

03021
15



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL
SISTEMA SEROTONINÉRGICO DEL EPIDÍMIO DE LA RATA
DURANTE LA MADURACIÓN SEXUAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

MIGUEL TAPIA RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIERREZ OSPINA



México, D.F.

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Dr. José Narro Robles
Director de la
Facultad de Medicina
Presente

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Coordinación de Enseñanza

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por medio del presente le informamos que la tesis: " Caracterización del sistema serotoninérgico durante la maduración sexual del epidídimo de rata " que presenta el alumno: Miguel Tapia Rodríguez, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente.

Dr. Horacio Merchant Larios

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Dr. Gabriel Manjarez Gutierrez

Dra. Irma Villalando Fierro

Dra. Maria Elena Ayala Escobar

DEDICATORIAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**A mis padres: Miguel y Rosalía,
por haberme brindado siempre
su confianza y su cariño**

**A mis hermanos: Sandra e Iván,
por su apoyo y cariño que
siempre me han demostrado**

**A Carolina, por ser la mujer de mi vida
y convertirse en la luz de mi camino**

**A mis amigos de siempre: Fer, Leti, Oscar,
Poncho, Alex, Ricardo, Francisco, por todo
lo que hemos vivido y por haber sido una
parte importante de mi vida**

**A los compañeros de laboratorio con los
que he estado a lo largo de estos años, por
ayudarme a madurar como investigador y
como persona**

**En memoria de los familiares que no se
encuentran ya con nosotros y que fueron
una fuente de inspiración para mi**

**A todas aquellas familiares, amigos y
conocidos que me apoyaron y cuyos
nombres no recuerde, gracias por las
lecciones que me dieron y que me
ayudaron a llegar hasta aquí**

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio A-107 del Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

El trabajo contó con el apoyo técnico del M.C. Francisco J. Jiménez Trejo en el manejo de los animales, obtención de muestras y técnicas histológicas.

La M.C. Patricia Padilla Cortés apoyó en la realización de las electroforesis e inmunotransferencias.

El Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez, M.C. Francisco J. Jiménez Trejo y Ma. Del Rocío Herrera apoyaron en la realización de la cromatografía de líquidos de alta resolución.

A los investigadores: Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez, Dra. Irma Villalpando Fierro y Dra. Ma. Elena Ayala Escobar, por aceptar formar parte del jurado y por sus comentarios al presente trabajo.

A los investigadores Dra. Alicia Ortega Aguilar, Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Pablo Jorge Suárez Munguía, Dr. Horacio Merchant Larios, Dra. Leda C. Torres Maldonado y Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por el apoyo brindado para mi formación académica.

Este proyecto fue apoyado por fondos concurrentes del CONACyT (38615N) y UNAM (DGAPA / PAPIIT (IN203702).

El CONACyT otorgó beca de licenciatura durante el periodo de enero a diciembre de 2002.

INDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	3
2.1 El epidídimo	3
2.1.1 Generalidades estructurales y funcionales del epidídimo	3
2.1.2 Inervación del epidídimo	6
2.2 La serotonina	7
2.2.1 Generalidades de su estructura, síntesis, transporte, degradación y función	7
2.2.2 Serotonina y sus efectos sobre el tracto genital masculino	11
3. Justificación	12
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	13
5.1 Objetivo General	13
5.2 Objetivos Particulares	13
6. Materiales y Métodos	14
6.1 Animales	14
6.2 Obtención de las muestras	14
6.3 Inmunohistoquímica	15
6.4 Electroforesis e inmunotransferencia para la enzima triptofano hidroxilasa	16
6.5 Análisis cromatográfico de la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa	18

6.6 Análisis Estadístico	20
7. Resultados	20
7.1 Inmunohistoquímica	20
7.1.1 Serotonina	20
7.1.2 Transportador de serotonina	20
7.1.3 Receptor 5-HT _{1B}	23
7.1.4 Sinaptofisina y Neurofilamentos	24
7.1.5 Evaluación cromatográfica de la actividad e identificación por Western blot de la enzima triptofano hidroxilasa	27
8. Discusión	29
9. Conclusiones	37
10. Referencias	39

Resumen

La serotonina (5-HT) es una indolamina que regula una gran variedad de funciones a lo largo de la escala filogenética. Entre éstas funciones, cabe destacar sus efectos estimulantes sobre la motilidad y fertilidad espermática en invertebrados. En vertebrados, se ha detectado la presencia de concentraciones significativas de 5-HT en el testículo, conducto deferente y de manera particular, en la cabeza de epidídimo. Sin embargo, el origen celular de la 5-HT en el epidídimo es aún motivo de controversia. Así en el presente trabajo caracterizamos morfológica- y bioquímicamente algunos de los elementos que constituyen al sistema serotoninérgico epididimario. Dicho sistema está constituido por células subepiteliales y cebadas que muestran inmunoreactividad para serotonina. Algunas de las células subepiteliales y epiteliales también mostraron inmunoreactividad para neurofilamentos y sinaptofisina por lo que parecen ser de origen neuroendocrino. Por otro lado, tanto las células cebadas como las endoteliales y/o musculares de las paredes de los vasos sanguíneos mostraron inmunoreactividad para el receptor 5-HT_{1B} y el transportador de serotonina (SerT). También, mediante ensayos de inmunotransferencia y de cromatografía de líquidos de alta resolución, se documentó la presencia de la enzima triptofano 5-hidroxilasa (TPH) y se caracterizó parcialmente su actividad en homogenados de epidídimo, respectivamente. Todos los parámetros evaluados se modifican apreciablemente durante la maduración sexual por lo que proponemos que el sistema celular serotoninérgico pudiera participar de manera directa en el proceso de maduración espermática que tiene lugar en la cabeza del epidídimo.

1. Introducción

La reproducción sexual, junto con las estrategias de apareamiento, constituyen la piedra angular de la variabilidad fenotípica y genotípica en los vertebrados. Dicha variabilidad permite, por un lado, la adaptación de las distintas especies a nichos ecológicos específicos, y por otro, la selección de fenotipos que sustentan a la evolución biológica. Hasta hace algunas décadas, no se habían identificado factores que pudieran haber influenciado en la evolución de las estrategias de reproducción en los mamíferos. En los años 60's, sin embargo, se propuso la existencia de un fenómeno denominado competencia espermática como uno de los principales elementos que han esculpido las estrategias de reproducción a lo largo de la evolución. Éste fenómeno, ahora bien documentado, determina la probabilidad de fecundación (por ejemplo, la eficacia reproductiva) de los espermatozoides provenientes de distintos machos, cuando aquellos están reunidos simultáneamente en el tracto genital femenino. En otras palabras, la posibilidad de que un macho sea el padre de las crías dependerá, por un lado, de la habilidad de sus espermatozoides para competir contra otros que pudieran estar presentes en el tracto genital de la hembra y, por otro, de su capacidad para transitar de manera efectiva por dicho tracto. De ésta forma, la buena calidad y adecuada cantidad de los espermatozoides, son factores que influyen positivamente en la resolución de la competencia espermática.

El epidídimo es el órgano del tracto reproductor masculino en el que se llevan a cabo los procesos de maduración estructural y funcional de los espermatozoides (Robaire y Hermo, 1988; Gopal Dutt, 1999; Abou-Haila *et al*, 2000). Por otro lado, una de las características importantes del epidídimo, especialmente de la región conocida como cabeza, es su alto contenido en serotonina (5-HT). Si bien el origen celular y las funciones de la 5-HT epididimal se desconocen con precisión en los vertebrados, se ha documentado que la 5-HT

modula la motilidad y capacidad de fecundación de los espermatozoides en algunas especies de invertebrados (**Parisi et al, 1984**). Así, es probable que el epidídimo y la 5-HT en él localizada, jueguen un papel central en los procesos de competencia espermática, a través de promover directa o indirectamente la maduración morfofuncional de los espermatozoides. No obstante lo atractivo de ésta idea, aún no es posible evaluarla de manera directa puesto que no existe evidencia experimental que muestre claramente la presencia de un sistema serotoninérgico en el epidídimo de los mamíferos. Así, en éste trabajo, nos propusimos establecer las posibles fuentes y algunos de los blancos de 5-HT en el epidídimo de la rata.

2. Antecedentes

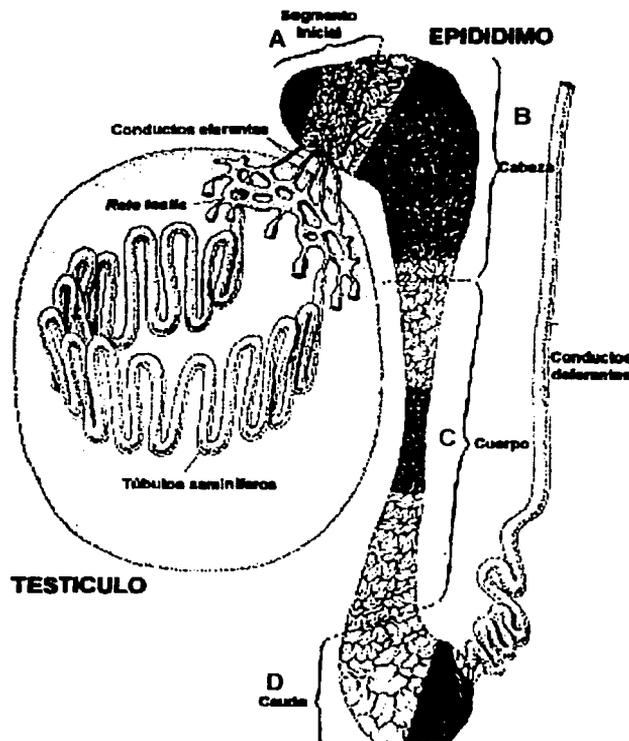
2.1 El epidídimo

2.1.1 Generalidades estructurales y funcionales del epidídimo

El epidídimo se forma a partir del segmento superior del conducto embrionario de Wolff (**Romer, 1962, Hyman, 1962**). Comparte el origen mesonéfrico con el riñón, lo que ha sugerido la posibilidad de que el epidídimo también desempeñe funciones de absorción y secreción de iones y solutos. Después del nacimiento, el epidídimo mantiene una tasa de crecimiento muy baja, la cual se incrementa rápidamente en respuesta a la producción de andrógenos testiculares por parte de las células de Leydig durante la pubertad así como por la aparición de espermatozoides en el ducto (**Setti y Jehan, 1977; Delongéas y Gelly, 1985**).

En los vertebrados, el epidídimo es un órgano par que se encuentra adyacente a cada uno de los testículos dentro del saco escrotal (**Figura 1**). Presenta una estructura tubular altamente contorneada, y su longitud y complejidad varía dependiendo de la especie

(Bedford, 1975; Robaire y Hermo, 1988, Gopal Dutt, 1999; Yeung *et al*, 1991). El epidídimo ha sido dividido en cuatro zonas generales: el segmento inicial, la cabeza, el cuerpo y la cola, aunque existen otras clasificaciones más detalladas que originan subdivisiones dentro de cada zona. El segmento inicial, es una zona de transición entre el epidídimo y los conductos eferentes, los cuales se originan a partir de la *rete testis* y se fusionan para continuar en el epidídimo. En la parte caudal, el epidídimo se continúa con el conducto deferente.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Esquema que ilustra las divisiones generales del epidídimo y su relación anatómica con el testículo. El epidídimo se divide en cuatro zonas A) Segmento inicial, B) Cabeza, C) Cuerpo y D) Cola. El segmento inicial está en contacto directo con los conductos eferentes provenientes del testículo. La cabeza es la parte con mayor área del órgano, mientras que el cuerpo es la parte más angosta. Los espermatozoides maduros llegan a la cola, la cual les sirve como reservorio. Adaptado de Robaire y Hermo, 1988.

La mucosa del epidídimo está constituida por un epitelio pseudoestratificado con microvellosidades. Los tipos celulares descritos en ésta mucosa son las células *principales*,

estrechas, claras, basales y halo (Sun y Flickinger, 1979, 1982; Robaire y Hermo, 1988; Gopal Dutt, 1999). Las células *principales* columnares conforman el linaje más abundante de los distintos compartimientos celulares del epidídimo. Son células secretoras que están en contacto directo con el compartimiento luminal y con los espermatozoides cuando éstos están presentes. Las células *estrechas* son células columnares que sólo han sido halladas en el segmento inicial. Se trata de un tipo epitelial especializado que parece participar en procesos de endocitosis y, al igual que las células *principales*, tiene interacción directa con el compartimiento luminal. Las células *claras* han sido descritas sólo en el epidídimo de roedores y en la zarigüeya. Estas células poseen una actividad endocítica mayor a la de las células *principales*, y son particularmente abundantes en la cauda del epidídimo. Las células *basales* se encuentran a todo lo largo del epidídimo. No están en contacto directo con el lumen y se localizan en la base del epitelio, mostrando una extensa área de contacto con la membrana basal y, hasta el momento, no se les ha demostrado alguna función en particular. Finalmente, las células *halo* se localizan a lo largo del epidídimo y muestran similitudes con ciertos monocitos circulantes del tejido sanguíneo aunque no tienen una función descrita. (Robaire y Hermo, 1988; Gopal Dutt, 1999).

En conjunto, la mucosa del epidídimo absorbe un gran volumen de fluido proveniente de la *rete testis*, lo cual conduce a un incremento gradual en la concentración de espermatozoides. La absorción del agua se da a través de difusión pasiva guiada por el intercambio de iones de cloro y sodio. Las células de la mucosa epididimaria sintetizan y metabolizan esteroides y prostaglandinas, y secretan diversas moléculas orgánicas hacia el lumen, incluidas aquellas que son transferidas desde el compartimiento vascular. La secreción de los distintos tipos celulares a lo largo del epidídimo es heterogénea. Esto define distintos microambientes a lo largo de la luz del órgano, los cuales se han postulado que conforman el mecanismo que

promueve la maduración de los espermatozoides (**Bedford, 1975; Orgebin-Crist et al, 1975; Orgebin-Crist, 1976; Hinton, 1990; Jervis y Robaire, 2001; Turner, 1991**).

En resumen, las funciones principales del epidídimo son la de recibir a los espermatozoides inmaduros que provienen del testículo (p.e., espermatozoides que poseen una motilidad reducida o nula y capacidad baja para fertilizar), promover su maduración mediante la interacción de los espermatozoides tanto con el epitelio tubular como con el fluido intraluminal, y servir de reservorio para los espermatozoides que han adquirido movimiento y la capacidad de fertilizar. De manera interesante, se ha sugerido que el incremento en la complejidad estructural y funcional epididimales a lo largo de la evolución de organismos superiores coincide con una mayor complejidad de los espermatozoides (**Bedford, 1978, Bedford y Rifkin, 1979**).

2.1.2 Inervación del Epidídimo

Se han realizado distintos estudios histoquímicos para determinar el tipo y el patrón de inervación que están presentes en el epidídimo de los mamíferos. En general, la densidad de inervación colinérgica y adrenérgica es significativamente mayor en la cauda que en la cabeza o el cuerpo del epidídimo (**El-Badawi, et al, 1967; Ricker, 1998**). En la cabeza del epidídimo, las fibras nerviosas están predominantemente asociadas con los vasos sanguíneos intertubulares grandes. Por el contrario, en la cauda del epidídimo los nervios forman plexos a lo largo de los vasos y hay algunos que pasan muy cerca de la membrana basal de las células epiteliales. Existen nervios colinérgicos y adrenérgicos que discurren entre las células epiteliales y terminan libres en la luz de los túbulos epididimarios. Finalmente, a lo largo del epidídimo existen plexos submucosos de neuronas colinérgicas, que son más numerosos en la cauda del epidídimo (**Silva et al, 2002**).

En el epidídimo de rata, la inervación sufre un proceso de remodelación asociada con la edad. Así, durante el primer mes de vida postnatal, la inervación en éste órgano es escasa. Sin embargo, al inicio de la maduración sexual alrededor de los 40 días, la densidad de inervación incrementa significativamente, en particular en la cauda, hasta los 120 días, edad en la que los animales se consideran maduros sexualmente (**Silva et al, 2002**).

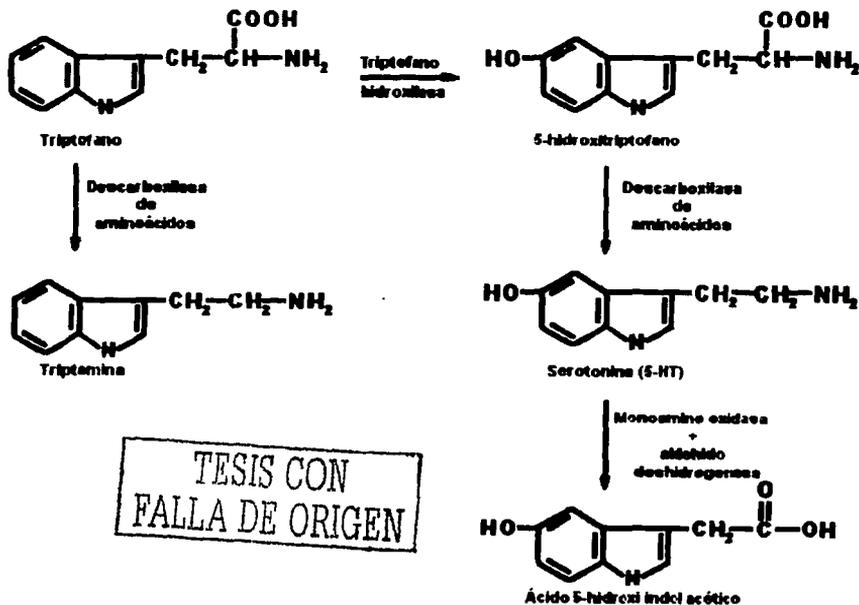
2.2 La Serotonina

2.2.1 Generalidades de su estructura, síntesis, transporte, degradación y función

Desde mediados del siglo XIX se conocía la existencia de una sustancia en el suero que tenía la capacidad de contraer el músculo liso e incrementar el tono vascular. A principios del siglo pasado, las plaquetas fueron identificadas como el origen de dicha sustancia. En la década de los 40's de ese mismo siglo, un grupo de investigadores italianos encabezados por Erspamer detectaron lo que llamaron la "enteramina", una hormona secretada por las células argentafines del estómago, y que más tarde purificaron a partir de las glándulas salivales del pulpo. Poco después, el grupo de Rapport aisló, purificó e identificó a la sustancia "tónica" del "suero" como la indolamina 5-hidroxitriptamina o serotonina (3-(β -aminoetil)-5-hidroxiindol; 5-HT).

En los organismos, la 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido esencial L-triptofano, (L-Trp) el cual contiene un anillo indol y una cadena lateral carboxi-amida (**Verbeuren, 1989**). El anillo indol es único en su estructura, ya que contiene un anillo de benceno y un anillo secundario de pentano que contiene un nitrógeno al centro, lo que le permite absorber fotones. En plantas, los receptores capaces de interactuar con fotones pueden hacerlo debido a la presencia de residuos de triptofano en lugares estratégicos de su estructura.

La síntesis de serotonina a partir de L-Trp ocurre mediante dos reacciones químicas; la primera, catalizada por la enzima L-triptofano-5-monooxigenasa (EC 1.14.16.4; triptofano hidroxilasa; TPH), constituye el paso limitante de la síntesis. La TPH transforma al L-triptofano en 5-hidroxitriptofano (5-HTP) utilizando oxígeno molecular y como co-factor a la L-eritro-tetrahidrobiopterina (BH₄). En ésta reacción, un átomo de oxígeno es insertado en la posición 5 del L-Trp para formar 5-HTP y el otro átomo es reducido a agua. El cofactor BH₄ dona los electrones necesarios, y el quinonoide inestable que resulta de la reacción retorna inmediatamente a la forma de tetrahidrobiopterina mediante la quinonoide dihidrobiopterina reductasa, que utiliza al dinucleótido de nicotinamida adenosina fosfatado (NADPH) como cofactor. La segunda reacción es catalizada por la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.28; AADC). Esta enzima convierte al 5-HTP en 5-HT, y utiliza como co-factor al fosfato de piridoxal (Figura 2).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Esquema que muestra la vía metabólica de la serotonina. La enzima triptofano hidroxilasa convierte al triptofano en 5-hidroxitriptofano, el cual sufre una descarboxilación por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos para dar origen a 5-hidroxitriptamina. La descarboxilasa puede actuar directamente sobre el L-Triptofano para dar origen a triptamina. La monoamino oxidasa junto con la aldehído deshidrogenasa degradan a la serotonina en ácido 5-hidroxi-indolacético. Adaptado de Cooper *et al*, 1996.

La TPH es miembro de una familia de enzimas monooxigenasas (**Hufton et al, 1995; Fitzpatrick, 1999**) a la que también pertenecen la fenilalanina hidroxilasa (EC 1.14.16.1; PH) y la tirosina hidroxilasa (EC 1.14.16.2; TH). Las tres enzimas se forman por homotetramerización de sus subunidades y necesitan contener en su sitio activo a un átomo de hierro para tener actividad enzimática (**Fitzpatrick, 1999**). Aunque la TPH ha sido vinculada casi de manera exclusiva al sistema serotoninérgico del cerebro, se encuentra ampliamente distribuida en todo el organismo. Sin embargo, no todas los elementos celulares que contienen 5-HT son capaces de sintetizarla. Por ejemplo, las plaquetas almacenan la serotonina que se encuentra libre en el plasma sanguíneo mediante su captura por un mecanismo de transporte activo localizado en su membrana celular. (**Lesch et al, 1993, Sanders-Bush y Mayer, 1996**)

La mayoría de las funciones fisiológicas producidas por la 5-HT son llevadas a cabo mediante su interacción con receptores específicos que se encuentran anclados en la membrana plasmática celular (**Fanburg y Lee, 1997; Pauwels, 2000; Azmitia, 2001; Hannon y Hoyer, 2002**). Dichos receptores han sido clasificados en siete clases distintas (5-HT₁ a 5-HT₇) con base en sus características génicas, estructurales, funcionales, así como por las vías de señalización intracelular a las que se encuentran asociados (**Hoyer et al, 1994; Hannon y Hoyer, 2002**). Con la excepción de los receptores 5-HT₃ que son ionotrópicos, el resto de los receptores a 5-HT pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (**Figura 3**).

Los efectos de la 5-HT sobre sus células blanco son modulados por la unión de ésta a una proteína transportadora que se encuentra en la membrana de distintos tipos celulares localizados en el cerebro, pulmón, placenta, plaquetas y en la glándula suprarrenal (**Balkovetz et al, 1989; Blakely et al, 1991; Lesch et al, 1993**). Si bien en el cerebro, la recaptura mediada por el transportador de serotonina (SerT) constituye el principal

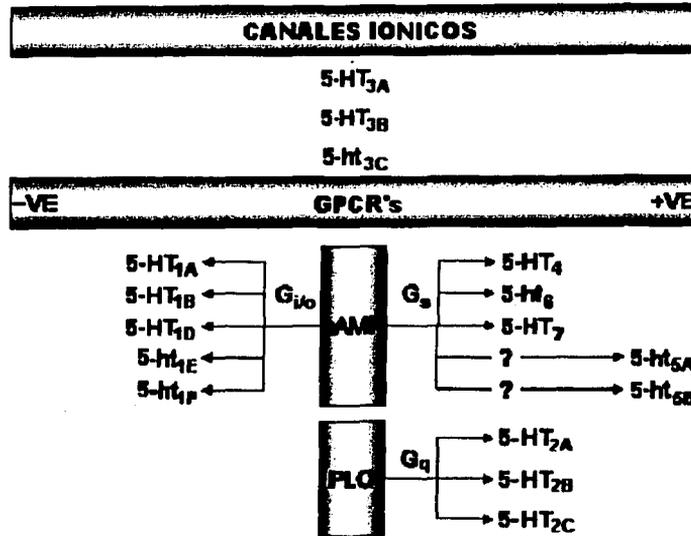


Figura 3. Clasificación actual de los receptores a 5-hidroxitriptamina (5-HT). Los subtipos ilustrados con minúsculas y en cajas sombreadas designan receptores cuya función en sistemas nativos no ha sido confirmada. GPCR's, receptores acoplados a proteínas G; cAMP, 3'-5' monofosfato de adenosina cíclico; PLC, fosfolipasa C; -VE, acción negativa; +VE, acción positiva. Adaptado de **Hannon y Hoyer, 2002**.

mecanismo de inactivación funcional de la 5-HT, la presencia del transportador en estructuras no neuronales sugiere que esta proteína puede tener otras funciones en el resto del organismo. La captura de 5-HT es un proceso activo que es dependiente de temperatura y requiere de la fuerza electromotriz de los iones de Na⁺ y Cl⁻ extracelulares. (**Sanders-Bush y Mayer, 1996**)

La 5-HT es degradada por la enzima monoamino oxidasa isoforma A (EC 1.4.3.4; MAO_A). Esta enzima cataliza la reacción de desaminación oxidativa de las aminas biogénicas. Así, MAO_A convierte a la 5-HT en 5-hidroxiindolacetaldehído, el cual es oxidado a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por una aldehído reductasa dependiente de dinucleótido de nicotinamida adenosina (NADH). De manera alternativa y de acuerdo al estado metabólico del organismo, el acetaldehído intermediario puede ser reducido por una aldehído reductasa dependiente de NADH para formar el alcohol 5-hidroxitriptofol.

Se ha postulado que la 5-HT apareció muy temprano en la evolución de los reinos vegetal y animal como molécula señalizadora. Así, diversas especies de plantas, tunicados, moluscos, artrópodos y celenterados poseen células que producen y/o contienen cantidades significativas de 5-HT. Esta amina biogénica también es uno de los compuestos que constituyen los venenos de las ortigas, avispas y escorpiones. En los vertebrados, las fuentes principales de 5-HT corresponden a las células enterocromafines localizadas en el tubo digestivo, las plaquetas y las células cebadas del tejido conectivo (**Sanders-Bush y Mayer, 1996**). Entre las funciones en las que participa la 5-HT, al menos en los mamíferos, caben destacar el control de la motilidad gastrointestinal, la contracción del músculo liso, la dilatación y contracción vasculares, la permeabilidad microvascular, la agregación plaquetaria, nocicepción, la modulación de la respuesta sexual y la ingesta, y la regulación de la actividad neuronal. También se ha reportado que la 5-HT puede afectar los procesos de secreción en las vías respiratorias, córnea, ileon, yeyuno, colon y vesícula biliar (**Azmitia, 2001**).

2.2.2 Serotonina y sus efectos sobre el tracto genital masculino

La 5-HT es un modulador de la actividad neuronal del sistema nervioso central (SNC) y está involucrada en diversos procesos biológicos y patológicos (**Cooper et al, 1996, Sanders-Bush y Mayer, 1996**). Uno de los procesos en los que participa la 5-HT es en la liberación de gonadotropinas y se presenta en ambos sexos (**Monroy et al, 2003; Pinilla et al, 2003**).

Con relación al papel de la 5-HT en el aparato reproductor masculino de los vertebrados, se ha mostrado que esta indolamina está presente en el testículo (**Aguilar et al, 1995**), regula la secreción del factor de liberación de corticotropinas desde las células de Leydig (**Dufau et al, 1993; Tinajero et al, 1993**). También tiene la capacidad de regular el

flujo de sangre en el testículo (**Collin et al, 1996**), y la contracción de los conductos eferentes (**Hay y Wadsworth, 1982**). Así mismo, la 5-HT está presente en los conductos deferentes, siendo mayor la concentración de esta indolamina en la porción cercana al epidídimo (**Celuch y Sloley, 1988**).

Por otro lado se sabe que una disminución en los niveles de serotonina producida por la aplicación de un inhibidor de la TPH retarda la aparición de la pubertad afectando al eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (**Naumenko y Shishkina, 1978; Shishkina y Dygalo, 2000**). Así mismo, modificaciones en las concentraciones de 5-HT alteran el comportamiento sexual (**Malmnäs, 1974; Naumenko y Shishkina, 1978; Shishkina y Dygalo, 2000**), la espermatogénesis y la síntesis de andrógenos (**Cockett et al, 1980**) y, en ciertas especies, la motilidad espermática (**Parisi et al, 1984**) así como la reacción acrosomal (**Meizel y Turner, 1983**).

En el epidídimo, la serotonina estimula la liberación de aniones en el epitelio de la cauda mediante la presunta activación de receptores tipo 5-HT_{1B} y 5-HT_{2B} (**Leung et al, 1999**). Finalmente, **Korman y Penttila** en 1968, y **Anderson et al** en 1977 y 1979, observaron la presencia de serotonina en mastocitos y células epiteliales del epidídimo de la rata y zarigüeya, respectivamente. Las concentraciones de 5-HT, sin embargo, fueron elevadas en la cabeza y más bajas en la cauda del epidídimo; este mismo patrón se encontró para otro tipo de indolamina que no fue identificada (**Anderson et al, 1979**).

3. Justificación

La cabeza del epidídimo es la región del tracto genital masculino encargada, entre otras cosas, de promover la maduración espermática. Los mecanismos que subyacen a éste proceso son aún poco claros. Por otro lado, la concentración de 5-HT en la cabeza del

epidídimo es muy elevada, y se ha documentado que es capaz de regular la motilidad y la reacción acrosomal de espermatozoides de invertebrados *in vitro*. Así, pensamos que la caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica del sistema serotoninérgico en la rata, nos permitirá en un futuro desarrollar estrategias para el control de la fertilidad en diversas especies, incluyendo a los seres humanos.

4. Hipótesis

Existe un sistema serotoninérgico intrínseco en la cabeza del epidídimo que es responsable, al menos en parte, de la producción de la serotonina presente en esta región durante el periodo de maduración sexual.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Caracterizar morfológica y bioquímicamente algunos de los elementos celulares y moleculares que componen al sistema serotoninérgico intrínseco de la cabeza del epidídimo, durante el periodo de maduración sexual de la rata.

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar el patrón de expresión de la triptofano hidroxilasa en el epidídimo de la rata durante el periodo de maduración sexual, mediante la técnica de Western Blot.
2. Identificar las fuentes y algunos de los blancos celulares de la 5-HT en el epidídimo de ratas durante la maduración sexual, utilizando técnicas de inmunohistoquímica contra 5-HT, TPH, SerT y el receptor para 5-HT subtipo 1B (5-HT_{1B}).

3. Caracterizar la actividad de TPH en el epidídimo de rata durante el periodo de maduración sexual, mediante la cuantificación de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

4. Identificar la presencia de células neuroendocrinas en el epidídimo de la rata durante la maduración sexual, utilizando técnicas de inmunohistoquímica para la detección de sinaptofisina (Syn) y los neurofilamentos de 150 kDa (Nf).

6. Materiales y Métodos

6.1 Animales

Para realizar los experimentos descritos en el proyecto se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 40, 60, 90 y 120 días de edad, provenientes de la colonia del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Las edades se eligieron respecto al criterio de maduración sexual propuesto por **Robb et al, 1979** para esta cepa, de acuerdo a la densidad espermática presente en la cauda del epidídimo a las distintas edades. Los animales se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación (12 horas luz /12 horas oscuridad) controladas y tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*.

6.2 Obtención de las muestras

Animales de 40, 60, 90 y 120 días de edad (n=15 / grupo edad) fueron anestesiados con pentobarbital sódico (20 mg/kg de peso corporal). Se realizó una incisión en la línea media del saco escrotal y se disecó hasta exponer la túnica albugínea. Se realizó una pequeña incisión sobre la túnica y se cortó longitudinalmente para liberar al testículo y al epidídimo. Los epidídimos fueron cuidadosamente removidos para evitar contaminación por otros tejidos. Una vez separados del resto del cuerpo, los epidídimos se lavaron tres veces con

solución salina al 0.9%, se disecaron en cabeza, cuerpo y cauda y se congelaron por inmersión en 4-metilbutano pre-enfriado con hielo seco. Después de ser congeladas, las muestras almacenadas en un ultracongelador a -74°C , hasta efectuar los experimentos morfológicos o bioquímicos.

6.3 Inmunohistoquímica

Se realizaron cortes longitudinales ($16\mu\text{m}$ de espesor) de la cabeza del epidídimo en un criostato (*CRYO-CUT*, American Optical Co., EUA) a una temperatura de -18°C . Los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados. Antes de los ensayos de inmunocitoquímica, los cortes montados fueron fijados con paraformaldehído (PFA) al 4% en amortiguador de fosfatos (PB; 0.1M, pH 7.4) por 25 minutos (para Syn, TPH SerT) o por 3.5-4 horas (para 5-HT y Nf) y se lavaron por 15 minutos con PB, todo ello a temperatura ambiente. Posteriormente las laminillas fueron incubadas en el interior de una cámara húmeda con una solución de bloqueo que contenía albúmina sérica bovina (ABS; 3%), Tritón X-100 (0.1%) y dithiothreitol (DTT; 0.025%) disueltos en PB por 2.5-3 horas a temperatura ambiente (T/A). Inmediatamente después se retiró la solución de bloqueo y se añadieron los anticuerpos primarios conejo contra Syn humana (1:500, Dako, Glostrup, Dinamarca), oveja o ratón contra TPH recombinante de conejo (1:500, Chemicon, Temecula, CA, EUA y Sigma, St. Louis, MO, EUA, respectivamente), cobayo contra SerT de rata (1:1000, Chemicon), cobayo contra 5-HT_{1B} de roedor (1:1000, Chemicon) y conejo contra 5-HT (1:200, Chemicon) diluidos en la solución de bloqueo. Como control de los experimentos se incubaron laminillas omitiendo el anticuerpo primario e incubándolas con suero de cabra. Las laminillas fueron incubadas con los anticuerpos toda la noche a 4°C . Al día siguiente, los anticuerpos se retiraron y las laminillas fueron lavadas tres veces con PB. Posteriormente, las laminillas

tratadas con cualquiera de los anticuerpos primarios se incubaron por 1.30 horas a temperatura ambiente con anticuerpos biotinilados dirigidos contra IgGs de conejo, ratón, oveja o cobayo, (todos de Chemicon, a una dilución 1:500), en correspondencia con los anticuerpos primarios utilizados. Pasado ese tiempo, los anticuerpos se retiraron y las laminillas fueron lavadas tres veces con PB. Enseguida, las laminillas fueron incubadas con el complejo avidina-peroxidasa (Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame CA, EUA) por 1.30 horas a temperatura ambiente, lavadas tres veces con PB, y la actividad de peroxidasa fue revelada con un kit de 3,3-diaminobencidina y peróxido de hidrógeno de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor (Vector Laboratories). Al final del procedimiento, los cortes se dejaron secar hasta el día siguiente en ambiente libre de polvo, se montaron en Cytoseal y se observaron en un microscopio de campo claro (Optiphot-2, Nikon, Tokio, Japón). Para todos los marcadores se describe, a menos que se indique alguna otra zona, la región proximal de la parte cefálica del epidídimo. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital (Coolpix995, Nikon) y convertidas a escala de grises con el programa Adobe Photoshop®

6.4 Electroforesis e inmunotransferencia para la enzima triptofano hidroxilasa

Las muestras mantenidas en ultracongelación fueron sonicadas en frío en 1 mL de amortiguador de lisis (100 mM NaCl, 10 mM, 1 mM PMSF, 1% Tritón-X100 y 1 tableta de inhibidores de proteasas en 0.01 M Tris-HCl pH 8.0). Las muestras sonicadas fueron centrifugadas a 20,800 g a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, se colectó el sobrenadante y se realizó la determinación de proteínas por el método de **Bradford (1976)** utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Se elaboraron geles de Sodio dodecil sulfato-poliacrilamida al 10% de 0.75 mm de grosor. Las muestras fueron descongeladas y adicionadas con amortiguador de carga (4% SDS, 20% glicerol, 0.2 M DTT, 0.02% azul de bromofenol y 5% 2-mercaptoetanol en 0.125 M Tris-HCl pH 6.8). Posteriormente las muestras fueron calentadas a 100°C en agua por espacio de 5 minutos, y cargadas en el gel. La fase concentradora fue corrida a 80V y la fase separadora fue corrida a 120V por espacio de 1.5 horas en una cámara de electroforesis (Miniprotean II, BioRad), con un amortiguador de corrida (0.192 M glicina y 0.1% SDS en 0.025 M Tris pH 8.3).

Una vez que terminó el tiempo de corrida, se retiró cuidadosamente el gel de la cámara y se equilibró, junto con los filtros y las fibras necesarias para hacer la transferencia, en amortiguador de transferencia (0.192M glicina, 20% metanol en 0.025M Tris). Las membranas de nitrocelulosa (0.2 μ m; Trans-Blot, Bio Rad) fueron equilibradas inicialmente en agua desionizada por 5 minutos y posteriormente en el amortiguador de transferencia. Se montó cuidadosamente la cámara, se añadió el amortiguador y se transfirieron los geles toda la noche a 25V en agitación continua en el cuarto frío

Al día siguiente, las membranas fueron recuperadas y bloqueadas con 1% de leche en polvo sin calcio en TBS en agitación durante todo el día en el cuarto frío. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal contra TPH (Sigma) a una dilución 1:7500 en solución de bloqueo (1% albúmina, 0.025% azida de sodio en 0.05% Tween 20-TBS; T-TBS). La incubación se realizó toda la noche en agitación a T/A. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con T-TBS de 5 minutos c/u y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón (Chemicon) a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo. Se realizó un lavado con T-TBS y 3 lavados con TBS de 5 minutos c/u y las membranas se incubaron con el sistema ABC Elite de Vector Labs. por 1 hora. Se realizaron 3 lavados con TBS de 5 minutos c/u y se realizó el revelado de las membranas por quimioluminiscencia con el sistema ECL de

Amersham de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron expuestas a placas fotográficas por 2 minutos a temperatura ambiente y las placas fueron reveladas (Dektol-19) durante 2 minutos y fijadas durante 1 minuto. Las placas reveladas fueron escaneadas, digitalizadas y analizadas densitométricamente mediante un programa analizador de imágenes (Scion Image, Scion Corporation, USA). Las muestras obtenidas de las distintas edades fueron corridas en SDS-PAGE, transferidas a las membranas de nitrocelulosa e inmunoteñidas de manera simultánea.

6.5 Análisis cromatográfico de la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa

Las muestras mantenidas en ultracongelación fueron pesadas, colocadas en el interior de tubos de centrifuga y homogenizadas en frío con tres volúmenes de buffer 0.05 M Tris·HCl pH 7.4 adicionado con 1 mM DTT y 1 mM EGTA. Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 29,000 g a 4°C por 16 minutos, se colectó el sobrenadante y posteriormente se realizó determinación de proteínas totales mediante el método de **Lowry et al, (1951)** utilizando albúmina sérica bovina (1 mg/mL) como estándar. Para realizar los ensayos *in vitro* de la actividad de la TPH, se hicieron los cálculos para obtener el volumen adecuado que tuviera 300 µg de proteína de cada muestra.

Para los ensayos de la actividad de TPH, se prepararon tubos de ensaye a un volumen final de 200 µL. Cada uno de los tubos contenía: 0.05 M buffer Tris HCl, pH 7.4, 40 µL de 1 mM EGTA, 30 µL de catalasa 1 mg/mL, 20 µL de 1mM del inhibidor de la MAO, pargilina; y 10 µL de 1 mM sulfato de amonio ferroso. Así mismo, a la mitad de los tubos de ensaye se les añadió 200 µM L-Trp. Posteriormente, se agregaron los 300 µg de proteína de cada una de las muestras y se incubaron por espacio de 5 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se agregaron 20 µL de 0.2 mM del cofactor sintético de la TPH, 6-metil-5, 6, 7, 8-

tetrahidropterina (6-MPH₄) y se dejó que transcurriera la reacción a 37°C por 10 minutos. La reacción se detuvo al agregar 20 µL de una solución que contenía (en concentraciones finales) 5 mM EDTA, 6 mM ácido ascórbico, y 0.6% HClO₄

Después de haber detenido la reacción enzimática, los tubos fueron centrifugados a 10,000 RPM por 10 minutos. Cada uno de los sobrenadantes fue filtrado, vaciado al interior de tubos eppendorf nuevos, protegidos de la luz, y almacenados a -74°C para su uso al día siguiente.

Las lecturas se realizaron en un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) equipado con detector de fluorescencia (Waters modelo 474), utilizando el software Millennium³². Se utilizó una columna simétrica C18 con tamaño de partícula de 5 µm y 3.9 x 150 mm de longitud (Waters Corporation). Todos los reactivos fueron diluidos en agua grado HPLC y filtrados en membranas con tamaño de poro de 0.2 µm de diámetro. Las longitudes de excitación y de emisión que se utilizaron fueron de 280 y 340 nm, respectivamente, y la presión de las bombas fue ajustada a un valor de 2000 psi. Una vez que el equipo fue lavado, las velocidades de flujo se modificaron, quedando la fase móvil en 95% acetato de sodio y 5% de acetonitrilo, a un flujo de 1 mL/min. Para determinar los tiempos de retención, se prepararon tres estándares mixtos con 5-hidroxitriptofano (5-HTP: 100, 2.5 y 0.0625 ng/20µL) y L-Trp (1, 0.05 y 0.001 ng/20µL) y posteriormente se corrieron las muestras. En nuestras condiciones, los tiempos de retención fueron de 2.5 min para 5-HTP y de 5 min para L-Trp. Todas las lecturas fueron almacenadas en el programa Millennium³². Con ayuda de este programa, se determinó la distancia al pico para obtener la concentración de 5-HTP en muestras con y sin triptofano, para obtener la actividad específica. Posteriormente los resultados fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism 3 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA), y la actividad fue expresada en nanomoles de 5-HTP/mg de proteína/hora.

6.6 Análisis Estadístico

Los datos se expresan como promedios por edad \pm S.E.M. La comparación estadística fue realizada mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de un análisis de rangos múltiples de Bonferroni, por medio del software InStat (Graphpad Software). Los valores de $P < 0.05$ fueron aceptados como significantes.

7. Resultados



7.1 Inmunohistoquímica

7.1.1 Serotonina

Como se ilustra en la **Figura 4**, células inmunoreactivas a 5-HT fueron observadas en la zona subepitelial tubular y en el intersticio intertubular. Las células intersticiales mostraron una morfología similar a la descrita para los mastocitos. Las células subepiteliales, por otro lado, presentan procesos finos que corren paralelos a la luz tubular o que se extienden hacia ella a través de las células epiteliales. No se observaron fibras nerviosas ni células epiteliales inmunoreactivas para 5-HT. En general, la cantidad de células subepiteliales inmunoreactivas a 5-HT se modifica con la edad. Mientras que a los 40 días de vida están ausentes, hacia los 60 y 90 días de vida son claramente distinguibles y numerosas. Después de los 90 días, sin embargo, se observa una reducción de las células subepiteliales reactivas para 5-HT. Éste no es el caso para los mastocitos, los cuales aumentan con la edad (no se muestra).

7.1.2 Transportador de serotonina

En la **Figura 5** se muestra la distribución de SerT en células de las paredes de los vasos sanguíneos y en la región apical del epitelio tubular durante la maduración sexual. Algunos

mastocitos también presentaron inmunoreactividad para SerT. La marca para SerT en los vasos sanguíneos varía poco con la edad al compararse 40, 60, 90 y 120 días de vida. Existe, sin embargo, un incremento en el número de vasos sanguíneos inmunoreactivos a lo largo de éste periodo. Mastocitos inmunoreactivos a SerT aparecen en el intersticio intertubular desde los 60 hasta los 120 días de edad. Estas células, sin embargo, no son muy numerosas. Finalmente, la marca apical mostrada por las células del epitelio tubular incrementa conforme los animales maduran sexualmente.

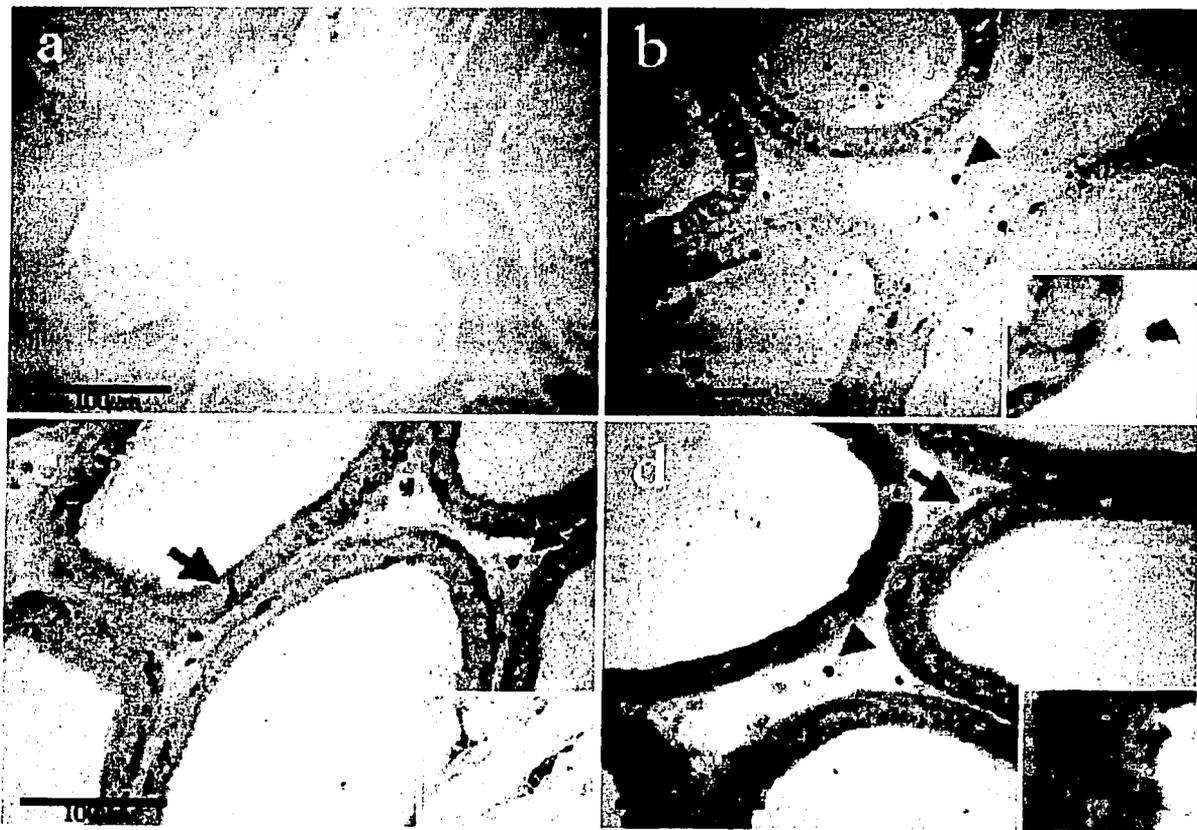


Figura 4. Fotomicrografías que ilustran la distribución de células inmunoreactivas para 5-HT en la cabeza del epidídimo de la rata en las edades de 40 (a), 60 (b), 90 (c) y 120 (d) días de vida. Nótese la ausencia de células inmunoreactivas a 5-HT a los 40 días de edad, y la aparición de éstas en las regiones subepiteliales e intersticiales a los 60 y 90 días de edad. Los insertos muestran detalles de las células subepiteliales marcadas para 5-HT a las edades correspondientes. Flecha, células subepiteliales; cabeza de flecha, mastocitos

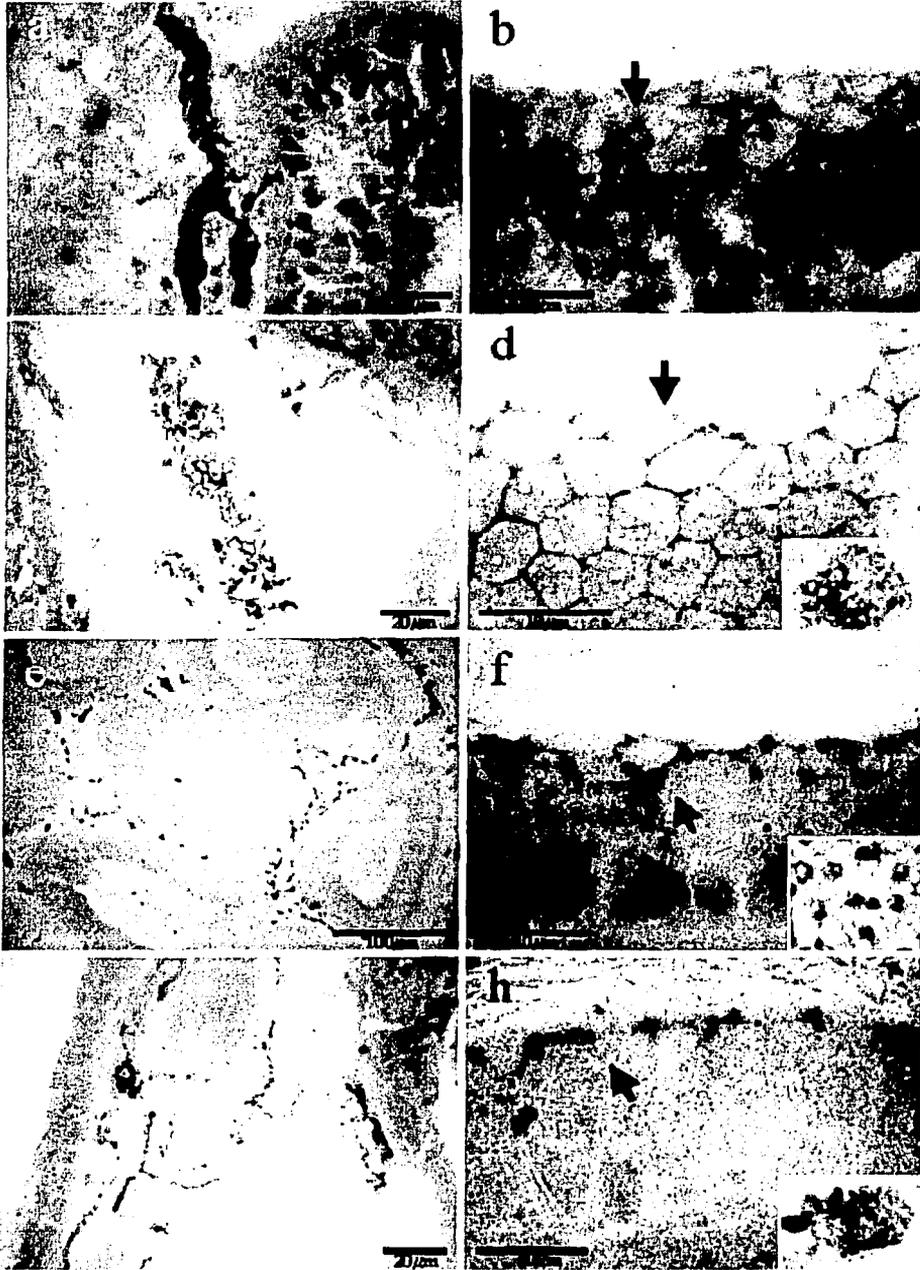


Figura 5. Fotomicrografías que muestran la distribución inmunocitoquímica de SerT en los vasos sanguíneos, mastocitos y células epiteliales tubulares en la cabeza del epidídimo a los 40 (a y b), 60 (c y d), 90 (e y f) y 120 (g y h) días de edad. Las células de las paredes de los vasos sanguíneos (c) y los mastocitos (insertos en d y h) parecen tener marca citoplásmica para SerT. Algunas células epiteliales muestran una marca fina apical (flechas y ver inserto en f)

7.1.3 Receptor 5-HT_{1B}

Estudios de inmunohistoquímica para identificar al receptor 5-HT_{1B} fueron realizados con la finalidad de documentar posibles células blanco de 5-HT. En la **Figura 6** se muestran los resultados. Numerosas células localizadas en las paredes vasculares muestran inmunoreactividad para el receptor 5-HT_{1B} en todas las edades estudiadas. Vale la pena destacar que los vasos que contienen células inmunoreactivas para éste receptor se encuentran localizados muy cercanos a los túbulos. Los mastocitos también fueron inmunoreactivos para el receptor 5-HT_{1B} a lo largo de la maduración sexual.

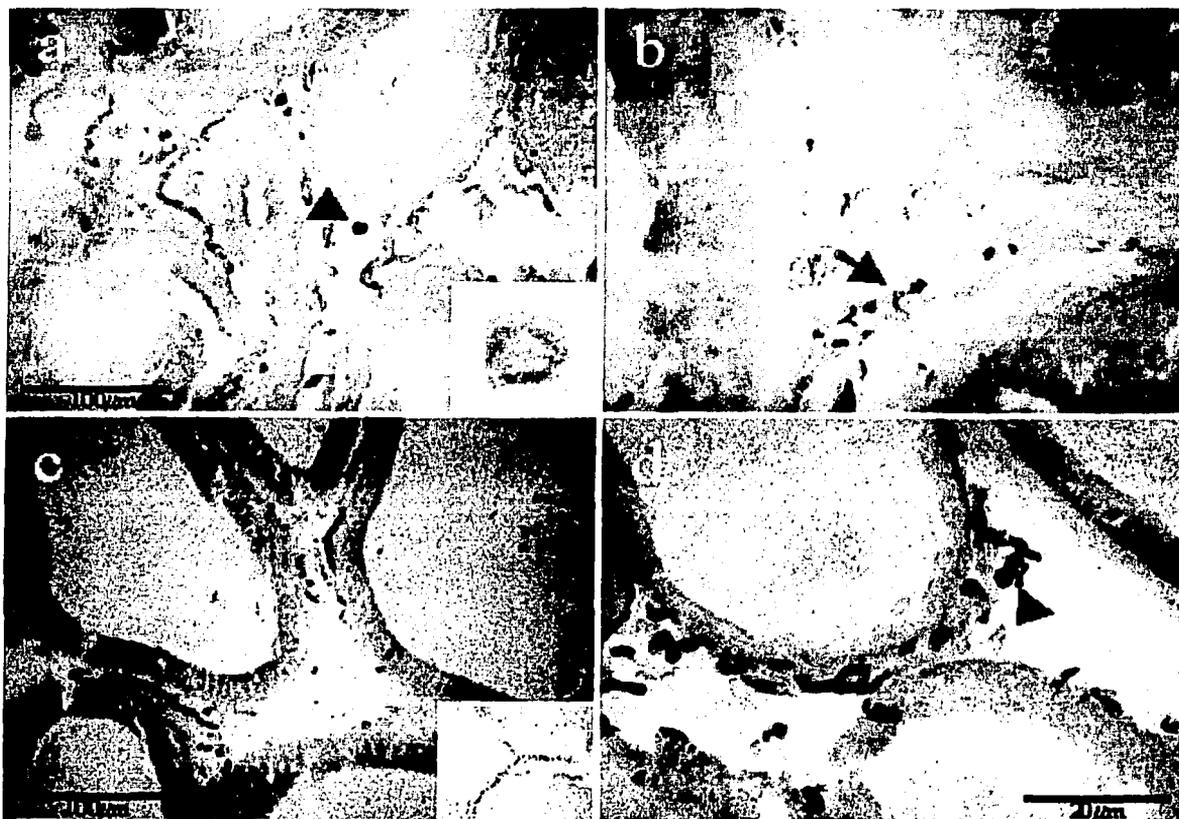


Figura 6. Fotomicrografías que ilustran la distribución y localización de mastocitos (inserto en a) y células vasculares (ver también inserto en c) inmunoreactivos para el receptor 5-HT_{1B} en el epidídimo de la rata a los 40 (a), 60 (b), 90 (c) y 120 (d) días de edad. La marca para éste receptor parece no variar significativamente durante la maduración sexual. Flecha, vasos sanguíneos; cabezas de flecha, mastocitos.

7.1.4 Sinaptofisina y Neurofilamentos

Con el objeto de establecer el posible linaje al que pertenecen las células subepiteliales inmunoreactivas a 5-HT, se realizaron estudios de inmunocitoquímica para detectar sinaptofisina (**Figura 7**) y neurofilamentos (**Figura 8**), dos marcadores de células neuroendocrinas. La marca para sinaptofisina se encontró fundamentalmente distribuida en vesículas contenidas en fibras nerviosas asociadas a vasos sanguíneos o subyacentes al epitelio tubular. En ocasiones se observó a algunas ramas de éstos nervios penetrando a la capa de epitelio tubular (**Figura 7d**). La intensidad de la marca para sinaptofisina no parece variar con la edad, aunque el número de fibras asociadas a los vasos sanguíneos aumenta. Además de lo anterior, se observó material granulado positivo para sinaptofisina en las células epiteliales tubulares. La cantidad relativa de dicho material incrementó con la edad.

Numerosas células subepiteliales y escasas intersticiales mostraron inmunoreactividad para neurofilamentos (**Figura 8**). Un número también reducido de fibras nerviosas intersticiales y perivasculares fueron inmunopositivas para ésta proteína del citoesqueleto neuronal. Si bien a los 40 días de vida solamente se observan escasas células intersticiales, la cantidad de elementos celulares inmunoreactivos para neurofilamentos aumenta significativamente a los 60 y 90 días de edad. Esto es particularmente evidente con relación a las células subepiteliales las cuales aumentan en número hasta los 90 días y disminuyen hacia los 120 días de edad. Esta disminución aparente del número de células subepiteliales inmunoreactivas a neurofilamentos pudiera no ser real puesto que se nota una reorganización de la localización de la marca. En edades tempranas ésta se localiza tanto en el citoplasma como en los procesos celulares, mientras que a los 120 días se le encuentra con mayor frecuencia en los procesos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

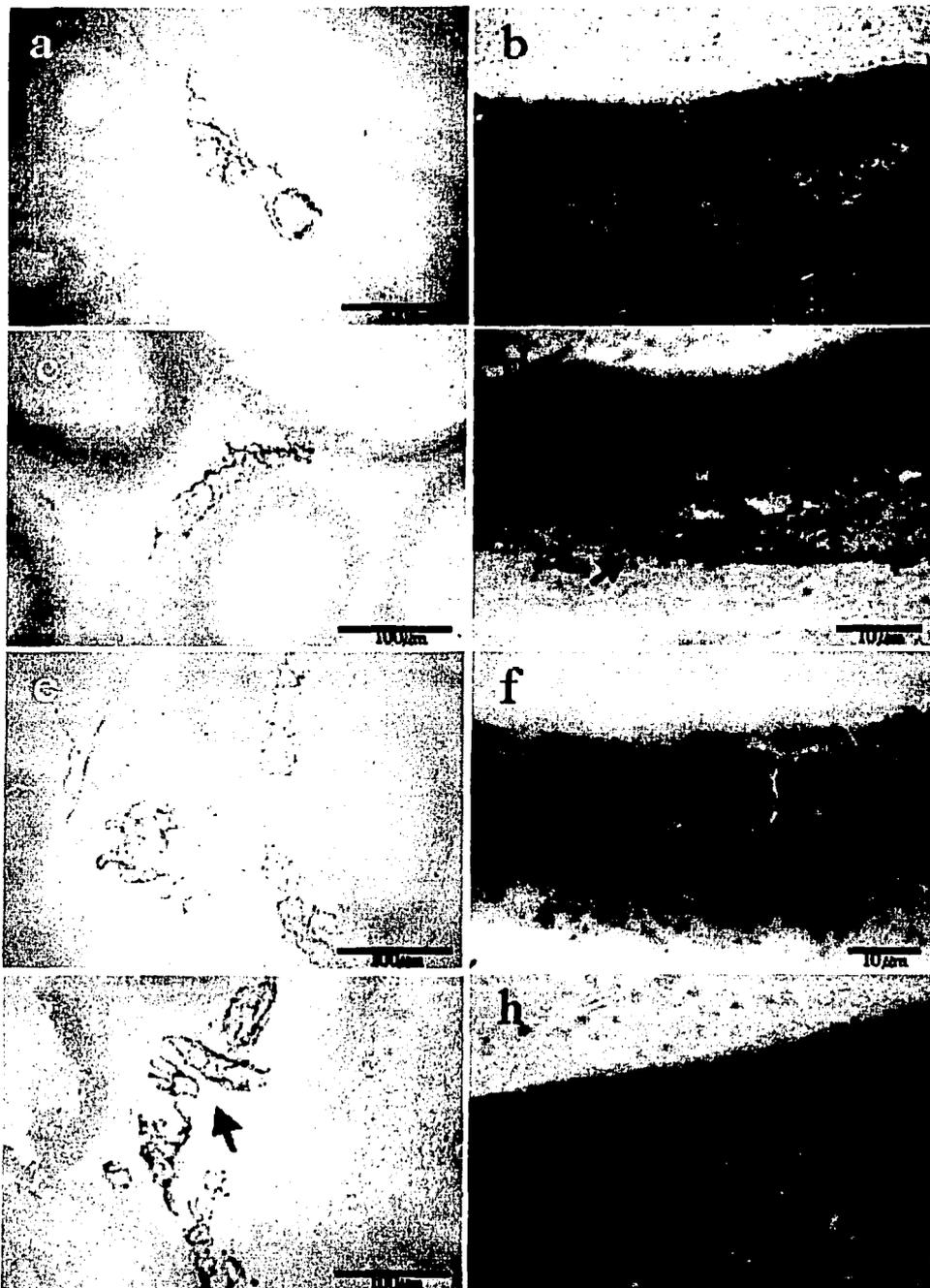


Figura 7. Fotomicrografías que muestran la distribución y localización de fibras nerviosas perivasculares y peritubulares, así como gránulos intraepiteliales inmunoreactivos para sinaptofisina en la cabeza del epidídimo de la rata a los 40 (a y b), 60 (c y d), 90 (e y f) y 120 (g y h) días de edad. Nótese el aumento en la cantidad de gránulos intraepiteliales conforme pasa la edad. Flechas, fibras nerviosas.

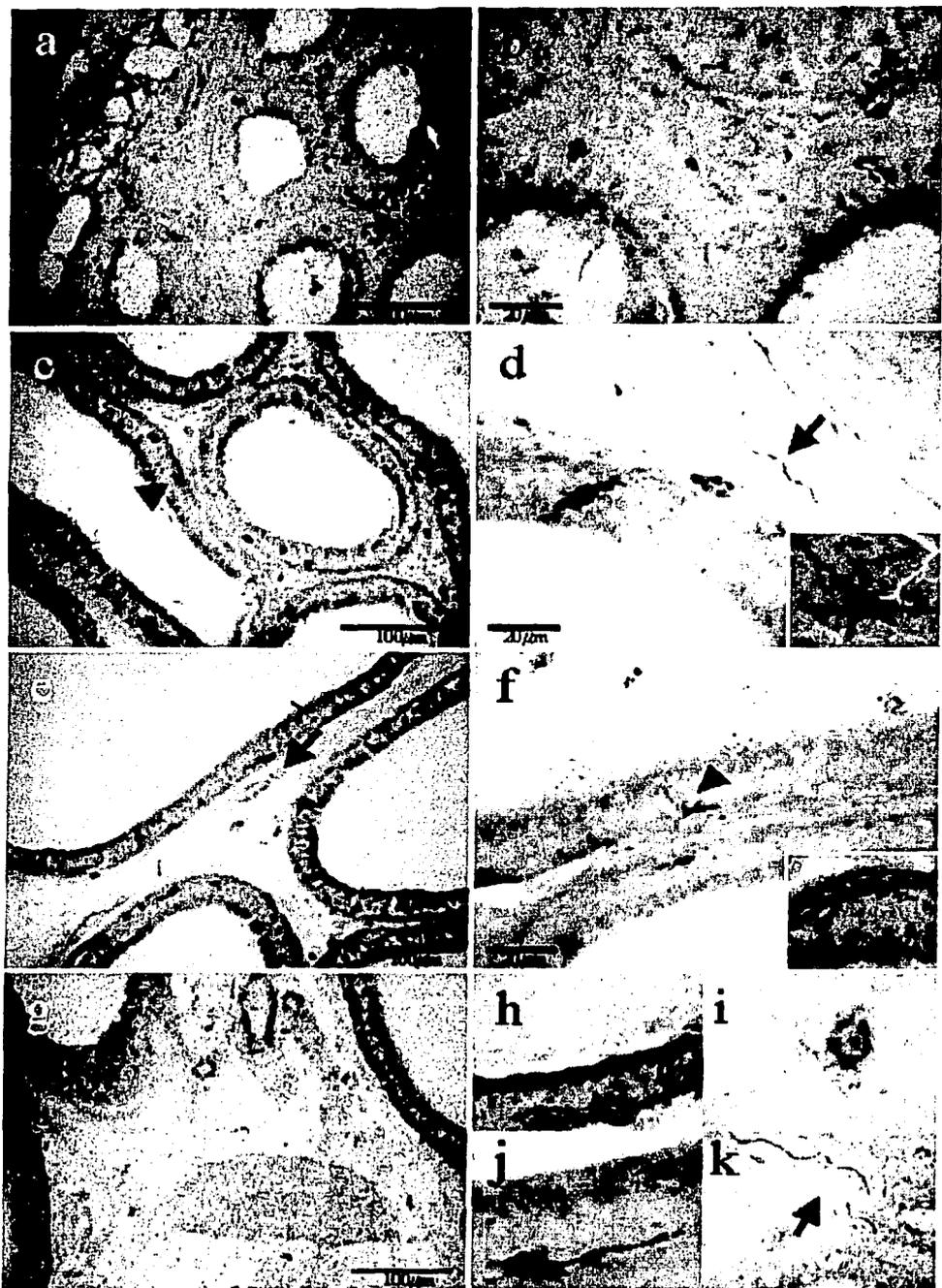


Figura 8. Fotomicrografías que muestran la distribución y localización de fibras nerviosas intersticiales y perivasculares, células subepiteliales e intersticiales inmunoreactivas para neurofilamentos 150kDa en la cabeza del epidídimo de la rata a los 40 (a y b), 60 (c y d), 90 (e y f) y 120 (g-k) días de edad. Flechas, fibras nerviosas; cabezas de flecha, células subepiteliales.

7.1.5 Evaluación cromatográfica de la actividad e identificación por Western blot de la enzima triptofano hidroxilasa

La actividad de la enzima limitante de la síntesis de 5-HT, la TPH, fue medida mediante la cuantificación de la concentración de 5-hidroxitriptofano en homogenados de la cabeza del epidídimo (**Tabla 1 y Figura 9a**). En general, se detectó consistentemente la actividad de ésta enzima a partir de los 90 y hasta los 120 días de edad. En nuestras series, los epidídimos de algunos animales de 60 días mostraron actividad de la enzima TPH. No logramos detectar actividad de la enzima en la cabeza del epidídimo a los 40 días de edad. Estos datos sugieren que existe una producción intrínseca regulada de 5-HT en la cabeza del epidídimo a lo largo de la maduración sexual. Para confirmar la presencia de la TPH en la cabeza del epidídimo, se realizaron experimentos de Western blot para cada una de las edades estudiadas (**Figura 9b**). En todas las edades se obtuvieron dos bandas una de 48 y otra de 51 kDa que parecen corresponder a las subunidades que forman a la enzima (ver discusión). La banda de 48kDa observada en el epidídimo fue semejante a la detectada en homogenados del tallo cerebral, región que contiene los núcleos serotoninérgicos que son ricos en TPH. Es interesante destacar que aunque se detectaron cambios significativos en la actividad de la enzima durante la maduración sexual, la intensidad y el grosor de las bandas inmunoreactivas a TPH no varió significativamente a lo largo del tiempo.

Edad	40	60	90	120
5-HTP	0.060±0.09	0.145±0.29	0.563±0.08*	0.920±0.18*

Tabla 1. Incremento en la actividad de la enzima TPH durante la maduración sexual obtenida mediante la cuantificación de 5-hidroxitriptofano por HPLC. Los resultados están expresados en nanomoles/mg de proteína/hora. ANOVA de una vía contra la edad menor inmediata, * $p < 0.05$.

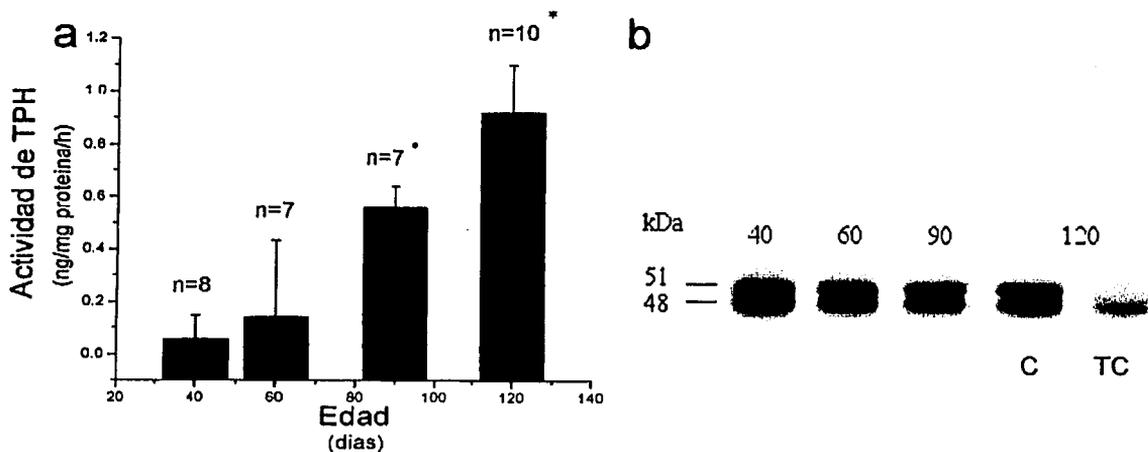


Figura 9. (a) Gráfica que muestra el incremento en la actividad de la enzima TPH durante la maduración sexual. (b) Imagen representativa de un Western blot inmunoteñido para la enzima TPH. ANOVA de una vía contra la edad menor inmediata * $p < 0.05$; C, cabeza del epidídimo; TC, tallo cerebral.

8. Discusión

La presencia de serotonina en el epidídimo fue descrita en el siglo pasado por los grupos de trabajo de **Kormano (1968)** y de **Anderson (1979)**. Sin embargo, hasta la fecha, relativamente poco se ha estudiado al respecto. Por esta razón, y dada la posible importancia de la 5-HT sobre la reproducción masculina, decidimos hacer una caracterización morfológica y bioquímica más detallada del posible sistema serotoninérgico epididimal utilizando técnicas de inmunodetección y cromatográficas para algunos antígenos y moléculas relacionados con el metabolismo de 5-HT a lo largo de la maduración sexual.

Anderson et al. (1979) sugirieron, mediante métodos histoquímicos, que la 5-HT en el epidídimo está localizada en el epitelio tubular y los mastocitos, así como en una banda "celular" subepitelial. Mediante los estudios de inmunohistoquímica que realizamos para 5-HT, se comprobó que las células cebadas están presentes a lo largo de la maduración sexual de la rata. No obstante, lo novedoso es la presencia de células inmunorreactivas para 5-HT localizadas en la base del epitelio. Dichas células, aparecen alrededor del comienzo de la etapa de pubertad de la rata a los 60 días, y presentan un incremento en su número al llegar a los 90 días. Nosotros no pudimos detectar inmunorreactividad para 5-HT en el epitelio.

Si bien nuestros resultados apoyan que los mastocitos pudieran ser una posible fuente celular de 5-HT en la cabeza del epidídimo, la falta de inmunoreactividad para 5-HT en el epitelio tubular no necesariamente sugiere que éste no produce 5-HT. Una posibilidad que explicaría la falta de inmunoreactividad para 5-HT en el epitelio es que la liberación de la 5-HT fuera constitutiva. Otra posible explicación para la discordancia entre las conclusiones alcanzadas por **Anderson et al. (1979)** y nosotros a este respecto pudiera deberse a la presencia de indolaminas diferentes de 5-HT en el epitelio tubular. como podría ser la N-

acetilserotonina. Este compuesto ha sido detectado en el testículo y funge como el precursor para la síntesis de melatonina testicular (**Tijmes et al, 1996**).

Nuestros resultados mostraron la presencia de células subepiteliales inmunoreactivas para 5-HT en los tubos epididimarios, especialmente a las edades de 60 y 90 días. Estas células podrían también ser, junto con los mastocitos, una fuente de 5-HT en el epidídimo durante la maduración sexual. Debido a que la mayor parte de las células productoras de 5-HT en los tejidos periféricos pertenecen al sistema neuroendocrino, pensamos que éstas células subepiteliales podrían pertenecer a este linaje celular. Para evaluar esta posibilidad, realizamos estudios de inmunohistoquímica para la detección de sinaptofisina (**Weidenmann et al, 1986**) y neurofilamentos. Aunque las células subepiteliales no mostraron inmunoreactividad para sinaptofisina, si lo hicieron para neurofilamentos. La morfología que presentaron dichas células subepiteliales, sugiere que pertenecen a un grupo de células conocidas como paraneuronas, las cuales fueron definidas por **Fujita (1977)**, que en sus características generales está el almacenamiento de monoaminas. Esta observación apoya que al menos algunas de las células subepiteliales pudieran tener naturaleza neuroendocrina (**Bloom et al, 1984, 1985; Gapp, 1987; Abrahamsson, 1999**).

Debido a que las células subepiteliales marcadas no tienen relación directa con la luz tubular podrían considerarse como células neuroendocrinas del tipo cerrado (**Gapp, 1987; Abrahamsson, 1999**), mismas que se sabe que funcionan como mecano o quimiosensores (**Gapp, 1987**). La presencia de células neuroendocrinas con procesos dendríticos que corren por debajo o entre las células epiteliales tubulares en el epidídimo no debe extrañarnos puesto que se ha reportado la presencia de paraneuronas semejantes en otros órganos del tracto urogenital masculino incluyendo el testículo, la próstata (**Abrahamsson, 1999**) y la uretra (**Hanyu et al, 1987; Vittoria et al, 1990; 1992**). Además, se ha mostrado la presencia del factor de crecimiento neural, NGF, en el compartimiento epitelial epididimario (**Ayer-**

LeLievre et al, 1988). El NGF podría encargarse de mantener el carácter neuroendocrino de éstas y otras células cuya presencia ha sido documentada en el epitelio (**Avellar y Gutiérrez-Ospina, observaciones no publicadas**). Por otro lado, el cambio en el número de las células subepiteliales epididimales en la edad adulta podría resultar de una remodelación de su población por procesos de muerte celular, similar a lo que sucede en el sistema neuroendocrino gastrointestinal (**Gapp, 1987**), o bien que existan cambios en la expresión de los marcadores neuronales al alcanzar la madurez sexual, sin que esto signifique necesariamente la pérdida del carácter neuroendocrino de dichas células.

Adicionalmente a estas observaciones, también identificamos células que mostraron una inmunoreactividad discreta para neurofilamentos en el intersticio intertubular. Pensamos que estas células podrían ser neuronas de ganglios submucosos, pues en la cauda del epidídimo se han descrito células semejantes que son inmunoreactivas para la proteína asociada a microtúbulos tipo 1B (MAP1B), acetilcolintransferasa o dopamina- β -hidroxilasa (**Silva et al, 2002**). Por otro lado, las células epiteliales mostraron gránulos inmunoreactivos para sinaptofisina. Si bien existen células neuroendocrinas epiteliales del tipo abierto a lo largo del epitelio tubular (**Avellar y Gutiérrez-Ospina, observaciones no publicadas**), el número de células que muestran éstos gránulos es tan abundante que pensar que todas ellas corresponden a células neuroendocrinas no hace sentido. De hecho, la mayor parte de las células epiteliales tubulares no muestra inmunoreactividad para otros marcadores neuronales (**Avellar y Gutiérrez-Ospina, observaciones no publicadas**). Aunque la evidencia acerca de la presencia de sinaptofisina en vesículas de secreción es abundante para las neuronas y células neuroendocrinas, su existencia en células epiteliales ha sido poco documentada (**Leube, 1994**). Incluso se ha sugerido que células no neurales no poseen la maquinaria molecular para insertar correctamente a la sinaptofisina en las vesículas secretorias (**Leube et al, 1994**). Así, la función de esta proteína en las células epiteliales

tubulares es desconocida. No obstante esto, la sobreexpresión de sinaptofisina en células epiteliales hepáticas transfectadas con el gen correspondiente muestra que esta proteína se integra a un tipo específico de vesículas que parecen estar involucradas en procesos de secreción (**Leube et al, 1994**). Así, nuestros datos morfológicos son compatibles con la idea de que las células epiteliales expresan sinaptofisina y que esta se integra a vesículas específicas. Finalmente, nosotros no logramos identificar fibras nerviosas positivas para 5-HT en la cabeza como se han descrito para el cuerpo y la cauda del epidídimo (**Leung et al, 1999**). Esto se puede explicar debido a que la inervación es escasa en la cabeza y la poca que hay pudiera no ser de naturaleza serotoninérgica (**El-Badawi, 1967; Silva et al, 2002**).

La capacidad para sintetizar 5-HT depende de una reacción enzimática cuyo paso limitante es mediado por la TPH (**Feldman et al, 1997; Fitzpatrick, 1999**), por lo tanto, decidimos caracterizarla en el epidídimo. Esta enzima es codificada por un gene que da origen al menos a dos transcritos (**Darmon et al, 1988, Dumas et al, 1989; Walther et al, 2003**) que traducen dos isoformas con propiedades bioquímicas (**Kim et al, 1991; Walther et al, 2003**) y distribución histológica distintas (**Haycock, et al, 2002; Walther et al, 2003**). La isoforma más abundante de esta enzima es una proteína homotetramérica con peso de 200kDa, formada por cuatro unidades cuyo peso molecular es de 53kDa aproximadamente (**Feldman et al, 1997**). En el presente trabajo, evaluamos la presencia de la TPH en la cabeza del epidídimo utilizando técnicas de inmunohistoquímica y Western blot. Desafortunadamente, no pudimos detectar la TPH mediante inmunohistoquímica con ninguno de los anticuerpos que disponíamos. Sin embargo, las subunidades de la enzima fueron identificadas como una banda de aproximadamente 48kDa de peso molecular (**Dumas et al, 1989**) tanto en el tallo cerebral como en la cabeza del epidídimo mediante Western blot. Además, también se observó una banda de aproximadamente 51kDa de peso molecular. Debido a que esta banda no se observó en el tallo cerebral, suponemos que podría corresponder a subunidades

de la otra isoforma de la TPH. Alternativamente, estas bandas también podrían corresponder a las subunidades de la enzima tirosina hidroxilasa (**Dumas et al, 1989**). Esta enzima responsable de sintetizar noradrenalina pertenece a la misma familia de la TPH, tiene una alta homología con ella y esta presente en el epidídimo de la rata (**Silva et al, 2002**).

Evidencia que confirma aún más la presencia de la TPH en la cabeza del epidídimo es la detección indirecta de su actividad a través de la generación y cuantificación por HPLC de 5-hidroxitriptofano en homogenados de ésta región epididimal. La actividad de la enzima es extremadamente baja a los 40 días de edad, y aumenta de manera significativa conforme la maduración sexual avanza. Es interesante destacar que no obstante este aumento en la actividad de la enzima con la edad, la banda de inmunoreactividad para las subunidades de la misma varía poco desde los 40 hasta los 120 días de edad. Esto indica que el aumento en la actividad de la enzima no resulta de un incremento en la cantidad sino en la actividad misma de la enzima. Aunque desconocemos las razones de este comportamiento, las modificaciones en la actividad podrían reflejar cambios en la disponibilidad del cofactor tetrahidrobiopterina y/o en la disponibilidad y/o estado de oxidación del ion fierro (**Moran et al, 1998**). Por otro lado, se sabe que en el cerebro la concentración de TPH es varias veces mayor con relación a la cantidad de 5-HT formada (**McGeer et al, 1987**). De hecho, se sabe que solamente de 10 a 25% de la capacidad de la TPH es utilizada para la síntesis de 5-HT. Esto podría también explicar la discrepancia entre la cantidad de TPH observada en los Western blots y los niveles de su actividad detectados por HPLC. Finalmente, aunque se ha sugerido que este exceso de TPH es una reserva para cubrir cambios inusitados en la demandas de 5-HT (**McGeer et al, 1987**), también podría ser que la TPH este involucrada en vías sintéticas diferentes o adicionales a las de esta indolamina. Por ejemplo, en los testículos se ha detectado la actividad de dos de las enzimas involucradas en la producción de melatonina (**Tijmes et al, 1996**), vía metabólica en la que se sabe participa la TPH

(McGeer *et al*, 1987). En el epidídimo, se ha caracterizado la presencia de receptores específicos a melatonina (Li *et al*, 1999; Shiu *et al*, 2000), lo cual abre la posibilidad de que exista un sistema modulador de la función epididimal mediado por indolaminas.

La mayor parte de las acciones de 5-HT sobre sus células blanco son mediados por diversos miembros de una superfamilia de receptores metabotrópicos (Hoyer *et al*, 1994; Fanburg y Lee, 1997; Pauwels, 2000; Azmitia, 2001; Hannon y Hoyer, 2002). De estos, los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2B} han sido identificados farmacológicamente en la cauda del epidídimo en donde parecen estimular la secreción de aniones (Leung *et al*, 1999). Por esta razón, en el presente estudio realizamos análisis de inmunocitoquímica para documentar la presencia y distribución de los receptores 5-HT_{1B} en la cabeza del epidídimo. La marca inmunológica para éste receptor fue detectada en células de las paredes de los vasos sanguíneos. Debido a que en los testículos la 5-HT regula el flujo de sangre a través de inducir vasoconstricción (Boccabella *et al*, 1962; Collin *et al*, 1996; Ullmer *et al*, 1995), nuestros resultados sugieren que los receptores 5-HT_{1B} pudieran mediar éste efecto en las cabeza del epidídimo. En apoyo a esta idea, diversos grupos de investigación han documentado la presencia del receptor 5-HT_{1B} y de su mensajero en células endoteliales y musculares de vasos de gran calibre y pulmonares así como su participación en la modulación del tono vascular (Ullmer *et al*, 1995; Hinton *et al*, 1999; Kato *et al*, 1999; Nilsson *et al*, 1999a, b; MacLean *et al*, 2000).

Debido a que en diversos órganos como el cerebro (Andrade, 1998) y el epidídimo (Leung *et al*, 1999), la 5-HT regula fenómenos de transporte y permeabilidad celular a través de la activación de receptores 5-HT_{1B}, la presencia de este receptor en vasos sanguíneos epididimales pudiera favorecer cambios en su permeabilidad. Por otro lado, Leung *et al* (1999) identificaron al receptor 5-HT_{1B} en monocapas de células epididimales de la cauda en cultivo. Nuestros resultados de inmunocitoquímica, sin embargo, sugieren que éste receptor

no se encuentra en el epitelio tubular de la cabeza del epidídimo. Esta discrepancia podría explicarse con base a la heterogeneidad de las poblaciones celulares que constituyen a la mucosa del epidídimo en sus distintas regiones (**Robaire y Hermo, 1988, Yeung et al, 1991; Gopal Dutt, 1999**). La marca inmunológica para el receptor 5-HT_{1B} también fue detectada en mastocitos. Aunque el papel de estos receptores en la función de los mastocitos es desconocido, los receptores 5-HT_{1B} podrían funcionar como autoreceptores que regulen la secreción de 5-HT, tal y como ha sido mostrado para las neuronas serotoninérgicas (**Andrade, 1998; Blier et al, 1998; Frazer y Daws, 1998**).

La 5-HT es capturada por diferentes tipos celulares a través de un transportador cuya fuerza electromotriz depende del co-transporte de iones de sodio y la hidrólisis de ATP por una ATPasa de sodio/potasio membranal. (**Sanders-Bush y Mayer, 1996; Feldman et al, 1997; Horschitz et al, 2001**). Éste transportador es codificado por un solo gene y no se han indentificado isoformas del mismo (**Horschitz et al, 2001**). En nuestros estudios morfológicos identificamos grupos de células positivas para SerT ubicadas en las paredes de los vasos sanguíneos. Aunque en el sistema nervioso generalmente se ha asociado la presencia de SerT con la recaptura e inactivación de 5-HT (**Lebrand et al, 1996; Sanders-Bush y Mayer, 1996; Feldman et al, 1997**), la acumulación de C¹⁴-5-HT administrada exógenamente en terminales adrenérgicas del conducto deferente (**Jaim-Etcheverry et al, 1969; Thoa et al, 1969**), así como su presencia en vasos sanguíneos pulmonares (**Eddahibi et al, 1999, 2000; MacLean et al, 2000**) y cerebrales (**Wakayama et al, 2002**), sugieren que en el tracto genital masculino SerT pudiera tener funciones diferentes de la inactivación de 5-HT. En apoyo a esta posibilidad se ha propuesto que los efectos mitogénicos de 5-HT en las células musculares de los vasos sanguíneos son mediados por SerT (**MacLean et al, 2000**). Adicionalmente, el SerT expresado por células en los vasos sanguíneos podría utilizarse en el transporte de 5-HT entre los compartimentos vascular e intersticial en el epidídimo como

se ha sugerido que ocurre en el testículo durante la maduración sexual (Frungeri *et al*, 1999), en pulmón (Lee y Fanburg, 1986) y en la pared ependimaria en el sistema nervioso central (Wakayama *et al*, 2002). Una posibilidad muy interesante que emerge de nuestras observaciones es que existieran interacciones entre el 5-HT_{1B} y SerT en las paredes de los vasos sanguíneos. En apoyo a esta posibilidad se ha mostrado que el bloqueo de SerT interfiere con los efectos inhibitorios del receptor 5-HT_{1B} sobre la liberación de 5-HT en terminales serotoninérgicas (Frazer y Daws, 1998). Así, es posible que el transporte de 5-HT en los vasos epididimales, si en verdad ocurre, pudiera ser regulado por interacciones entre el SerT y los receptores 5-HT_{1B}. Por otro lado, detectamos inmunoreactividad para SerT en la parte apical de las células epiteliales a lo largo de todas las edades estudiadas. Estos datos podrían sugerir que el sistema está diseñado para evitar la acumulación de 5-HT en el compartimiento luminal, o bien que la 5-HT luminal pudiera tener efectos sobre las células epiteliales como ha sido sugerido para las células musculares vasculares y endoteliales (MacLean *et al*, 2000)

Como comentario final, si el aumento en la disponibilidad y la disminución del recambio de 5-HT en la cabeza del epidídimo estuvieran asociados al incremento de mastocitos y vasos sanguíneos positivos para la 5-HT, el receptor 5HT_{1B} y el SerT a lo largo de la maduración sexual, nuestros resultados no pueden predecir directamente tal relación. En éste mismo contexto, es más difícil imaginar como un incremento entre los 40 y 90 días de edad seguido de un decremento hacia los 120 días de vida en el número de células subepiteliales inmunoreactivas a 5-HT pudiera asociarse a un aumento en la disponibilidad de 5-HT en la cabeza del epidídimo. Así, es claro que se requieren de otros experimentos para dilucidar si la remodelación de las poblaciones celulares serotoninérgicas en la cabeza del epidídimo y de los cambios en la disponibilidad de 5-HT en el mismo órgano están realmente relacionados.

9. Conclusiones

- 1) Existe un sistema serotoninérgico intrínseco en la cabeza del epidídimo de la rata.
- 2) Algunos de los elementos celulares que constituyen al sistema serotoninérgico epididimal son mastocitos, vasos sanguíneos y células epiteliales, los cuales presentan inmunoreactividad para 5-HT, su transportador y/o al menos el subtipo de receptores 5-HT_{1B}.
- 3) Existen células subepiteliales inmunorreactivas para 5-HT que se presentan en mayor cantidad durante los 60 y 90 días de edad de la rata. A los 120 días su presencia disminuye considerablemente.
- 4) Existe una producción endógena de 5-HT a lo largo de la maduración sexual, que se incrementa de manera significativa a partir de los 90 días de edad.
- 5) Algunas de las células subepiteliales epididimales parecen pertenecer al linaje neuroendocrino que presentan una distribución espacio-temporal similar a las células subepiteliales marcadas para 5-HT. De igual manera, existen otros elementos celulares inmunoreactivos para esta proteína de citoesqueleto neuronal, tanto en el epitelio como en el intersticio epididimal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6) Se presentó inmunorreactividad para sinaptofisina en fibras nerviosas asociadas a vasos sanguíneos en todas las edades estudiadas. Las células epiteliales tubulares presentaron gránulos con inmunoreactividad para esta proteína vesicular.

Referencias

Abou-Haila A, Tulsiani DRP (2000) **Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function.** *Arch. Biochem. Biophys* **379**: 173-182.

Abrahamsson PA (1999) **Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate.** *Endocr. Rel. Cancer* **6**: 503-519.

Aguilar R, Anton F, Bellido C, Aguilar E, Gaytan F (1995) **Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat.** *J Endocrinol* **46**: 15-21.

Anderson ME, Paparo AA (1977) **Paraformaldehyde-induced fluorescence in the epididymis of *Didelphis marsupialis*.** *Anat. Rec.* **187**: 524.

Anderson ME, Paparo AA, Martan J (1979) **Paraformaldehyde-induced fluorescence as a histochemical test for 5-hydroxytryptamine in the epididymis of the opossum.** *J Anat.* **129**: 141-149.

Andrade R (1998) **Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes.** *Ann. NY. Acad. Sci. USA* **861**: 190-203.

Ayer-LeLievre C, Olson L, Ebendal T, Hallböök F, Persson H (1988) **Nerve growth factor mRNA and protein in the testis and epididymis of mouse and rat.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2628-2632.

Azmitia EC (2001) **Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis.** *Brain. Res. Bull.* **56**: 413-424.

Balkovetz DF, Tirupathi C, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V. (1989) **Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes.** *J Biol Chem.* **264**:2195-8.

Bedford JM (1975) **Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis.** En: Greep R, Hamilton DW, Eds. **Handbook of Physiology. Endocrinology V**, section 7. Waverley Press Inc, Baltimore, 303-317 pp.

Bedford JM. (1978) **Anatomical evidence for the epididymis as the prime mover in the evolution of the scrotum.** *Am J Anat.* **152**:483-507.

Bedford JM, Rifkin JM. (1979) **An evolutionary view of the male reproductive tract and sperm maturation in a monotreme mammal--the echidna, *Tachyglossus aculeatus*.** *Am J Anat.* **156**:207-30.

Blakely RD, Berson HE, Freneau RT Jr, Caron MG, Peek MM, Prince HK, Bradley CC. (1991) **Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain.** *Nature* **354**:66-70.

Blier P, Piñeyro G, El Mansari M, Bergeron R, De Montigny C (1998) **Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission.** *Ann. NY. Acad. Sci. USA* **861**: 204-216.

Bloom GS, Schoenfeld TA, Vallee RB (1984) **Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP 1 (Microtubule Associated Protein 1) in the nervous system.** *J Cell Biol* **98**: 320-330.

Bloom GS, Luca FC, Vallee RB (1985) **Microtubule associated protein 1B: Identification of a major component of the neuronal cytoskeleton.** *Proc. Natl Acad Sci USA* **82**: 5404-5408.

Bocabella AV, Salgado ED, Alger EA (1962) **Testicular function and histology following serotonin administration.** *Endocrinology* **71**:827-837.

Bradford MM (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* **72**:248-254.

Campos MB, Vitale ML, Calandra RS, Chiocchio SR (1990) **Serotonergic innervation of the rat testis.** *J. Reprod. Fert.* **88**: 475-479.

Celuch SM, Sloley BD (1988) **Regional distribution of dopamine, 5-hydroxytryptamine, and noradrenaline in the rat vas deferens.** *Neurochem. Res.* **10**: 967-972.

Cockett AT, Al-Juburi A, Aldebarmakian V, Vergamini RF, Caldamone AA. (1980) **The varicocele: new experimental and clinical data.** *Urology* **15**:492-5.

Collin O, Damber JE, Bergh A (1996). **5-Hydroxytryptamine: a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats.** *J Reprod Fertil* **106**: 17-22.

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (1996) **Serotonin (5-hydroxytryptamine) and Histamine en The Biochemical Basis of Neuropharmacology 7a.** ed. Oxford University Press, Oxford 338-367 pp.

Darmon MC, Guibert B, Leviel V, Ehret M, Maitre M, Mallet J (1988). **Sequence of two mRNAs encoding active rat tryptophan hydroxylase.** *J Neurochem.* **51**:312-6.

Delongeas JL and Gelly JL (1985) **Differentiation of the rat epididymis after withdrawal of androgen.** *Cell Tissue Res.* **241**: 657-662.

Dufau ML, Tinajero JC, Fabbri A (1993) **Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis.** *FASEB J* **7**: 299-307.

Dumas S, Darmon MC, Delort J, Mallet J (1989) **Differential control of tryptophan hydroxylase expression in the raphe and in the pineal gland: Evidence for a role of translation efficiency.** *J. Neurosci. Res.* **24**: 537-547.

Eddahibi S, Fabre V, Boni C, Martres MP, Raffestin B, Hamon M, Adnot S. (1999) **Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth**

muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circ Res.* **84**:329-36.

Eddahibi S, Hanoun N, Lanfumey L, Lesch KP, Raffestin B, Hamon M, Adnot S. (2000) **Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene.** *J Clin Invest.* **105**:1555-62.

El-Badawi A, Schenk EA (1967) **The distribution of cholinergic and adrenergic nerves in the mammalian epididymis.** *Am. J. Anat.* **121**: 1-14.

Fanburg BL, Lee SL (1997) **A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen** *Am. J. Physiol.* **272**: L795-L806.

Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF (1997) **Principles of Neuropsychopharmacology.** Sinauer Associates, Inc, Publishers: Sunderland, Massachusetts.

Fitzpatrick PF (1999) **Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases.** *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 355-381.

Frazer A, Daws LC (1998) **Serotonin transporter function in vivo: Assessment by chronoamperometry.** *Ann. NY. Acad. Sci.*, **861**: 217-229.

Frungieri MB, González-Calvar SI, Rubio M, Ozu M, Lustig L, Calandra RS (1999) **Serotonin in Golden Hamster Testes: Testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition.** *Neuroendocrinology* **69**: 299-308.

Fujita T. (1977) **Concept of paraneurons.** *Arch Histol Jpn.* **40** Suppl:1-12.

Gapp DA (1987) **Gastroenteropancreatic cells.** En: Chester-Jones I, Ingleton PM, Phillips JG, Eds. **Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology.** Plenum Press, New York, 515-540 pp.

Goppal Dutt NH (1999) **Structure of Mammalian Epididymis.** In **Comparative endocrinology and reproduction.** Joy KP, Krishna A, Haldar C, Springer-Verlag, Nueva Delhi, 201-227 pp.

Hannon J, Hoyer D (2002) **Serotonin receptor and systems: endless diversity?** *Acta Biol. Szeger.* **46:** 1-12.

Hanyu S, Iwanaga T, Kano K, Fujita T (1987) **Distribution of serotonin-immunoreactive paraneurons in the lower urinary tract of dogs.** *Am. J. Anat.* **180:** 349-356.

Hay DWP, Wadsworth RM (1982) **The contractile effects of 5-hydroxytryptamine on the rat isolated vas deferens.** *Br. J. Pharmac.* **77:** 605-613.

Haycock JW, Kumer SC, Lewis DA, Vrana KE, Stockmeier CA (2002) **A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope.** *J. Neurosci. Methods* **114:** 205-212.

Hinton B (1990) **The testicular and epididymal luminal aminoacids micro environment in the rat.** *J Androl* **11:** 498-505.

Hinton JM, Adams D, Garland CJ (1999) **5-Hydroxytryptamine stimulation of phospholipase D activity in the rabbit isolated mesenteric artery.** *Brit. J. Pharmacol.* **126:** 16011-1608.

Horschitz S, Hummerich R, Schloss P (2001) **Structure, function and regulation of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) transporter.** *Biochem. Soc. Trans.* **29:** 728-732.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) **International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin).** *Pharmacol Rev.* **46:**157-203.

Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG. (1995) **Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases.** *Biochem J.* **311:**353-66.

Hyman LH (1962) **Comparative Anatomy**. The University of Chicago Press, Chicago, 338-427 pp.

Jaim-Etcheverry G, Zieher LM (1969) **Ultrastructural cytochemistry and pharmacology of 5-hydroxytryptamine in adrenergic nerve endings – I. Localization of exogenous 5-hydroxytryptamine in the autonomic nerves of the rat vas deferens**. *J. Pharmac. Exp. Ther.* **166**: 264-271.

Jervis KM, Robaire B (2001) **Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis**. *Biol. Reprod.* **65**: 696-703.

Kato S, Kumamoto H, Hirano M, Akiyama H, Kaneko N (1999) **Expression of 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B} receptor mRNA in blood vessels**. *Mol. Cell. Biochem.* **199**: 57-62.

Kim KS, Wessel TC, Stone DM, Carver CH, Joh TH, Park DH (1991) **Molecular cloning and characterization of cDNA encoding tryptophan hydroxylase from rat central serotonergic neurons**. *Brain Res Mol Brain Res.* **9**:277-83.

Kormano M, Penttillä A (1968) **Distribution of endogenous and administered 5-hydroxytryptamine in the rat testis and epididymis**. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae* **46**: 468-473.

Lebrand C, Cases O, Adelbrecht C, Doye A, Alvarez C, El Mestikawy S, Seif I, Gaspar P (1996) **Transient uptake and storage of serotonin in developing thalamic neurons**. *Neuron* **17**: 823-835.

Lee S, Fanburg BL (1986) **Serotonin uptake by bovine pulmonary artery endothelial cells in culture**. *Am. J. Physiol.* **250**: C761-C765.

Lesch, KP, Wolozin, BL, Murphy, DL, Reiderer, P (1993) **Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter**. *J. Neurochem.* **60**:2319-2322

Leube RE (1994) **Expression of the synaptophysin gene family is not restricted to neuronal and neuroendocrine differentiation in rat and human.** *Differentiation* **56**: 163-171.

Leube RE, Leimer U, Grund C, Franke WW, Harth N, Wiedenmann B (1994) **Sorting of synaptophysin into special vesicles in nonneuroendocrine epithelial cells.** *J. Cell Biol.* **127**: 1589-1601.

Leung GP, Dun SL, Dun NJ, Wong PY (1999) **Serotonin via 5-HT1B and 5-HT2B receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium.** *J Physiol* **519**: 657-667.

Li L, Wong JTY, Pang SF, Shiu YW (1999) **Melatonin-induced stimulation of rat corpus epididymal epithelial cell proliferation** *Life Sci.* **65**: 1067-1076.

Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) **Protein measurement with the Folin phenol reagents** *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

MacLean MR, Herve P, Eddahibi S, Adnot S (2000) **5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension.** *Brit. J. Pharmacol.* **131**: 161-168.

Malmnäs CO. (1974) **Opposite effects of serotonin and dopamine on copulatory activation in castrated male rats.** *Adv Biochem Psychopharmacol.***11**:243-248.

McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG (1987) **Molecular neurobiology of the mammalian brain.** Plenum Press, New York, 319-347 pp.

Meizel S, Turner KO (1983) **Serotonin or its agonist 5-methoxytryptamine can stimulate hamster sperm acrosome reactions in a more direct manner than catecholamines.** *J. Exp. Zool.* **226**: 171-174.

Monroy J, Ayala ME, Chavira R, Damian-Matsumura P, Dominguez R. (2003) **Comparative effects of injecting 5,6-dihydroxytryptamine in the dorsal or medial raphe nuclei on rat puberty.** *Brain Res Bull.* **60**:307-315.

Moran GR, Daubner SC, Fitzpatrick PF (1998) **Expression and characterization of the catalytic core of tryptophan hydroxylase.** *J. Biol. Chem.* **273**: 12259-12266.

Morecroft I, Heeley RP, Prentice HM, Kirk A, MacLean MR (1999) **5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor.** *Brit. J. Pharmacol.* **128**: 730-734.

Naumenko EV, Shishkina GT (1978) **Role of serotonin in feedback control of hypothalamic-pituitary-testicular complex in male rats.** *Neuroendocrinology* **26**: 359-366.

Nilsson T, Longmore J, Shaw D, Olesen IJ, Edvisson L (1999) **Contractile 5-HT_{1B} receptors in human cerebral arteries: pharmacological characterization and localization with immunocytochemistry.** *Brit. J. Pharmacol.* **128**: 1133-1140.

Nilsson T, Longmore J, Shaw D, Pantev E, Bard JA, Branchek T, Edvisson L (1999) **Characterization of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques.** *Eur. J. Pharmacol.* **372**: 49-56.

Orgebin-Crist MC (1976) **Sperm maturation in rabbit epididymis.** *Nature* **216**: 816-818.

Orgebin-Crist MC, Danzo BJ, Bavies J (1975) **Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis.** En: Greep R, Hamilton DW. Eds. **Handbook of Physiology. Endocrinology V**, section 7. Waverley Press Inc, Baltimore, 319-338 pp.

Parisi E, De Prisco P, Capasso A, del Prete M (1984) **Serotonin and sperm motility.** *Cell Biol. Int. Rep* **8**: 95.

Pauwels PJ (2000) Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol* 60: 1743-1750.

Pinilla L, Gonzalez LC, Tena-Sempere M, Aguilar E. (2003) 5-HT1 and 5-HT2 receptor activation reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-stimulated LH secretion in prepubertal male and female rats. *Eur J Endocrinol* 148:121-7.

Ricker DD. (1998) The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *J Androl* 19: 1-4.

Robaire B, Hermo L (1988) Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions, and their regulation. En: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*. 2ª. Ed. Raven Press Ltd, New York, 999-1080 pp.

Robb GW, Amann RP, Killian GJ (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats *J. Reprod. Fertil* 54: 103-107.

Romer AS (1962) *The vertebrate body*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 275-318 pp.

Sanders-Bush E, Mayer SE (1996) *Agonistas y antagonistas de los receptores de 5-hidroxitriptamina*. En Goodman, A y Gilman, A eds. *Las bases fisiológicas de la terapéutica*, Volumen II. 9ª. Ed, McGraw-Hill Interamericana, México, D.F. 265-279 pp.

Setti BS and Jehan Q (1977) Functional maturation of the epididymis in the rat. *J. Reprod. Fertil.* 49: 317-322.

Shishkina GT, Dygalo NN (2000) Role of serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comp. Biochem. Physiol.* 125:45-51.

Shiu SY, Li L, Siu SW, Xi SC, Fong SW, Pang SF (2000) **Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis.** *Biol. Signals Recept.* **9**: 172-187.

Silva AM, Queiroz DBC, Castro EF, Naffah-Mazzacoratti MG, Godinho RO, Porto CS, Gutierrez-Ospina G, Avellar CW **Segment-specific decrease of both catecholamine concentration and acetylcholinesterase activity are accompanied by nerve refinement in the rat cauda epididymis during sexual maturation.** *J. Androl.* **23**: 374-382.

Sun EL, Flickinger CJ. (1979) **Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis.** *Am J Anat* **154**:27-56.

Sun EL, Flickinger CJ. (1982) **Proliferative activity in the rat epididymis during postnatal development.** *Anat Rec* **203**:273-284.

Thoa NB, Eccleston D, Axelrod J (1969) **The accumulation of C14-serotonin in the guinea pig vas deferens.** *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **169**: 68-73.

Tijmes M, Pedraza R, Valladares L (1996) **Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis.** *Steroids* **61**: 65-68.

Tinajero JC, Fabbri A, Ciocca DR, Dufau ML (1993) **Serotonin secretion from rat Leydig cells.** *Endocrinology* **133**:3026–3029.

Turner TT (1991) **Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis.** *Ann N Y Acad Sci* **637**: 364-383.

Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Lubbert H. (1995) **Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels.** *FEBS Lett.* **370**:215-21.

Verbeuren TJ (1989) **Synthesis, storage, release, and metabolism of 5-hydroxytryptamine.** En: Fozars JR (ed) **The Peripheral actions of 5-hydroxytryptamine.**, Oxford University Press, Oxford, 1-25 pp.

Vittoria A, Cocca T, La Mura E, Cecio A (1990) **Serotonin-, somatostatin- and chromogranin A-containing cells of the urethro-prostatic complex in the sheep. An immunocytochemical and immunofluorescent study.** *J. Anat.* **171**: 169-178.

Vittoria A, Cocca T, La Mura E, Cecio A (1992) **Immunocytochemistry of paraneurons in the female urethra of the horse, cattle, sheep, and pig.** *Anat. Rec.* **233**: 18-24.

Wakayama K, Ohtsuki S, Takanaga H, Hosoya K, Terasaki T (2002) **Localization of norepinephrine and serotonin transporter in mouse brain capillary endothelial cells.** *Neurosci. Res.* **44**: 173-180.

Walther DJ, Peter JU, Bashmmakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M (2003) **Synthesis of serotonin by a second Tryptophan Hydroxylase isoform.** *Science* **299**: 76.

Weidenmann B, Franke NW, Kuhn C, Moll R, Gould VE (1986) **Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3500-3504.

Wingren U, Wasteson A, Enerback L (1983) **Storage and turnover of histamine, 5-hydroxytryptamine and heparin in rat peritoneal mast cells *in vivo*.** *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* **70**:193-199.

Wong PYD, Yeung CH (1977) **Hormonal regulation of fluid reabsorption in isolated rat cauda epididymis.** *Endocrinology* **101**: 1391-1397.

Yeung CH, Cooper TG, Bergmann M, Schulze (1991) **Organization of tubules in the human caput epididymis and the ultrastructure of their epithelia.** *Am. J. Anat.* **191**: 261-279.