grupo CAC:** Grupo control con administración de L-Trp en etapas temprana y tardía; **Grupo CC:** Grupo control con administración de L-Trp en etapa tardía; **Grupo D:** Grupo diabético; **Grupo DA:** Grupo diabético con administración de L-Trp en etapa temprana; **Grupo DAC:** Grupo diabético con

administración de L-Trp en etapas temprana y tardía; **Grupo DC:** Grupo diabético con administración de L-Trp en etapa tardía.

El tratamiento en una etapa temprana del modelo de DME con L-Trp inicio tres semanas posteriores a la administración de STZ (Grupos C, CA, D y DA); los grupos CA y DA fueron administrados con L-Trp durante 5 días en una dosis de 100 mg/kg de peso vía IP (los grupos CAC y DAC, recibieron un primer tratamiento durante este periodo), mientras que a los grupos C y D se les administró el vehículo, los animales de estos grupos fueron sacrificados al cumplirse la cuarta semana experimental.

En un estadio tardío del modelo de DME dentro de la séptima post-STZ, 5 días previos al día de sacrificio de los animales experimentales se inició el tratamiento con L-Trp en la dosis antes mencionada de los grupos CAC, CC, DAC, y DC (segundo tratamiento para CAC y DAC); mientras que a los grupos C y D únicamente se les administró el vehículo. Durante el tiempo experimental (8 semanas) se llevó el registro del peso, consumo de agua y alimento, y nivel de glucemia.

VI.3. Obtención de muestras biológicas

Los animales, con un periodo de ayuno de alrededor de 6 h, se sacrificaron por dislocación cervical entre las 12:00 y 3:00 pm; rápidamente se obtuvo de cada uno de ellos una muestra de sangre intracardiaca, además se diseccionaron los testículos con sus respectivos epidídimos y conductos deferentes.

La muestra sanguínea se recuperó con anticoagulante (K2-EDTA 7.2 mg/4 ml sangre) para la determinación de hemoglobina glucosilada, mientras que la sangre sin anticoagulante se centrifugó a 2000 RCF y se recuperó el suero para realizar determinaciones enzimático-colorimétricas de glucosa, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), triglicéridos, proteínas totales, y albumina sérica. Se emplearon kits Spinreact® para la determinación de los diferentes parámetros bioquímicos, se siguieron los protocolos y recomendaciones del fabricante, así como

la ecuación de Friedewald para el cálculo de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lípidos totales (Friedewald *et al.*, 1972). Los testículos y epidídimos fueron pesados y medidos, posteriormente se utilizaron para realizar cortes histológicos. El contenido de los conductos deferentes se colocó en 0.5 ml de solución (EquiPRO®) a 37 °C para obtener una suspensión de espermatozoides. Se procedió a realizar la espermatobioscopia para determinar la motilidad, morfología, vitalidad y cantidad de los espermatozoides presentes (World Health Organization, 2010); el resto de la muestra se empleó para la obtención de productos para la valoración de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa.

VI.4. Cortes para análisis histológico

Los testículos y epidídimos se colocaron en una placa fría con solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) a pH 7.4, se disecaron y por separado se almacenaron a 4 °C en una solución fijadora de paraformaldehído al 4 %. Las partes anatómicas siguieron un proceso de deshidratación y aclaramiento para ser incluidos en parafina. Al finalizar la inclusión y montaje de las muestras se procedió a realizar cortes del tejido en serie de un grosor de 10 μm que se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se analizaron al azar un centenar de secciones transversales de los túbulos seminíferos por animal con el fin de evaluar la frecuencia relativa de las etapas VII-VIII del ciclo epitelio germinal (Aragón *et al.*, 2005).

VI.5. Medición de la actividad específica de la Na^+/K^+ -ATPasa

Los espermatozoides se colocaron en solución 50 mM de Tri-s-HCl pH 7.4 y se homogeneizaron con 10 pasos a 700 rpm en un homogeneizador Thomas con vástago de teflón de 0.25 mm de luz. Se determinó su contenido proteico del homogeneizado (Lowry *et al.*, 1951). La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa fue medida con el método usado por Mercado y Hernández (1994), en triplicado de alícuotas del homogeneizado equivalentes a 50 μg de proteína, donde la actividad de la enzima se

determinó mediante la cantidad de fosfato inorgánico liberado de la reacción de hidrólisis del ATP. La actividad específica (A.E.) se expresó como mMolPi/mgProt/h .

VI.6. Análisis estadístico

Se evaluaron estadísticamente los datos de los resultados experimentales. Las curvas patrón se sometieron a regresión lineal. Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución Gaussiana, y a partir de estos datos, se calcularon la media aritmética y la desviación estándar. La comparación de los resultados se realizó por las prueba "t" de Student y ANOVA según correspondió con una $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

VII.1. Diabetes mellitus experimental

Para realizar este trabajo primero se estableció el modelo de DME mediante el uso de la STZ. En las ratas a las que se les administró STZ se observó un aumento significativo de la glucosa sanguínea (400 mg/dl) en comparación con los grupos control, dicho incremento permaneció constante desde la primera hasta la octava semana (Figura 3).

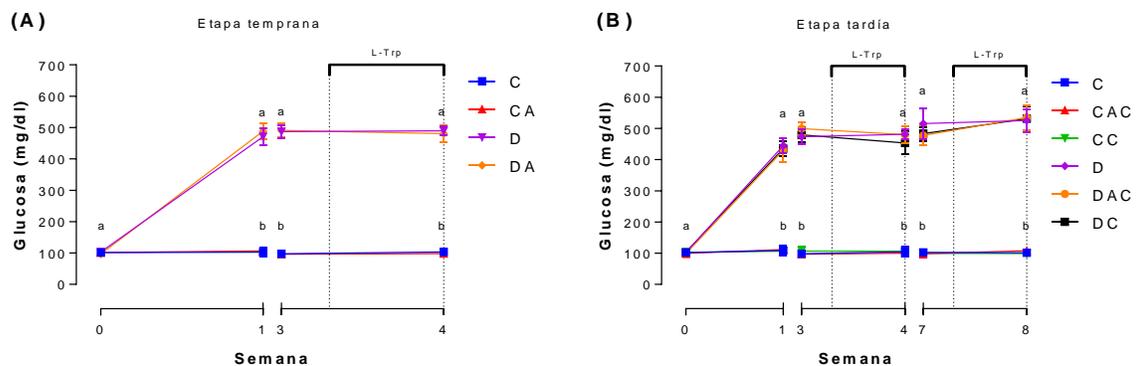


Figura 3. Niveles de glucemia en los animales con DME.

Las mediciones del índice glucémico fueron realizadas con un ayuno de 6 h de los animales. Se presentan los valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

La hiperglucemia en los animales de los grupos D y DA de la etapa temprana, así como de D, DAC, y DC no mostró una diferencia significativa entre ellos, aun con los diferentes tratamientos con L-Trp a los que fueron sometidos en los tiempos que fueron monitorizados; pero si se encontró diferencia en los valores de hemoglobina glucosilada (ver Tabla 3).

Está bien establecido que en ratas a las que se administra STZ para inducir DME, además de hiperglucemia, presentan polifagia (Lenzen, 2008). El registro de la ingesta de alimento mostró que los grupos con DME tanto en una etapa temprana como en una etapa tardía, consumieron hasta el doble de alimento con respecto a los grupos control (Figura 4). La administración de L-Trp produjo una reducción del 20 al 50% en la ingesta de alimento de los grupos: CA, DA, CAC y DAC; el grupo DAC durante la quinta semana de estudio no presentó incluso polifagia.

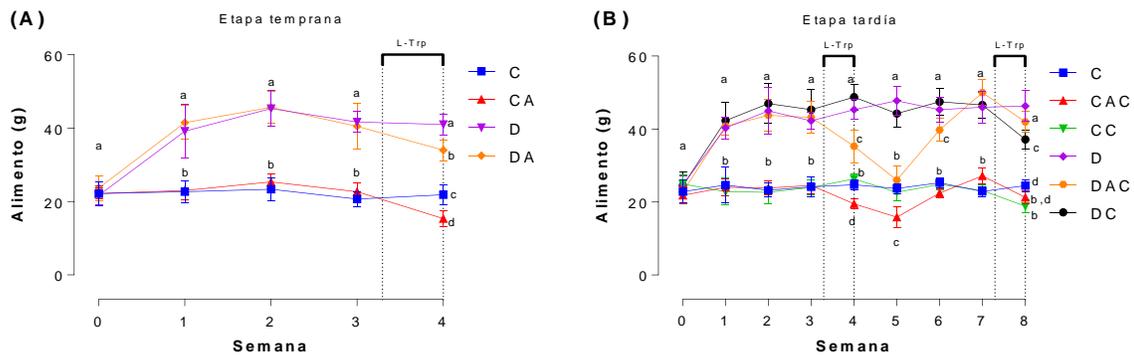


Figura 4. Ingesta de alimento por los animales de experimentación.

El consumo de alimento presentado es el monitoreado en un día por semana, se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

Con respecto a la ingesta de agua las ratas de los grupos DME presentaron polidipsia, Figura 5. En la mayoría de animales diabéticos, el consumo de agua fue hasta 4 veces más que el de los animales control, excepto para el grupo DAC que en la quinta semana disminuyó su ingesta de agua con respecto a los grupos con DME.

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

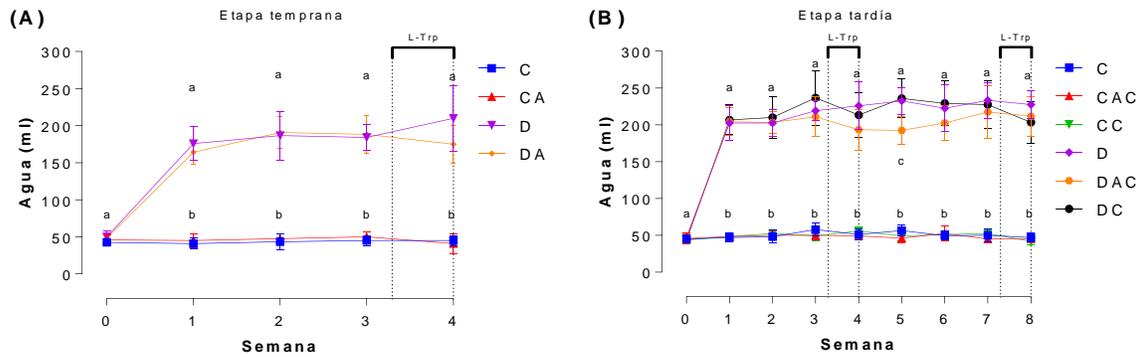


Figura 5. Consumo de agua por los animales de experimentación.

El consumo de agua presentado es el monitoreado en un día por semana, se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

A partir de la segunda semana experimental, en los grupos DME su peso corporal disminuyó con respecto a los grupos control (Figura 6); la pérdida de peso fue hasta de 140 g al final del estudio. En los grupos control, el grupo CAC mostró al final del monitoreo una disminución de 40 g en peso corporal con respecto al grupo C. El grupo DAC, que recibió los mismos tratamientos que CAC, también presentó un cambio significativo en el peso corporal al final del experimento con respecto a los grupos DME de la etapa crónica, pero en este caso mostró un mayor peso.

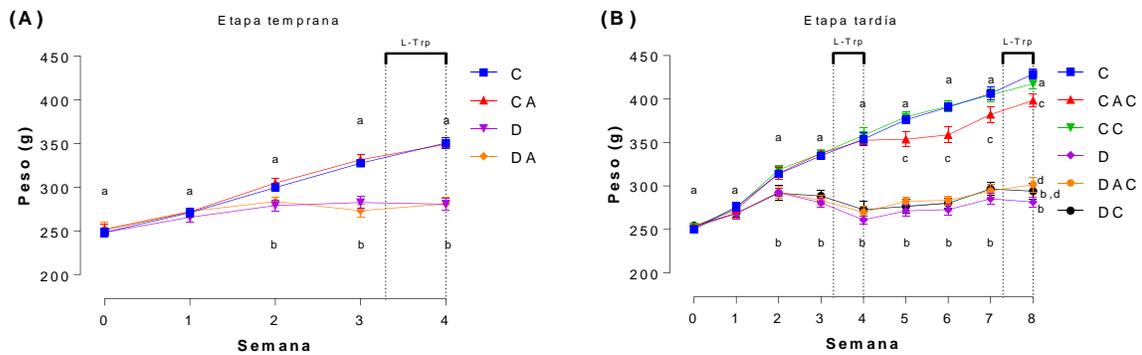


Figura 6. Peso corporal de los animales de experimentación.

Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

VII.2. Valoración de parámetros bioquímicos

Finalizada la monitorización del modelo de DM, los animales experimentales fueron sacrificados y de ellos se obtuvo una muestra sanguínea intracardiaca para valorar diferentes parámetros bioquímicos que se enlistan en las Tablas 1 y 2, con la finalidad de apreciar si ocurrió algún cambio por acción de los diferentes tratamientos que fueron aplicados.

Los grupos DME mostraron hiperglucemia ($>400\text{mg/dl}$) al analizarse el suero obtenido de la sangre tomada del corazón, y no hubo diferencia significativa dentro de los grupos primarios (control y DME) por los diferentes tratamientos de L-Trp. Sin embargo, se observó una disminución significativa del 1% en el nivel de glucosilación de hemoglobina del grupo DAC con respecto a los grupos D y DC (Tabla 3), aun así el nivel de hemoglobina glucosilada fue muy superior al mostrado por los grupos control.

Tabla 2. Parámetros bioquímicos de animales experimentales en la etapa temprana de estudio.

| Parámetro | Grupo | | | |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | C | CA | D | DA |
| Glucosa* | 96.0 \pm 13.75 ^a | 109.0 \pm 19.31 ^a | 451.0 \pm 22.61 ^b | 459.0 \pm 26.15 ^b |
| Hb glucosilada** | 4.0 \pm 0.10 ^a | 3.87 \pm 0.15 ^a | 8.63 \pm 0.21 ^b | 8.2 \pm 0.26 ^b |
| Colesterol* | 46.33 \pm 4.51 ^a | 52.33 \pm 6.43 ^a | 77.0 \pm 6.56 ^b | 91.33 \pm 8.5 ^b |
| Triglicéridos* | 95.67 \pm 7.77 ^a | 119.67 \pm 10.02 ^a | 173.67 \pm 16.26 ^b | 207.0 \pm 22.61 ^b |
| HDL* | 20.50 \pm 2.5 ^a | 23.83 \pm 3.71 ^b | 36.07 \pm 4.06 ^b | 45.70 \pm 4.59 ^b |
| LDL* | 9.70 \pm 1.44 ^a | 12.63 \pm 0.93 ^b | 15.13 \pm 0.55 ^b | 13.93 \pm 0.68 ^b |
| VLDL* | 19.13 \pm 1.55 ^a | 23.93 \pm 2.0 ^a | 34.73 \pm 3.25 ^b | 41.40 \pm 4.52 ^b |
| Lípidos totales* | 255.6 \pm 14.73 ^a | 309.60 \pm 10.95 ^a | 451.20 \pm 26.04 ^b | 537.0 \pm 55.61 ^c |
| Proteínas totales*** | 6.63 \pm 0.31 ^{a,b} | 6.10 \pm 0.46 ^b | 7.03 \pm 0.38 ^a | 6.0 \pm 0.20 ^b |
| Albumina*** | 1.57 \pm 0.15 ^a | 1.20 \pm 0.10 ^{a,b} | 1.53 \pm 0.25 ^a | 1.10 \pm 0.10 ^b |

Unidades: *mg/dl, **%, ***g/dl. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 3 ratas por grupo. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

Tabla 3. Parámetros bioquímicos de animales experimentales en la etapa tardía de estudio.

| Parámetro | Grupo |
|-----------|-------|
|-----------|-------|

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

| | C | CAC | CC | D | DAC | DC |
|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Glucosa* | 107.33±8.08 ^a | 115.33±3.51 ^a | 98.67±8.62 ^a | 553.67±27.01 ^b | 565.67±32.04 ^b | 556.67±29.74 ^b |
| Hb glucosilada** | 4.13±0.06 ^a | 3.97±0.06 ^a | 4.17±0.06 ^a | 11.07±0.50 ^b | 9.77±0.67 ^c | 10.80±0.20 ^b |
| Colesterol* | 54.00±6.08 ^a | 52.67±6.43 ^a | 62.00±3.46 ^a | 102.67±4.04 ^b | 110.67±5.13 ^b | 109.33±5.69 ^b |
| Triglicéridos* | 89.33±9.45 ^a | 102.00±8.19 ^{a,b} | 124.33±9.02 ^b | 179.33±10.69 ^c | 190.67±10.07 ^c | 161.67±10.41 ^d |
| HDL* | 27.47±4.96 ^a | 23.73±7.43 ^a | 25.27±4.11 ^a | 54.37±3.65 ^b | 60.03±3.33 ^b | 63.87±8.85 ^b |
| LDL* | 8.67±0.68 ^a | 8.53±0.76 ^a | 11.87±1.50 ^b | 12.43±0.85 ^b | 12.50±0.61 ^b | 13.13±1.86 ^b |
| VLDL* | 17.87±1.89 ^a | 20.40±1.64 ^{a,b} | 24.87±1.80 ^b | 35.87±2.14 ^c | 38.13±2.01 ^c | 32.33±2.08 ^d |
| Lípidos totales* | 258.0±23.49 ^a | 278.40±15.10 ^a | 335.40±11.57 ^b | 507.60±25.20 ^c | 542.40±25.86 ^c | 487.80±16.00 ^c |
| Proteínas totales*** | 6.07±0.12 ^a | 5.80±0.20 ^{a,b} | 6.03±0.15 ^a | 5.50±0.10 ^b | 5.83±0.15 ^{a,b} | 5.60±0.17 ^b |
| Albumina*** | 1.70±0.10 ^a | 1.57±0.06 ^{a,b} | 1.37±0.06 ^{b,c} | 1.33±0.06 ^{c,d} | 1.40±0.10 ^{b,c} | 1.13±0.06 ^d |

Unidades: *mg/dl, **%, ***g/dl. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 3 ratas por grupo. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

En cuanto a la valoración del perfil de lípidos, los grupos diabéticos de ambas etapas de estudio mantuvieron una mayor concentración de triglicéridos y lipoproteínas que los transportan (LDL y VLDL), en general una mayor concentración de lípidos totales en el suero sanguíneo analizado. En el caso de los grupos CAC Y CC, se observó un incremento en lipemia de animales que los integran.

Al analizar la cantidad de proteínas en el suero de la muestra sanguínea, se observó una menor proporción de proteínas totales en los grupos DME respecto a los grupos control. El grupo DAC mostró un ligero aumento (no significativo dentro de los grupos DME) que le permitió alcanzar los valores de los grupos control, así como una menor concentración en el contenido de albumina sanguínea.

VII.3. Peso y tamaño de testículos y epidídimos

Una vez que se sacrificaron a los animales, los testículos y epidídimos fueron aislados, pesados y medidos. Los resultados del peso testicular se muestran en la Figura 7, en donde se puede observar una disminución significativa de 0.15 g en peso testicular en los animales del grupo D con respecto al grupo C en una etapa

temprana de DME, que con el avance del estadio diabético disminuyó el peso testicular hasta 0.3 g.

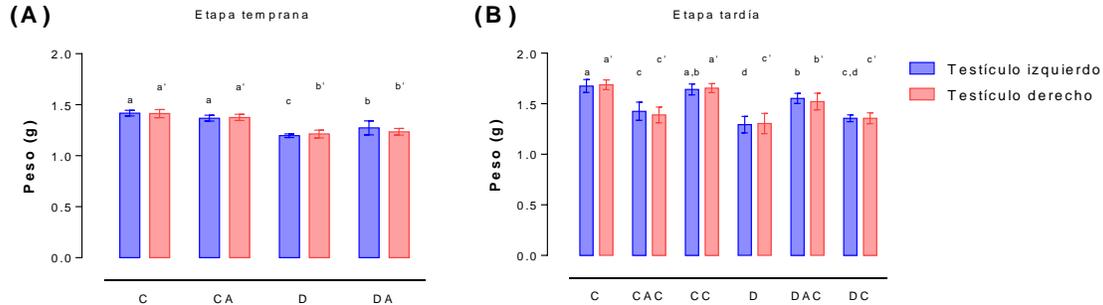


Figura 7. Peso testicular de los animales experimentales.

Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes, literales sin o con símbolo prima corresponden a comparación de testículo izquierdo o derecho, respectivamente (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

El grupo CAC (animales con dos tratamientos de L-Trp), mostró una disminución significativa de 0.2 g en el peso testicular al comparar con el grupo C; y su contraparte diabética, el grupo DAC, recuperó peso testicular hasta en 0.2 g con respecto al peso testicular del grupo D en la etapa tardía.

En las Figura 8 y Figura 9 se muestran los resultados de la medición de los diámetros cráneo-caudal y dorso-ventral de los testículos, donde cambios significativos fueron apreciables solamente durante la etapa tardía de DME. El diámetro cráneo-caudal testicular en los animales de los grupos D y CAC disminuyó hasta en 0.2 cm con respecto al grupo C, así como el diámetro dorso ventral testicular que fue 0.25 cm menor en los grupos D y CAC al comparar con el grupo C.

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

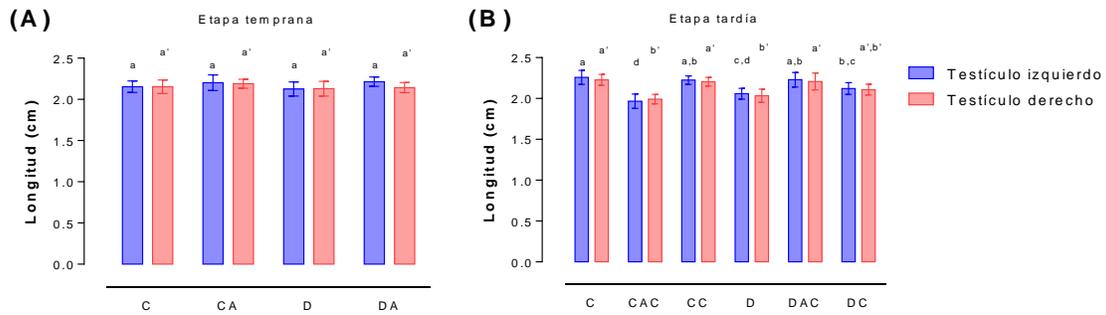


Figura 8. Diámetro cráneo-caudal de los testículos.

Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes, literales sin o con símbolo prima corresponden a comparación de testículo izquierdo o derecho, respectivamente (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

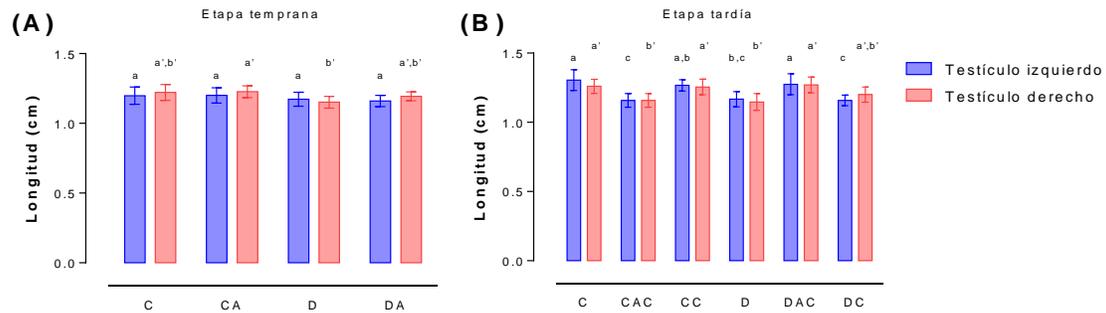


Figura 9. Diámetro dorso-ventral de los testículos.

Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes, literales sin o con símbolo prima corresponden a comparación de testículo izquierdo o derecho, respectivamente (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

Animales con dos tratamientos de L-Trp, grupo DAC, recuperaron en las dimensiones dorso-ventral y cráneo-caudal hasta 0.2 cm de longitud en comparación con el grupo D al que no se administró el aminoácido.

El peso de los epidídimos también mostró diferencias significativas al comparar entre los diferentes grupos experimentales como se puede apreciar en la Figura 10. Dichas diferencias se presentaron únicamente en una etapa tardía del modelo de DME, donde el grupo D fue quien presentó la mayor disminución de peso epididimal hasta 0.25 g con respecto al grupo C.

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

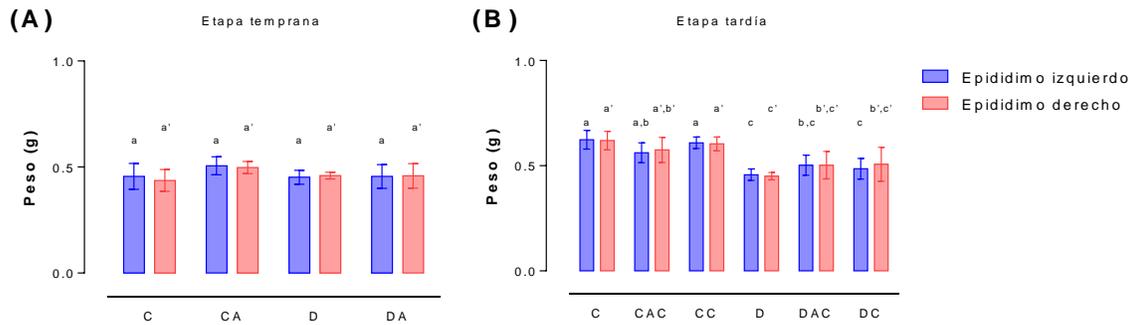


Figura 10. Peso de epidídimos en animales de experimentación.

Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes, literales sin o con símbolo prima corresponden a comparación de epidídimo izquierdo o derecho, respectivamente (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

En la Figura 11 se muestra la medición del largo del epidídimo, entre las afecciones presentes en los animales del grupo D hay una disminución de 0.5 cm de longitud epididimal con respecto al grupo C en la etapa tardía pero no en la etapa temprana de DME. La administración de L-Trp recupero en el grupo DAC la longitud del epidídimo siendo esta alrededor de 5 cm igual que el grupo C.

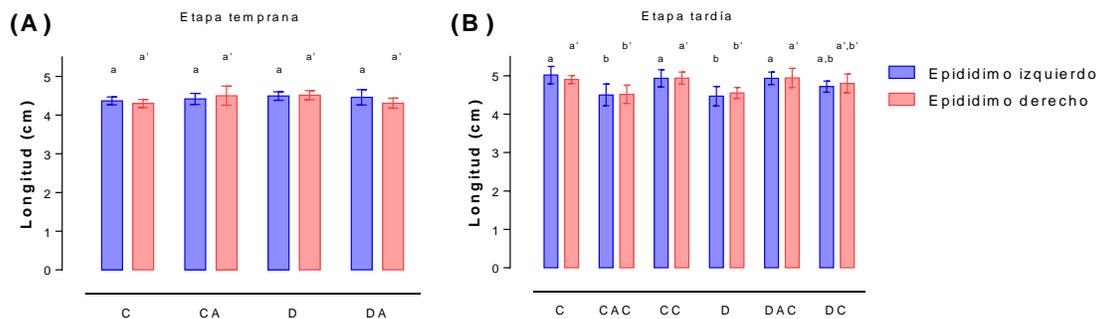


Figura 11. Largo de epidídimos.

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes, literales sin o con símbolo prima corresponden a comparación de epidídimo izquierdo o derecho, respectivamente (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

Al analizar los diámetros de la cabeza y la cola de los epidídimos, se observó en una etapa tardía de DME, que en los grupos DME hubo una reducción en el diámetro de la cabeza del epidídimo con respecto al grupo C de 0.14 cm y 0.1 cm en la cabeza y cola de epidídimo respectivamente (Figura 12). Así mismo se observó una relación entre las disminuciones de tamaño de la cabeza y la del epidídimo y el peso de este órgano para el grupo D.

Un resultado importante obtenido hasta el momento, es que el tratamiento con L-Trp a los animales del modelo de DME produjo una recuperación en algunos parámetros de peso y tamaño tanto de testículos como de epidídimos. Lo anterior se puede observar principalmente en el grupo DAC, al cual fueron administrados dos tratamientos de L-Trp.

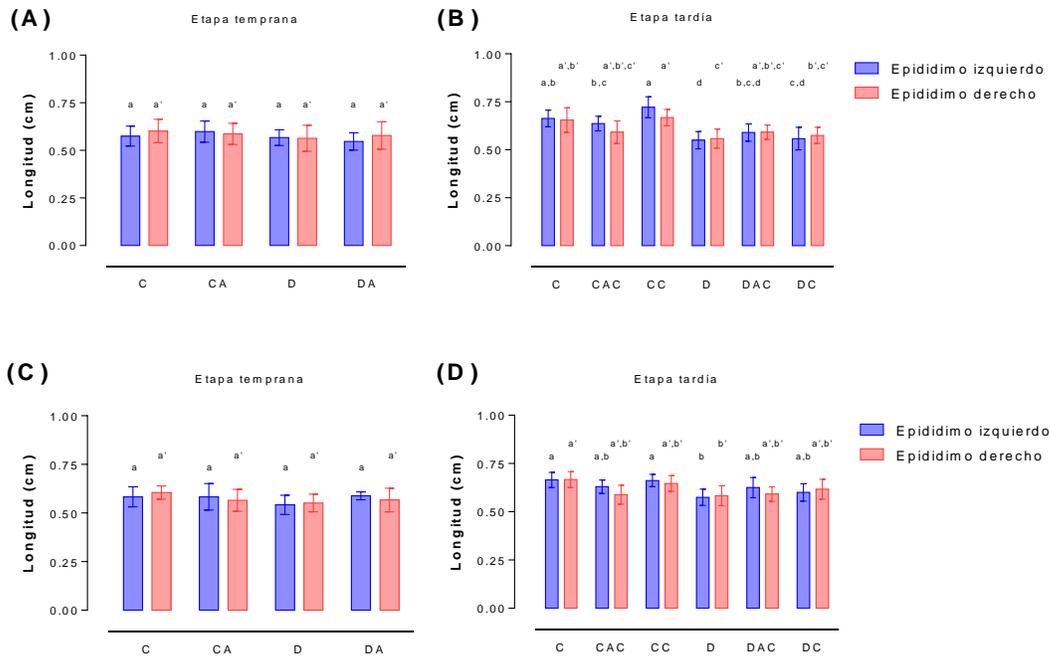


Figura 12. Diámetro de la cabeza y cola de los epidídimos.

Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Cabeza de epidídimo en animales de etapa temprana de DME, **(B)** Cabeza de epidídimo en animales de etapa tardía de DME. **(C)** Cola de epidídimo en animales de etapa temprana de DME, **(D)** Cola de epidídimo en animales de etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes, literales sin o con símbolo prima corresponden a comparación de epidídimo izquierdo o derecho, respectivamente (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

VII.4. Microscopia testicular y de epidídimos

El análisis de los cortes histológicos obtenidos de los testículos en los animales experimentales que se presenta en la Figura 13, mostró que el número de túbulos seminíferos presentes no se modificó entre los diferentes grupos experimentales ($p < 0.05$). No obstante, los túbulos seminíferos de los grupos con DME presentaron una situación irregular ya que el diámetro de los túbulos seminíferos disminuyó significativamente de 20 a 30 μm con respecto al grupo C (Figura 14).

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

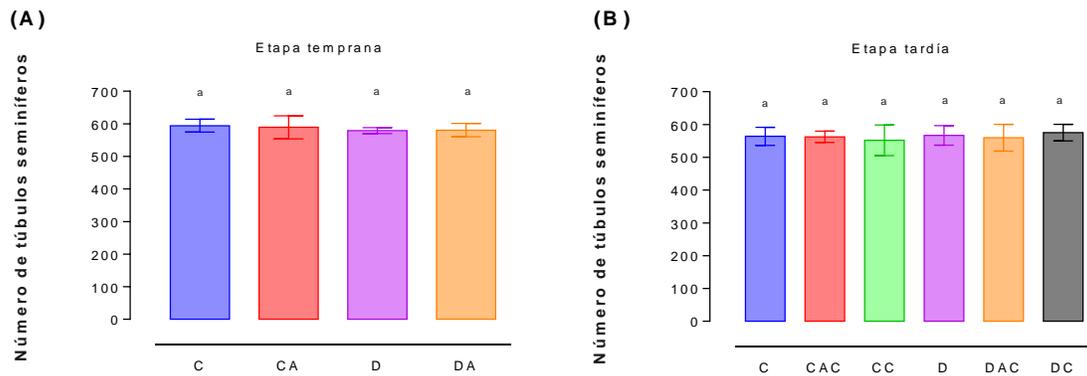


Figura 13. Número total de túbulos seminíferos en corte transversal de testículo.

Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 3 cortes por grupo. (A) Etapa temprana de DME, (B) Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

Si bien el tratamiento de L-Trp administrado a grupos de ratas control no provocó un cambio del diámetro de túbulos seminíferos, si se apreció un mayor diámetro en la luz del túbulo en estos grupos experimentales (Figura 15, grupo CAC); además, hubo una mejora en el diámetro de los túbulos seminíferos de hasta $10 \mu\text{m}$ en los testículos de ratas con DME a las que se les administró L-Trp, grupo DAC.

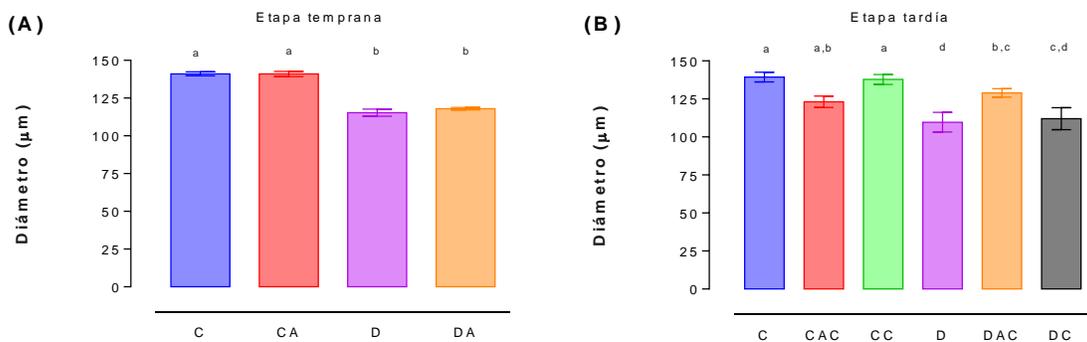


Figura 14. Diámetro de túbulos seminíferos de testículo.

Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 3 cortes por grupo donde se midieron al azar al menos 10 túbulos seminíferos. (A) Etapa temprana de DME, (B) Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

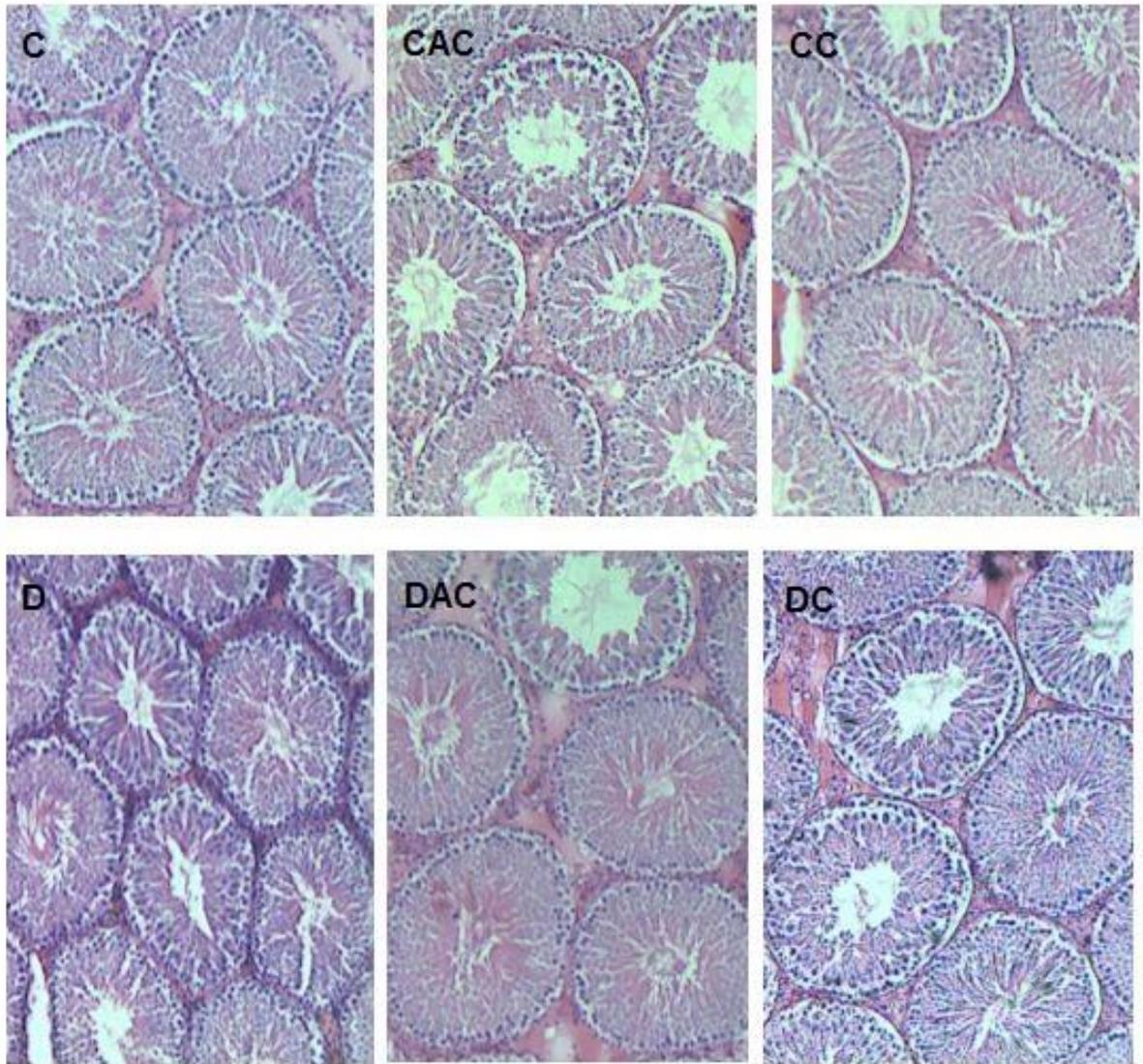


Figura 15. Micrografías representativas de cortes histológicos de testículos en animales de los diferentes grupos experimentales teñidos con hematoxilina-eosina 100X.

El número de túbulos seminíferos en los estadios VII y VIII, se muestra en la Figura 16. Es apreciable que desde una etapa temprana de la DME estos estadios del proceso de espermatogénesis disminuyeron hasta en 8% con respecto al grupo C. En la etapa tardía de estudio se observó que en los grupos D y CAC disminuyó en un 15% el número de túbulos seminíferos en los estadios VII y VIII en comparación con el grupo C; mientras que el grupo DAC mostró una mayor cantidad de túbulos seminíferos en estadios VII y VIII con respecto al grupo D que emula al grupo C, lo que significa que el proceso de espermatogénesis se recuperó para este grupo.

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

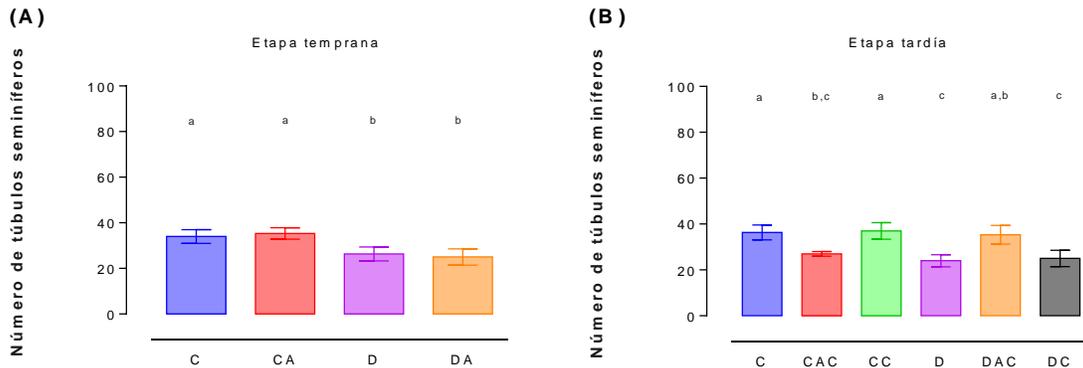


Figura 16. Estadios VII y VIII de la espermatogénesis en los túbulos seminíferos.

Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 3 cortes por grupo de donde se valoró el estadio de espermatogénesis de 100 túbulos seminíferos por corte. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

El análisis de cortes histológicos del epidídimo demostró cómo es que la DME afectó la cantidad de espermatozoides presentes en la luz de los túbulos que lo conforman (Figura 17), lo que está relacionado con que también se afecte el proceso de espermatogénesis y los gametos por la patología diabética. Así mismo se observó una menor cantidad de espermatozoides en el epidídimo del grupo CAC; mientras que el grupo DAC mostró una ligera mejoría en la concentración espermática en este órgano con respecto al grupo D.

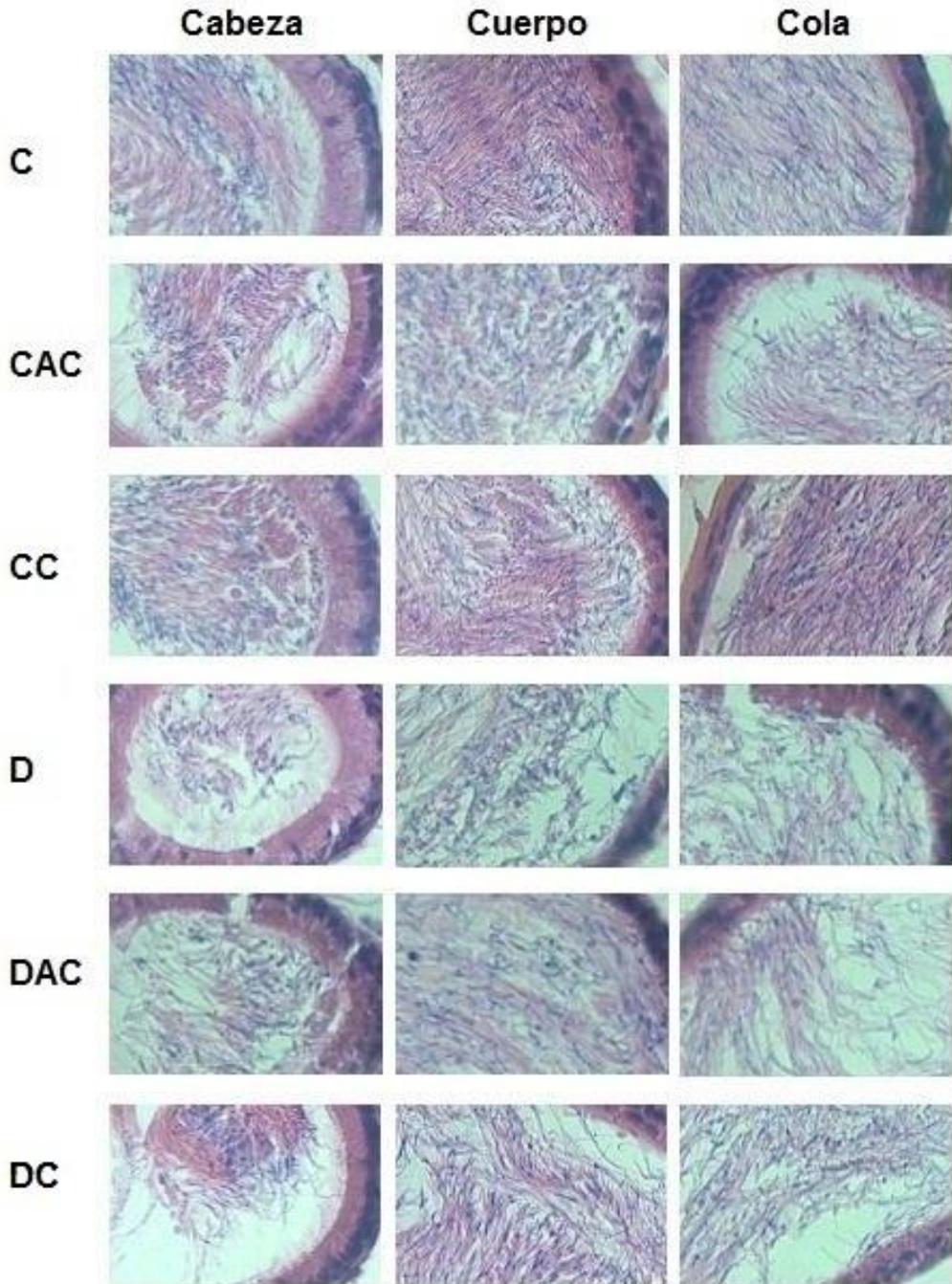


Figura 17. Micrografías representativas de cortes histológicos de diferentes regiones del epidídimo teñidos con hematoxilina-eosina 400X.

VII.5. Espermatobioscopia

Del conducto deferente diseccionado se obtuvo una suspensión de espermatozoides sobre la cual se realizó la espermatobioscopia (Figura 18). La concentración espermática en las dos etapas de estudio de los grupos D se mostró disminuida entre 3 a 5 millones de espermatozoides al comparar con el grupo C ($p < 0.05$, Figura 19). El grupo CAC mostró también una disminución significativa en la cantidad de espermatozoides presentes de 3 a 5 millones, esto como consecuencia de la inhibición de la espermatogénesis por los tratamientos con L-Trp. No se observó una diferencia significativa en el número de espermatozoides de los grupos DME a pesar de los diferentes tratamientos con L-Trp, aunque si se observó una tendencia a incrementar el número de gametos masculinos en el grupo DAC por arriba de 2 millones con respecto al grupo D.

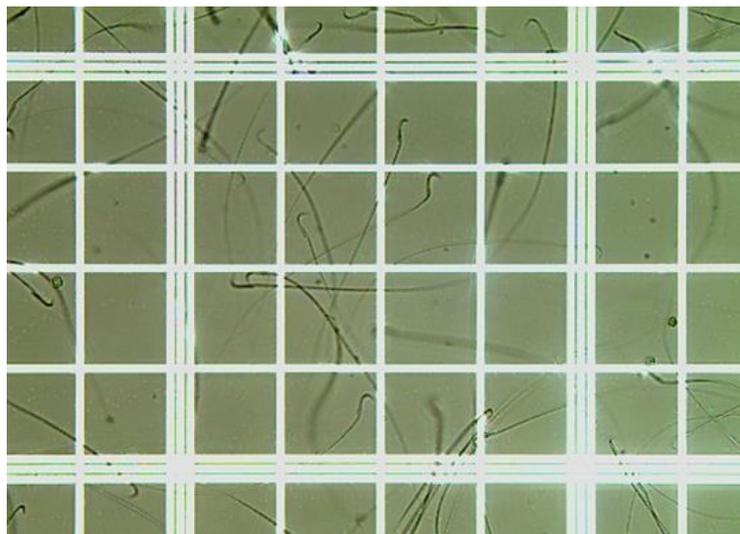


Figura 18. Espermatozoides observados con microscopio óptico 400X.

Se muestran espermatozoides recolectados del conducto deferente en una preparación para su conteo.

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

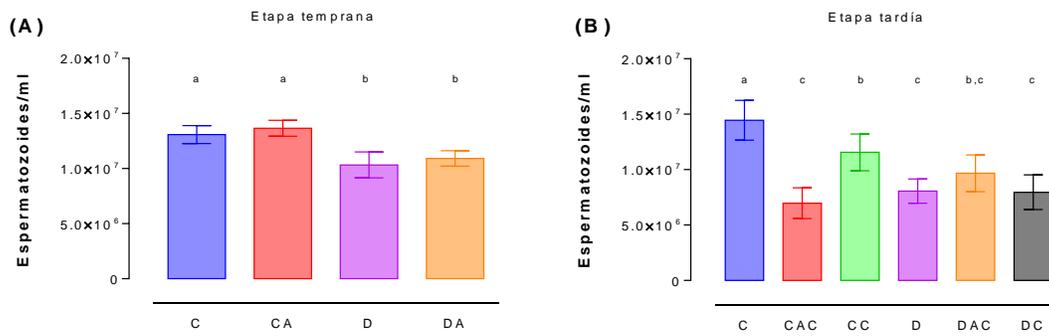


Figura 19. Concentración espermática en el conducto deferente.

Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

Para valorar la viabilidad de los espermatozoides se hizo empleo de la técnica azul de tripano (Figura 20). Se observó que la viabilidad se afectó negativamente en las dos etapas de estudio como consecuencia de la DME (Figura 21). Al comparar la viabilidad espermática entre los diferentes grupos experimentales se observó que aquellos que recibieron un tratamiento con L-Trp como los grupos DA y DAC elevaron un poco la supervivencia de espermatozoides, pero no hubo una diferencia significativa al comparar éstos con el grupo D. En cuanto a la morfología espermática no se observó un cambio mayor al 5% de espermatozoides anormales sin que se alcanzará una diferencia significativa entre grupos.

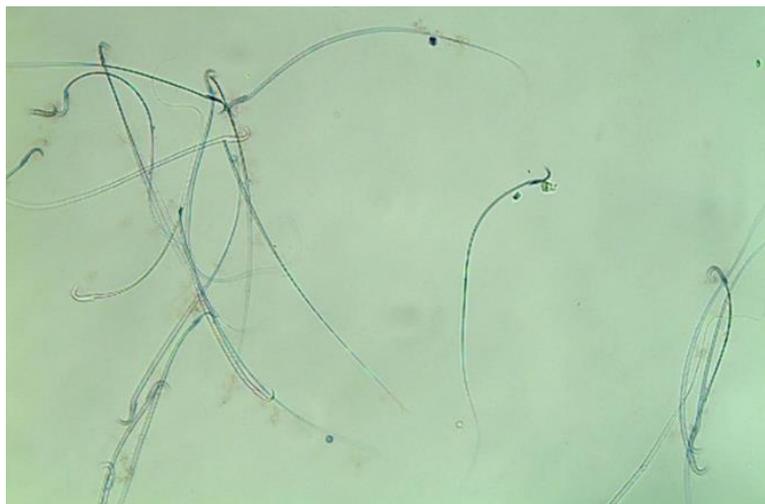


Figura 20. Micrografía de espermatozoides teñidos con azul tripano.

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

Los espermatozoides viables permanecen sin teñirse, mientras que los teñidos por completo de color azul están muertos.

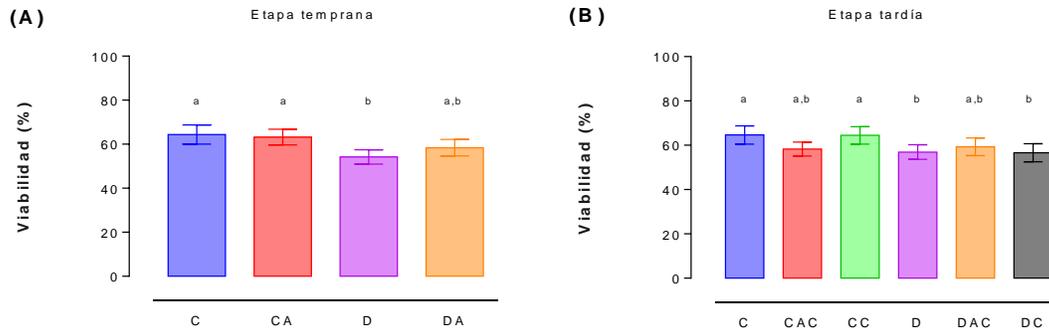


Figura 21. Viabilidad espermática.

Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

La motilidad de los espermatozoides del grupo D en etapa tardía disminuyó en un 10% con respecto al grupo C. La motilidad de los espermatozoides se incrementó con la administración de L-Trp como se observó en los grupos CA y CAC (Figura 22), pero no alcanzó a rebasar la motilidad del grupo C. La motilidad mejoró a raíz de la administración de L-Trp en los grupos DAC y DC.

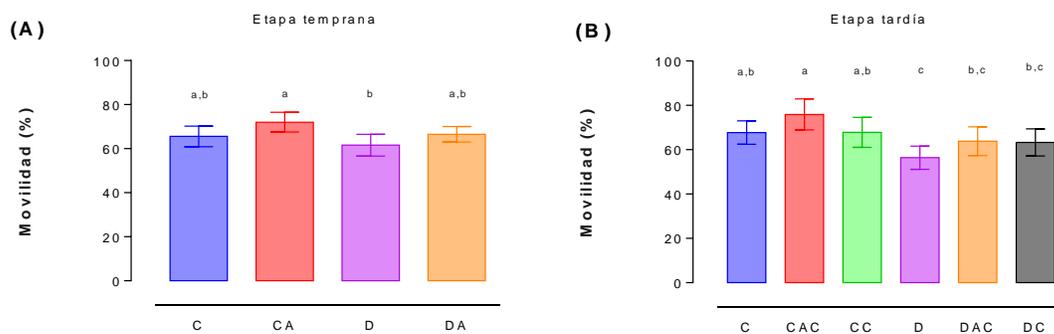


Figura 22. Motilidad de los espermatozoides.

Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 6 ratas por grupo. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

VII.6. Actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa

La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en los espermatozoides disminuyó significativamente de 0.5 a 0.8 mMolPi/mgProt/h en el grupo D de las dos etapas de estudio al comparar con el grupo C (Figura 23). Mientras que los grupos DA, DAC y DC incrementaron su actividad hasta valores cercanos al grupo control de 3.0 mMolPi/mgProt/h.

Si bien se ha descrito que la 5-HT puede modificar la cinética de la enzima en células gliales del cerebro de la rata, como resultado de la administración de L-Trp, tanto en animales de grupos control y DME, se produjo un incremento en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa.

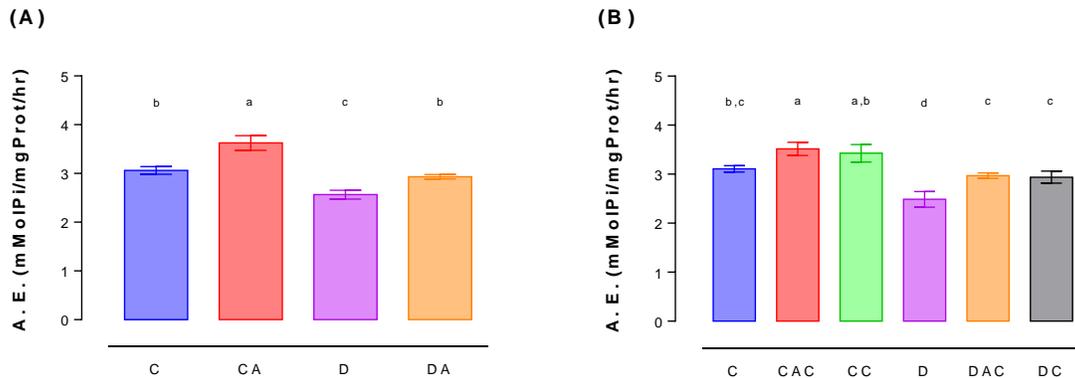


Figura 23. Actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en homogenizado de espermatozoides. Se muestran valores promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos por triplicado. **(A)** Etapa temprana de DME, **(B)** Etapa tardía de DME. Grupos no conectados por la misma letra son estadísticamente diferentes (ANOVA una vía, seguida de la prueba Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, $p < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de administrar un tratamiento corto de L-Trp, precursor de la síntesis de 5-HT, sobre la producción y calidad de espermatozoides en ratas macho adultas durante una etapa temprana y tardía de DME (4 y 8 semanas, respectivamente); con la finalidad de valorar si este tratamiento ayuda a mejorar la producción de espermatozoides así como de algunos parámetros espermáticos, que como consecuencia de la diabetes se encuentran deteriorados, y a determinar si en éste proceso se asocia la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, enzima que está directamente relacionada con la motilidad y viabilidad de los gametos.

Los resultados del presente estudio muestran que los animales con DME exhibieron muchos de los síntomas comúnmente asociados con la diabetes (por ejemplo: polifagia, polidipsia y poliuria); además que en el estadio diabético disminuye el peso corporal y de órganos reproductivos de las ratas macho, y que estas alteraciones se correlacionan con modificaciones metabólicas provocadas por las hipoinsulinemia e hiperglucemia crónicas; pudiéndose apreciar una mayor lipemia y disminución de algunas proteínas plasmáticas entre las que se encuentra la albumina (Manjarrez-Gutiérrez *et al.*, 1999). Estos resultados coinciden con reportes de otros autores en donde además también señalan que se ven afectados la expresión y despliegue de la conducta sexual que impactan negativamente sobre la capacidad reproductiva de los animales con DME (Scarano *et al.*, 2006). Si bien la terapia con insulina ha ayudado a recuperar el peso corporal y a alcanzar el equilibrio en algunos parámetros metabólicos en las ratas diabéticas a las cuales es administrada (Manjarrez-Gutiérrez *et al.*, 2000), así como la restauración del peso de determinados órganos reproductivos (Paz *et al.*, 1978); hay alteraciones que prevalecen aun con la administración de insulina, y afectan la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada donde continúan inhibiendo los procesos de esteroidogénesis y espermatogénesis (La Vignera *et al.*, 2012; Seethalakshmi *et al.*, 1987).

La adecuada regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada por diferentes hormonas y neurotransmisores es crucial para mantener la función óptima de los procesos de esteroidogénesis y espermatogénesis. Particularmente la 5-HT, un compuesto con cualidades tróficas del que se han descrito funciones de neurotransmisor en el sistema nervioso central y neurohormona en la periferia del organismo (Berger *et al.*, 2009), regula activamente a lo largo del eje hipotálamo-hipófisis-gónada diversas funciones que intervienen tanto en los procesos de expresión y despliegue de la conducta sexual hasta la espermatogénesis y fertilización del espermatozoide (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012; Olivier *et al.*, 2011; Snoeren *et al.*, 2014). Durante el desarrollo de las ratas, la concentración de 5-HT va disminuyendo en los testículos (Zieher *et al.*, 1971), donde en ratas inmaduras promueve y en adultas suprime la esteroidogénesis, teniendo con ello un fuerte influencia regulatoria sobre la espermatogénesis y el desarrollo sexual (Csaba *et al.*, 1998).

Las modificaciones en la concentración de 5-HT, tanto a la alta como a la baja pueden impactar de manera directa la regulación que este compuesto ejerce sobre una determinada función; es por ello que en diversas patologías como la depresión mediante el uso de diversos fármacos se trata de elevar la concentración de 5-HT que se encuentra disminuida para remediar parte de los trastornos que la enfermedad provoca (Cousins y Goodyer, 2015). Sin embargo, el control no adecuado en el tratamiento de este tipo de fármacos puede traer consecuencias en otros sistemas del organismo (Raeder *et al.*, 2006; Silva Junior *et al.*, 2008). Por ejemplo, la ligera dislipidemia que se observó en este trabajo con respecto a los animales de grupos control a los que se administró L-Trp reflejó cambios en el metabolismo de lípidos por tejidos y órganos del organismo (Boschmann *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2012).

En estudios donde se modificó la concentración de 5-HT de su umbral normal, tanto positiva como negativamente, mostraron afecciones importantes en los testículos y epidídimos de los animales experimentales (Aragón *et al.*, 2005; Boccabella *et al.*, 1962). En animales sanos donde se indujo un incremento en la concentración de

serotonina, a partir del tratamiento con fármacos inhibidores de la recaptura de 5-HT y de la administración de precursores serotoninérgicos como el L-Trp, se describe una disminución en el peso y tamaño de los testículos y epidídimos, así como una inhibición del proceso de espermatogénesis dependientes de la duración del tratamiento y tiempo de análisis post-tratamiento (Das *et al.*, 1986; Vega Matuszczyk *et al.*, 1998); Estos resultados coinciden con lo observado en el grupo CAC de este estudio se manifiesta de igual manera, donde además se observa una disminución en la cantidad de espermatozoides presentes en la luz del epidídimo (Bellentani *et al.*, 2011).

Por otro lado, cuando se experimenta para reducir la concentración de 5-HT en animales sanos, por ejemplo al hacer uso de *p*-clorofenilalanina o *p*-amfetamina, se ha observado también una inhibición de la espermatogénesis y una reducción del peso y tamaño testicular y epididimal (Aragón *et al.*, 2005; Bush y Seibel, 1977). Lo que en parte podría relacionarse con que en animales diabéticos disminuye la concentración de 5-HT (Herrera *et al.*, 2003; Manjarrez-Gutiérrez *et al.*, 1999), y que estos animales presentan una disminución en el tamaño y peso testicular y un deterioro del proceso de espermatogénesis que se intensifica por otros trastornos propios de la patología diabética (La Vignera *et al.*, 2012; Sisman *et al.*, 2014). Siendo así que los grupos D, tanto en etapa temprana y tardía de este trabajo, presentan una gran atrofia en relación a la morfología testicular y epididimal.

Al evaluar la morfología de los espermatozoides no se observaron afecciones importantes como consecuencia del estadio diabético, pero si se pudo valorar que la DME produjo deterioro en algunos parámetros que se emplean para valorar la calidad espermática. Por ejemplo los grupos D presentaron una menor cantidad, viabilidad y motilidad de espermatozoides, las cuales se incrementaron a partir de la administración de L-Trp desde una etapa temprana; este dato sumado a resultados de otros estudios realizados *in vitro* (Fujinoki, 2011), puede brindar evidencia de que la 5-HT participa incrementando la motilidad espermática, así como en la promoción

de la espermatogénesis en animales donde el tono serotoninérgico se encontraba disminuido (Grupo DAC).

Con relación al incremento de la motilidad, hay investigaciones que han reportado que en este proceso los sistemas de transporte iónico localizados en la membrana del espermatozoide son esenciales (Salicioni *et al.*, 2007; Visconti *et al.*, 2011). La Na^+/K^+ -ATPasa, enzima integral de membrana que lleva a cabo transporte activo (Skou y Esmann, 1992), participa activamente en los procesos de capacitación y motilidad espermáticas (Jiménez *et al.*, 2011). Como resultado de la administración de L-Trp, tanto en animales de grupos control y con DME se produjo un incremento en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa de los espermatozoides (donde además se pudo observar que la diabetes causa una disminución en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en los gametos), que bien puede estar relacionada con el aumento de motilidad (Jiménez *et al.*, 2012).

Es importante conocer como la administración de L-Trp incrementa la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa para proponer que, además de modificar la actividad de la enzima en células gliales del cerebro de la rata (Mercado-Camargo y Hernández-Rodríguez, 1992), la 5-HT tiene participación en la regulación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en los espermatozoides; y así contar con mayor información sobre la función que la 5-HT tiene en los gametos masculinos (Jiménez-Trejo *et al.*, 2012).

IX. CONCLUSIÓN

La administración de L-triptófano promueve la espermatogénesis de la rata con diabetes mellitus experimental incrementando la cantidad de espermatozoides, además incrementa la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa y mejora la viabilidad y motilidad espermáticas.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbaje, I.M., Rogers, D.A., McVicar, C.M., McClure, N., Atkinson, A.B., Mallidis, C., Lewis, S.E.M., 2007. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum. Reprod.* 22, 1871–1877. doi:10.1093/humrep/dem077
- Amaral, S., Moreno, A.J., Santos, M.S., Seïça, R., Ramalho-Santos, J., 2006. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology* 66, 2056–2067. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.06.006
- American Diabetes Association, 2015. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 38, S8–S16. doi:10.2337/dc15-S005
- Aragón, M.A., Ayala, M.E., Marín, M., Avilés, A., Damián-Matsumura, P., Domínguez, R., 2005. Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reprod. Camb. Engl.* 129, 717–727. doi:10.1530/rep.1.00598
- Arnoult, C., Kazam, I.G., Visconti, P.E., Kopf, G.S., Villaz, M., Florman, H.M., 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6757–6762.
- Ballester, J., Muñoz, M.C., Domínguez, J., Rigau, T., Guinovart, J.J., Rodríguez-Gil, J.E., 2004. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J. Androl.* 25, 706–719.
- Barazani, Y., Katz, B.F., Nagler, H.M., Stember, D.S., 2014. Lifestyle, environment, and male reproductive health. *Urol. Clin. North Am.* 41, 55–66. doi:10.1016/j.ucl.2013.08.017
- Bellentani, F.F., Fernandes, G.S.A., Perobelli, J.E., Pacini, E.S.A., Kiguti, L.R.A., Pupo, A.S., Kempinas, W.D.G., 2011. Acceleration of Sperm Transit Time and Reduction of Sperm Reserves in the Epididymis of Rats Exposed to Sibutramine. *J. Androl.* 32, 718–724. doi:10.2164/jandrol.111.013466

- Berger, M., Gray, J.A., Roth, B.L., 2009. The Expanded Biology of Serotonin. *Annu. Rev. Med.* 60, 355–366. doi:10.1146/annurev.med.60.042307.110802
- Blanco, G., Mercer, R.W., 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 275, F633–F650.
- Blanco, G., Sánchez, G., Melton, R.J., Tourtellotte, W.G., Mercer, R.W., 2000. The $\alpha 4$ Isoform of the Na,K-ATPase Is Expressed in the Germ Cells of the Testes. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1023–1032. doi:10.1177/002215540004800801
- Boccabella, A.V., Salgado, E.D., Alger, E.A., 1962. Testicular Function and Histology Following Serotonin Administration. *Endocrinology* 71, 827–837. doi:10.1210/endo-71-5-827
- Boschmann, M., Adams, F., Klaus, S., 2001. In situ metabolic and hemodynamic response to dexfenfluramine in white adipose tissue of rats. *Ann. Nutr. Metab.* 45, 24–29. doi:46702
- Breitbart, H., 2002. Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J. Reprod. Immunol.* 53, 151–159.
- Bush, F.M., Seibel, H.R., 1977. Blinding and Pinealectomy in Male Hamsters: Effects of Pineal Indoles and P-Chlorophenylalanine on Testes, Seminal Vesicles, Pituitary and Adrenal Glands. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 84, 419–428. doi:10.1530/acta.0.0840419
- Celuch, S.M., Sloley, B.D., 1989. Release of 5-hydroxytryptamine, dopamine and noradrenaline in the rat vas deferens in the presence of compound 48/80, veratridine or K⁺. *Br. J. Pharmacol.* 96, 77–82.
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2010. The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 1459–1463. doi:10.1098/rstb.2010.0024
- Collin, O., Damber, J.-E., Bergh, A., 1996. 5-Hydroxytryptamine – a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. *J. Reprod. Fertil.* 106, 17–22. doi:10.1530/jrf.0.1060017
- Cousins, L., Goodyer, I.M., 2015. Antidepressants and the adolescent brain. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* doi:10.1177/0269881115573542

- Crandall, E.A., Gillis, M.A., Fernstrom, J.D., 1981. Reduction in brain serotonin synthesis rate in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 109, 310–312.
- Csaba, Csernus, Gerendai, 1998. Intratesticular Serotonin Affects Steroidogenesis in the Rat Testis. *J. Neuroendocrinol.* 10, 371–376. doi:10.1046/j.1365-2826.1998.00217.x
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., Espinosa, F., 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiol. Rev.* 79, 481–510.
- Das, T. k., Mazumder, R., Biswas, N. m., 1986. Further Evidence for an Inhibitory Effect of L-Tryptophan Loading on Testicular Functions of Rat. *Andrologia* 18, 618–623. doi:10.1111/j.1439-0272.1986.tb01841.x
- Dym, M., Clermont, Y., 1970. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am. J. Anat.* 128, 265–282. doi:10.1002/aja.1001280302
- Ewart, H.S., Klip, A., 1995. Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 269, C295–C311.
- Feng, X.-M., Xiong, J., Qin, H., Liu, W., Chen, R.-N., Shang, W., Ning, R., Hu, G., Yang, J., 2012. Fluoxetine induces hepatic lipid accumulation via both promotion of the SREBP1c-related lipogenesis and reduction of lipolysis in primary mouse hepatocytes. *CNS Neurosci. Ther.* 18, 974–980. doi:10.1111/cns.12014
- Fraser, L.R., Umar, G., Sayed, S., 1993. Na(+)-requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 97, 539–549.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502.
- Fujinoki, M., 2011. Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* 142, 255–266. doi:10.1530/REP-11-0074
- Geering, K., 2008. Functional roles of Na, K-ATPase subunits. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 17, 526–532.

- Gutiérrez, J., Rivera, J., Shamah, T., Villalpando, S., Franco, A., Cuevas, L., Romero, M., Hernández, M., 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: resultados nacionales, 1st ed. Instituto Nacional de Salud Pública, México.
- Hernández-Rodríguez, J., 1992. Na⁺/K⁺-ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem. Int.* 20, 1–10.
- Herrera, J.R., Manjarrez-Gutiérrez, G., Nishimura, E., Hernández-Rodríguez, J., 2003. Serotonin-related tryptophan in children with insulin-dependent diabetes. *Pediatr. Neurol.* 28, 20–23.
- Hess, R.A., Franca, L.R. de, 2009. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium, in: Cheng, C.Y. (Ed.), *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York, pp. 1–15.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 533–554.
- Jiménez, T., McDermott, J.P., Sánchez, G., Blanco, G., 2011. Na,K-ATPase alpha4 isoform is essential for sperm fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 644–649. doi:10.1073/pnas.1016902108
- Jiménez-Trejo, F., Tapia-Rodríguez, M., Cerbón, M., Kuhn, D.M., Manjarrez-Gutiérrez, G., Mendoza-Rodríguez, C.A., Picazo, O., 2012. Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility. *Reproduction* 144, 677–685.
- Jiménez-Trejo, F., Tapia-Rodríguez, M., Queiroz, D.B.C., Padilla, P., Avellar, M.C.W., Manzano, P.R., Manjarrez-Gutiérrez, G., Gutiérrez-Ospina, G., 2006. Serotonin Concentration, Synthesis, Cell Origin, and Targets in the Rat Caput Epididymis During Sexual Maturation and Variations Associated With Adult Mating Status: Morphological and Biochemical Studies. *J. Androl.* 28, 136–149. doi:10.2164/jandrol.106.000653
- Jiménez, T., Sánchez, G., Blanco, G., 2012. Activity of the Na,K-ATPase α 4 Isoform Is Regulated During Sperm Capacitation to Support Sperm Motility. *J. Androl.* 33, 1047–1057. doi:10.2164/jandrol.111.015545

- Jiménez, T., Sánchez, G., McDermott, J.P., Nguyen, A.-N., Kumar, T.R., Blanco, G., 2010a. Increased Expression of the Na,K-ATPase alpha4 Isoform Enhances Sperm Motility in Transgenic Mice. *Biol. Reprod.* 84, 153–161. doi:10.1095/biolreprod.110.087064
- Jiménez, T., Sánchez, G., Wertheimer, E., Blanco, G., 2010b. Activity of the Na,K-ATPase 4 isoform is important for membrane potential, intracellular Ca²⁺, and pH to maintain motility in rat spermatozoa. *Reproduction* 139, 835–845. doi:10.1530/REP-09-0495
- Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B., 1980. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. *Biol. Reprod.* 22, 1233–1243.
- Jorgensen, P.L., Håkansson, K.O., Karlsh, S.J.D., 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 817–849. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142558
- Kaplan, J.H., 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 511–535. doi:10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218
- La Vignera, S., Condorelli, R.A., Vicari, E., D'Agata, R., Calogero, A.E., 2011. Seminal vesicles and diabetic neuropathy: ultrasound evaluation in patients with couple infertility and different levels of glycaemic control. *Asian J. Androl.* 13, 872–876. doi:10.1038/aja.2011.47
- La Vignera, S., Condorelli, R., Vicari, E., D'Agata, R., Calogero, A.E., 2012. Diabetes Mellitus and Sperm Parameters. *J. Androl.* 33, 145–153. doi:10.2164/jandrol.111.013193
- Leclerc, P., de Lamirande, E., Gagnon, C., 1998. Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J. Androl.* 19, 434–443.
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216–226. doi:10.1007/s00125-007-0886-7
- Lesage, J., Bernet, F., Montel, V., Dupouy, J.P., 1996. Hypothalamic metabolism of neurotransmitters (serotonin, norepinephrine, dopamine) and NPY, and

- gonadal and adrenal activities, during the early postnatal period in the rat. *Neurochem. Res.* 21, 87–96.
- Leung, G.P.H., Dun, S.L., Dun, N.J., Wong, P.Y.D., 1999. Serotonin via 5-HT1B and 5-HT2B receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium. *J. Physiol.* 519, 657–667. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0657n.x
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Mallidis, C., Agbaje, I., McClure, N., Kliesch, S., 2011. Einfluss des Diabetes mellitus auf die Fertilität des Mannes. *Urol.* 50, 33–37. doi:10.1007/s00120-010-2440-3
- Mallidis, C., Agbaje, I.M., Rogers, D.A., Glenn, J.V., Pringle, R., Atkinson, A.B., Steger, K., Stitt, A.W., McClure, N., 2009. Advanced glycation end products accumulate in the reproductive tract of men with diabetes. *Int. J. Androl.* 32, 295–305. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00849.x
- Manjarrez-Gutiérrez, G., Herrera, J.R., Bueno, S., González, M., Hernández-Rodríguez, J., 2000. Cambio en la biosíntesis de serotonina cerebral en ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina: efecto del tratamiento con insulina. *Rev. Investig. Clínica* 52, 509–16.
- Manjarrez-Gutiérrez, G., Herrera, J.R., Molina, A., Bueno, S., González, M., Hernández-Rodríguez, J., 1999. Alteraciones en la síntesis de serotonina cerebral inducidas por diabetes mellitus insulino dependiente. *Rev. Investig. Clínica* 51, 293–302.
- McDermott, J., Sánchez, G., Nangia, A.K., Blanco, G., 2015. Role of human Na,K-ATPase alpha 4 in sperm function, derived from studies in transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* n/a–n/a. doi:10.1002/mrd.22454
- Mercado-Camargo, R., Hernández-Rodríguez, J., 1994. Biochemical properties of Na⁺/K⁺-ATPase in axonal growth cone particles isolated from fetal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 12, 485–489.
- Mercado-Camargo, R., Hernández-Rodríguez, J., 1992. Regulatory role of a neurotransmitter (5-HT) on glial Na⁺/K⁺-ATPase in the rat brain. *Neurochem. Int.* 21, 119–127.

- Mobasheri, A., Avila, J., Cózar-Castellano, I., Brownleader, M.D., Trevan, M., Francis, M.J., Lamb, J.F., Martín-Vasallo, P., 2000. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Rep.* 20, 51–91.
- Muñoz-Garay, C., De la Vega-Beltrán, J.L., Delgado, R., Labarca, P., Felix, R., Darszon, A., 2001. Inwardly Rectifying K⁺ Channels in Spermatogenic Cells: Functional Expression and Implication in Sperm Capacitation. *Dev. Biol.* 234, 261–274. doi:10.1006/dbio.2001.0196
- Murphy, M.G., 1990. Dietary fatty acids and membrane protein function. *J. Nutr. Biochem.* 1, 68–79.
- Ng, Y.C., Tolerico, P.H., Book, C.B., 1993. Alterations in levels of Na(+)-K(+)-ATPase isoforms in heart, skeletal muscle, and kidney of diabetic rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 265, E243–E251.
- Noda, M., Higashida, H., Aoki, S., Wada, K., 2004. Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol. Neurobiol.* 29, 31–39. doi:10.1385/MN:29:1:31
- Oatley, J.M., Brinster, R.L., 2008. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 263–286. doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175355
- Olivier, B., Chan, J.S.W., Snoeren, E.M., Olivier, J.D.A., Veening, J.G., Vinkers, C.H., Waldinger, M.D., Oosting, R.S., 2011. Differences in Sexual Behaviour in Male and Female Rodents: Role of Serotonin, in: Neill, J.C., Kulkarni, J. (Eds.), *Biological Basis of Sex Differences in Psychopharmacology, Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 15–36.
- OMS, 2012. Diabetes. Nota descriptiva No. 312 [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/> (accessed 7.22.13).
- Orchard, T.J., Costacou, T., Miller, R.G., Prince, C.T., Pambianco, G., 2007. Modeling chronic glycemic exposure variables as correlates and predictors of microvascular complications of diabetes: response to Dyck *et al.* *Diabetes Care* 30, 448; author reply 448–449. doi:10.2337/dc06-2143

- Paz, G., Homonnai, Z.T., Harell, A., Kraicer, P.F., 1978. Improvement in the fertility of streptozotocin-diabetic male rats following treatment with insulin and human chorionic gonadotropin. *Isr. J. Med. Sci.* 14, 1073–1078.
- Peña-Rangel, M.T., Mercado-Camargo, R., Hernández-Rodríguez, J., 1999. Regulation of Glial Na^+/K^+ -ATPase by Serotonin: Identification of Participating Receptors. *Neurochem. Res.* 24, 643–649. doi:10.1023/A:1021048308232
- Pichardo, A.I., 2011. Increased serotonin concentration and tryptophan hydroxylase activity in reproductive organs of copulator males: a case of adaptive plasticity. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 02, 75–84. doi:10.4236/abb.2011.22012
- Pinilla, L., TenaSempere, M., Aguilar, E., 1997. Role of serotonergic receptors in gonadotropin secretion in male rats. *J. Endocrinol. Invest.* 20, 410–416.
- Raeder, M.B., Bjelland, I., Emil Vollset, S., Steen, V.M., 2006. Obesity, dyslipidemia, and diabetes with selective serotonin reuptake inhibitors: the Hordaland Health Study. *J. Clin. Psychiatry* 67, 1974–1982.
- Rapport, M., Green, A., Page, I., 1948. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 176, 1243–1251.
- Rees, D.A., Alcolado, J.C., 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 22, 359–370. doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x
- SAGARPA, 2001. NOM-062-ZOO-1999 - Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, Diario Oficial de la Federación - México.
- Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., Visconti, P.E., 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 245–259.
- Sánchez, G., Nguyen, A.-N.T., Timmerberg, B., Tash, J.S., Blanco, G., 2006. The Na,K -ATPase $\alpha 4$ isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 565–576. doi:10.1093/molehr/gal062
- Sandler, M., Reveley, M.A., Glover, V., 1981. Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease: a review. *J. Clin. Pathol.* 34, 292–302.

- Scarano, W.R., Messias, A.G., Oliva, S.U., Klinefelter, G.R., Kempinas, W.G., 2006. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int. J. Androl.* 29, 482–488. doi:10.1111/j.1365-2605.2006.00682.x
- Seethalakshmi, L., Menon, M., Diamond, D., 1987. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J. Urol.* 138, 190–194.
- Setchell, B.P., Breed, W.G., 2006. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the male reproductive tract, in: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, New York, pp. 771–825.
- Shamraj, O.I., Lingrel, J.B., 1994. A putative fourth Na⁺, K⁺-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 12952–12956.
- Silva Junior, V.A. da, Lins Amorim, M.J.A.A., Amorim Junior, A.A. de, Pinto, C.F., Deiró, T.B.J., Oliveira, J.R.M. de, Peixoto, C.A., Manhães-de-Castro, R., 2008. Administración Neonatal de Fluoxetina Disminuye el Número Final de Células de Sertoli en Ratas Wistar. *Int. J. Morphol.* 26, 51–62. doi:10.4067/S0717-95022008000100009
- Sisman, A.R., Kiray, M., Camsari, U.M., Evren, M., Ates, M., Baykara, B., Aksu, I., Guvendi, G., Uysal, N., 2014. Potential Novel Biomarkers for Diabetic Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Nerve Growth Factor Beta and Vascular Endothelial Growth Factor. *Dis. Markers* 2014. doi:10.1155/2014/108106
- Skou, J.C., Esmann, M., 1992. The Na, K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 249–261.
- Snoeren, E.M.S., Veening, J.G., Olivier, B., Oosting, R.S., 2014. Serotonin 1A receptors and sexual behavior in male rats: a review. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 121, 102–114. doi:10.1016/j.pbb.2013.11.007
- Soudamani, S., Malini, T., Balasubramanian, K., 2005. Effects of streptozotocin-diabetes and insulin replacement on the epididymis of prepubertal rats: histological and histomorphometric studies. *Endocr. Res.* 31, 81–98.

- Stafford, S.A., Tang, K., Coote, J.H., 2006. Activation of lumbosacral 5-HT_{2C} receptors induces bursts of rhythmic activity in sympathetic nerves to the vas deferens in male rats. *Br. J. Pharmacol.* 148, 1083–1090. doi:10.1038/sj.bjp.0706814
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–546.
- Tentolouris, N., Marinou, K., Kokotis, P., Karanti, A., Diakoumopoulou, E., Katsilambros, N., 2009. Sudeptomotor dysfunction is associated with foot ulceration in diabetes. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 26, 302–305. doi:10.1111/j.1464-5491.2009.02677.x
- Tesfaye, S., Boulton, A.J.M., Dyck, P.J., Freeman, R., Horowitz, M., Kempler, P., Lauria, G., Malik, R.A., Spallone, V., Vinik, A., Bernardi, L., Valensi, P., 2010. Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments. *Diabetes Care* 33, 2285–2293. doi:10.2337/dc10-1303
- Therien, A.G., Blostein, R., 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 279, C541–C566.
- Thundathil, J.C., Anzar, M., Buhr, M.M., 2006. Na⁺/K⁺ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 75, 308–317. doi:10.1095/biolreprod.105.047852
- Tinajero, J.C., Fabbri, A., Ciocca, D.R., Dufau, M.L., 1993. Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology* 133, 3026–3029. doi:10.1210/en.133.6.3026
- Trulson, M.E., MacKenzie, R.G., 1980. Increased tryptophan hydroxylase activity may compensate for decreased brain tryptophan levels in streptozotocin-diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212, 269–273.
- Tyce, G.M., 1990. Origin and metabolism of serotonin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16 Suppl 3, S1–7.
- Valensi, P., Pariès, J., Attali, J.R., French Group for Research and Study of Diabetic Neuropathy, 2003. Cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients: influence of diabetes duration, obesity, and microangiopathic complications--the French multicenter study. *Metabolism.* 52, 815–820.

- Várkonyi, T., Kempler, P., 2009. Erectile Dysfunction, in: Sinclair, A.J. (Ed.), *Diabetes in Old Age*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 149–161.
- Vega Matuszcyk, J., Larsson, K., Eriksson, E., 1998. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sexual motivation in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60, 527–532.
- Visconti, P., Kopf, G.S., 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59, 1–6.
- Visconti, P., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J.L., Acevedo, J.J., Darszon, A., 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* 13, 395–405. doi:10.1038/aja.2010.69
- Visconti, P., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S., 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Dev. Camb. Engl.* 121, 1139–1150.
- Wagoner, K., Sánchez, G., Nguyen, A.-N., Enders, G.C., Blanco, G., 2005. Different expression and activity of the $\alpha 1$ and $\alpha 4$ isoforms of the Na,K-ATPase during rat male germ cell ontogeny. *Reproduction* 130, 627–641. doi:10.1530/rep.1.00806
- Walther, D.J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., Bader, M., 2003. Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science* 299, 76–76. doi:10.1126/science.1078197
- Winters, B.R., Walsh, T.J., 2014. The epidemiology of male infertility. *Urol. Clin. North Am.* 41, 195–204. doi:10.1016/j.ucl.2013.08.006
- Woo, A., James, P.F., Lingrel, J.B., 2002. Roles of the Na,K-ATPase $\alpha 4$ isoform and the Na⁺/H⁺ exchanger in sperm motility. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 348–356. doi:10.1002/mrd.90002
- Woo, A., James, P.F., Lingrel, J.B., 1999. Characterization of the fourth alpha isoform of the Na,K-ATPase. *J. Membr. Biol.* 169, 39–44.
- World Health Organization, 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization, Geneva.

Estudio de la interacción serotonina- Na^+/K^+ -ATPasa en gametos masculinos de ratas con diabetes mellitus experimental

Xie, Z., 2003. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 986, 497–503.

Zieher, L.M., Debeljuk, L., Iturriza, F., Mancini, R.E., 1971. Biogenic Amine Concentration in Testes of Rats at Different Ages. *Endocrinology* 88, 351–354. doi:10.1210/endo-88-2-351