

Universidad Nacional Autónoma de México



DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL SISTEMA
SEROTONINÉRGICO DE LA CABEZA DEL EPIDÍDIMO
DE LA RATA ADULTA

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ TREJO

TUTOR

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

COMITÉ TUTORAL

DR. GABRIEL MANJARREZ GUTIÉRREZ

DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Patricia Padilla por su valiosa ayuda técnica con relación a la detección de las isoformas de la enzima triptofano hidroxilasa mediante las técnicas de inmunoelectrotransferencia.

Al LIBB. Miguel Tapía Rodríguez por su colaboración y apoyo en la estandarización metodológica de la técnica de inmunohistoquímica.

Al M.V.Z. Adolfo Herrera Juárez por proveer, cuidar y proporcionar la información de los parámetros reproductivos de los animales utilizados en este estudio.

A la M.V.Z. Susana Rojas por su apoyo técnico con relación a la detección de la hormona 5-dihidrotestosterona por la técnica de radioinmunoanálisis.

A la Dra. Rosa Angélica Lucio por su apoyo en la revisión de este trabajo.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Fue apoyado por el CONACyT (proyectos 38615N y J28035N y beca 169641), PAPITT-UNAM (proyectos IN203702 y IN232604), FAPESP (proyectos 99/09491-8 y 00/09381-7) y Fundación Telmex (beca de posgrado).

El trabajo experimental y escrito fue avalado por el comité evaluador integrado por: Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez, Dra. Bertha Prieto Gómez, Dra. Ma. de Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Alfredo Medrano y Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

DEDICATORIA

A Lucy y a Katia Lorena por brindarme su apoyo y compañía en la realización de este logro.

A mis padres y hermanos por su confianza y entusiasmo.

A Luis y a Miguel, compañeros de laboratorio por compartir conmigo experiencias gratas.

A todas las colegas del laboratorio: Abril, Julieta, Brenda, Eileen, Esperanza, Ingrid, Laura, Sofía, Leonora, Mireya, Ximena y Rosa Angélica. También a los colegas: Eduardo, Pablo y Horacio, Ismael, Alejandro y Don José.

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Dedicatoria	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Anatomía general del sistema reproductor masculino de la rata	3
2.2 Anatomía e histología del testículo	5
2.2.1 Espermatogénesis	7
2.3 Anatomía e histología del epidídimo	10
2.3.1 Modelo de maduración espermática	15
2.3.2 Cambios bioquímicos de la maduración espermática	17
2.3.3 Función de la inervación en el epidídimo	18
2.4 Anatomía del conducto deferente y glándulas sexuales extramurales	19
2.5 Fisiología sexual masculina	22
2.6 Serotonina: generalidades sobre su metabolismo	23
2.6.1 Funciones de la serotonina sobre el sistema reproductor masculino	27
3. Justificación	29
4. Hipótesis	30
4.1 De la etapa I	
4.2 De la etapa II	
4.3 De la etapa III	
5. Objetivos generales	31
5.1 De la etapa I	
5.2 De la etapa II	
5.3 De la etapa III	
6. Objetivos específicos	32
6.1 De la etapa I	
6.2 De la etapa II	
6.3 De la etapa III	
7. Materiales y métodos	33
7.1 Animales	33
7.2 Cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar la actividad de la enzima triptofano-5-hidroxilasa	33
7.3 Cromatografía líquida de alta resolución para determinar la concentración de serotonina	34
7.4 Inmunocitoquímicas para marcadores serotoninérgicos	34
7.5 Inmunotransferencia por Western blot para la enzima triptofano-5-hidroxilasa .	35
7.6 Tratamiento de ratas con para-clorofenilalanina	36

7.7 Ensayo de ratas con y sin experiencia sexual	36
7.8. Análisis estadístico	37
8. Resultados	38
De la etapa I	
8.1 Descripción del sistema serotoninérgico en la cabeza del epidídimo	38
8.2 Producción de serotonina a través de la vía clásica de síntesis mediada por triptofano-5-hidroxilasa: presencia de dos isoformas	38
8.3 Elementos celulares inmunoreactivos para serotonina, su transportador y sus receptores (5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{2A} , 5-HT ₃)	41
De la etapa II	
8.4 Efectos de la para-clorofenilalanina sobre el sistema serotoninérgico de la cabeza del epidídimo	44
De la etapa III	
8.5 Evaluación de los machos con actividad sexual monogámica y machos sin experiencia sexual	47
9. Discusión	49
10. Conclusiones	56
10.1 De la etapa I	
10.2 De la etapa II	
10.3 De la etapa III	
11. Referencias	57
12. Anexos	66
a) Cuantificación de la actividad de la enzima triptofano-5-hidroxilasa por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución	66
b) Determinación de la concentración de la serotonina por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución	68
c) Inmunocitoquímica para marcadores serotoninérgicos (transportador, enzima triptofano-5-hidroxilasa y serotonina)	69
d) Inmunotransferencia por Western blot para la enzima triptofano-5- hidroxilasa ..	70
e) Disminución de serotonina y evaluación anatómica de testículo y epidídimo	71
13. Publicación	
The origin targets and variations of serotonin in the rat caput epididymis: morphological and biochemical studies	

RESUMEN

En la cabeza del epidídimo existen grandes cantidades de serotonina, cuyo origen, función y blancos aún no son muy claros. El propósito de este trabajo fue identificar los principales componentes del sistema de serotonina en la cabeza del epidídimo mediante técnicas histológicas (inmunocitoquímica) y bioquímicas (cromatografía líquida de alta resolución: HPLC y Western blot). Identificamos células epiteliales, células neuroendocrinas de tipo basal y mastocitos inmunoreactivos a serotonina. Las células epiteliales, endoteliales y mastocitos mostraron inmunoreactividad para el transportador de serotonina y a varios subtipos de receptores de serotonina (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃). Los espermatozoides presentaron inmunoreactividad para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃. La zona supranuclear de células epiteliales presentó marca para la enzima triptofano-5-hidroxilasa (TPH). Por otro lado, los ensayos de Western Blot mostraron la presencia de dos bandas de TPH, una con peso molecular de ≈ 48 kDa y la otra de ≈ 51 kDa que parecen corresponder a dos isoformas de la enzima TPH. Además se confirmó la existencia de serotonina y la actividad de la enzima TPH en homogenados de la cabeza del epidídimo mediante HPLC. Para confirmar la síntesis local de serotonina utilizamos animales tratados con para-clorofenilalanina (*p*CPA), inhibidor de TPH, que disminuyó la concentración de serotonina y la actividad enzimática. Adicionalmente, en este trabajo mostramos que existe mayor actividad de TPH y mayor concentración de serotonina en la cabeza del epidídimo, mismas que incrementan en las ratas con experiencia sexual monogámica en relación con los animales sin actividad sexual. Con base en estos hallazgos sugerimos que la cabeza del epidídimo contiene un sistema serotoninérgico que podría regular directa y/o indirectamente la maduración espermática y posiblemente la fertilidad masculina.

ABSTRACT

The epididymal caput in some mammals contains large quantities of serotonin. However, the origin, targets and physiological variations of serotonin in the epididymis have been poorly studied. Our aim in this work was to distinguish some of the main components of the serotonin system present in the epididymal caput. We combined morphological and biochemical techniques in order to test if a serotonin system is indeed present in rat epididymal caput. Serotonin immunoreactivity was detected in mast, epithelial and neuroendocrine cells. Epithelial cells showed immunoreactivity to 5HT_{1A}, 5HT_{2A} and 5HT₃ serotonin receptors. In addition, endothelial and mast cells were immunostained against 5HT_{1B} serotonin receptor. Spermatozoa displayed immunoreactivity against 5HT_{2A} and 5HT₃ serotonin receptors. Moreover, epithelial, endothelial and mast cells were stained positively together with the serotonin transporter. Only epithelial cells showed immunoreactivity against tryptophan hydroxylase (TPH). TPH modulates the limiting step in serotonin synthesis. Additionally, Western blot analysis showed the presence of two protein bands (\approx 48kDa and \approx 51kDa) corresponding to TPH. Chromatographic analysis confirmed the presence of tryptophan hydroxylase in the caput. Furthermore, chromatographic analysis proved that TPH is indeed active and showed that both activity and availability of serotonin decreases following the treatment with the inhibitor *p*-chloro-phenylalanine treatment of the TPH activity. Interestingly, serotonin concentration and TPH activity tend to be higher in breeder than in sexually inactive males. We think that these results support the existence of a local serotonergic system in the rat caput epididymis that might regulate some aspects of male reproductive function.

1. INTRODUCCIÓN

La maduración espermática es el proceso que permite a los espermatozoides adquirir la capacidad de fertilizar a los ovocitos en el sistema reproductor femenino (Robaire y Hermo, 1988). Este proceso involucra la remoción de lípidos (colesterol), fosfolípidos (fosfatidilinositol), polisacáridos de la membrana celular (N-acetilglucosamina), estabilización de la cromatina nuclear, aumento en la formación de los puentes disulfuro (S-S), cuya formación es importante para la estabilización de los espermatozoides y el desplazamiento y pérdida de la gota citoplásmica. La adquisición de la motilidad progresiva también ocurre como parte del proceso de maduración espermática que tiene lugar en un órgano tubular llamado, epidídimo (Bedford, 1975; Robaire y Hermo, 1988; Oko y Clermont, 1990).

Una de las mayores interrogantes de la reproducción masculina se relaciona con los procesos que subyacen a la maduración espermática en el epidídimo. Se ha propuesto que la testosterona producida y liberada por las células de Leydig a la luz tubular testicular es transportada por la proteína acarreadora de andrógenos (PAA), producida por las células de Sertoli. Este complejo molecular alcanza la luz del epitelio epididimal a través de la red testicular. Una vez en el epidídimo, la testosterona es transformada en 5α -dihidrotestosterona por las células principales del epitelio de la cabeza del órgano. Se cree que este andrógeno promueve la secreción de factores proteicos que son liberados a la luz del órgano, promoviendo los procesos de maduración espermática (Esteban et al., 1997). Sin embargo, es posible, que factores intrínsecos del epidídimo tengan un papel central en los procesos de maduración espermática. La serotonina (5-HT), es un buen candidato, porque las concentraciones de

esta amina en la cabeza del epidídimo se encuentran entre las más elevadas del organismo (Anderson et al., 1979).

Así, el propósito de este estudio fue el de identificar los elementos celulares y bioquímicos que pudieran constituir parte del sistema serotoninérgico intrínseco en la cabeza del epidídimo.

2. ANTECEDENTES

La reproducción sexual constituye una parte fundamental de las funciones de los organismos que habitan el planeta, ya que permite la continuidad de las especies mediante la transferencia e intercambio de información genética, necesaria para incrementar sus posibilidades de variación, adaptación, supervivencia y permanencia (Billett et al., 1985).

2.1 Anatomía general del sistema reproductor masculino de la rata

En la rata macho, la mayoría de los órganos que constituyen al sistema reproductivo son pares. Así se observa a los testículos, epidídimos, conductos deferentes en ambos lados de la línea media pélvica. Además, presentan estructuras accesorias conocidas como glándulas extramurales del sistema reproductor y son: las vesículas seminales, las glándulas coagulantes y bulbouretrales que también son pares, mientras que la próstata es impar y esta constituida por lóbulos ventrales, laterales y dorsales. Las secreciones de estas glándulas son vertidas a la uretra que por su anatomía se distingue en uretra prostática, pélvica y peneana; esta última rodeada por el cuerpo esponjoso del pene.

Los testículos están protegidos por una bolsa de piel llamada escroto, que se divide por un rafe medio en dos mitades, cada una aloja a un testículo (Coffey, 1988; Robaire y Hermo, 1988; Mann y Lutwak-Mann, 1990). La superficie interna de la piel escrotal se adosa al dartos, capa subcutánea de músculo liso que junto con el cremáster -músculo de apariencia estriada-, coadyuvan al mantenimiento de la temperatura testicular, acercan o alejan a los testículos hacia el cuerpo. El músculo cremáster al contraerse desplaza rápidamente a los testículos hacia la cavidad abdominal (i.e. durante la eyaculación) o simplemente los mantiene cercanos o lejanos de ésta (i.e. durante la

termorregulación testicular; Zempoalteca et al., 2002). El plexo pampiniforme también es necesario en la termorregulación testicular, permitiendo así, la espermatogénesis y esteroidogénesis (Bedford, 1975).

Por otro lado, la irrigación de los testículos y de los epidídimos procede de las arterias testiculares que se originan en la aorta abdominal. También, la arteria espermática interna irriga al epidídimo, por medio de sus ramas epididimales. Los genitales externos son irrigados por ramas de la arteria pudenda interna, que salen de la cavidad pélvica por el arco isquiático hacia el pene (i.e. arteria del pene, arteria profunda del pene). Este último, junto con el escroto y el prepucio, son irrigados por la arteria pudenda externa. La linfa producida por los testículos y el epidídimo llega a los ganglios linfáticos lumbares aórticos localizados cerca de la aorta abdominal. La linfa de la uretra, de las glándulas sexuales extramurales y del pene llega a los ganglios ilíacos mediales y sacros, mientras que la del escroto, prepucio y de los tejidos peripeneanos drenan hacia los ganglios linfáticos inguinales (Hebel y Stronberg, 1986).

La inervación para las gónadas en los machos acompaña a la arteria testicular. La mayoría de los nervios que regulan la actividad de las estructuras reproductivas se originan en la médula espinal lumbosacra, se compone de fibras sensoriales del pene que constituyen al nervio dorsal del pene (Pacheco et al., 1997). Además, existen fibras motoras del pudendo que inervan a los músculos perineales conocidos como bulboesponjoso e isquiocavernoso (Pacheco et al., 1997). También se han encontrado también fibras simpáticas y parasimpáticas del nervio pélvico y fibras simpáticas del nervio hipogástrico que convergen en el ganglio pélvico mayor del llamado plexo pélvico, para luego distribuirse al tejido eréctil del pene y a las glándulas sexuales extramurales (Dail et al., 1989).

2.2 Anatomía e histología del testículo

Los testículos son órganos de forma oval que varían en peso y tamaño dependiendo de la especie estudiada. Se les describen dos polos (dorsal y ventral), dos caras (lateral y medial) y dos bordes (craneal y caudal) (Mann y Lutwak-Mann, 1990). Cada testículo está cubierto de una capa serosa, la túnica vaginal, que deriva del peritoneo. Esta serosa cubre la bolsa escrotal lo que forma un fondo de saco que contiene una pequeña cantidad de líquido que facilita el desplazamiento del testículo en la bolsa escrotal. La túnica albugínea, la cubierta propia del testículo, es una membrana fibrosa, firme, de color azulado, que le da consistencia a la gónada (Coffey, 1988; Mann y Lutwak-Mann, 1990). La túnica albugínea se engruesa en el mediastino testicular. Desde allí, se proyecta hacia el espesor de la gónada formando tabiques testiculares que delimitan a los lobulillos (200 a 300 en cada testículo), que son espacios donde se ubican los túbulos seminíferos. La base de cada lobulillo se encuentra en relación con la túnica albugínea y el vértice se orienta hacia el mediastino testicular, zona que es atravesada por los conductos eferentes y por los vasos sanguíneos (Mann y Lutwak-Mann, 1990).

Adosada a la túnica albugínea se encuentra una capa vascular, constituida por un plexo vascular inmerso en una fina red de tejido conectivo que cubre la superficie interna de la albugínea y de los tabiques testiculares. El parénquima testicular lo constituyen los túbulos seminíferos ubicados en los lobulillos testiculares, estos túbulos (2 a 3 para cada lobulillo) se encuentran densamente enrollados. Hacia el borde caudal del testículo los túbulos se hacen rectos, penetran la zona del mediastino y convergen formando la red testicular. Hacia el extremo dorsal del mediastino, desde la red testicular, surgen los ductos eferentes en número desde 3 hasta más de 12, dependiendo de la especie, los cuales penetran la albugínea y desembocan en el segmento inicial de la cabeza del epidídimo (Okó y Clermont, 1990).

Durante la pubertad, el crecimiento testicular y epididimal es lento hasta el momento en que los andrógenos producidos por células de Leydig promueven su crecimiento acelerado. En la rata, se ha visto que esta respuesta se presenta en el día 75 después del nacimiento, aunque la maduración sexual se completa hasta el día 100 postnatal (Robb et al., 1978).

En los animales adultos, histológicamente, los túbulos seminíferos presenta un epitelio germinal en el que se distinguen las diferentes fases de formación de los espermatozoides: espermatogonias, espermatocitos, espermátides y espermatozoides, además se encuentran las células de Sertoli que realizan funciones de soporte y tróficas para las células germinales en la luz tubular. En el intersticio testicular se observan las células de Leydig, productoras de testosterona, células musculares lisas, endoteliales, epitelio cuboidal no secretor en la rete testis, mastocitos, fibroblastos, entre otras. Cada tipo celular cumple una función específica y coordinada para llevar a cabo el proceso de espermatogénesis. Por ejemplo, la formación de espermatozoides se da en la zona del epitelio seminífero, donde se encuentran células germinales llamadas espermatogonias que están estrechamente relacionadas con las células de Sertoli. Las espermatogonias continúan con varias divisiones y llevan a cabo procesos de diferenciación que culminan con la formación de los espermatozoides inmaduros (figura 1; Mann y Lutwak-Mann, 1981; Oko y Clermont, 1990). El proceso de espermatogénesis varía en tiempo entre las diferentes especies, y depende del tipo de reproducción del macho, de la estación reproductiva, de la disponibilidad de las hembras, etc. Entre los túbulos seminíferos, las células de Leydig son las encargadas de la secreción de testosterona, regulada por un sistema complejo de señales hipofisarias e hipotalámicas (Oko y Clermont, 1990).

En general, la testosterona induce el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos, promoviendo el comportamiento e impulso sexual, la

agresividad y la defensa territorial, entre otros aspectos (Oko y Clermont, 1990). Durante los procesos de la espermatogénesis se han caracterizado diferentes etapas de formación de los espermatozoides clasificadas en: espermatocitogénesis, espermiogénesis y espermiación (Oko y Clermont, 1990).

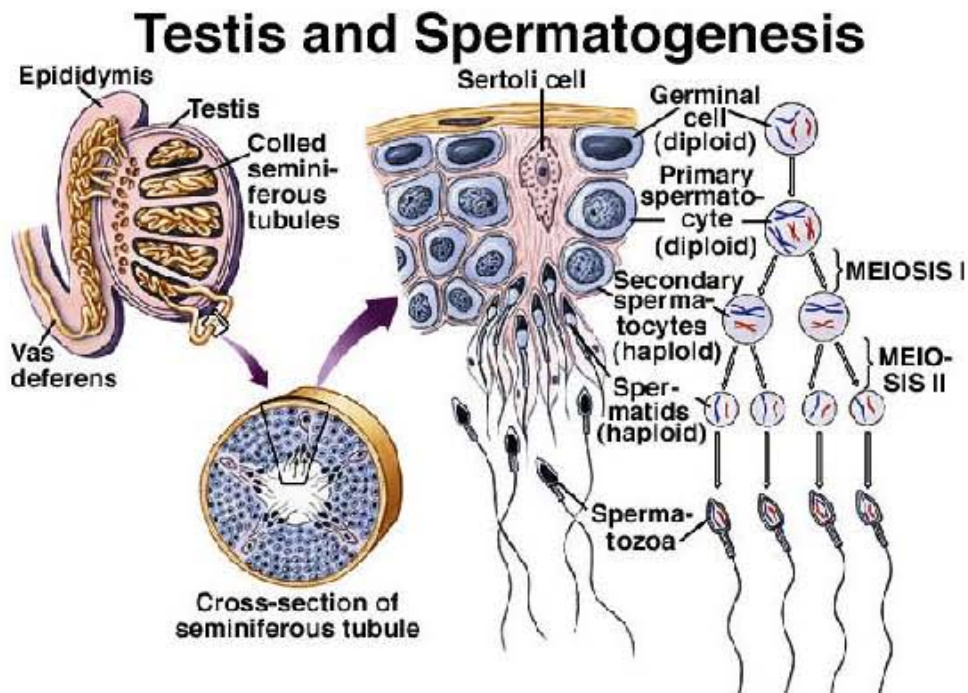


Figura 1. Producción de espermatozoides en el epitelio seminífero. Las espermatogonias que son células diploides ($2n$) originan, durante la primera división de la meiosis, a los espermatocitos primarios también diploides que, durante la segunda división de la meiosis originan a los espermatocitos secundarios haploides (n). Éstos por división mitótica originan a las espermatídes que se transforman en espermatozoides (tomada de Internet: www.faculty.southwest.tn.edu/rburkett/A&P2_r7.jpg).

2.2.1 Espermatogénesis

Durante el desarrollo embrionario las células germinales primordiales que migraron desde el mesodermo extraembrionario a las crestas gonadales continúan dividiéndose por mitosis para dar origen a los gonocitos que permanecen quiescentes hasta cerca de la pubertad, momento en que se diferencian en espermatogonias de diferentes tipos. Las espermatogonias primordiales se diferencian en espermatogonias A0, algunas de las cuales sirven de reserva y otras se dividen y dan origen a espermatogonias tipo A1, que

a su vez originan a los tipos A2, A3 y A4. Este último subtipo origina a las espermatogonias intermedias y después a las espermatogonias tipo B.

Las espermatogonias tipo B se dividen por mitosis, dan origen a los espermatocitos que se clasifican en espermatocitos primarios y secundarios los primeros se caracterizan por que inician la meiosis, y en la segunda división meiótica generan a los espermatocitos secundarios. En la siguiente fase, los espermatocitos secundarios se dividen formando las células haploides conocidas como espermátides. La duración del proceso de diferenciación en el epitelio germinativo difiere según la especie. En la rata y en el ratón dura aproximadamente 21 días; en el hombre, 45 días (figura 2; Oko y Clermont, 1990).

Espermiogénesis.- Esta etapa corresponde a la transformación de las espermátides mediante cambios morfológicos y bioquímicos que culminan con la formación de espermatozoides. En general, estos cambios incluyen la condensación de la cromatina nuclear, la formación del capuchón acrosomal y del aparato locomotor. Esta transformación se divide en varias fases que son: fase I o de Golgi (etapas 2-5), fase II o de formación de la cabeza y acrosoma (capuchón acrosómico; etapas 6-13) y fase III o de maduración (etapa 15-19; Oko y Clermont, 1990).

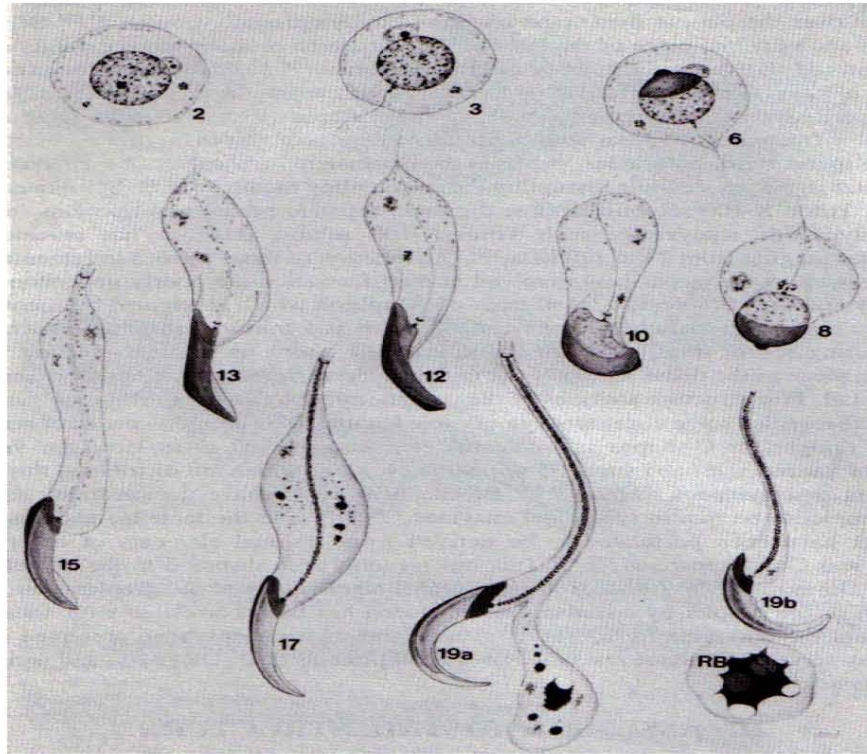


Figura 2. Fases principales de la diferenciación de las espermátides durante la espermiogénesis. La fase Golgi se representa por los números 2 y 3, la fase de formación de la cabeza y acrosoma corresponde del 6-13 y la fase de maduración del 15-19 (modificada de Oko y Clermont, 1990).

La fase I se caracteriza por el inicio de la formación del capuchón acrosomal por el aparato de Golgi, la adhesión del gránulo acrosómico a la envoltura nuclear y las etapas tempranas de la formación de la cola en el polo opuesto a la adhesión del gránulo acrosómico. Durante la fase II, el centríolo proximal se acerca al núcleo, probablemente para establecer la unión de la cabeza con el flagelo. En esta fase se elonga el gránulo acrosómico sobre la superficie del núcleo de la espermátide, quedando cubierto por un delgado saco membranoso de doble capa que se adhiere a la envoltura nuclear. A partir de los elementos del centríolo distal se forman los elementos axonémicos que originan al flagelo del espermatozoide (Oko y Clermont, 1990). Finalmente, durante la fase III se observan cambios en el núcleo, en el acrosoma y en la cola de las espermátides. Inicialmente, el acrosoma se dirige a la pared del túbulo seminífero y el flagelo hacia la

luz. A nivel nuclear existen cambios en la condensación de la cromatina, presencia de gránulos densos y remodelación del núcleo que de alargado y ovoide se vuelve aplanado. El acrosoma adherido al núcleo también se alarga, las mitocondrias antes dispersas en la célula se concentran en el axonema, donde forman la vaina que caracteriza la pieza media del espermatozoide. La remodelación del núcleo y las otras estructuras citoplásmicas de las espermatídes son características de cada especie (Oko y Clermont, 1990).

Espermiación.- En esta etapa los espermatozoides se separan gradualmente de las células de Sertoli y la gota citoplásmica es fagocitada por las células de Sertoli. Ésta a nivel ultraestructural contiene residuos del citoplasma, ribosomas, mitocondrias, lípidos, microtúbulos (Oko y Clermont, 1990).

2.3 Anatomía e histología del epidídimo

El epidídimo es un órgano tubular enrollado que forma parte del sistema de conductos extratesticulares del sistema reproductor masculino. Fisiológicamente, el epidídimo es responsable de propiciar un ambiente óptimo y específico para el transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides antes de ser expulsados durante la eyaculación. De acuerdo con Robaire y Hermo (1988), este órgano se encuentra dividido en segmento inicial, cabeza, cuerpo y cauda (figura 3). Estos segmentos a su vez se subdividen en 6 zonas a lo largo de toda la extensión del epidídimo de la rata adulta (Gopal Dutt, 1999). La zona I es la que abarca la parte del segmento inicial. Las zonas II y III corresponden a la región de la cabeza proximal y distal, respectivamente. La zona IV corresponde al cuerpo y las zonas V y VI incluyen a la cauda del órgano. Esta última zona se continúa con los conductos deferentes (figura 4). Otra característica del epidídimo es que la luz del segmento inicial contiene pocos espermatozoides cuya

cantidad aumenta en la cabeza y cuerpo del epidídimo. Igualmente, el diámetro de la luz tubular incrementa de la cabeza a la cauda, también concentra mayor número de espermatozoides (Turner, 1991). Esta última se continúa con el conducto deferente, el cual transporta a los espermatozoides durante el proceso de eyaculación (Bedford, 1975).

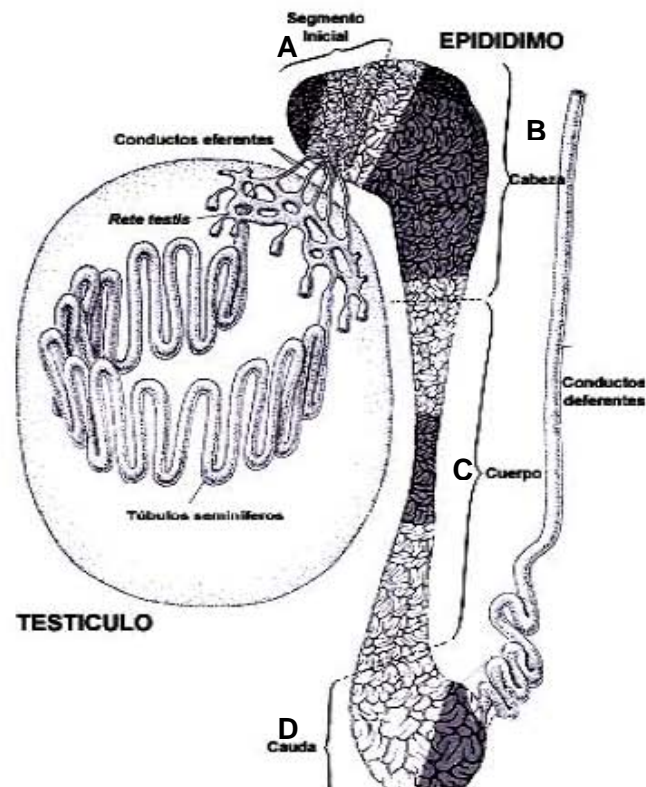


Figura 3. Regiones del epidídimo: A) Segmento inicial, B) Cabeza, C) Cuerpo y D) Cola. Los conductos eferentes del testículo se continúan formando un sólo conducto en el segmento inicial del epidídimo, luego continúa la cabeza que es la región más ancha del epidídimo, mientras que el cuerpo es la más angosta. Finalmente, se forma la cauda y es ahí donde los espermatozoides maduros son almacenados antes de ser eyaculados (modificada de Robaire y Hermo, 1988).

La función del epitelio epididimal de la cabeza y el cuerpo incluyen la absorción de fluidos provenientes del testículo (segmento inicial), síntesis y secreción de diversos compuestos en la luz tubular (carbohidratos, proteínas, lípidos, electrolitos) que durante su recorrido por las diferentes zonas permiten que los espermatozoides sean bañados por

diferentes concentraciones de los componentes del fluido epididimal permitiéndoles adquirir la motilidad y la capacidad de fertilizar (Bedford, 1975; Orgebin Crist, 1975; Robaire y Hermo, 1988; Hinton, 1990; Turner, 1991). Por ejemplo, la concentración de aminoácidos totales dentro del epidídimo varía en las diferentes secciones, siendo de 50 mmol/L en la cabeza, mientras que en el cuerpo, disminuye en 50% y en la cauda sólo se alcanza el 0.1% (Hinton, 1990).

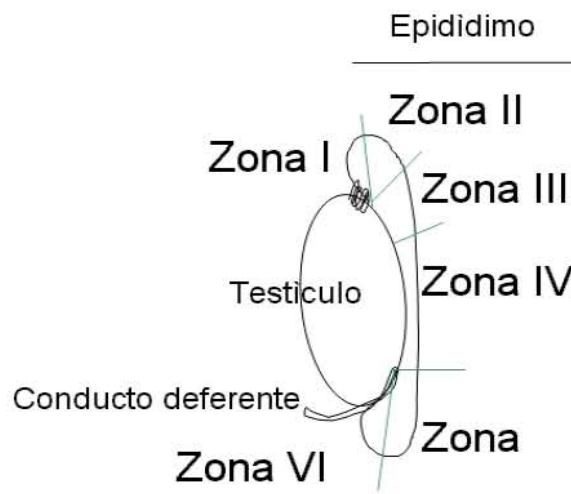


Figura 4. Zonas del epidídimo de la rata. La zona I corresponde al segmento inicial; II y III a la cabeza; IV al cuerpo y V y VI a la cauda (modificada de Gopal-Dutt, 1999).

Se ha observado que también existen altos niveles de glutamato originados por la enzima gamma-glutamil transpeptidasa en el fluido de la cabeza del epidídimo. En contraste, en la zona de la cauda la actividad de ésta enzima está disminuida. Esto se asocia con una disminución de 20 veces la concentración de glutamato con respecto a la zona de la cabeza. Cabe señalar que la concentración del aminoácido L-triptofano (L-Trp) es mayor en la cabeza que en la cauda del epidídimo (1336 ± 340 vs 630 ± 130 , respectivamente; Hinton, 1990). Un ejemplo adicional que sustenta la heterogeneidad química del líquido epididimal que se relaciona con las variaciones regionales de pH a lo largo de los túbulos epididimales. El pH en la luz de la cabeza es de 6.2, mientras que

en la cauda es de 6.8. Estos cambios posiblemente resultan de las diferencias en la actividad de la enzima anhidrasa carbónica y del transporte de iones como H^+ y HCO_3^- en el epitelio tubular a lo largo del epidídimo (Hoskins y Vijayaraghavan, 1990).

Tipos celulares del epidídimo.- El epitelio que reviste la cabeza del epidídimo es cilíndrico pseudoestratificado, mientras que en las zonas del cuerpo y cauda es un epitelio columnar simple. (Turner, 1991; Gopal Dutt, 1999). En las células epiteliales a lo largo del órgano pueden diferenciarse dos tipos celulares. Las células principales, las cuales conforman la mayor parte de las células presentes en el órgano en las diferentes zonas del epidídimo. Estas células son de tipo columnar con microvellosidades y se caracterizan por tener gran cantidad de retículo endoplásmico, un aparato de Golgi prominente y numerosas vesículas en su citoplasma. Su función es absorber fluidos provenientes de la *rete testis* y la secreción de diversas proteínas y aminoácidos (acuaporina 9, proteínas B/C, D/E, glutamato, carnitina) y otros compuestos como carbohidratos, lípidos, electrolitos, etc. Además, las células principales intervienen en la conversión a 5α -dihidrotestosterona y prostaglandinas que en conjunto parecen ser necesarias para la maduración espermática (figura 5; Robaire y Hermo, 1988; Jervis y Robaire, 2001). Otro tipo de célula en el epitelio lo constituyen las células basales que se caracterizan por presentar procesos tipo dendrita a lo largo de la membrana basal. Se considera que estas células regulan el estrés oxidativo (Gapp, 1987). También se ha sugerido que tienen actividad fagocítica ya que presentan inmunoreactividad para varios marcadores de macrófagos (Seiler et al., 2000). Otra propuesta es que pudieran también fungir como quimiorreceptores (Hinton, 1990).

Las células claras, localizadas en la superficie del epitelio, participan en la fagocitosis de la gota citoplásmica de los espermatozoides. Debido a que se ha

observado en su interior la presencia de componentes espermáticos, se ha sugerido que juegan un papel central en el proceso de espermiófagia (Turner, 1991).

Otra población celular que constituye al epitelio epididimal es conformada por las células estrechas, presentes solo en el segmento inicial del epidídimo. Se considera que son precursoras de las células claras y su función parece ser la degradación de partículas grandes (proteínas) que se encuentran en la luz tubular por endocitosis (Turner, 1991).

Las células halo se intercalan entre las células principales y han sido descritas como células de tipo linfocítico o monocítico ya que presentan marcadores específicos para estas células del sistema inmune. Se ha propuesto que constituyen parte de la barrera inmunológica en el órgano. Finalmente, se ha descrito un tipo de célula apical que tiene como característica un núcleo esférico y la presencia de gránulos con enzimas proteolíticas. Aunque su función es desconocida, se ha sugerido que protegen al espermatozoide de los radicales libres (Robaire y Hermo, 1988).

Por otro lado, los tipos de uniones que se presentan entre las células del epidídimo permiten la organización de una barrera especializada conocida como barrera hemato-epididimal que mantiene un ambiente adecuado a lo largo del órgano que permite a los espermatozoides madurar. Además, protegen a los espermatozoides del sistema inmune. Existen diferentes tipos de uniones entre las células del epidídimo: las uniones estrechas, las uniones adherentes y los desmosomas (Robaire y Hermo, 1988).

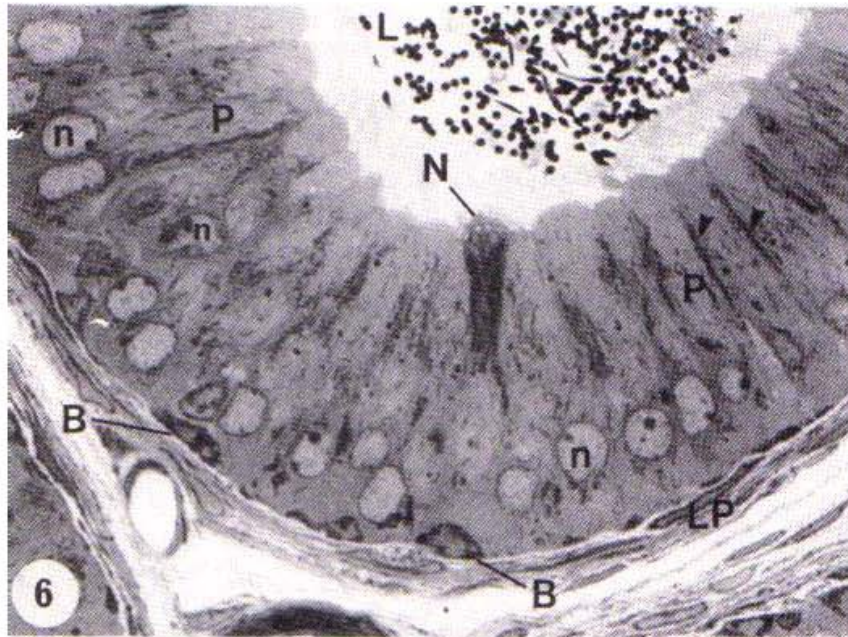


Figura 5. Fotomicrografía que muestra diferentes tipos celulares del epitelio epididimal: célula principal (P), célula basal (B) y célula estrecha (N). Se observan también algunos núcleos celulares (n), y la lámina propia (LP) (modificada de Robaire y Hermo, 1988).

2.3.1 Modelo de maduración espermática

El modelo más aceptado sobre el mecanismo que conduce a la maduración del espermatozoide en el epidídimo, propone que la testosterona producida por las células de Leydig y liberada a la luz tubular es transportada por la proteína PAA. Este complejo molecular (acarreador y testosterona) alcanza la luz del epitelio epididimal a través de la red testicular. Una vez en el epidídimo, la testosterona es transformada en 5α -dihidrotestosterona por la enzima 5α -reductasa presente en las células principales del epitelio de la cabeza del epidídimo. Se cree que este andrógeno promueve la secreción de factores proteicos que se liberan hacia la luz de los túbulos desde las células principales promoviendo los procesos de maduración espermática (figura 6; Esteban et al., 1997; Ricker et al., 1997). Además, este complejo molecular (testosterona-PAA) se mantiene unido a la membrana celular de los espermatozoides cuando llegan al

segmento inicial y conforme pasan por las otras regiones del epidídimo la cantidad de moléculas del complejo disminuye significativamente cuando los espermatozoides se encuentran en la cauda del epidídimo. En apoyo a este modelo, se ha mostrado que tanto la PAA como la testosterona son necesarias para permitir la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Esteban et al., 1997).

Jervis y Robaire (2001), mostraron que la ausencia de andrógenos inhibe la secreción de la proteína D/E producida por las células principales del epidídimo, la cual forma el 10% de proteínas totales presentes en la luz de los túbulos. Estudios adicionales utilizando antagonistas de hormonas androgénicas, han permitido observar una degeneración celular en diversas zonas del epitelio que se acompaña de alteraciones en los patrones de motilidad de los espermatozoides. Si bien el modelo descrito enfatiza el papel de los esteroides testiculares sobre la maduración espermática epididimal, es posible que factores locales pudieran participar en este proceso (El Badawi y Schenk, 1967; Queiroz et al., 2002), tal es el caso de la serotonina (5-HT) como se verá más adelante.

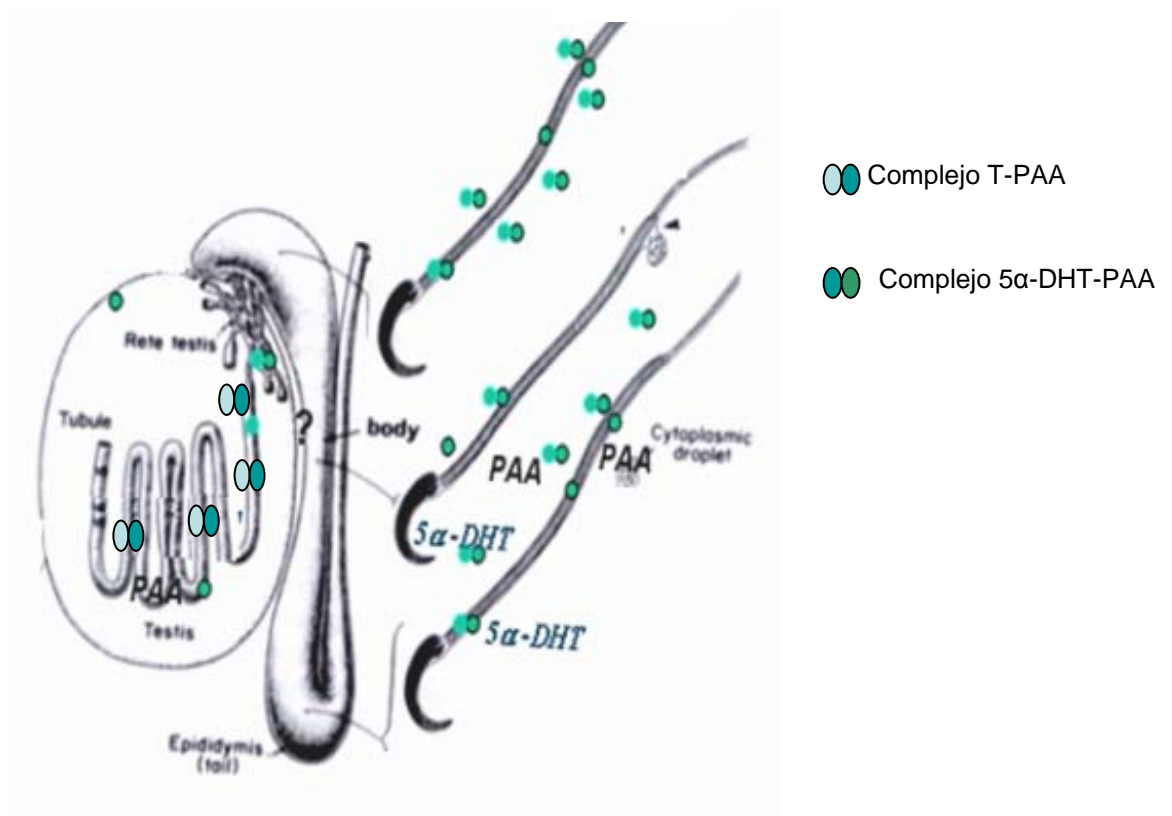


Figura 6. Maduración espermática. La 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT) transportada por la proteína acarreadora de andrógenos (PAA) favorece la secreción de proteínas del epitelio epididimal favoreciendo la maduración de los espermatozoides mientras permanecen en la luz de la cabeza y cuerpo epididimales (T-PAA= testosterona-proteína acarreadora de andrógenos; modificada de Robaire y Hermo (1988) y Esteban et al., (1997).

2.3.2 Cambios bioquímicos de la maduración espermática

Durante su tránsito por la luz del epidídimo, los espermatozoides modifican su metabolismo en respuesta a moléculas de superficie localizadas en la parte apical del epitelio epididimal o a las proteínas espermatóricas que son liberadas directamente a la luz tubular. Así, en este proceso de maduración, la superficie del espermatozoide juega un papel vital (Majumder et al., 1990). Estudios previos han mostrado que la tasa de metabolismo energético aumenta varias veces en los espermatozoides que se encuentran en la cauda o los que son eyaculados, con respecto a los espermatozoides que se encuentran en los testículos o en la cabeza del epidídimo (Majumder et al., 1990). Un proceso similar ocurre con los niveles de AMPc como resultado del aumento en la actividad de la enzima adenilato-ciclase y una disminución de la AMPc-fosfodiesterasa

(Hoskins y Vijayaraghavan, 1990). Otra variable importante durante la maduración de los espermatozoides se relaciona con el grado de acidez intraespermática. Mientras que el pH intraespermático en la cabeza del epidídimo es 5.84 ± 0.1 , en la cauda alcanza 6.27 ± 0.05 . Este cambio parece favorecer la fosforilación de la proteína dineína y por consiguiente la motilidad espermática (Majumder et al., 1990; Stephens y Prior, 1992). Las bases bioquímicas de la alcalinización celular dependiente de la maduración no son claras. Además, se han observado cambios en la concentración relativa de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, en la relación colesterol/fosfolípidos y en la simetría de la membrana plasmática de los espermatozoides durante su paso por el epidídimo (inserción de N-acetilglucosamina; Hoskins y Vijayaraghavan, 1990; Oko y Clermont, 1990).

2.3.3 Función de la inervación en el epidídimo

El epidídimo recibe inervación de fibras aminérgicas, colinérgicas y peptidérgicas que nacen en los ganglios mesentéricos inferior, pélvico y accesorio, además de recibir inervación del vago. Se ha visto que la inervación se distribuye predominantemente sobre la región caudal de este órgano. En la cabeza del epidídimo, el nervio espermático medio es el que suple la mayor inervación, mientras que en la cauda, el nervio espermático inferior es el que envía fibras en mayor número. Dicha inervación llega del ganglio pélvico mayor que es parte del plexo pélvico. La inervación es responsable de regular la peristalsis del epidídimo a través de fibras nerviosas que llegan a las células musculares lisas, las cuales se contraen periódicamente y más aún durante el proceso de la eyaculación. Estas fibras también inervan los vasos sanguíneos, y así modulan el flujo de sangre a lo largo de este órgano (Orgebin-Crist et al., 1975, 1976; Gerendai et al., 2001; Queiroz et al., 2002).

Estudios recientes han mostrado que se requiere de la integridad de la inervación para el adecuado mantenimiento de las funciones del epidídimo, así como de la maduración de los espermatozoides. De hecho, alteraciones farmacológicas y/o quirúrgicas de la inervación conducen a un alto grado de infertilidad (Queiroz et al., 2002) debido, muy probablemente, a cambios en los procesos de secreción de los factores involucrados. En apoyo a esta idea, se ha mostrado que la estimulación de la inervación adrenérgica permite la secreción de cloro en el epidídimo. También se ha descrito que la inervación adrenérgica participa en el acoplamiento de las contracciones del músculo liso, que facilitan el paso de los espermatozoides por la luz del tubo durante la eyaculación (Queiroz et al., 2002).

De esta manera, la regulación adrenérgica puede estar involucrada en mantener un microambiente óptimo que permita la maduración espermática y que incremente la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Queiroz et al., 2002). De acuerdo con ello, la denervación del epidídimo produce una pérdida de la motilidad, de la maduración y de la capacidad de fertilización espermática (Queiroz et al., 2002).

No obstante, otros factores adicionales modularían directa o indirectamente la maduración espermática. Como se mencionó anteriormente, uno de estos factores pudiera ser la 5-HT, ya que esta molécula regula diversas funciones importantes en el sistema reproductor de los machos, tanto a nivel central como periférico. Más adelante se describirán las razones para proponer porqué la 5-HT podría participar en la regulación de la maduración espermática y la funcionalidad epididimal.

2.4 Anatomía del conducto deferente y glándulas sexuales extramurales

El tiempo en que los espermatozoides pasan a lo largo del epidídimo varía entre especies (12 días para la rata), lo que depende principalmente de la actividad sexual del

macho (Orgebin Crist, 1975; Robaire y Hermo, 1988). La principal fuerza de propulsión de los espermatozoides dentro de la luz del epidídimo es de origen neuromuscular y depende de las contracciones rítmicas espontáneas generadas por las paredes del epidídimo, las cuales obedecen en parte a la presencia de andrógenos. La cauda del epidídimo recibe principalmente inervación adrenérgica (Mann y Lutwak-Mann, 1990). Esta misma inervación se continúa en el conducto deferente, permitiendo concentrar, almacenar y expulsar a los espermatozoides durante la eyaculación.

El conducto deferente se caracteriza por tener una mucosa de células epiteliales columnares simples y una capa gruesa de músculo liso. Además, presenta gran cantidad de fibras nerviosas (adrenérgicas, colinérgicas y peptidérgicas), las cuales permiten tener contracciones periódicas (peristalsis), mismas que acarrear a los espermatozoides en la parte del conducto deferente que ingresa a la cavidad abdominal hasta alcanzar la próstata (Robaire y Hermo, 1988; Mann y Lutwak-Mann, 1990). Finalmente, el conducto deferente se aproximan a la línea media y termina uniéndose con el conducto de la vesícula seminal, formando así los conductos eyaculatorios. Las vesículas seminales son dos conductos de fondo ciego, que se encuentran enrollados conformando una masa. Las características estructurales de este órgano son similares a las del conducto deferente. Las vesículas seminales producen una secreción amarillenta y viscosa, rica en fructuosa y prostaglandinas, que sirve de vehículo durante la deposición de los espermatozoides en la vagina. Su actividad está regulada por andrógenos (Coffey, 1988; Mann y Lutwak-Mann, 1990). Otras glándulas llamadas coagulantes también son pares y cada una está adosada a la pared ventral de las vesículas seminales. Por su apariencia habían sido descritas como los lóbulos anteriores de la próstata, posteriormente fueron identificadas como glándulas separadas (Hebel y Stromberg, 1986) y reciben el nombre de coagulantes por los estudios *in vitro* que han mostrado

que sus secreciones favorecen la coagulación del semen (Gotterer y Williams-Ashman, 1957).

Anatómicamente la próstata es una glándula compleja formada por varios lóbulos. Tiene una túnica externa fibrosa conocida como cápsula prostática (Coffey, 1988). La próstata rodea al cuello de la vejiga y a la porción proximal de la uretra. Su funcionamiento depende de las hormonas sexuales masculinas. Produce un líquido incoloro rico en ácido cítrico, fosfatasa alcalina y fibrolisina. Estas secreciones sirven de vehículo para transportar a los espermatozoides y dar volumen al eyaculado (Coffey, 1988; Mann y Lutwak-Mann, 1990). El tejido glandular de la próstata drena su secreción por una veintena de conductillos excretores, los conductos prostáticos, los cuales se abren en los senos prostáticos dispuestos a ambos lados de la cresta uretral, en la uretra prostática (Coffey, 1988).

Otras glándulas sexuales extramurales son las bulbouretrales, dos pequeños órganos que producen una secreción mucoide y transparente que limpia y lubrica a la uretra peneana. Estas se sitúan en la porción proximal del pene, donde drenan mediante conductos hacia la uretra (Oko y Clermont, 1990).

Las diferentes especies de mamíferos presentan diferencias en la forma, tamaño y número de glándulas sexuales extramurales. Por ejemplo, las vesículas seminales son grandes y prominentes en la rata, mientras que en el gato y en el perro no están. La próstata está presente en la mayoría de los mamíferos, pero puede estar compartimentalizada, como en el caso de la rata que presenta varios lóbulos (Coffey, 1988; Oko y Clermont, 1990).

2.5 Fisiología sexual masculina

El pene contiene a la uretra y sirve como órgano para la cópula. Está constituido por los cuerpos cavernosos, situados dorsolateralmente, y por el cuerpo esponjoso que rodea la uretra y termina en una posición distal agrandada que constituye al glande. La piel que lo cubre es laxa lo que le confiere elasticidad, excepto en el glande donde está firmemente adherida.

La erección se produce por la llegada de la sangre de los capilares de las trabéculas y de las arteriolas a los espacios cavernosos del tejido eréctil de la raíz y cuerpo del pene. La tumescencia peneana se debe no sólo a la entrada masiva de sangre al pene, sino también a la oclusión de las venas que lo irrigan. Además, en la rata se ha mostrado, mediante la inserción crónica de electrodos en los músculos perineales, que la actividad electromiográfica del músculo isquiocavernoso ocurre durante las intromisiones, porque aumenta la rigidez del pene y que la contracción del músculo bulboesponjoso aumenta la rigidez peneana durante la erección. El primero se inserta en la crura peneana, el segundo rodea al bulbo vascular del pene (Holmes et al., 1991).

La inervación eferente del pene llega hasta las trabéculas y a los pequeños vasos sanguíneos. La inervación simpática y parasimpática aseguran el mantenimiento de la erección y la presentación de la eyaculación (Coffey, 1988; Mann y Lutwak-Mann, 1990).

La eyaculación es dada por un reflejo espinal, que produce contracciones musculares desde la cauda del epidídimo. El semen es el líquido expulsado durante el orgasmo masculino, es una mezcla de espermatozoides y diversas secreciones provenientes de las glándulas antes mencionadas. La cantidad de semen varía

dramáticamente entre las especies, por ejemplo, en el cerdo, el volumen del eyaculado es de aproximadamente 250 ml, para el caballo 70 ml, el perro 9 ml, el toro 4 ml. También, entre las especies, existen variaciones bioquímicas en la composición de las secreciones glandulares que constituyen el semen (Coffey, 1988; Mann y Lutwak-Mann, 1990). Las secreciones glandulares contienen altas concentraciones de sustancias biológicas como las prostaglandinas (200 µg/ml), fructuosa, ácido cítrico, poliaminas (espermina, espermidina), altas concentraciones de zinc, etc. Por otra parte, las razones fisiológicas y evolutivas de las variaciones de las secreciones en los componentes según las especies no han sido comprendidas (Coffey, 1988).

2.6 Serotonina: generalidades sobre su metabolismo

El L-Trp es uno de los 20 aminoácidos que necesitan los organismos vivos, es un aminoácido esencial, la única manera de conseguirlo es a través de la dieta (Verbeuren, 1989). Existen procesos fisiológicos importantes en los que el L-Trp participa de manera directa, uno de ellos es en la síntesis de 5-HT (5-hidroxi-triptamina) la 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 (figura 7; Fitzpatrick, 1999).

La síntesis de 5-HT a partir de L-Trp ocurre mediante dos reacciones, la primera es catalizada por la enzima L-triptofano-5-monooxigenasa (EC 1.14.16.4; triptofano-5-hidroxilasa; TPH), la cual constituye el paso limitante de la reacción. La enzima TPH transforma al L-Trp en 5-hidroxitriptofano utilizando oxígeno molecular y como cofactor a la L-eritro-tetrahidrobiopterina. En esta reacción, un átomo de oxígeno es insertado en la posición 5 del L-Trp para formar 5-hidroxitriptofano y otro átomo es reducido a agua. El cofactor tetrahidrobiopterina dona los electrones necesarios y el quinonoide dihidrobiopterina 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-hidroxitriptofano en 5-HT y utiliza como cofactor al fosfato de piridoxal (figura 7; Cooper et al., 1996; Fitzpatrick, 1999).

La TPH es miembro de la 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 enzima TPH ha sido relacionada de manera exclusiva al sistema serotoninérgico del cerebro, ésta se encuentra ampliamente distribuida en todo el organismo. Recientemente se han caracterizado dos diferentes genes que codifican para dos isoformas de la enzima TPH, una denominada central (TPH2) y la otra periférica (TPH1) (Walter et al., 2003). Ambas isoformas varían en sus propiedades cinéticas, peso molecular y solubilidad (Walter et al., 2003; McKinney et al., 2005). Las diferencias entre la TPH1 y la TPH2 tienen importantes implicaciones para la regulación de la producción de 5-HT en el cerebro y en los órganos periféricos.

La mayoría de las funciones de la 5-HT son llevadas a cabo mediante su interacción con receptores específicos que se encuentran en la membrana plasmática celular (Fanburg y Lee, 1997; Pauwels, 2000; Azmitia, 2001; Hannon y Hoyer, 2002).

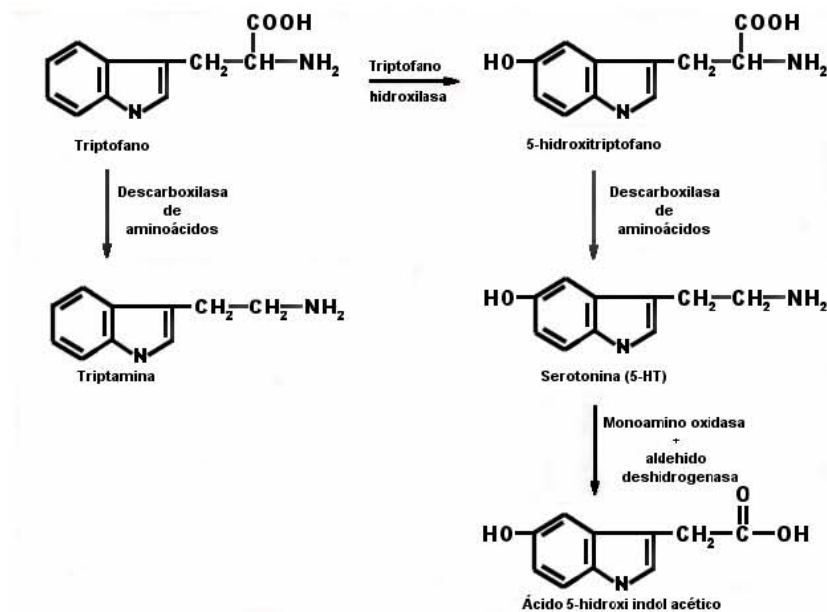


Figura 7. Vía metabólica de la síntesis de serotonina (5-HT). La enzima triptofano-5-hidroxilasa convierte al L-triptofano en 5-hidroxitriptofano, el cual sufre una descarboxilación por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos para dar origen a la serotonina. La descarboxilasa puede actuar directamente sobre el triptofano para dar origen a la triptamina. La monoamino oxidasa junto con la aldehído deshidrogenasa degradan a la 5-HT en ácido 5-hidroxi-indolacético (modificada de Cooper et al., 1996).

Estos receptores serotoninérgicos han sido divididos 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 (receptores metabotrópicos; figura 8).

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 adrenal (Balkovetz et al, 1989; Blakely et al, 1991; Lesch et al, 1993). Si bien en el cerebro la recaptura mediada por el transportador de 5-HT (5-HT_T) constituye el principal mecanismo de inactivación y reutilización de 5-HT, la presencia del transportador en

estructuras no nerviosas sugiere que esta proteína puede tener otras funciones en el resto del organismo, como se ha mostrado en los procesos de remodelación de los vasos sanguíneos (Collin et al, 1996; Kato et al, 1999). 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; figura 7). De manera alternativa y de acuerdo con el estado metabólico del organismo, el acetaldehído intermediario puede ser reducido por una aldehído-reductasa-dependiente de NADH para formar el alcohol 5-hidroxitriptofol (Azmitia et al., 2001).

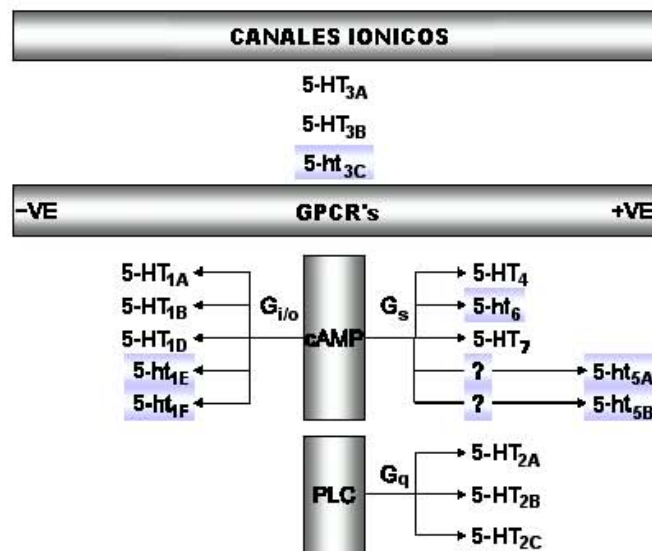


Figura 8. Esquema que ilustra la clasificación actual de los receptores a 5-hidroxitriptamina. Los subtipos ilustrados con minúsculas y en cajas sombreadas designan receptores cuya función en sistemas nativos no ha sido confirmada. GPCR's, receptores acoplados a proteínas G; cAMP, 3'-5' monofosfato de adenosina cíclico; PLC, fosfolipasa C; -VE, acción negativa; +VE, acción positiva (adaptado de Hannon y Hoyer, 2002).

Además de ser uno de los principales neurotransmisores o neuromoduladores del sistema nervioso central y de funcionar como hormona a nivel periférico, la 5-HT constituye uno de los mensajeros más utilizados en los mecanismos inductores de señales a nivel celular. La activación de las vías celulares asociadas con la 5-HT promueve la contracción de la musculatura lisa y modifica la permeabilidad de vasos sanguíneos (túnicas endoteliales y musculares), regula procesos de secreción y ósmosis (células enterocromafines del sistema digestivo), actúa como mediador de los procesos de inflamación, agregación plaquetaria y en la coagulación sanguínea (mastocitos y plaquetas), regula la contracción del músculo liso, la respuesta sexual y la ingesta (Azmitia et al., 2001). En el sistema nervioso central, se ha propuesto que la 5-HT participa en la etiología de enfermedades mentales como la depresión, ansiedad, esquizofrenia, entre otras (Celuch y Sloley, 1988; Sanders-Bush y Mayer, 1996; Azmitia et al., 2001).

2.6.1 Funciones de la serotonina sobre el sistema reproductor masculino

En el sistema reproductivo de los mamíferos, la 5-HT regula directamente algunas de sus funciones. La disminución de 5-HT a nivel central afecta al eje hipotálamo-hipófisis-gónada de ambos sexos, retardando la pubertad e interrumpiendo los procesos involucrados en la gametogénesis (Naumenko and Shiskina, 1978; Shiskina and Dígaló, 2000). También, se ha documentado que los bajos niveles de 5-HT alteran el comportamiento sexual (Malmnäs, 1974; Naumenko y Shiskina, 1978; Shiskina y Dígaló, 2000), la espermatogénesis y la síntesis de andrógenos (Bocabella et al., 1962; Cockett et al., 1980; Campos et al., 1990; Tinajero et al., 1993; Aguilar et al., 1995; Frungieri et al., 1999).

La 5-HT, no solamente pudiera regular las funciones reproductivas de manera indirecta, a través de sus efectos a nivel hipotalámico, sino que pudiera tener acciones locales e incluso ser producida en los órganos reproductivos. De hecho, la 5-HT regula el flujo de sangre en el testículo (Collin et al., 1996), la contracción de los conductos eferentes (Hay y Wadsworth, 1982) y la liberación de los iones Cl^- y HCO_3^- en el epitelio epididimal mediante la activación de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2B} (Leung et al., 1999). Se ha observado que la concentración testicular de 5-HT aumenta en la época reproductiva en los animales estacionales como el hámster (Frungeri et al., 1999). Además se ha propuesto que la 5-HT regula de forma autocrina la liberación de testosterona en el testículo y que es liberada por las células de Leydig (Tinajero et al., 1993; Tijmes et al., 1996; Frungieri et al., 1999). También se ha encontrado que en algunos mamíferos como la rata y la zarigüeya, la cabeza del epidídimo tiene una de las concentraciones más altas de 5-HT, producida probablemente por las células mioepiteliales y mastocitos (Kormano y Penttila, 1968; Anderson y Paparo., 1977; Anderson et al., 1979). Asimismo, la 5-HT está presente en los conductos deferentes y su concentración es mayor en la porción cercana al epidídimo (Celuch y Sloley, 1988; Monroy et al., 2003; Pinilla et al., 2003). Finalmente, en hombres se ha determinado que los niveles altos de 5-HT en el semen y en la sangre se relacionan con infertilidad y/o la esterilidad (Gonzales et al., 1989; Gonzales et al., 1992).

Por otro lado, se ha mostrado que los espermatozoides expresan receptores para 5-HT durante la reacción acrosomal *in vitro* (Meizel y Turner, 1983). Se reconoce que la 5-HT estimula la motilidad espermática a través de activar el movimiento flagelar, promoviendo la fosforilación de la proteína dineína presente en el axonema a través de un mecanismo mediado por AMPc, aumentando la capacidad de fertilización, al menos en espermatozoides de invertebrados (Bandivdekar et al., 1992). Además se han

identificado receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₃ en espermatozoides de especies de invertebrados (moluscos bivalvos y erizo de mar; Parisi et al., 1984; Bandivdekar et al., 1992). En especies de mamíferos tales como el conejo, se han identificado receptores del grupo 2 de 5-HT en la cabeza y en el flagelo de los espermatozoides (Joung y Laing, 1990).

Con estos antecedentes y dada la posible importancia de la 5-HT en la biología reproductiva de los machos, en este trabajo, en una primera etapa se caracterizaron los elementos citológicos que pudieron ser las fuentes locales y blancos de la 5-HT en la cabeza del epidídimo de la rata adulta. En una segunda etapa se evaluaron los parámetros bioquímicos y las variaciones del sistema de 5-HT por la administración de para-clorofenilalanina (*p*-CPA). Finalmente, en la tercera etapa se analizaron las características bioquímicas del sistema serotoninérgico dependiendo de la experiencia sexual de las ratas macho.

3. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo representa el inicio de una línea de investigación que pretende establecer el papel de la 5-HT epididimal en los procesos de maduración espermática y en la eficacia reproductiva. Si la 5-HT tiene efectos sobre uno o ambos procesos, quizá este conocimiento podría ser utilizado para el desarrollo de técnicas no hormonales, locales para el control de la fertilidad de los machos.

4. HIPÓTESIS

4.1 De la etapa I

Existe un sistema serotoninérgico intrínseco en la cabeza del epidídimo de la rata adulta.

4.2 De la etapa II

La administración de un inhibidor de la actividad de la enzima TPH, la para-clorofenilalanina disminuye la síntesis y concentración de 5-HT en la cabeza del epidídimo.

4.3 De la etapa III

La concentración de 5-HT es mayor en ratas con experiencia sexual monogámica que en las ratas inactivas sexualmente.

5. OBJETIVOS GENERALES

5.1 De la etapa I

1) Identificar con técnicas histológicas y bioquímicas los componentes celulares que integran al sistema serotoninérgico en la cabeza del epidídimo de la rata adulta.

5.2 De la etapa II

2) Describir los efectos de la para-clorofenilalanina sobre los niveles de serotonina y de la actividad de la enzima TPH.

5.3 De la etapa III

3) Evaluar los niveles de serotonina y la actividad de la enzima TPH en el epidídimo en las ratas con experiencia sexual monogámica y en las ratas sin experiencia sexual.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6.1 De la etapa I

- 1) Cuantificar la concentración de serotonina y la actividad de la enzima TPH en la cabeza del epidídimo de ratas adultas, mediante cromatografía líquida de alta resolución.
- 2) Determinar la localización de la enzima TPH, serotonina, sus receptores y su transportador en el epitelio de la cabeza del epidídimo de ratas adultas, utilizando la técnica de inmunocitoquímica.
- 3) Determinar la presencia y posibles variaciones en la expresión de la enzima TPH en homogenados de la cabeza de epidídimo de ratas adultas, mediante técnica de inmunotransferencia de Western blot.

6.2 De la etapa II

- 4) Evaluar en homogenados de la cabeza del epidídimo de ratas adultas, los efectos del tratamiento con para-clorofenilalanina sobre la concentración de serotonina y la actividad de la enzima TPH mediante cromatografía líquida de alta resolución.

6.3 De la etapa III

- 5) Determinar la concentración de serotonina y la actividad de la enzima TPH en homogenados de la cabeza del epidídimo de ratas adultas con experiencia sexual monogámica y sin experiencia sexual, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con edades de 120 (sin actividad sexual) y 180 días de edad (con experiencia sexual monogámica y sin experiencia sexual). Los animales fueron colocados bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12/12 horas), con libre acceso de agua y alimento. Para su sacrificio, los animales 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 vaginal parietal y poder liberar al epidídimo junto con el testículo.

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 y cauda y se congelaron por inmersión en 2-metilbutano pre-enfriado con hielo seco. Un procedimiento similar se utilizó para obtener y congelar muestras del tallo cerebral, lugar en donde se localizan las neuronas serotoninérgicas. Después de ser congeladas, las muestras se almacenaron en un ultra congelador a -75°C , hasta efectuar los experimentos morfológicos y bioquímicos.

7.2 Cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar actividad de la enzima triptofano-5-hidroxilasa

Los tejidos obtenidos fueron pesados en una balanza analítica y homogenizadas en tres volúmenes de su peso en una solución amortiguadora (Tris·HCl, pH 7.4). El homogenado se centrifugó y se colectó el sobrenadante para realizar como primer paso la determinación de las proteínas totales (Lowry et al., 1951). 300 μg de la proteína de

cada una de las muestras se utilizaron para el ensayo de actividad *in vitro* de la enzima TPH (ver anexo a). 20µl de la reacción de incubación fueron inyectados en un sistema de HPLC. Las longitudes de excitación y de emisión que se utilizaron fueron de 280 y 340 nm, respectivamente. En nuestras condiciones, los tiempos de retención fueron de 2.5 minutos para 5-hidroxitriptofano y de 5 minutos para L-Trp. (figura 9).

7.3 Cromatografía líquida de alta resolución para determinar la concentración de serotonina

Las muestras de la cabeza del epidídimo fueron pesadas y homogenizadas en una solución amortiguadora de HClO₄ 4mM más meta-bisulfito de sodio 6mM en tres volúmenes de su peso en una relación 1:3 (g/v), centrifugadas y filtradas para obtener el sobrenadante (Manjarrez et al., 1988; 1994). 20 µl de cada muestra fueron inyectados en el sistema de HPLC. Las longitudes de excitación y de emisión que se utilizaron fueron de 280 y 340 nm, respectivamente. En nuestras condiciones, los tiempos de retención fueron de 4-5 minutos para el 5-HIAA, 7-8 para el L-Trp y entre 8-10 minutos para 5-HT (ver anexo b).

7.4 Inmunocitoquímica para marcadores serotoninérgicos

Las muestras congeladas de la región de la cabeza del epidídimo fueron colocadas en un criostato para obtener cortes longitudinales de 12 µm de grosor en promedio y ser montadas en laminillas preparadas con gelatina. Se fijaron las muestras con paraformaldehído al 4% en un amortiguador de fosfatos (PB; 0.1 M, pH 7.4) por 25 minutos (para la enzima TPH y el transportador 5-HT_T) o por 4 horas (para 5-HT y receptores de 5-HT: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃). Se colocaron los cortes en suero de bloqueo (3% de albúmina bovina en amortiguador de fosfatos) y se agregó

anticuerpo primario diluido en suero de bloqueo toda la noche a 4°C (ver anexo c). Se lavaron y se colocó inmediatamente el anticuerpo secundario diluido en suero de bloqueo durante 2 horas (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. Los cortes de las laminillas fueron incubadas con el complejo avidina-peroxidasa por 1.50 horas a temperatura ambiente, lavadas tres veces con amortiguador de fosfatos, y la actividad de peroxidasa fue revelada con un kit comercial de 3,3-diaminobencidina y peróxido de hidrógeno de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor (Vector Laboratories). Se capturaron las fotomicrografías tomadas con una cámara digital (Coolpix995, Nikon) y convertidas a escala de grises con el programa Adobe Photoshop® (ver anexo c).

7.5 Inmunotransferencia por Western blot para la enzima triptofano-5-hidroxilasa

Se homogenizaron las muestras en frío utilizando Tris-HCl, pH 8.0 con amortiguador de lisis e inhibidores de proteasas endógenas (ver anexo d). Las muestras fueron centrifugadas durante 30 minutos. Por un lado, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), y por el otro se cargaron las muestras previamente calentadas en el gel de Sodiodecil sulfato-poliacrilamida al 10% de 0.75 mm de grosor. Se utilizó un voltaje diferente para cada fase de corrida, se montó el gel en la membrana de nitrocelulosa y se transfirieron las proteínas de los geles toda la noche a 25 V en agitación continua en un cuarto frío. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fue colocada en suero de bloqueo. Se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal contra la enzima TPH (Sigma) a una dilución 1:7500 en solución de bloqueo. Al día siguiente, se colocó el anticuerpo secundario anti-ratón (Chemicon) a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo. Las membranas se incubaron

con el sistema ABC Elite de Vector Labs. durante 1 hora. Se realizaron tres lavados con una solución amortiguadora durante 5 minutos cada uno y se realizó el revelado de las membranas por quimioluminiscencia con el sistema ECL de Amersham de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ver anexo d).

7.6 Tratamiento de ratas con para-clorofenilalanina

A las ratas se les administró el inhibidor para la enzima TPH, la para-clorofenilalanina (*p*CPA) tres inyecciones (una cada 72 horas; 300 mg/kg/peso vivo; ip). En las ratas control se inyectó solución salina únicamente. Se sacrificaron el día 12 de tratamiento y se obtuvieron los epidídimos y tallo cerebral para determinar la concentración de 5-HT y actividad de la enzima TPH (ver anexo e). A los machos también se les determinó el peso corporal, testicular y epididimal.

7.7 Ratas con y sin experiencia sexual

Ratas con experiencia sexual.- Machos que cohabitaron durante todo el experimento con una hembra. Cada macho fue colocado con su pareja en una jaula jumbo de acrílico. Después de algunos apareamientos, la hembra preñada permaneció con el macho durante toda la gestación y lactancia. Las crías lactantes, una vez destetadas fueron removidas de la jaula. La hembra al presentar de nuevo el ciclo estral quedaba otra vez preñada. Este esquema se repitió al menos cinco veces. De este modo, cada macho fue el padre de cinco camadas de 8 crías en promedio.

Ratas sin experiencia sexual.- Machos que nunca tuvieron acceso a las hembras a lo largo de su vida, por ello no adquirieron experiencia sexual.

7.8 Análisis estadístico

Los datos se expresan como promedio \pm SEM. La comparación estadística fue realizada mediante la prueba de t de student (Sigma Stat). Los valores de $p < 0.0001$, $p < 0.01$ y $p < 0.05$, fueron aceptados como significativos de acuerdo con los valores obtenidos de cada experimento.

8. RESULTADOS

De la etapa I

8.1 Descripción del sistema serotoninérgico de la cabeza del epidídimo

La figura 9a muestra un cromatograma representativo de una corrida de estándares (línea de color negro) donde se observan las alturas de los picos (unidades de intensidad relativa) y los tiempos de retención del 5-HIAA, del L-Trp y de la 5-HT. La línea en rojo corresponde a un cromatograma de una muestra representativa de la cabeza del epidídimo. Como se puede observar los tiempos de retención de las moléculas analizadas en la muestra coinciden con los de los estándares correspondientes. Nótese la presencia de los picos de retención rápida de estas moléculas. Aunque no sabemos la identidad de éstas, es posible que se trate de otras aminas biogénicas como la dopamina. En la figura 9b se muestra la concentración de 5-HT en la cabeza y en la cauda del epidídimo. Dicha concentración fue 6 veces mayor en la cabeza que en la cauda del epidídimo edad ($p < 0.0001$).

8.2 Producción de serotonina a través de la vía clásica de síntesis mediada por triptofano-5-hidroxilasa: presencia de dos isoformas

La actividad de la enzima limitante en la síntesis de 5-HT, la TPH, fue medida mediante la cuantificación cromatográfica de 5-hidroxitriptofano después de su obtención a partir de L-Trp en homogenados de la cabeza del epidídimo. En general, se detectó consistentemente la actividad de esta enzima a los 120 días de edad en las ratas (figura 10a), lo que confirma que la enzima está presente en la cabeza del epidídimo y que es activa. El nivel de actividad alcanzó una producción mayor a 0.965 nM/mg de proteína/hora (figura 10b).

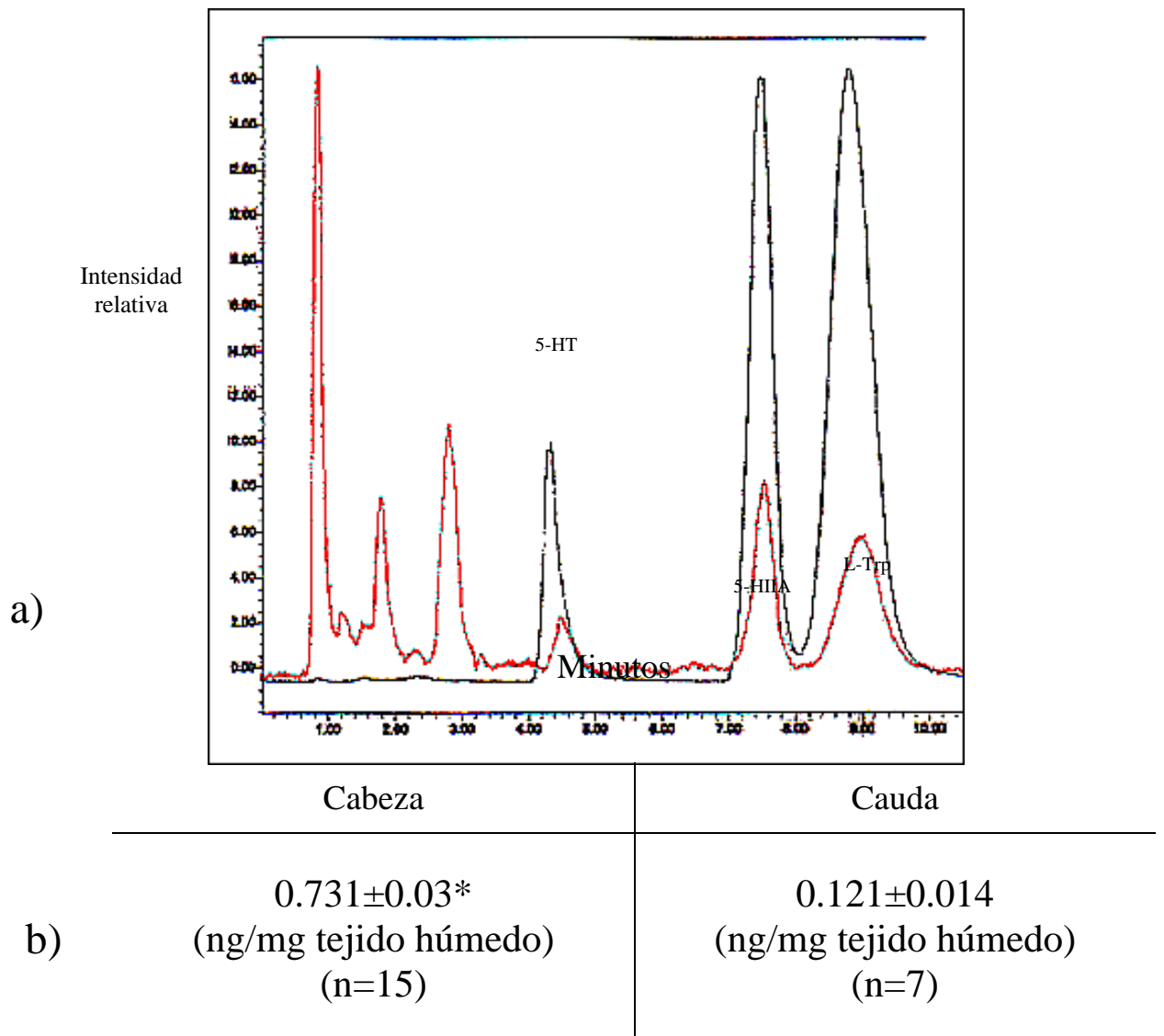


Figura 9. a) Cromatograma representativos del estándar (línea negra) y de una muestra obtenida de la cabeza del epidídimo (línea roja) en una rata adulta. Nótese que el tiempo de retención para la 5-HT, el ácido 5-hidroxiindolacético y el L-Trp de la muestra corresponden con aquellos definidos mediante el uso de los estándares correspondientes. b) Concentración de 5-HT en la cabeza y la cauda del epidídimo de ratas de 120 días de edad. * $p < 0.0001$

Con el propósito de evaluar si la enzima TPH en el epidídimo es similar a la descrita en el tallo cerebral, se realizaron experimentos de Western blot utilizando muestras de este ambos órganos de ratas de 120 días de edad. A diferencia de lo que ocurre en el tallo cerebral en donde se observó una banda de 48kDa, en el epidídimo se

observaron dos bandas inmunoreactivas a la enzima TPH (48 y 51kDa), confirmándose así la presencia de la enzima TPH en la cabeza del epidídimo (figura 10b).

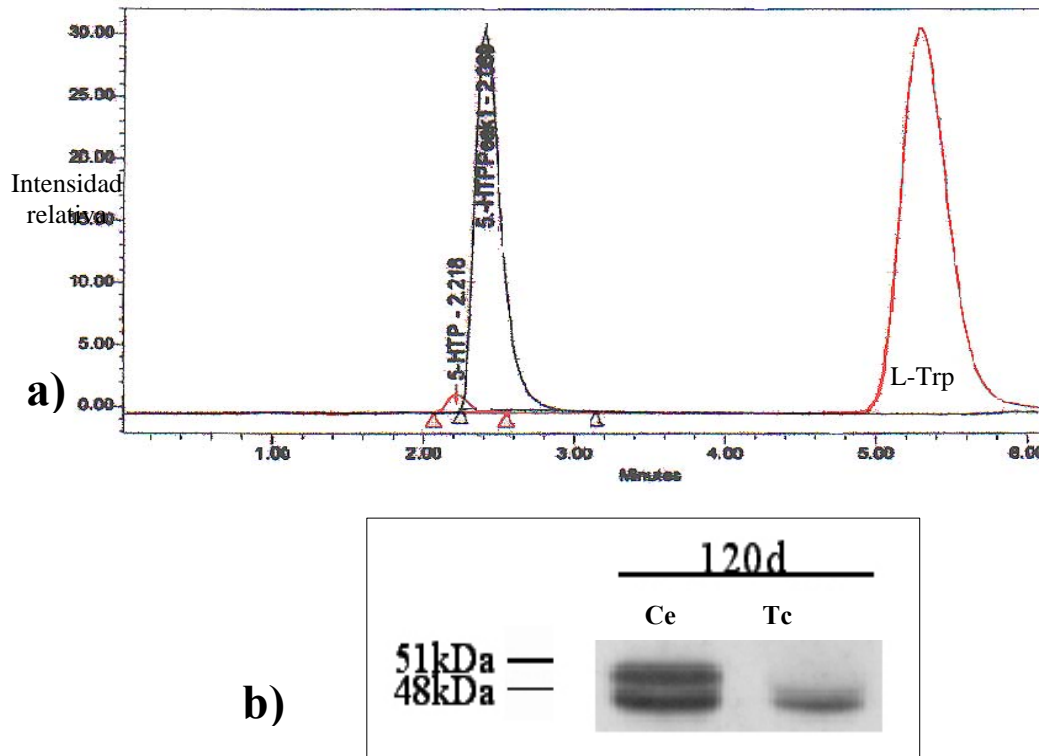


Figura 10. a) Cromatograma representativo que ilustra la presencia de 5-hidroxitriptano (5-HTP) en homogenados de cabeza de epidídimo incubados con L-Trp. La línea negra representa el estándar; la roja, la muestra. b) Western blot inmunoteñido para la enzima TPH. Se observan dos bandas con diferente peso molecular (48 y 51kDa) en la cabeza del epidídimo (Ce), mientras que en el tallo cerebral (Tc), utilizado como control, se observó solo una banda de 48kDa (n=6).

8.3 Elementos celulares inmunoreactivos para serotonina, su transportador y sus receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT₃

Los estudios de inmunocitoquímica para el anticuerpo contra 5-HT mostraron células principales con gránulos intracitoplásmicos (figura 11a), células neuroendocrinas de tipo cerrado con proyecciones parecidas a dendritas (figura 11b). También en el intersticio epididimal se localizaron células parecidas a mastocitos (figura 11c). Las células principales fueron positivas a la enzima TPH (figura 11d); los mastocitos y

células endoteliales, para el 5-HT_T (figura 10b y c). Para la enzima TPH se observó inmunoreactividad en el borde superficial de las células epiteliales principales. La inmunoreactividad para el 5-HT_T se observó en las células de las paredes de los vasos sanguíneos y en algunas zonas de la región apical del epitelio tubular. Algunos mastocitos localizados en el intersticio intertubular también presentaron inmunoreactividad para el 5-HT_T (recuadro de la figura 11e). El control de la técnica se realizó omitiendo el anticuerpo primario (figura 11f).

La inmunocitoquímica permitió identificar receptores para 5-HT, las células endoteliales y epiteliales mostraron inmunoreactividad para 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT₃, mientras que los espermatozoides presentaron inmunoreactividad solo para 5-HT_{2A} y 5-HT₃. Para 5-HT_{1A} la inmunoreactividad fue observada en las células principales (figura 12a). Por otro lado, células epiteliales mostraron inmunoreactividad para el receptor 5-HT₃ (figura 12b). Numerosas células localizadas en las paredes vasculares mostraron inmunotinción para el receptor 5-HT_{1B} (figura 12c). Así mismo, algunos mastocitos presentaron marca para este receptor (figura 12d). Las células inmunoreactivas para este receptor en los vasos sanguíneos se encuentran cercanas a los túbulos. Además, se observó marca positiva para el receptor 5-HT_{2A} en el epitelio epididimal (figura 12e). El flagelo de los espermatozoides también mostró marca positiva para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃ (figura 12b).

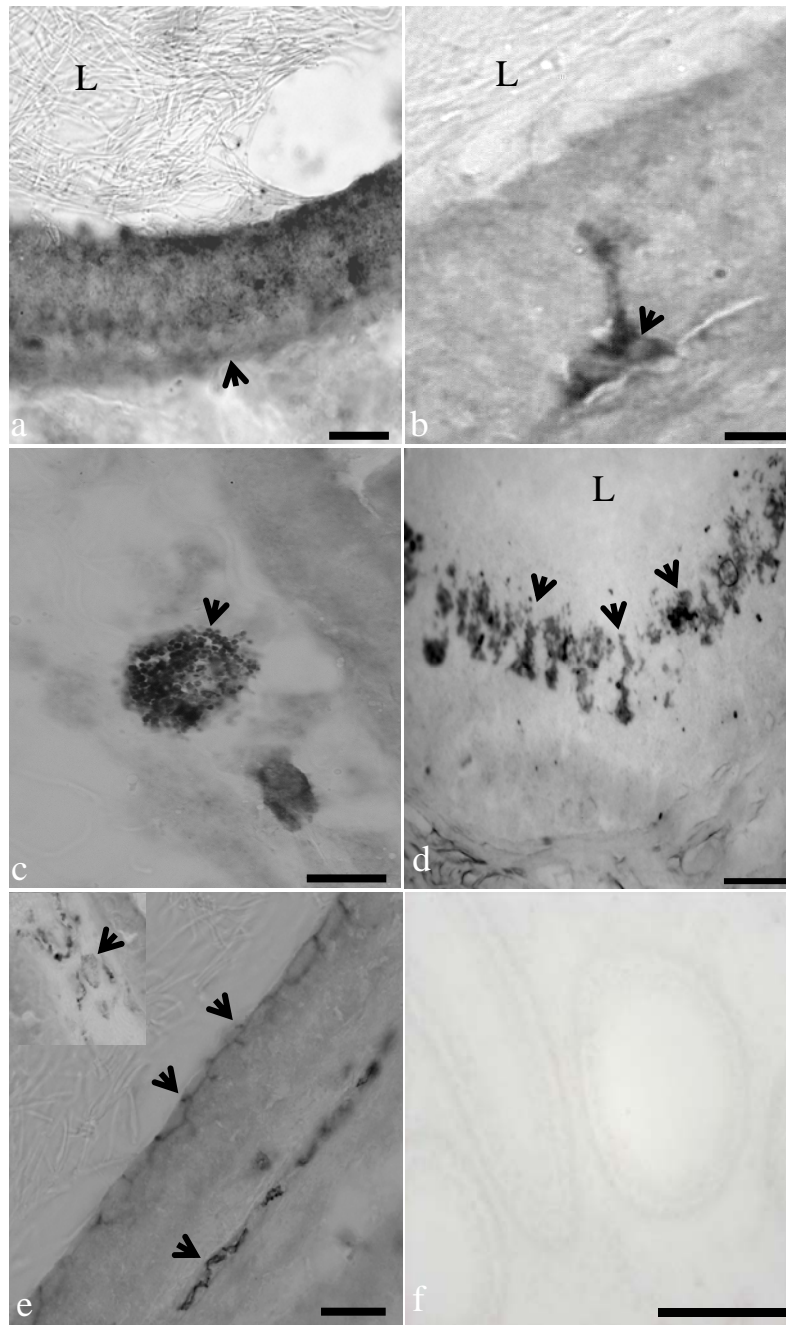


Figura 11. Imágenes digitales de cortes longitudinales de la cabeza del epidídimo de rata adulta. a) Las flechas muestran inmunoreactividad para 5-HT en gránulos de células principales. b) Célula neuroendocrina localizada en la base del epitelio con prolongaciones parecidas a dentritas dirigidas a la luz tubular (flecha). c) mastocito positivo en la región intersticial del tejido d) Se observa la distribución de la marca para la enzima TPH en el epitelio que se localiza en la zona apical de las células principales (flechas). e) Se muestra la marca del 5-HT_T en el borde superficial del epitelio, en vasos sanguíneos que corren por el intersticio del tejido y en mastocitos (ver recuadro; flechas). f) Se ilustra un corte panorámico del epitelio tubular de la cabeza de epidídimo como control de la técnica. L=luz del túbulo; vs=vaso sanguíneo. Escalas en a,c e=20µm; b, d=10µm; f=100µm.

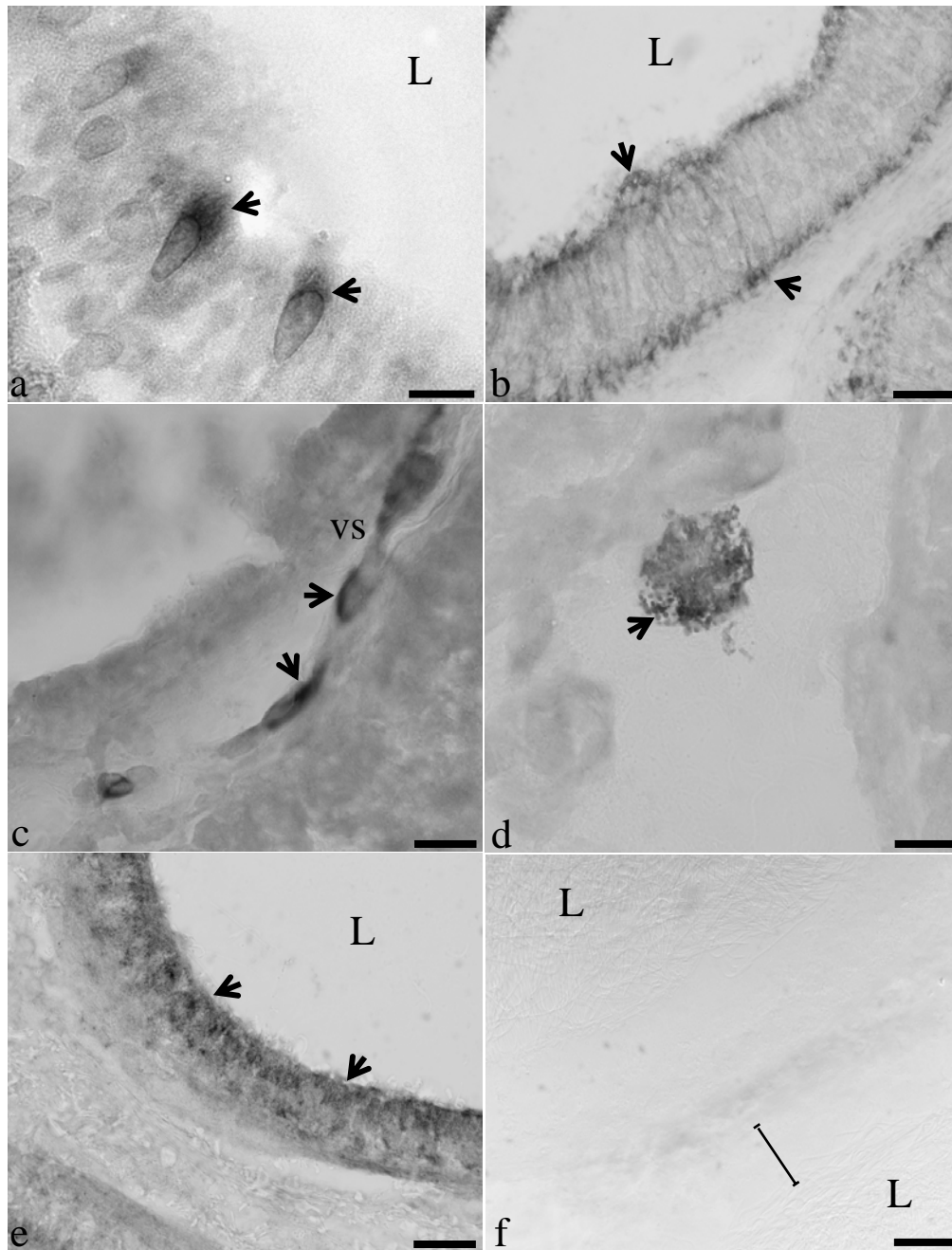


Figure 12 . Imágenes digitales que muestran la localización de diferentes tipos de receptores para serotonina en el epitelio de la cabeza del epidídimo de ratas adultas. a) Células apicales inmunoreactivas para el receptor 5-HT_{1A} en el epidídimo. b) Inmunoreactividad homogénea en la base y superficie del epitelio del epidídimo para el receptor 5-HT₃ (cabezas de flecha). c) Células endoteliales con inmunoreactividad positivas para el receptor 5-HT_{1B} localizados en el intersticio del epitelio epididimal (cabezas de flecha). d) Mastocito con gránulos inmunoreactivos para el receptor 5-HT_{1B} (cabeza de flecha). e) Células epiteliales con marca positiva para el receptor 5-HT_{2A}, localizada en el borde superficial. f) Túbulos de la cabeza del epidídimo sin marca positiva (control de la técnica omitiendo el anticuerpo primario). L=luz tubular; vs=vaso sanguíneo. Escala de barra: a) 10µm; b-f)=20µm.

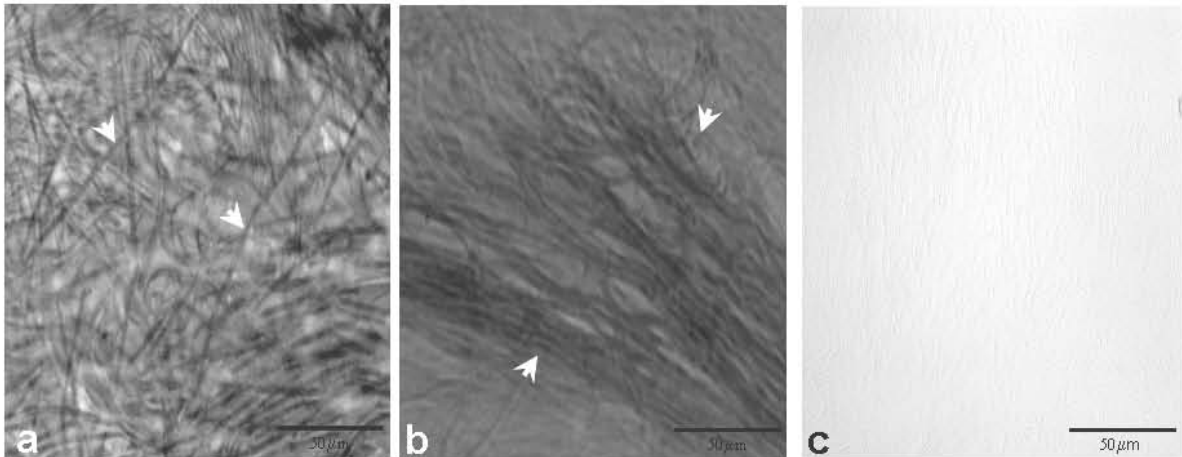


Figura 13. Fotomicrografías que muestran espermatozoides localizados en la luz tubular en la cabeza del epidídimo de ratas adultas. a) Inmunotinción para el receptor 5-HT_{2A}. b) Inmunotinción para el receptor 5-HT₃. c) Se observan espermatozoides sin teñir de una muestra control.

De la etapa II

8.4 Efectos de la para-clorofenilalanina sobre el sistema serotonérgico de la cabeza del epidídimo

Un inhibidor que ha sido utilizado para depletar la síntesis de 5-HT a nivel central es la *p*CPA. Como se muestra en la figura 14 el tratamiento disminuyó significativamente la concentración de 5-HT en el tallo cerebral y en el epidídimo alrededor del 40% en relación con los animales control. Por otra parte, la actividad de la enzima TPH en los homogenados de la cabeza del epidídimo disminuyó significativamente en un 69% en las ratas tratadas (figura 15). Sin embargo, el tratamiento no alteró el peso corporal, ni el peso epididimal ni el peso testicular (Tabla 1).

Efecto del *p*-CPA sobre la concentración de 5-HT en epidídimo

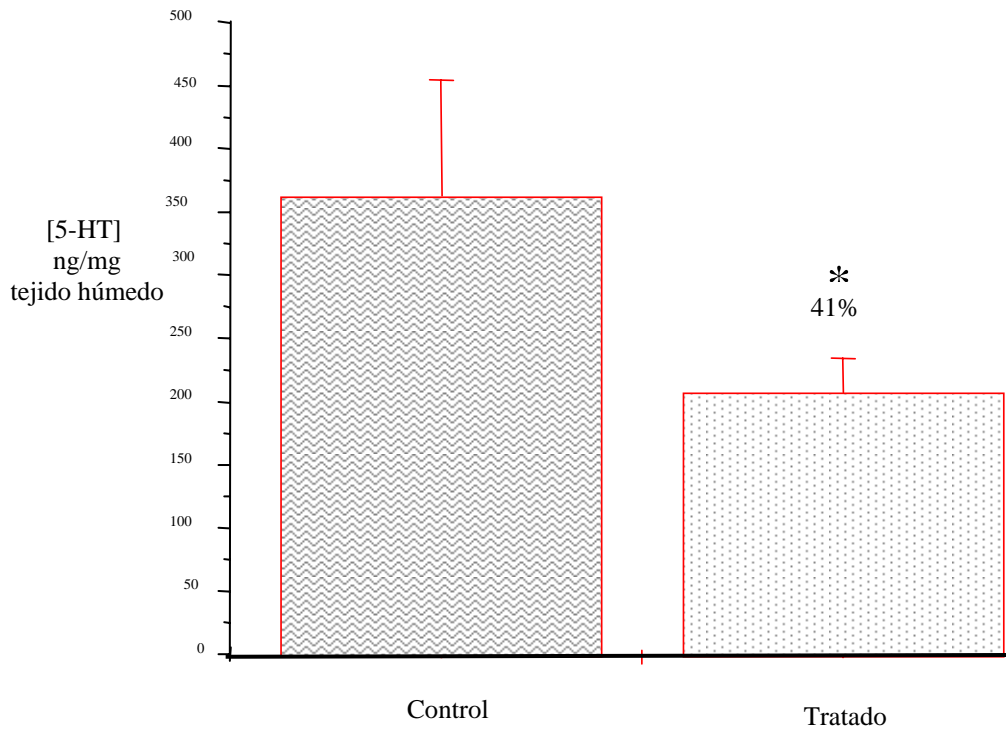


Figura 14. Efectos del tratamiento con para-clorofenilalanina (*p*CPA) en el tallo cerebral y en la cabeza del epidídimo de ratas a los 120 días de edad. Nótese la disminución de la concentración de 5-HT en ambas regiones estudiadas. Los epidídimos de animales tratados evidencian una disminución del 41%. Control: n=17; tratado: n=25; $p < 0.05$).

Efecto del *p*CPA sobre la actividad de TPH en epidídimo

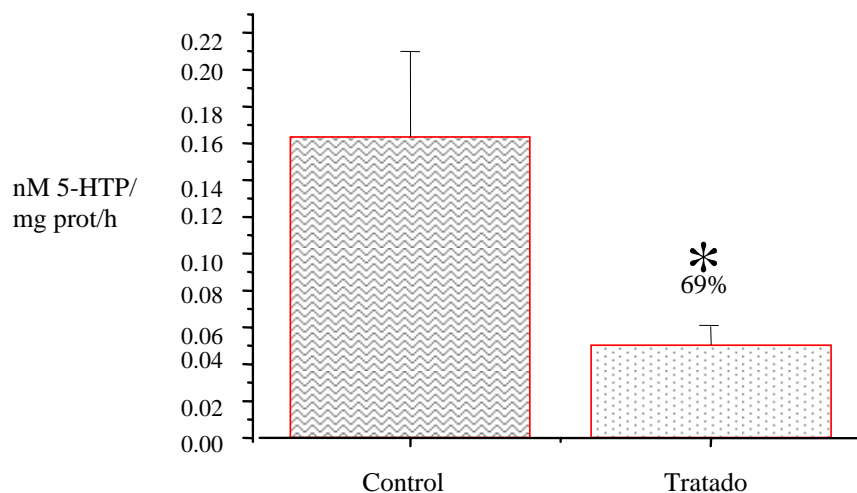


Figura 15. Concentración de 5-HTP en homogenados de la cabeza del epidídimo incubados con L-Trp de ratas control y tratadas con *p*CPA. Nótese la disminución significativa de los valores en el grupo tratado, lo que se traduce una disminución de la actividad de la enzima TPH. Los datos se analizaron con una prueba de t de student (Control n=6; tratado n=12; $p < 0.05$).

Tabla 1. Pesos epididimal, testicular y corporal de las ratas control y tratadas con *p*CPA.

Grupo	Peso epididimal (g)	Peso testicular (g)	Peso corporal (g)
Control	0.652±0.112 (n=27)	1.87±0.158 (n=27)	387±44 (n=27)
<i>p</i> CPA	0.611±0.008 (n=27)	1.86±0.041 (n=27)	351±80 (n=27)

Se expresa el promedio \pm SEM

De la etapa III

8.5 Evaluación de los machos con actividad sexual monogámica y machos sin experiencia sexual

Para determinar si la concentración de 5-HT en la cabeza del epidídimo se modificaba dependiendo de la experiencia sexual, se evaluó la concentración de 5-HT y la actividad de la enzima TPH en ratas adultas sin experiencia sexual y en aquellas con experiencia sexual monogámica. Como se ilustra en la figura 16a, estas últimas mostraron un incremento significativo en la concentración de 5-HT. Aunque la actividad de la enzima TPH tendió a ser mayor en las ratas sementales (figura 16b), la diferencia no fue significativa. De manera interesante, los cambios en la concentración de 5-HT se acompañaron de un incremento en los niveles sanguíneos de 5α -DHT en las ratas monogámicas (figura 16c).

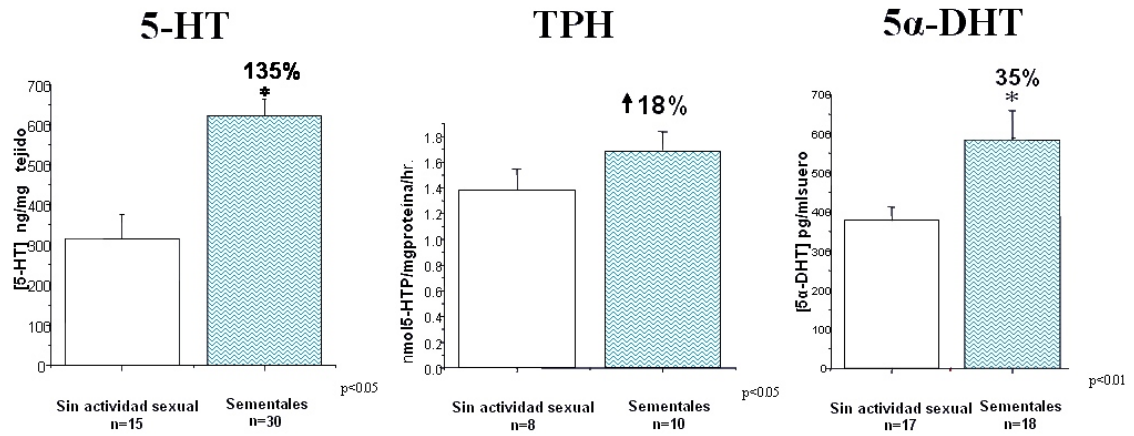


Figura 16. a) Concentración de serotonina (5-HT) en la cabeza del epidídimo de ratas adultas (180 días de edad). Nótese el incremento en aquellos animales con experiencia sexual con respecto a ratas sin experiencia. b) Concentración de 5-HTP en homogenados de la cabeza del epidídimo de ratas adultas. Se muestra una tendencia de mayor actividad para la enzima TPH en animales con experiencia sexual. c) Concentración plasmática de 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT) en ratas adultas con experiencia sexual. Los datos se analizaron con una prueba de t de student. (a: p<0.05; c: p<0.01).

9. DISCUSIÓN

El epidídimo de algunos mamíferos es uno de los órganos que contiene altas concentraciones de serotonina en el cuerpo (Kormano y Penttila 1968; Anderson y Paparo, 1977; Anderson et al., 1979), a pesar de eso el origen de esta amina es desconocido. Anderson et al. (1979), propusieron, que el epitelio tubular y los mastocitos podrían ser la fuente de la 5-HT en este órgano. Nuestros resultados apoyan la propuesta anterior ya que existen gránulos positivos para 5-HT e inmunoreactividad en el citoplasma para la enzima TPH en células principales del epitelio del epidídimo. Además, mostramos la existencia de células neuroendocrinas inmunoreactivas a 5-HT en el epitelio de la cabeza del epidídimo que adicionalmente podrían participar en la formación de la 5-HT en esta región. Esta última observación es nueva ya que no había sido observada en el epidídimo de la rata, la presencia de células neuroendocrinas asociadas al epitelio en los órganos reproductivos masculinos no es un hallazgo nuevo, otras descripciones han mostrado este tipo de células en otros órganos del sistema reproductivo como son los testículos (Frungieri et al., 2000; Mayerhofer et al., 1999), la próstata (Abrahamsson, 1999) y la uretra (Hanyu et al., 1987; Vittoria et al., 1990). Sin embargo, su función precisa se desconoce, se ha propuesto que las células neuroendocrinas transducen estímulos mecánicos o químicos (Gapp, 1987; Fujita et al., 1995) de modo que, después de su activación, las moléculas liberadas por las células neuroendocrinas modularían la actividad secretora del epitelio, la excitabilidad de los nervios intraepiteliales adyacentes y/o el flujo de sangre (Fujita et al., 1995). Por su localización y la presencia de 5-HT en su citoplasma, consideramos que este tipo de células en el epidídimo pudieran modular directa o indirectamente la función de los vasos sanguíneos y/o la maduración espermática. Esta idea se basa en: 1) la relación de

los procesos dendríticos de las células basales con el epitelio y las proyecciones dirigidas a la luz tubular (Fujita et al., 1995); 2) el efecto de la 5-HT sobre la actividad secretora del epitelio epididimal (Leung et al., 1999) y sobre la contractilidad de los vasos sanguíneos dependiendo de los tipos de receptores presentes (ManLean et al., 2000); 3) la acción de los productos de secreción del epitelio sobre la maduración espermática (Toshimori, 2003; Hinton, 1990), y por último; 4) la presencia de receptores para 5-HT en el epitelio y en los espermatozoides (este trabajo; ver también Meizel y Turner, 1983; Bandivdekar et al., 1992; Joung y Laing, 1990). Además, los productos de secreción de las células neuroendocrinas y de los mastocitos pueden controlar la división celular, crecimiento y diferenciación a través de las vías de señalización promovidas por la activación de los distintos receptores (segundos mensajeros, fosforilación de proteínas CREB, Erk $\frac{1}{2}$, Rap-1, caspasas) como se ha descrito para otros órganos incluyendo al sistema urogenital del macho (Abrahamsson, 1999; Mayerhofer et al., 1999).

En los estudios de inmunohistoquímica, observamos inmunoreactividad para los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en grupos de células del epitelio tubular epididimal claramente regionalizados. La función de ambos receptores en las células del epitelio del epidídimo se desconoce. Sin embargo, en el sistema nervioso central en desarrollo, el receptor 5-HT_{1A} regula la proliferación celular (Gaspar et al., 2003). De igual manera, el receptor 5-HT_{1A} podría regular la epiteliogénesis en el epidídimo. Por otro lado, el receptor 5-HT_{1B} estimula la secreción de electrolitos (Cl⁻) en el epitelio de la cauda epididimal (Leung et al., 1999). En la cabeza del epidídimo, sin embargo, la inmunoreactividad para el receptor 5-HT_{1B} fue detectada en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Esta discrepancia pudiera reflejar la diversidad de los tipos celulares que constituyen el epitelio del epidídimo (Ullmer et al., 1995). Se conoce que

las células endoteliales, así como las células musculares lisas de los vasos sanguíneos expresan al receptor 5-HT_{1B} (Kato et al., 1999; Nilsson et al., 1999), la activación de este receptor induce la vasoconstricción en diversos órganos como el pulmón. (Maclean et al., 2000). Esto pudiera ser el caso también para los vasos sanguíneos del epidídimo pues se ha observado que la 5-HT tiene acciones vasomotoras en los órganos del sistema reproductor masculino (Collin et al., 1996; Blier et al., 1998). Así mismo, estos receptores pudieran regular la permeabilidad de los vasos sanguíneos en la cabeza del epidídimo, como se ha mostrado para los vasos sanguíneos del cerebro (Nilsson et al., 1999). Los mastocitos también mostraron inmunoreactividad para el receptor 5-HT_{1B}. Este receptor podría autorregular la secreción de 5-HT desde los mismos como ocurre en las neuronas serotoninérgicas del tallo cerebral (Blier et al., 1998).

Los estudios realizados en los espermatozoides de invertebrados han mostrado la presencia de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₃. El bloqueo de estos receptores disminuye la motilidad y la capacidad de fertilización *in vitro* de espermatozoides de erizo de mar (Parisi et al., 1984) y de moluscos bivalvos (Bandivdekar et al., 1992). También se han identificado sitios de unión para la 5-HT en los espermatozoides de hámster (Meizel y Turner, 1983) y del conejo (Joung y Laing, 1990). No obstante, la evidencia experimental que apoya la presencia de estos receptores para la 5-HT en los mamíferos es limitada. En concordancia con los datos previos, los estudios histológicos efectuados en este proyecto mostraron la presencia de inmunoreactividad para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃ en la pieza media de los espermatozoides de rata que se localizan en la cabeza del epidídimo. Aunque se desconoce cual podría ser su papel biológico, pensamos que ambos receptores participan activamente en los procesos de maduración espermática. A este respecto, resulta interesante que la pieza media del espermatozoide parece estar sometida a la selección natural por la vía de la competencia

espermática en los mamíferos (Dixson y Anderson, 2004). Así pues, la 5-HT puede participar en estos procesos de selección espermática. En apoyo a esta posibilidad, en este estudio observamos que la concentración de la 5-HT aumenta en los animales con experiencia sexual monogámica con respecto a los animales de la misma edad sin experiencia sexual.

También se sabe que la 5-HT promueve la movilidad espermática (Parisi et al., 1984), al activar el flagelo a través de un proceso de fosforilación de la proteína dineína dependiente de AMPc (Stephens y Prior, 1992). Además se ha observado en humanos que altos niveles de 5-HT en semen y sangre (hiperserotoninemia) pueden disminuir la cantidad de los espermatozoides (azoospermia) y de la movilidad espermática en el semen (Gonzales et al., 1989; Gonzales et al., 1992).

Finalmente, se observó inmunoreactividad para el receptor 5-HT₃ en células estrechas de epitelio del epidídimo. Estudios de hibridación *in situ* han mostrado la presencia del mensajero que codifica para este receptor en las células epiteliales del sistema gastroentérico (Liu et al., 2002; Costall y Naylor, 2004), lo que sugiere que el receptor 5-HT₃ regula la secreción de ácido clorhídrico en las células parietales localizadas en la mucosa gástrica. Con base en lo anterior se podría plantear que el receptor 5-HT₃ tenga una función similar en el epidídimo, regulando los procesos de secreción epitelial.

La 5-HT es internalizada en las células, mediante un transportador de membrana cuya fuerza electromotriz depende del co-transporte de iones de sodio (Na⁺) y de la hidrólisis de ATP (Horschitz et al., 2001; Gaspar et al., 2003). Un sólo gen codifica para 5-HT_T y no existen isoformas descritas hasta el momento (Gaspar et al., 2003; Wakayama et al., 2002). Se observó que las células endoteliales en la cabeza del epidídimo mostraron inmunoreactividad para este transportador, se conoce que las

células endoteliales y fibras musculares lisas de los vasos sanguíneos expresan el 5-HT_T en órganos como pulmón, cerebro y arteria caudal de la rata (Horschitz et al., 2001; Wakayama et al., 2002). Estudios recientes han mostrado que el 5-HT_T pudiera estar involucrado en el intercambio de 5-HT entre el compartimiento vascular y el intersticial, en la modulación del flujo y permeabilidad vascular y/o en la remodelación de los vasos sanguíneos (Lee y Fanburg, 1986; MacLean et al., 2000; Horschitz et al., 2001; Wakayama et al., 2002). La inmunoreactividad para el 5-HT_T también se observó en los mastocitos, lo que sugiere que estas células capturan y almacenan la 5-HT (MacLean et al., 2000; Lee y Fanburg, 1986; Padawer, 1974; Wingren et al., 1983). La presencia del 5-HT_T en la superficie de las células epiteliales sugiere que éstas la transportan del compartimiento luminal al epitelial de los túbulos del epidídimo. Este transporte pudiera resultar en la inactivación y reciclamiento de la 5-HT como se ha descrito en el sistema nervioso (Horschitz et al., 2001).

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la capacidad de síntesis de 5-HT por los elementos celulares presentes en la cabeza del epidídimo. Esta amina es sintetizada a través de una vía metabólica, cuyo paso limitante está dado por la enzima TPH (Ibraim y Koshayan, 1981; Walther et al., 2003). Dos genes codifican las dos isoformas de la enzima (una central y la otra periférica; Walther et al., 2003; McKinney et al., 2005). La forma cerebral es una proteína homotetramérica cuyo peso molecular es de 260kDa; cada subunidad pesa alrededor de 50kDa (Walter et al., 2003). Así, la presencia de la enzima TPH en las células del epidídimo sugieren que probablemente exista un sistema de autorregulación de la actividad de esta enzima que podría controlar la síntesis local de 5-HT. De acuerdo con esta posibilidad, nuestros estudios morfológicos documentaron la presencia de inmunoreactividad para la enzima TPH en células principales de la cabeza del epidídimo. Los análisis de Western blot revelaron la

presencia de dos bandas inmunoreactivas para la enzima TPH con pesos moleculares de 48kDa y 51kDa en la cabeza del epidídimo. En el tallo cerebral, solo se observó la banda de 48kDa de peso molecular. Estos resultados sugieren la existencia de dos isoformas de la enzima en la cabeza del epidídimo. La presencia de estas isoformas no es sorprendente porque estudios previos han mostrado su existencia en el tallo cerebral (Walter et al., 2003), intestino y glándula pineal (Walter et al., 2003; McKinney et al., 2005). No sabemos, si en el epidídimo coexisten ambas isoformas, aunque nuestros resultados sugieren esta posibilidad. Las observaciones morfológicas y bioquímicas apoyan que la enzima TPH está presente en la cabeza del epidídimo de la rata adulta. Esta conclusión se fortalece por el hecho de que los homogenados de la cabeza del epidídimo mostraron actividad para la Finalmente, la actividad de la enzima es muy alta enzima y que esta actividad y la concentración de 5-HT disminuyen en ratas tratadas con *p*CPA. con relación a la concentración de 5-HT en la cabeza de epidídimo. Un exceso relativo de la actividad de la enzima con respecto a la concentración de 5-HT también se encontró en el tallo cerebral (Fitzpatrick, 1999). Se ha pensado que este exceso puede contender contra las demandas excesivas de 5-HT (Feldman et al., 1997). Otra posibilidad es que la enzima pudiera estar involucrada en otras vías metabólicas e.g. en la síntesis de melatonina, la cual ha sido descrita en otros órganos del aparato reproductor masculino y en el cuerpo del epidídimo (Dumas et al., 1989; Tijmes et al., 1996; Shiu et al., 2000).

Por último, para evaluar indirectamente si la 5-HT pudiera participar en la fisiología del epidídimo, se midió el contenido de esta amina y la actividad de la enzima TPH en la cabeza del epidídimo de ratas adultas sin actividad sexual y en ratas con experiencia sexual monogámica. Una vez realizados los ensayos de HPLC, tanto la concentración de 5-HT como la actividad de la enzima TPH se encontró elevada en los

epidídimos de las ratas con experiencia sexual monogámica al compararse con los valores obtenidos para los animales control. La hormona 5α -dihidrotestosterona también estaba aumentada en el plasma de los machos con experiencia sexual monogámica. Estos resultados apoyan que la 5-HT liberada de las células epiteliales pudiera regular algunas funciones reproductivas entre las que destacaría el control de la maduración espermática, actuando a través de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_3 . Por otro lado, la 5-HT secretada por las células neuroendocrinas y los mastocitos quizás afecten la maduración espermática modulando la temperatura local, el aporte de nutrientes y apoyo trófico a través de controlar la función vasomotora y secretora del epitelio. Claramente más investigaciones son necesarias para evaluar el mérito de cada una de las ideas y especulaciones discutidas en el presente trabajo.

10. CONCLUSIONES

10.1 De la etapa I

La presencia de marcadores histológicos en el epitelio y en los espermatozoides de la cabeza del epidídimo, aunado a la identificación bioquímica de los dos componentes principales en la vía de síntesis - el producto la serotonina y la enzima limitante TPH - sugieren que existe una síntesis local de esta amina biogénica y que pudiera participar, entre otros, en procesos de maduración espermática.

10.2 De la etapa II

El tratamiento farmacológico con *p*CPA disminuyó significativamente la concentración de serotonina así como la actividad de la enzima TPH, confirmando que existen elementos celulares en la cabeza del epidídimo que sintetizan una fracción de la 5-HT.

10.3 De la etapa III

La concentración de serotonina y la actividad de la enzima TPH en la cabeza del epidídimo, y la concentración plasmática de testosterona tienden a elevarse en animales con experiencia sexual. Esto sugiere que existe una relación entre estos parámetros.

11. REFERENCIAS

Abrahamsson PA (1999) Neuroendocrine cells in tumor growth of the prostate. *Endocrinol 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.

Arrighi S, Cremonesi F, Bosi G, Domeneghini C (2004) Endocrine-paracrine cells of the male urogenital apparatus: A comparative histochemical and immunohistochemical study in some domestic ungulates. *Anat Histol Embryol* 33:225-232.

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.

Bandivdekar AH, Segal SJ, Koide SS (1992) Binding of 5-hydroxytryptamine analogs by isolated *Spisula* sperm membrane. *Inv Reprod Develop* 21:43-46.

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

Billet F, Gans C, Maderson PFA (1985) Practical considerations in biology of the reptilia. *Biology of the Reptilia*. En: Gans C, Billet F, Maderson PFA Wiley. New York. Vol. 14, 7-14 pp.

Blakely RD, Berson HE, Fremeau 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* 861:204-216.

Boccabella 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, Chiochio SR (1990) Serotonergic innervation of the rat testis. *J Reprod Fertil* 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.

Coffey DS, Berry SW, Walsh PC (1988) *Endocrinology of male reproduction*. Philadelphia Saunders Company. EUA. 5-49 pp.

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: Bloom FE (ed) *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* Oxford University Press. Oxford. 338-367 pp.

Costall B, Naylor RJ (2004) 5-HT₃ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord Rev* 3:27-37.

Dail WG, Trujillo D, de la Rosa D, Walton G (1989) Autonomic innervation of reproductive organs: Analysis of the neurons whose axons project in the main penile nerve in the pelvic plexus of the rat. *Anat Rec* 224:94-101.

Dixson AF, Anderson MJ (2004) Sexual behaviour, reproductive physiology and sperm competition in male mammals. *Physiol Behav* 83:361-371.

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.

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

Esteban C, Gerard A, Larrib S, Toran N, Gerard H, Reventos J (1997) Sertoli cell-specific expression of rat androgen-binding protein in transgenic mice: Effects on somatic cell lineages. *Mol Cell Endocrinol* 132(1-2):127-36.

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

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

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.

Frungieri MB, Zitta K, Pignataro OP, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS (2002) Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic, and corticotropin-releasing hormone systems modulating cAMP and testosterone production in the golden hamster. *Neuroendocrinology* 76:35-46.

Fujita T, Iwanaga T, Lee SH, Terada M (1995) Sensor cells and nerve terminals in some gut-derived organs: A review. *Ital J Anat Embryol Suppl* 100:197-204.

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.

Gaspar P, Cases O, Maroteaux L (2003) The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4:1002-1012.

Gonzales GF, García-Hjarles MA, Napuri R, Coyotupa J, Guerra-Garcia R (1989) Blood serotonin levels and male infertility. *Arch Androl* 22:85-89.

Gonzales GF, García-Hjarles M, Velasquez G (1992) Hyperprolactinaemia and hyperserotoninaemia: Their relationship to seminal quality. *Andrologia* 24:95-100.

Gopal Dutt NH (1999) Structure of mammalian epididymis. En: Joy KP, Krishna A, Haldar C (eds) *Comparative Endocrinology and Reproduction*. Springer-Verlag. Nueva Delhi. 201-227 pp.

Gotterer GS, Williams-Ashman HG (1957). *Proc Soc Exp Biol Med*. 94:60-64.

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 Pharmacol* 77:605-613.

Hebel R, Stronberg MW (1986) *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rats*. Biomed- Verlag. Wörthsee.

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

Holmes G, Chapple W, Leipheimer R, Sachs BD (1991). Electromyographic analysis of male rat perineal muscles during copulation and reflexive erections. *Physiol Behav* 49:1235-1246.

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

Hoskins DD, Vijayaraghavan S (1990) A new theory on the acquisition of sperm motility during epididymal transit. En: Gagnon C (ed) *Control of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. CRC Press. Boca Raton 53-62 pp.

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.

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

Ibrahim MZ, Koshayan DS (1981) The mast cells of the mammalian central nervous system. VIII. Uptake of 35S and 3H-5-hydroxytryptophan inside and outside of CNS. *Cell Tissue Res* 220:529-538.

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

Joung RJ, Laing JC (1990) Biogenic amine binding sites in rabbit spermatozoa. *Biochem Int* 21:781-7.

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.

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

Lee SL, Fanburg BL (1986) Serotonin uptake by bovine pulmonary artery endothelial cells in culture. I. Characterization. *Am J Physiol* 250:C761-765.

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.

Leung GP, Dun SL, Dun NJ, Wong PY (1999) Serotonin via 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium. *J Physiol* 519:657-667.

Liu MT, Rayport S, Jiang Y, Murphy D, Gershon D (2002) Expression and function of 5-HT₃ receptors in the enteric neurons of mice lacking the serotonin transporter. *Am J Physiol Gastrointest Liv Physiol* 283:G1398-G1411.

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

McKinney J, Knappskog PM, Haavik J (2005) Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *J Neurochem* 92:311-320.

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

Majumder G, Jaiswal BS, Nath D, Banerjee S, Barua M, Sarkar M, Rana APS, Mitra S, Dutta P, Chatterjee T, Misra S, Ghosh A (1990) Biochemistry of sperm motility: Initiation during epididymal maturation. En: Joy KP, Krishna A, Haldar C *Comparative. Endocrinology and Reproduction*. Springer-Verlag. Nueva Delhi. 201-227 pp.

Mann T, Lutwak-Mann C (1981) *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin.

Mann T., Lutwak-Mann C. (1990) *Male Reproductive Function and Semen. Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. pp: 139-156.

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

Manjarrez G, Chagoya G, Hernández J (1988) Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished *in utero*. *Biol Neonate* 54(4):232-240.

Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández J (1994) Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int J Dev Neurosci* 12:695-702.

Mayerhofer A, Frungieri MB, Fritz S, Bulling A, Jessberger B, Vogt HG (1999) Evidence for catecholaminergic, neuron-like cells in the adult human testis: Changes associated with testicular pathologies. *J Androl* 20:341-347.

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, Domínguez 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.

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. *Br Pharmacol* 128:1133-1140.

Oko R, Clermont Y (1990) Mammalian spermatozoa: Structure and assembly of the tail. En: Gagnon C. Editor. *Control of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Boca Raton Florida Fl. CRC Press, 427.

Orgebin-Crist MC, Danzo BJ, Bavies J (1975) Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. En: Greep VR, Hamilton DW (eds) *Handbook of Physiology-Endocrinology*. Williams and Wilkins. Baltimore. 319-338 pp.

Pacheco P, Camacho MA, García LI, Hernández ME, Carrillo P, Manzo J (1997) Electrophysiological evidence for the nomenclature of the pudendal nerve and sacral plexus in the male rat. *Brain Res* 763:202-208.

Padawer J (1974) Mast cells: Extended lifespan and lack of granule turnover under normal *in vivo* conditions. *Exp Mol Pathol* 20:269-280.

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

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

Pinilla L, González 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.

Queiróz DBC, Mendes FR, Porto CS, Avellar MCW (2002) 1 α -adrenoceptor subtypes in rat epididymis and the effects of sexual maturation. *Biol Reprod* 66:508-511.

Ricker DD (1997) 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*. 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.

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*. McGraw-Hill Interamericana. México DF, 265-279 pp.

Seiler P, Cooper TG, Nieschlag E (2000) Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expresión of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int J Androl* 23:65-76.

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.

Stephens RE, Prior G (1992) Dynein from serotonin-activated cilia and flagella: Extraction characteristics and distinct sites for cAMP-dependent protein phosphorylation. *J Cell Sci* 103:999-1012.

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.

Toshimori K (2003) Biology of spermatozoa maturation: An overview with an introduction to this issue. *Micr Res Tech* 61:1-6.

Turner TT (1991) Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. *Ann NY 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.

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.

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.

Weissmann D, Chamba G, Debure L, Rousset C, Richard F, Maitre M, Pujol JF (1990) Variation of tryptophan-5-hydroxylase concentration in the rat raphe dorsalis nucleus after p-chlorophenylalanine administration. II. Anatomical distribution of the tryptophan-5-hydroxylase protein and regional variation of its turnover rate. *Brain Res* 536:46-55.

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 Immunol* 70:193-199.

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

Zempoalteca R, Martínez-Gómez M, Hudson R, Cruz Y, Lucio RA (2002) An anatomical and electrophysiological study of the genitofemoral nerve and some of its targets in the male rat. *J Anat* 201:493-505.

12. ANEXOS

Anexo a

Cuantificación de la actividad de la enzima triptofano-5-hidroxilasa por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución

Se evaluaron los niveles de actividad de la enzima TPH en el epidídimo de rata durante el periodo de maduración sexual con y sin actividad sexual, y tratados con inhibidor de 5-HT (*p*CPA), mediante la cuantificación *in vitro* de la síntesis de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) se llevó a cabo el siguiente protocolo:

Los tejidos de las muestras mantenidas en ultracongelación fueron pesadas en balanza analítica (Adventurer TM; OHAUS: AR5120), colocadas en el interior de tubos de centrífuga y homogenizadas en frío en tres volúmenes de buffer Tris·HCl pH 7.4 que contenía 1 mM dithiothreitol y 1 mM EGTA.

Las muestras en los tubos fueron colocadas dentro de la centrífuga y se llevó a 29,000 g a 4°C por 16 minutos, (Beckman, Micromax RF) con el rotor 25.15 (Beckman) se colectó el sobrenadante y posteriormente se realizó determinación de proteínas totales mediante el método de Lowry et al. (1951) (ver más adelante) utilizando albúmina sérica bovina (1 mg/mL) como estándar. Se tomaron 50 µl del sobrenadante y se llevaron a 2 ml. con agua bidestilada, para tener una dilución 1:40. Se prepararon tubos de ensaye que contenían 50 µl de la dilución de proteína más 50 µl de agua bidestilada.

Para realizar los ensayos *in vitro* de la actividad de la enzima TPH, se hicieron los cálculos para obtener el volumen adecuado que tuviera 300 µg de proteína de cada muestra, se prepararon tubos de ensaye a un volumen final de 200 µl (Johansen et al., 1991). Cada uno de los tubos contenía: 0.05M buffer Tris HCl, pH 7.4, 40 µl de 1 mM EGTA, 30 µl de catalasa 1 mg/mL, 20 µl de 1 mM del inhibidor de la MAO, pargilina, y 10 µl de 1 mM sulfato de amonio ferroso. Asimismo, 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 enzima 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, 6mM 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 (acrodisc 0.45µm), vaciado al interior de tubos eppendorf nuevos, protegidos de la luz, y almacenados a -75°C para su uso al día siguiente.

La cuantificación se realizó en un sistema de HPLC equipado con detector de fluorescencia (Waters modelo 474), utilizando el software Millennium 32. Se utilizó una columna simétrica C18 con tamaño de partícula de 5 µm y 3.9x150 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 (unidades de presión). Una vez que el equipo fue equilibrado, la composición del flujo se modificó, estableciéndose la fase móvil en 95% acetato de sodio y 5% de acetonitrilo, a un flujo de 1ml/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 estas condiciones, los tiempos de retención fueron de 2.5 minutos para 5-HTP y de 5 minutos para L-Trp.

Todas las lecturas fueron almacenadas en el programa Millennium 32. Con ayuda de este programa, se determinó la altura del pico para obtener la concentración de 5-HTP en muestras con y sin triptofano, para obtener las diferencias de 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.

Anexo b

Determinación de la concentración de la serotonina por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución

En la cuantificación de la concentración de la 5-HT en la cabeza del epidídimo de animales control, tratados con 300 mg de *p*CPA, y animales con actividad sexual se homogenizaron los tejidos en meta-bisulfito de sodio (152 mg: 4 mM) HClO₄ (1.7 ml) en 200ml de H₂O HPLC filtrada, se centrifugaron a 1,8000 g por 16 minutos a 4°C (previo a la centrifugación de las muestras, se tomaron 50 µl de este homogenado para determinación de proteína por el método de Lowry). Para realizar la cuantificación de proteínas, se agregaron, a cada tubo de ensaye, 500µl de una solución que contenía 250 µl de sulfato de cobre (CuSO₄) al 1% y 250 µl de tartrato de sodio potasio al 2% diluidos en 25 ml de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 5% disuelto en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N (Solución A). Después de 10 minutos, se agregaron 50 µl de solución B (reactivo Folin más H₂O_{bd}, en proporción 1:1), agitándose los tubos hasta obtener un color homogéneo. Se dejó correr la reacción por espacio de 30 minutos, para posteriormente realizar las lecturas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 700 nm (Manjarrez et al., 1988, 1994).

Las lecturas obtenidas fueron analizadas en el software GraphPad Prism® 3 donde se obtuvo una curva de concentración basada en albúmina sérica bovina, y se calcularon las concentraciones de proteína existentes en cada una de las muestras en microgramos por microlitro (µg/µl). Inmediatamente después de la centrifugación se filtraron las alícuotas (acrodisc 0.45 µm), y se inyectaron 20 µl de cada muestra en el sistema de HPLC ya descrito.

Anexo c

Inmunocitoquímica para marca dores sero toninérgicos (transportador, enz ima tripofano-5-hidroxilasa y serotonina)

Se realizaron cortes longitudinales (12µm de espesor) de la cabeza del epidídimo en un criostato (CRYO-CUT, American Optical Co., EUA) a una temperatura de -20°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 la enzima TPH y 5-HT_T) o por 3.5-4 horas (para 5-HT) 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 oveja o ratón contra la enzima TPH recombinante de conejo (1:500, Chemicon, Temecula, CA, EUA y Sigma, St. Louis, MO, EUA, respectivamente), cobayo contra 5-HTT de rata (1:1000, Chemicon), cobayo contra 5-HT1B de roedor (1:1000, Chemicon) y conejo contra 5-HT (1:200, Chemicon) diluidos en la solución de bloqueo. Los anticuerpos para los receptores 5-HT1A, 2A y 3 (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃) son policlonales de cabra contra humano. Como control de los experimentos se incubaron laminillas omitiendo el anticuerpo primario e incubándolas con suero de cabra en sustitución del anticuerpo primario. 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 secundarios se incubaron por 1.5 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. En seguida, las laminillas fueron incubadas con el complejo avidina-peroxidasa (Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame CA, EUA) por 1.50 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 (II y III) 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®.

Anexo d

Inmunotransferencia por Western blot para la enzima triptofano-5-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 20,800g 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 0.75mm 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 se calentaron a 100°C en agua por espacio de 5 minutos, y cargadas en el gel.

La fase concentradora fue corrida a 80 V y la fase separadora fue corrida a 120 V por espacio de 90 minutos 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 (0.192 M glicina, 20% metanol en 0.025 M Tris). Las membranas de nitrocelulosa (0.2 µm; Trans-Blot, BioRad) 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 25 V 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 la enzima 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., durante 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.

Anexo e

Disminución de serotonina y evaluación anatómica de testículo y epidídimo

Para llevar a cabo la evaluación de los efectos de la disminución de 5-HT de manera local en la cabeza del epidídimo en ratas adultas se realizó un tratamiento crónico de paraclorofenilalanina (*p*CPA) (Weissmann et al., 1990), (3 inyecciones de 300 mg/kg cada 72 horas, ip) sacrificando a los animales en el día 12 para simular los 12 días en que se lleva a cabo el paso de los espermatozoides de la cabeza hasta la cauda del epidídimo en ratas. Los animales control fueron inyectados con solución salina. Previamente los animales fueron pesados en una báscula e inmediatamente anestesiados con pentobarbital sódico (20 mg/kg, i.p.) se disecaron los testículos y epidídimos completos para ser pesados y comparados por grupo de animales. Las cabezas de los epidídimos de los animales control y tratados fueron utilizadas para evaluar la concentración de 5-HT y la actividad de la enzima TPH por la técnica de HPLC. El tallo cerebral se utilizó como control. Al mismo tiempo se evaluó el efecto del fármaco con parámetros morfométricos para mostrar posibles alteraciones corporales producidas por el tratamiento (peso corporal, testicular y epididimal y conteo espermático).

The origin, targets and variations of serotonin in the rat caput epididymis: Morphological and biochemical studies

Running Head: Serotonin system in the rat epididymis

FRANCISCO JIMÉNEZ-TREJO^{1ξ}, MIGUEL TAPIA-RODRÍGUEZ^{1ξ}, DANIEL B.C. QUEIROZ², PATRICIA PADILLA¹, MARIA CHRISTINA W. AVELLAR², PATRICIA RIVAS MANZANO³, GABRIEL MANJARREZ-GUTIÉRREZ⁴ AND GABRIEL GUTIÉRREZ-OSPINA^{1*}

¹Department of Cell Biology and Physiology, Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, 04510.

²Department of Pharmacology, Section of Experimental Endocrinology, Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brazil 04044-020.

³Department of Reproductive Biology, Faculty of Sciences, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, 04510.

⁴Unit of Medical Investigation in Neurological Diseases, XXI Century National Medical Center, Mexican Institute of Social Security, Mexico City, 06703.

^ξThese authors contributed equally to the present work.

Correspondence to:

* Dr. Gabriel Gutiérrez-Ospina, Department of Cell Biology and Physiology, National Autonomous University of Mexico, Ciudad Universitaria, Mexico City, 04510. Phone: (+52) (55) 5622-3195. Fax: (+52) (55) 5622-3897. E-mail: gabo@correo.biomedicas.unam.mx

Supported by: CONACyT grants 38615N and J28035N, PAPITT, UNAM grants IN203702 and IN232604, FAPESP grants 99/09491-8 and 00/09381-7. Fellowships supported by FAPESP (DBCQ), by CONACyT (FJT and MTR) and Telmex Foundation (FJT).

Abstract

The caput epididymis of some mammals contains large quantities of serotonin whose origin, targets and physiological variations have been poorly studied. We then combined morphological and biochemical techniques to study these aspects of serotonin in the rat caput epididymis. Serotonin immunostaining was detected in mast, epithelial and neuroendocrine cells. Epithelial cells displayed immunoreactivity to 5HT_{1A}, 5HT_{2A} and 5HT₃ serotonin receptors. Endothelial and mast cells labeled positive for 5HT_{1B} serotonin receptors and spermatozoa displayed 5HT_{2A} and 5HT₃ serotonin receptor immunoreactivity. Epithelial, endothelial and mast cells stained positive for serotonin transporters. Only epithelial cells showed tryptophan hydroxylase immunoreactivity; this enzyme poses the regulatory step in the serotonin synthetic pathway. In addition, Western blot analyses of caput homogenates documented the presence of two protein bands (\approx 51kDa and \approx 48kDa) that were immunoreactive for tryptophan hydroxylase. Chromatographic analyses documented the presence of the activity of tryptophan hydroxylase in the caput, and showed that both its activity and serotonin availability increased with sexual maturation, and decreased following *p*-chloro-phenylalanine treatment; this agent inhibits tryptophan hydroxylase activity. Interestingly, serotonin concentration and tryptophan hydroxylase activity tend to be higher in breeder than in sexually inactive males. We think that these results support the existence of a local serotonergic system in the rat caput epididymis that might regulate some aspects of male reproductive function.

Key words: 5-hydroxytryptamine, tryptophan hydroxylase, neuroendocrine cells, male reproduction, serotonin receptor, spermatozoa

Acknowledgements:

The authors thank Dr. Maria da Graça Naffah-Mazzacoratti and Eduardo F. Castro Neto (Department of Neurology and Neurosurgery, UNIFESP-EPM) for their help with HPLC analysis of 5-HT and 5-HIAA. We are indebted to Adolfo Herrera Juárez for providing animal care and for keeping the record of each rat reproductive history. We also thank to Susana Rojas for her valuable technical assistance and to Dra. Rosa Angélica Lucio for helpful criticisms.

Abbreviations:

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

p-chlorophenylalanine (*p*CPA)

Phosphate buffer (PB)

Tris Sodium Chloride buffer (TBS)

Trizma Hydrochloride (Tris HCl)

Acetic acid (ethylenebis (oxyethylenitrilo)) tetra-; ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether)

N,N,N'N'-tetraacetic acid (EGTA)

Tween-Tris Sodium Chloride (T-TBS)

5-hydroxyindole acetic acid (5HIA)

The epididymis is a tubular extra-testicular organ of the mammalian male reproductive system. It is divided in three major compartments termed caput, corpus and cauda, and further divisions have been described based upon the distribution of epithelial cell types and the animal species under study. In rats, the caput comprises zones I through III, the corpus corresponds to zone IV and the cauda is formed by zones V and VI (Gopal Dutt, 1999). The luminal side of the tubules in the epididymis is covered by a pseudo-stratified epithelium formed by principal, narrow, basal, clear, halo and apical cells (Robaire and Hermo, 1988). It is generally accepted that by absorbing, secreting and/or removing a variety of elements, the epididymal epithelial cells adjust the composition of the luminal fluid creating a favorable environment for spermatozoa to mature (Robaire and Hermo, 1988; Weissenberg et al, 1995; Toshimori, 2003). The pivotal role of the epididymis in sperm maturation may be determinant in the control of male fertility.

In the male reproductive system, serotonin plays an important role in the regulation of testicular blood flow (Collin et al, 1996) and in the secretion of corticotropin-releasing factor and testosterone from Leydig cells (Dufau et al, 1993; Tinajero et al, 1993; Frungieri et al, 1999). Serotonin also induces the contraction of the vas deferens (Hay and Wadsworth, 1982). Although the concentration of serotonin in the caput epididymis of some mammals is one of the highest in the body (Kormano and Penttila, 1968; Anderson and Paparo, 1977; Anderson et al, 1979), we know very little about the biology of serotonin in this organ. It is known, however, that serotonin regulates chloride secretion from epithelial cells in the cauda epididymis (Leung et al, 1999).

With respect to its origin, Anderson et al (1979) proposed that the epithelial, mast and myoepithelial cells were most likely the sources of serotonin in the epididymis; this contention has not been confirmed. In fact, the epididymis contains a great deal of mast cells that could well function as an important local source of serotonin (Leung et al, 1999), even though most of them lack the ability to synthesize it (Padawer, 1974). There are, however, a couple of reports that

show the presence of the pineal isoform of tryptophan hydroxylase, the limiting-step enzyme in the serotonin synthesis pathway, in a subtype of mast cells located in the dura mater (Mathiau et al, 1994) and in a serotonin producing RBL2H3 mast cell line (Kojima et al, 1998).

Another potential source of serotonin in the epididymis is constituted by neuroendocrine cells. Neuroendocrine cells are neuroectoderm-derived cells that have the ability of uptaking, storing and releasing serotonin, but they lack tryptophan hydroxylase activity so they do not have the ability to synthesize this amine (Ibrahim and Koshayan, 1981; Gapp, 1987; for a recent review see Fujita et al, 1995). A number of studies have identified neuroendocrine cells in various organs of the body and indeed in those of the male reproductive system, but not yet in the epididymis (Hanyu et al, 1987; Vittoria et al, 1990; Abrahamsson, 1999; Mayerhofer et al, 1999; Arrighi et al, 2004). Having this in mind, the main goals of the present work were 1) to identify serotonin cell sources and targets, 2) to evaluate the possibility of local serotonin synthesis, and 3) to document changes in serotonin concentration associated with sexual maturation and reproductive status. Although descriptive in nature, our morphological and biochemical results provide guidelines to design future experiments aimed at evaluating directly the functions of serotonin in the caput epididymis of the male reproductive system.

Materials and Methods

Animals

Sexually inactive male Wistar rats of 40, 60, 90 and 120 days of age were used to determine the concentration of serotonin and the activity of tryptophan hydroxylase in the caput epididymis by using high performance liquid chromatography (HPLC). Another set of animals of the same ages were also utilized to characterize the histological localization of the enzyme, transporter and receptors involved in serotonin synthesis, transport and transduction, respectively, and to detect

the presence of tryptophan hydroxylase through western blot analyses in the caput during sexual maturation. The age of the animals used to carry out the studies was selected based upon data on sperm reserves in the epididymal segments (Robb et al, 1978) and plasma levels of testosterone (Queiroz et al, 2002) during sexual maturation. An additional group of 120 days old rats was used to assess the effects of *p*-chlorophenylalanine (*p*CPA; 300 mg/kg of body weight) on serotonin availability and tryptophan hydroxylase activity. This pharmacological agent inhibits tryptophan hydroxylase (Richards et al, 1990; Weissmann et al, 1990; Gutiérrez-Ospina et al, 2002) and thus blocks the enzymatic limiting step of serotonin synthesis. Finally, to provide circumstantial evidence that could support a role for serotonin in epididymal reproductive functions, we compared the concentration of this amine and the activity of tryptophan hydroxylase in the caput of sexually inactive adults and colony breeders at the age of 170 days with the aid of HPLC. Breeders had an average of 5 crosses and fathered an average of 45 ± 2 pups (mean \pm S.E.M). All rats were raised and housed in the animal facilities located at the Instituto Nacional de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo and the Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico. Animals were kept on a 12 hours light/12 hours dark schedule, lights on 7:00-19.00 pm, at 22°C and had free access to food and water. Animal handling and experimentation followed the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health. Local Animal Right's Committees from both universities approved all protocols.

Immunohistochemistry

The epididymis of anesthetized animals (pentobarbital; Pfizer, 45mg/kg of body weight) was dissected and freed of fat. The caput epididymis was isolated, included in tissue freezing medium TM (Leica Instruments, Nussloch, Germany), frozen rapidly in 2-methyl butane pre-chilled with

dry ice, and stored at -75°C until use. Longitudinal sections (8-15 μm) of the caput (zones II and III) were cut in a cryostat, mounted on to gelatin-coated slides and fixed in paraformaldehyde (4%) dissolved in phosphate buffer (PB 0.1M, pH 7.4). Endogenous activity of peroxidase was blocked by incubating the sections in a solution containing 3% of hydrogen peroxide. Sections intended for detecting tryptophan hydroxylase, serotonin transporter and serotonin receptors 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{2A} and 5HT₃ were immersion-fixed for 20-30 minutes. We focused on these serotonin receptors because 5HT_{1B} receptors have been identified in epithelial cells of the rat cauda epididymis (Leung et al, 1999), whereas receptors of the 5HT₁ and 5HT₂ families appear to be located in invertebrate (Bandivdekar, 1992; Stephens and Prior, 1992) and mammalian spermatozoa (Meizel and Turner 1983; Young and Laing, 1990). In addition, Meizel and Turner (1983) suggested the existence of a serotonin responsive ionotropic receptor in the sperm of hamsters. The ionotropic serotonin receptors are grouped in the 5HT₃ subfamily (Gaspar et al, 2003). Sections used to stain neurofilaments 150kDa and serotonin also were immersion-fixed for 4 hours at room temperature. Neurofilaments are currently used to identify neuroendocrine cells (Davidoff et al, 1999; Mayerhofer et al, 1999; Frungieri et al, 2002). After a thorough wash, sections were incubated with blocking solution (bovine albumin 3%, Triton X-100 0.3% and sodium azide 0.025% in PB) for 4 hours at room temperature. Sections were then incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies. The information about the specificity and cross-reactivity of each antibody was provided by the suppliers:

- 1) Rabbit anti-serotonin (1:200, Chemicon, Temecula, CA, USA). This antibody was raised against serotonin linked to poly-lysine, and its cross-reactivity was tested against various indolamine and tryptophan derivatives by using ELISA and RIA; the antibody is highly specific to serotonin.

- 2) Mouse anti-tryptophan hydroxylase (1:500; Sigma, St. Louis, MO, USA). This is a monoclonal antibody raised against a recombinant rabbit tryptophan hydroxylase, and its specificity was tested by using Western blot. The cross-reactivity against the forms of the enzyme found in other species was evaluated by ELISA.
- 3) Rabbit anti-bovine neurofilaments 150kDa (1:1000, Chemicon). This antibody was raised against a HPLC-purified bovine neurofilament 150kDa, and its cross-reactivity tested against other forms of neurofilaments by using ELISA.
- 4) Guinea pig anti-serotonin transporter (5HT_T) polyclonal antibody (1:500, Chemicon). This antibody was raised against a synthetic peptide that corresponds to the carboxy-terminus of the cloned rat serotonin transporter. The staining pattern obtained with this antibody corresponds to that described using other antibodies to 5HT_T (Haase et al, 2001). The pre-absorption of the antiserum with the immunogen peptide completely abolishes the immunostaining.
- 5) Guinea pig anti-serotonin receptor 1B (5HT_{1B}) polyclonal antibody (1:500, Chemicon). This antibody was raised against a synthetic peptide that corresponds to a sequence located in the third large intracytoplasmic loop of the receptor. The staining pattern of this antibody matches that of oligonucleotides used to detect 5HT_{1B}-coding mRNA by in situ hybridization (Langlois et al, 1995; Sari et al, 1997; Bonaventure et al, 1998). Also, the pre-absorption of the antiserum with the immunogen peptide completely abolishes the immunostaining.
- 6) Affinity purified goat anti-5HT_{1A} receptor polyclonal antibody. This antibody was raised against a peptide mapping near the carboxy terminus cytoplasmic domain of the receptor, and its specificity tested by using Western blot.
- 7) Affinity purified goat anti-5HT_{2A} receptor polyclonal antibody. This antibody was raised against a peptide mapping within an internal region of the receptor, and its specificity tested by using Western blot.

8) Affinity purified goat anti-5HT₃ receptor polyclonal antibody. This antibody was raised against a peptide mapping near the carboxy terminus region of the receptor, and its specificity tested by using Western blot.

All antibodies were diluted in blocking solution. After three washes (10-15 minutes/each) with PB, sections were incubated with the corresponding biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA and Santa Cruz Biotechnologies, Austin, TX, USA), diluted 1:200 in blocking solution. This incubation lasted for 2 hours at room temperature. The avidin-biotin-peroxidase staining system (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used to detect the biotinylated antibodies following the manufacturer's instructions (Vector Laboratories). The enzymatic reaction was stopped after 1-3 minutes by washing several times in PB. Air-dried slides were cover slipped with cyto seal (Richard Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA). In control experiments, slides were incubated with pre-immune serum or the incubation with primary antibodies was omitted. The sections were visualized and images acquired using a Nikon Optiphot-2 microscope equipped with a digital camera CoolPix 4300 (Nikon, Melville, NY, USA) and an Olympus BX51 microscope equipped with a digital camera Olympus DP70 (Olympus American Inc, USA).

Images were digitized and figures elaborated using Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

Estimations of Cell Density

The density (cell number/750 μm^2) of mast and neuroendocrine cells displaying immunoreactivity for serotonin and of neuroendocrine cells immunoreactive to neurofilaments was estimated in seven alternate slices per animal following the single slice cell counting protocol (Chang et al, 1993). Although this is not an unbiased method, the results regard cell density are fully

comparable with those obtained using the dissector method (Wilson et al, 1998). We analyzed caput epididymis from at least six animals per age (40, 60, 90 and 120 days). Neuroendocrine cells were clearly distinguishable from mast cells since the latter are larger, have secretory granules of considerable size and are located in the interstitial space. The average cell density was estimated per animal and then per animal group. Because data did not pass the normality test, we carried out a Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks (significant level set at $p < 0.01$) followed by a Dunn's method for multiple comparisons (significant level set at $p < 0.05$).

Western blot for tryptophan hydroxylase

Rats of different ages were anesthetized and the caput rapidly dissected, frozen in 2-methylbutane pre-chilled with dry ice and stored at -75°C . Tissue samples were homogenized in a buffer containing Tris-HCl (0.05 M, pH 7.4), dithiothreitol (1 mM) and EGTA (1 mM) supplemented with a mixture of protease inhibitors (Complete, EDTA-free, Roche-Mannheim, Germany). Samples (12.5 μg of protein/well) diluted in Laemmli's solution were electrophoresed, under reducing conditions (5% β -mercaptoethanol), through sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels (12%) at 100–150 volts for 2 hours. Pre-stained molecular weight markers (Amersham-Pharmacia-Biotech, Piscataway, NJ, USA) were used to determine the relative mobility of proteins. Following electrophoresis, the gels were equilibrated in a buffer containing Tris 25 mM, glycine 192 mM, methanol 20%) for 15 minutes. The proteins were then transferred to nitrocellulose sheets (BIO-RAD) at 200 μA during 1 hour at 4°C . The membranes were blocked with non-fat milk (5%) dissolved in Tris (20 mM)-Sodium Chloride (500 mM) buffer (TBS) for 2 hours at room temperature. Membranes were then washed three times for 5 minutes with TBS containing Tween-20 (0.05%; T-TBS), and incubated with a monoclonal anti-mouse tryptophan hydroxylase (1:3000, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) at room temperature overnight.

Membranes were washed three times with T-TBS and incubated with goat anti-mouse secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (1:5000, Vector) for 2 hours at room temperature. Finally, after washing the membranes with T-TBS three times for 5 minutes, peroxidase activity was revealed by using a chemiluminescence-based detection kit according to the protocol suggested by the manufacturer (ECL, Amersham-Pharmacia-Biotech, Buckinghamshire, UK). Membranes were exposed to film sheets for 2 minutes at room temperature and the films developed (Dektol-19, Kodak, Rochester, NY, USA) and fixed (Rapid Fixer, Kodak). Images of these films were captured, digitized and analyzed through densitometry (Software Quantity One 4.4.1, BIORAD) by using a computer-based imaging analysis system (Fluor S Multimager, BIORAD). All measurements were corrected based upon the average value of each film's background. Statistical comparisons among different ages were carried out with a one way ANOVA (significant level set at $p < 0.05$).

HPLC analyses of tryptophan hydroxylase activity and serotonin concentration

Caput samples were obtained of animals between the ages of 40 and 120 days to evaluate local variations of serotonin concentration during sexual maturation. Caput samples were also collected from 170 days old sexually inactive and breeder rats to analyze whether serotonin concentration in the epididymis shifts in association with the animal's reproductive status.

Finally, we collected caput samples from 120 days old rats treated or not with *p*CPA to further evaluate the possibility of local synthesis. This agent was administered intraperitoneally every 72 hours for three times, the animals were sacrificed 72 hours after the last injection. Tissue samples from the three groups described were dissected on an ice-chilled plate, weighted, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -75°C until use. The activity of tryptophan hydroxylase in the caput of epididymis was estimated by measuring the production of 5-

hydroxytryptophan following the protocol described previously (Manjarrez-Gutiérrez et al, 1994). Results are expressed in nanomoles of product/milligram of protein/hour (nM/mg protein/h). The detection of serotonin and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) was carried out according to the HPLC protocol described previously (Silva et al, 2002; least detectable dose 5 pg/μl). Chromatograms were recorded on line and the peak heights measured by using Millennium 32 Software (Waters Co., Milford, MA, USA). Results are expressed in nanograms of serotonin or 5-HIAA/milligram of tissue (ng/mg tissue). The statistical test used to analyze differences among groups when the data sets passed the normality test was ANOVA (significant level set at $p < 0.01$) followed by a Bonferroni's t-test for multiple comparisons (significant level set at $p < 0.05$). For data sets that did not pass the normality test, we used a Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks (significance level set at $p < 0.01$) followed by a Dunn's or Holm-Sidak's methods for multiple comparisons (significance level set at $p < 0.05$).

Results

Immunohistochemical survey

Immunohistochemical studies were carried out to identify cells positive to serotonin, to different serotonin receptor subtypes and to serotonin transporter in the caput epididymis. Serotonin immunoreactivity was observed in epithelial (Fig. 1a), neuroendocrine (Fig. 1b), and mast cells (Fig. 1c). Because near 80% of the epithelial cells in the caput are of the principal type (Robaire and Hermo, 1988), and the pattern of epithelial cell staining for serotonin appears to a large extent homogeneous, we think that principal cells the ones displaying serotonin immunoreactivity. This staining appears in granules that are distributed throughout the cytoplasm and accumulate in the luminal phase of the cells (Fig. 1a). In addition, serotonin positive neuroendocrine cells had dendrite-like projections extending through the basal lamina and/or

directing towards the tubular lumen (Fig. 1b). The density of these cells increased significantly from 40 to 60 days of age (Table 1). Another increment occurred between postnatal days 60 and 90. There was a significant fall between 90 days and 120 days of age. On the other hand, the density of serotonin-positive mast cells increases significantly between 40 and 90 days of age, to remain unchanged thereafter (Table 1).

Besides presenting immunoreactivity to serotonin, neuroendocrine cells also display immunoreactivity to neurofilaments. In the caput, neurofilament positive neuroendocrine cells showed fine processes running parallel to the tubular wall and/or between adjacent epithelial cells (Fig. 1d). The density of these cells increased significantly from 40 to 60 days of age (Table 1). Another increase was observed between the ages of 60 and 90 days. There was a significant fall in the density of neurofilament positive neuroendocrine cells between 90 to 120 days of age.

Immunocytochemical studies evaluated the presence and distribution of the serotonin transporter and of serotonin receptors 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{2A} and 5HT₃. Serotonin transporter immunoreactivity was observed in the luminal border of putative principal epithelial (Fig. 2a), endothelial (Fig. 2b) and mast cells (Fig. 2c). Interestingly, the staining to serotonin transporters in mast cells appears distributed in granules. One must remember that the majority of these cells uptake and concentrate serotonin in these granules (Padawer, 1974; Wingren et al, 1983), so this pattern of staining is not unexpected.

5HT_{1A} (Fig. 3a) and 5HT₃ (Fig. 3b) receptor immunoreactivity was observed in epithelial cells. These cells appear to be apical and principal, respectively. Endothelial (Fig. 3c) and mast cells (Fig. 3d) labeled positive for 5HT_{1B} serotonin receptors. Cells that appear to be principal (Fig. 3e) showed 5HT_{2A} receptors immunoreactivity. No reaction was observed in epithelial cells of the caput epididymis incubated only with the conjugated antibody (Fig. 3f). It is interesting to note that immunoreactivity for various serotonin receptors appears cytoplasmic with the

exception of that observed for 5HT₃ receptors. This pattern of immunocytochemical staining has been reported in neuronal and non-neuronal tissue (Haase et al, 2001; Langlois et al, 1995; Sari et al, 1997; Bonaventure et al, 1998; Huang et al, 1998; see also www.chemicon.com). Because transporters and receptors are subjected to a process of vesicular-mediated recycling (Melikian, 2004; Saxena et al, 2005), this process may contribute to explain the cytoplasmic distribution of immunocytological labels. Also, the observation that suggests that 5HT_{1A} receptors do not co-localize with serotonin in the same type of epithelial cell is not surprising since Kaya et al (2004) have reported a similar finding for taste bud receptors. We did not pursue any quantitative analyses of cells stained for serotonin receptors because no obvious changes were observed with age. Finally, spermatozoa displayed immunoreactivity for 5HT_{2A} and 5HT₃ receptors (Figs. 4a-4b, respectively). Flagella appear to be stained for both receptor subtypes. Sections incubated only with the conjugated antibody showed no staining (Fig. 4c).

Tryptophan hydroxylase and serotonin in the caput epididymis during sexual maturation

To document the presence and distribution of tryptophan hydroxylase in the caput, we first carried out immunohistochemical studies using monoclonal antibodies raised against this enzyme. Intense staining for tryptophan hydroxylase was observed in the cytoplasm of what appeared principal epithelial cells (Fig. 5a). Western blot analyses further suggested the presence of tryptophan hydroxylase in caput homogenates. In the adult brain stem, used as a control, tryptophan hydroxylase was identified predominantly as a single band with a molecular weight of around 48kDa (Fig. 5b). In contrast, two protein bands displayed immunoreactivity for tryptophan hydroxylase in the caput. These bands had approximate molecular weights of 48kDa and 51kDa (Fig. 5b). Densitometric analyses revealed no differences in the intensity of the immunostained bands as animals mature. Furthermore, by measuring the production of 5-hydroxytryptophan through HPLC, we confirmed the presence of tryptophan hydroxylase activity

in the caput at different ages (Table 2). These studies showed that significant increases in the activity of this enzyme occur between the ages of 40 and 60 days and between the ages of 90 and 120 days. HPLC analyses also documented that the concentration of serotonin tends to increase with age. The increment reached statistical significance only when the ages of 40, 60 and 90 days were compared with 120 days (Table 2). It is interesting to note that serotonin concentrations in the caput were higher (0.731 ± 0.03 ng/mg) than those in the brain stem (0.279 ± 0.036 ng/mg). This is remarkable if one considers that the brain stem is one of the major sites of serotonin synthesis (for further discussions see Anderson et al, 1979). In contrast, the concentration of 5-hydroxyindole acetic acid, the degradation product of serotonin, was similar among different ages (Table 2). Finally, the ratio 5-hydroxyindole acetic acid/serotonin decreased in more mature rats (Table 2).

Tryptophan hydroxylase and serotonin in the caput epididymis of sexually inactive, breeder and pCPA-treated rats

To further document the ability of the caput epididymis to produce serotonin, we injected a group of adult rats with pCPA and measured tryptophan hydroxylase activity and serotonin concentration in the caput. Table 3 summarizes these results. pCPA treatment decreased both the activity of tryptophan hydroxylase and serotonin concentration in adult rats. The administration of pCPA did not affect body, epididymal or testicular weight. To begin evaluating whether epididymal serotonin may affect reproductive functions, tryptophan hydroxylase activity and serotonin concentrations were determined in the epididymis of sexually inactive and breeder rats. The activity of tryptophan hydroxylase tends to increase in breeder rats (Table 4). The concentration of serotonin was significantly higher in breeder than in sexually inactive rats (Table 4). Breeder rats displayed increased body weight but not those of the epididymis and testes as compared with sexually inactive rats (Table 4).

Discussion

The concentration of serotonin in the epididymis of some mammals is one of the highest in the body (Kormano and Penttila, 1968; Anderson and Paparo, 1977; Anderson et al, 1979). Although the origin of this amine is uncertain, Anderson et al, (1979) proposed that the tubular epithelium and mast cells were most likely the sources of serotonin in the epididymis. The presence of tryptophan hydroxylase and serotonin immunoreactivity in what appears to be principal cells and of serotonin immunoreactivity in mast cells is fully compatible with this concept. In addition, our study documents the existence of neuroendocrine cells that likely constitute an additional source of serotonin in the caput epididymis. Because neuroendocrine cells are located at the base of the epithelium, it is quite possible that Anderson et al (1979) misinterpreted them as being myoepithelial cells. Although reporting the presence of neuroendocrine cells in the epididymis is new, previous studies have shown neuroendocrine cells associated with epithelia in other male reproductive organs (Hanyu et al, 1987; Vittoria et al, 1990; Abrahamsson, 1999; Frungieri et al, 2002; Arrighi et al, 2004). Interestingly, in the caput epididymis, the density of neuroendocrine and mast cells shifted during sexual maturation reaching a peak by about 90 days of age. Although we ignore the meaning of the presence and numerical changes of these cell types in the caput, the secretory products of neuroendocrine and mast cells might control cell division, growth and differentiation as described in other organs through the male urogenital tract (Abrahamsson, 1999; Mayerhofer et al, 1999; Arrighi et al, 2004). Because the density of mast and neuroendocrine cells and serotonin concentration follow a similar pattern only from 40 and 90 days of age, it is possible that both cell groups might contribute to maintain caput serotonin levels mainly between these ages. In addition, neuroendocrine cells transduce mechanical and/or chemical stimuli. Following their activation, messengers released by neuroendocrine cells

modulate the secretory activity of epithelia, the excitability of adjacent intraepithelial nerves and/or blood flow (Fujita et al, 1995; Gapp, 1987).

Our immunocytochemical studies revealed the presence of 5HT_{1B} receptors and of serotonin transporters in endothelial cells of the caput epididymis. These observations agree with previous work showing the expression of both in endothelial cells in the nervous system (Daws, 2000) and in the lung (Wang, 2004). Serotonin transporters and the receptors 5HT_{1B} in endothelial cells may control serotonin uptake, blood vessel remodeling and permeability and blood flow (Lee and Fanburg, 1986; Collin et al, 1996; Nilsson et al, 1999; MacLean et al, 2000; Horschitz et al, 2001; Wakayama et al, 2002). Mast cells also displayed immunoreactivity for serotonin transporter and 5HT_{1B} receptors. The presence of serotonin transporter in mast cells supports the notion that they take up serotonin (Vega and Rudolph, 2002). 5HT_{1B} receptors function as auto-receptors that modulate serotonin release in serotonergic neurons (Blier et al, 1998). This might also be their role in mast cells. Finally, we did not detect tryptophan hydroxylase immunoreactivity in mast cells as previously reported in a subtype of them located in the nervous system (Mathiau et al, 1994). This indicates that mast cells in the epididymis are of the subtype that does not have the ability to synthesize serotonin. This could explain why they displayed immunoreactivity to serotonin transporter.

Epithelial cells that appear to be apical showed immunoreactivity to 5HT_{1A} receptors. On the other hand, epithelial cells likely of the principal type displayed immunoreactivity to serotonin transporters and 5HT₃ receptors. Because the activation of 5HT_{1A} receptors regulate cell proliferation (reviewed in Gaspar et al, 2003) and 5HT₃ receptors stimulate enterocyte secretion (Liu et al, 2002; Costall and Naylor, 2004), we think that they might have similar functions in the caput epididymis. The presence of serotonin transporter in the luminal face of

principal-like cells suggests that they either transfer serotonin between compartments or degrade this amine as described in neuronal systems (Horschitz et al, 2001).

Previous studies conducted in invertebrates support the presence of 5HT_{1A}, 5HT_{2A} and 5HT₃ receptors in mature spermatozoa (Bandivdekar et al, 1992; Stephens and Prior, 1992) and of 5HT₂ receptors in spermatozoa of some mammals (Meizel and Turner, 1983; Young and Laing, 1990). Our results support the existence of 5HT_{2A} and 5HT₃ receptors in rat spermatozoa, but not of 5HT_{1A} receptors as shown for invertebrates. The reason for this discrepancy may be interspecies variations and/or differences in the maturation stage of the sperm. Because spermatozoa immunostained for 5HT_{2A} and 5HT₃ are observed in caput tubules, our observation suggests that both receptors may participate in the process of maturation of the spermatozoon. In support of this possibility, we found that the content of serotonin and tryptophan hydroxylase activity tend to increase in breeder as compared with sexually inactive rats. Also it is known that serotonin (50µM) activates motility in ejaculated, invertebrate spermatozoa (Parisi et al, 1984). This might result from the activation of flagella through a process of cAMP-dependent dynein phosphorylation (Stephens and Prior, 1992). Furthermore, in humans, hyperserotoninaemia (120.8±33.0 relative to control values of 68.5±5.3) leads to azoospermia (Gonzales et al, 1992).

One of the goals of this work was to evaluate whether some of the cellular elements of the caput epididymis have the ability to produce serotonin. This amine is synthesized through a metabolic pathway in which the limiting step is posed by tryptophan hydroxylase. Hence, the presence of tryptophan hydroxylase in the epididymis would support local synthesis of serotonin. In agreement with this possibility, our morphological studies documented the presence of tryptophan hydroxylase and serotonin immunoreactivity in what appeared to be principal cells of the caput epididymis. Western blot analyses showed the presence of two bands (48kDa and 51kDa) positive to tryptophan hydroxylase in caput homogenates. Chromatographic studies

revealed *p*CPA-sensitive, tryptophan hydroxylase activity in the caput and a decreased concentration of serotonin in *p*CPA treated rats. All these data, together with those discussed earlier, support the concept that the caput epididymis has the ability to produce serotonin locally, being the likely source, the principal epithelial cells. Other sources such as neuroendocrine, mast and vascular cells, as well as the tubular fluid incoming from the testicle, surely make a significant contribution to the total amount of serotonin in the caput. Finally, the presence of two isoforms of tryptophan hydroxylase in the caput is not completely surprising because previous studies suggested the existence of two isoforms of tryptophan hydroxylase encoded by two distinct genes in the central nervous system and peripheral organs (Walther et al, 2003). It is clear, however, that more studies are needed before concluding that the caput epididymis indeed contains two active forms of tryptophan hydroxylase.

An interesting observation is that the activity of tryptophan hydroxylase increased with age despite the fact that both the intensity of the bands positive for tryptophan hydroxylase in the Western blots and of the immunocytochemical staining did not vary much among different ages. This suggests that the mechanisms that regulate the activity of this enzyme in the epididymis shift during sexual maturation. For instance, the levels of activity of tryptophan hydroxylase are modulated by the availability of co-factors such as that of tetrahydrobiopterine (Fitzpatrick, 1999); it is possible that the availability of this co-factor increases with age. Furthermore, caput serotonin concentration increased with age. However, the activity of tryptophan hydroxylase is much greater than that expected considering the concentration of serotonin. A relative excess of tryptophan hydroxylase activity with respect to the concentration of serotonin also occurs in the brain (Feldman et al, 1997). Although the excess of the enzymatic activity may contend extra-demands (Feldman et al, 1997), tryptophan hydroxylase might also be involved in other

metabolic pathways in the epididymis, such as in the synthesis of melatonin, as described in the testis (Tijmes et al, 1996).

The concentration of serotonin in the caput increased with age, but that of 5-hydroxyindole acetic acid was essentially the same during sexual maturation. This finding suggest that serotonin synthesis increases as animals mature sexually, likely as a result of an increment in tryptophan hydroxylase activity as discussed in the preceding paragraph. This conclusion contrast with previous studies that conclude that increments of serotonin concentration in reproductive organs result from changes in the turnover rate in golden hamsters (Frungeri et al, 1999).

Finally, to evaluate whether serotonin might participate in the reproductive function of the epididymis, we measured the content of this amine and the activity of tryptophan hydroxylase in the caput of sexually inactive and breeder rats subjected to a monogamous mating system. Both parameters were found increased in breeders supporting the concept that sexual activity and serotonin concentration in the epididymis are somehow linked. Although the mechanism is yet unknown, evidence supports that serotonin modulates testosterone release from testicular Leydig cells (Tinajero et al, 1993; Frungieri et al, 1999) and that both testosterone and serotonin regulate sexual behavior by acting on the hypothalamic preoptic area (e.g., Popova and Amstislavskaya, 2002). Interestingly, preliminary observations support that testosterone serum levels in breeders are eighteen percent higher than those observed in sexually inactive rats (Jiménez-Trejo and Gutiérrez-Ospina, unpublished observations). It might then be possible that testosterone serum levels match sexual behavior with serotonin concentration in the epididymis. In addition, based upon our results, we could speculate that serotonin released from epithelial cells might affect directly sperm maturation acting through 5HT_{2A} and 5HT₃ receptors. On the other hand, serotonin secreted from neuroendocrine and mast cells could affect sperm maturation by modulating local temperature, nutrient apportionment and/or trophic support through controlling

vasomotor and epithelial function. Clearly, more research is needed to evaluate the merit of each of these ideas.

References

- Abrahamsson PA. Neuroendocrine cells in tumor growth of the prostate. *Endocrinol Relat Cancer* 1999;6:503-519.
- Anderson ME, Paparo AA. Paraformaldehyde-induced fluorescence in the epididymis of *Didelphis marsupialis*. *Anat Rec.* 1977;187:524.
- Anderson ME, Paparo AA, Martan J. Paraformaldehyde-induced fluorescence as a histochemical test for 5-hydroxytryptamine in the epididymis of the opossum. *J Anat.* 1979;129:141-149.
- Arrighi S, Cremonesi F, Bosi G, Domeneghini C. Endocrine-paracrine cells of the male urogenital apparatus: a comparative histochemical and immunohistochemical study in some domestic ungulates. *Anat Histol Embryol.* 2004;33:225-232.
- Bandivdekar AH, Segal SJ, Koide SS. Binding of 5-hydroxytryptamine analogs by isolated Spisula sperm membrane. *Invest Reprod Dev.* 1992;21:43-46.
- Blier P, Pineyro G, el Mansari M, Bergeron R, de Montigny C. Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann NY Acad Sci.* 1998;861:204-216.
- Bonaventure P, Voorn P, Luyten WH, Leysen JE. 5HT1B and 5HT1D receptor mRNA differential co-localization with peptide mRNA in the guinea pig trigeminal ganglion. *Neuroreport.* 1998;9:641-645.
- Chang FL, Hawrylak N, Greenough WT. Astrocytic and synaptic response to kindling in hippocampal subfield CA1. I. Synaptogenesis in response to kindling in vitro. *Brain Res.* 1993;603:302-308.
- Collin O, Damber JE, Bergh A. 5-Hydroxytryptamine a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. *J Reprod Fertil.* 1996;106:17-22.
- Costall B, Naylor RJ. 5-HT₃ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2004;3:27-37.
- Davidoff MS, Middendorff R, Pusch W, Muller D, Wichers S, Holstein AF. Sertoli and Leydig cells of the human testis express neurofilament triplet proteins. *Histochem Cell Biol.* 1999;111:173-187.
- Daws LC, Gold GG, Teicher SD, Gerhardt GA, Frazer A. 5-HT(1B) receptor-mediated regulation of serotonin clearance in rat hippocampus in vivo. *J Neurochem.* 2000;75:2113-2122.
- Dufau ML, Tinajero JC, Fabbri A. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J.* 1993;7:299-307.
- Feldman RS, Meyer J, Quenzer LF, eds. *Principles of Neuropharmacology.* 1st ed. Sunderland: Sinauer Associates; 1997.

Fitzpatrick PF. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Ann Rev Biochem.* 1999;68:355-381.

Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Rubio M, Ozu M, Lustig L, Calandra RS. Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology.* 1999;69:299-308.

Frungieri MB, Zitta K, Pignataro OP, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS. Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic, and corticotropin-releasing hormone systems modulating cAMP and testosterone production in the golden hamster. *Neuroendocrinology.* 2002;76:35-46.

Fujita T, Iwananga T, Lee SH, Terada M. Sensor cells and nerve terminals in some gut-derived organs: a review. *Ital J Anat Embryol.* 1995;100:197-204.

Gapp DA. Gastroenteropancreatic cells. In: Chester-Jones I, Ingleton PM, Phillips JG, eds. *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology.* New York: Plenum Press; 1987;515-540.

Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:1002-1012.

Gonzales GF, García-Hjarles M, Velasquez G. Hyperprolactinaemia and hyperserotoninaemia: their relationship to seminal quality. *Andrologia.* 1992;24:95-100.

Gopal Dutt N. Structure of mammalian epididymis. In: Joy K, Krishna A, Haldar C, eds. *Comparative Endocrinology and Reproduction.* New Delhi: Narosa Publishing House.1999:201-227.

Gutiérrez-Ospina G, Manjarrez-Gutiérrez G, González C, López S, Herrera R, Medina-Aguirre I, Hernández RJ. Neither increased nor decreased availability of cortical serotonin (5HT) disturbs barrel field formation in isocaloric undernourished rat pups. *Int J Dev Neurosci.* 2002;20:497-501.

Haase J, Killiam AM, Magnani F, Williams C. Regulation of the serotonin transporter by interacting proteins. *Biochem Soc Trans.* 2001;29:722-728.

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

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

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

Huang WQ, Zhang CL, Di XY, Zhang RQ. Studies on the localization of 5-hydroxytryptamine and its receptors in human placenta. *Placenta* 1998; 19:655-61

Ibrahim MZ, Koshayan DS. The mast cells of the mammalian central nervous system. VIII. Uptake of 35S and 3H-5-hydroxytryptophan inside and outside of CNS. *Cell Tissue Res.* 1981; 220:529-538.

Kaya N, Shen T, Lu SG, Zhao FL, Herness S. A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286:R649-58.

Kojima M, Oguro K, Sawabe K, Lida Y, Ikeda R, Yamashita A, Nakanishi N, Hasegawa H. Rapid turnover of tryptophan hydroxylase is driven by proteosomes in RBL2H3 cells, a serotonin producing mast cell line. *J Biochem (Tokyo)* 2000;127:121-127.

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

Langlois X, Gerard C, Darmon M, Chauveau J, Hamon M, el Mestikawy S. Immunolabeling of central serotonin 5-HT1D beta receptors in the rat, mouse, and guinea pig with a specific anti-peptide antiserum. *J Neurochem.* 1995;65:2671-2681.

Lee SL, Fanburg BL. Serotonin uptake by bovine pulmonary artery endothelial cells in culture. I. Characterization. *Am J Physiol.* 1986;250:C761-765.

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

Liu MT, Report S, Kiang Y, Murphy DL, Garson MD. Expression and function of 5-HT3 receptors in the enteric neurons of mice lacking the serotonin transporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G1398-1411.

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

Manjarrez-Gutiérrez G, Chagoya-Guzmán G, Hernández J. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int J Dev Neurosci.* 1994;12:695-702.

Mathiau P, Bakalara N, Aubineau P. Tryptophan hydroxylase can be present in mast cells and nerve fibers of the rat dura mater but only mast cells contain serotonin. 1994. *Neurosci Lett* 182:133-137.

Mayerhofer A, Frungieri MB, Fritz S, Bulling A, Jessberger B, Vogt HJ. Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies. *J Androl.* 1999;20:341-347.

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

Melikian HE. Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling and regulation. *Pharmacol Ther.* 2004; 104:17-27.

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

Padawer J. Mast cells: extended lifespan and lack of granule turnover under normal in vivo conditions. *Exp Mol Pathol.* 1974;20:269-280.

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

Popova NK, Amstislavskaya TG. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonin receptors differentially modulate mouse sexual arousal and the hypothalamo-pituitary-testicular response to the presence of a female. *Neuroendocrinology.* 2002;76:28-34.

Queiroz DBC, Mendes FR, Porto CS, Avellar MC. Alpha1-adrenoceptor subtypes in rat epididymis and the effects of sexual maturation. *Biol Reprod.* 2002;66:508-515.

Richard F, Sanne JL, Bourde O, Weissman D, Ehret M, Cash C, Maitre M, Pujol JF. Variation of tryptophan-5-hydroxylase concentration in the rat raphe dorsalis nucleus after p-chlorophenylalanine administration. I. A model to study the turnover of the enzymatic protein. *Brain Res.* 1990;536:41-45.

Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press, 1988:999-1080.

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

Sari Y, Lefevre K, Bancila M, Quignon M, Miquel MC, Langlois X, Hamon M, Verge D. Light and electron microscopic immunocytochemical visualization of 5-HT_{1B} receptors in the rat brain. *Brain Res.* 1997;760:281-286.

Saxena S, Bucci C, Weis J, Kruttgen A. The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci.* 2005; 25:10930-10940

Silva AM, Queiroz DBC, Castro EF, Naffah-Mazzacoratti MG, Godinho RO, Porto CS, Gutiérrez-Ospina G, Avellar MCW. 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.* 2002;23:374-382.

Stephens RE, Prior G. Dynein from serotonin-activated cilia and flagella: extraction characteristics and distinct sites for cAMP-dependent protein phosphorylation. *J Cell Sci* 1992;103:999-1012.

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

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

Toshimori K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Micros Res Tech.* 2003;61:1-6.

Vega E, Rudolph MI. Characterization of oxytocin receptors and serotonin transporters in mast cells. 2002. *Endocrine.* 18:167-172.

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

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

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* 2003;299:76.

Wang HL. The serotonin receptor and transporter as potential therapeutic targets for pulmonary hypertension. *Curr Opin Invest Drugs.* 2004;5:963-966.

Weissenberg R, Yossefi S, Oschri Y, Madgar I, Lewin LM. Investigation of epididymal sperm maturation in the golden hamster. *Int J Androl.* 1995;18:256-261.

Weissmann D, Chamba G, Debure L, Rousset C, Richard F, Maitre M, Pujol JF. Variation of tryptophan-5-hydroxylase concentration in the rat raphe dorsalis nucleus after p-chlorophenylalanine administration. II. Anatomical distribution of the tryptophan-5-hydroxylase protein and regional variation of its turnover rate. *Brain Res.* 1990;536:46-55.

Wilson CC, Faber KM, Haring JH. Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT1A receptors: evidence for a glial mechanism. *Brain Res.* 1998;782:235-239.

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

Young RJ, Laing JC. Biogenic amine binding sites in rabbit spermatozoa. *Biochem Int* 1990;21:781-787.

Figure Legends

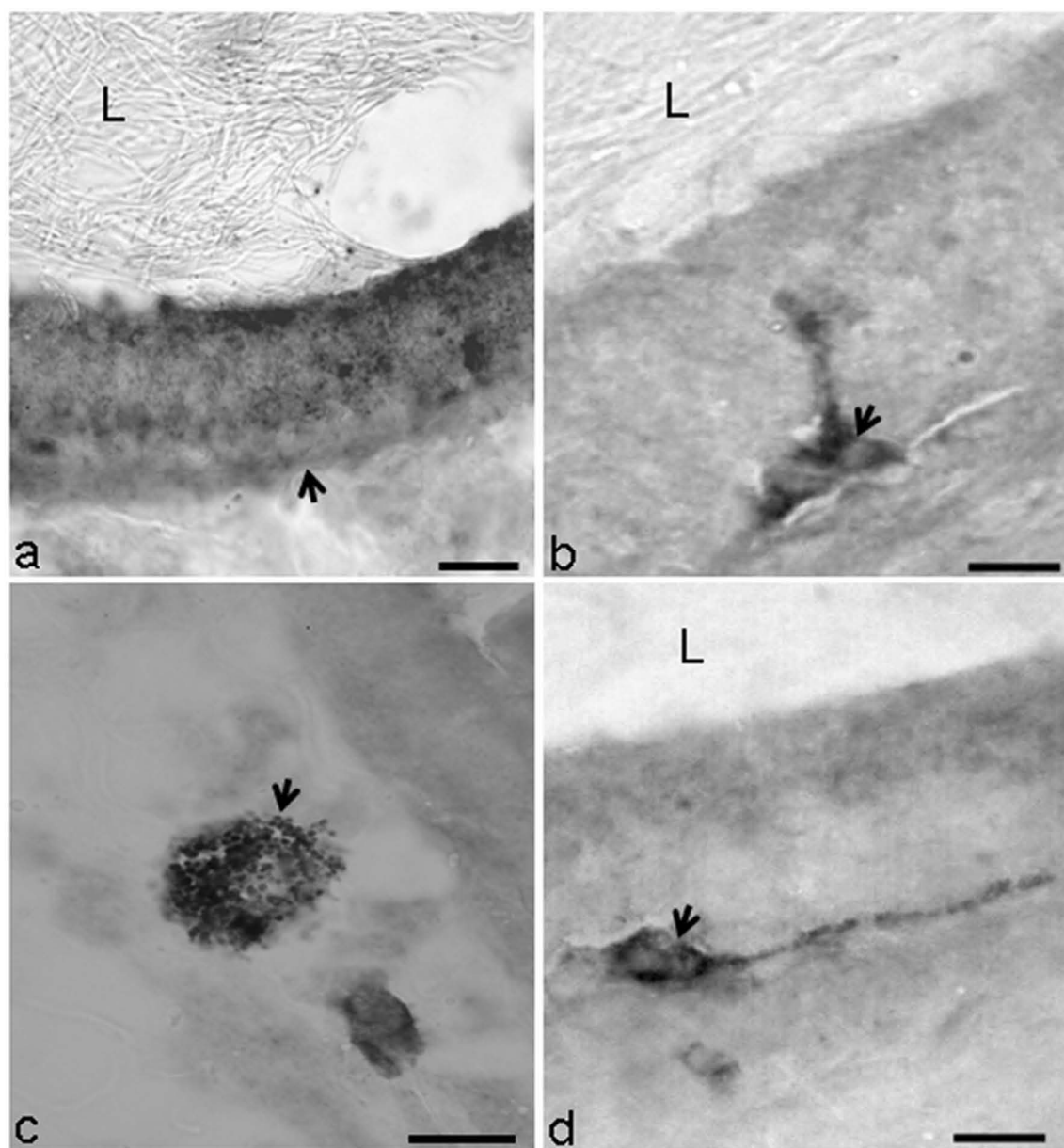
Figure 1. Digital photomicrographs that show putative principal epithelial (a), neuroendocrine (b) and mast (c) cells, all indicated by arrows, displaying immunoreactivity for serotonin in the caput epididymis of 90 days old rats. Whereas in epithelial and mast cells the staining appears granular, in neuroendocrine cells it takes a diffuse cytoplasmic pattern. Neuroendocrine cells also displayed positive immunostaining for neurofilaments 150kDa (d). L=tubular lumen. Scale bars in a and c=20 μ m, in b and d=10 μ m.

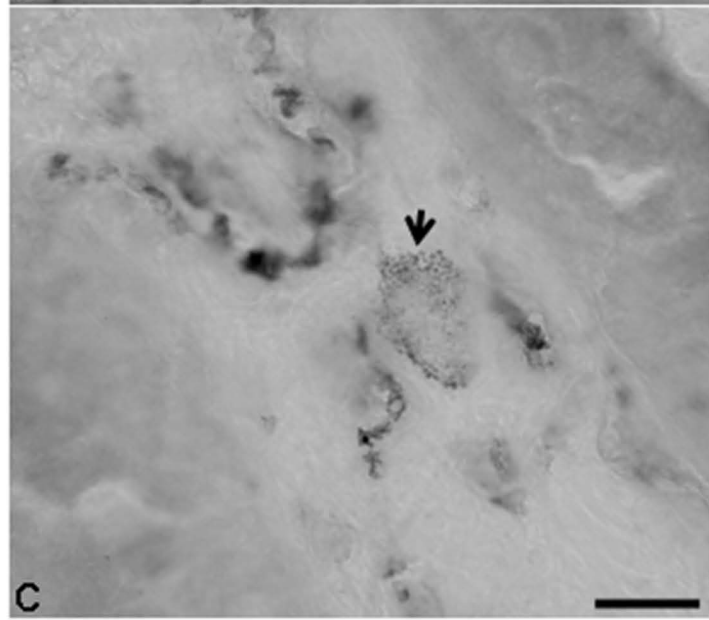
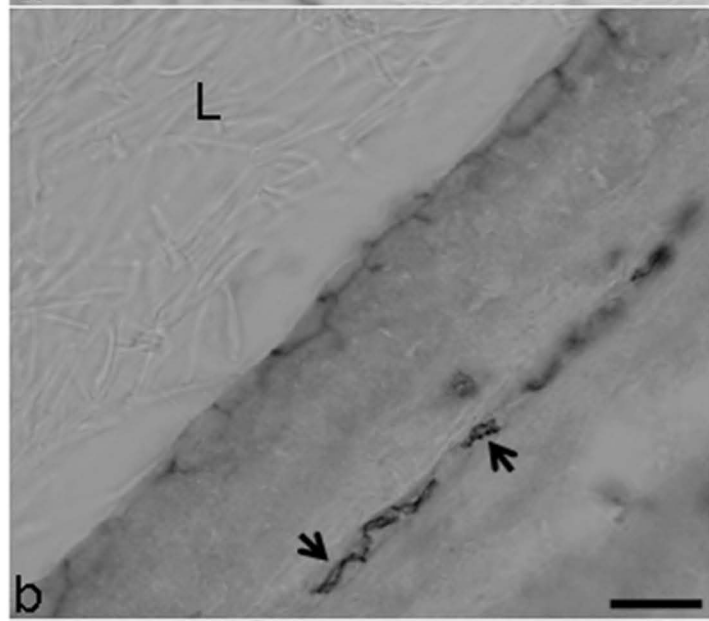
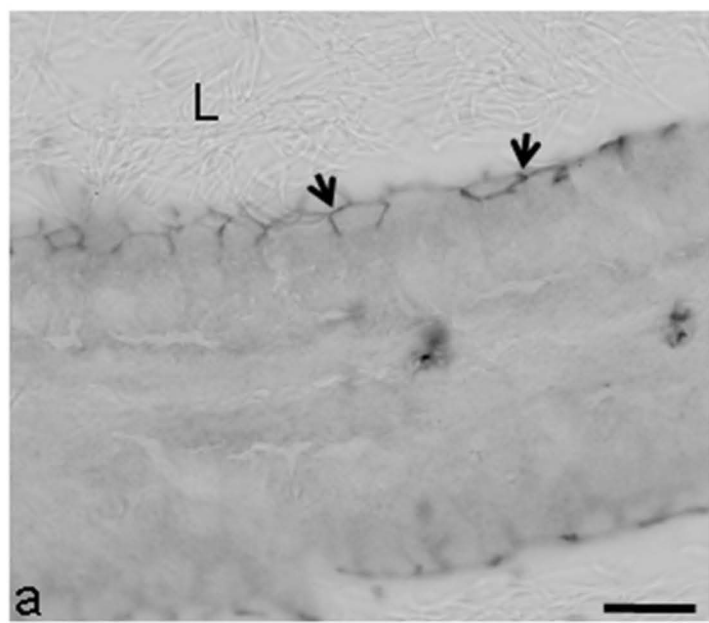
Figure 2. Digital photomicrographs that show putative principal epithelial (a), endothelial (b) and mast cells (c) immunoreactive all to the serotonin transporter in the caput epididymis of 90 days old rats. Whereas in epithelial and endothelial cells the staining contours their free surface, in mast cells it appears granular. Arrows indicate the localization of the staining. L=tubular lumen. Scale bars=20 μ m.

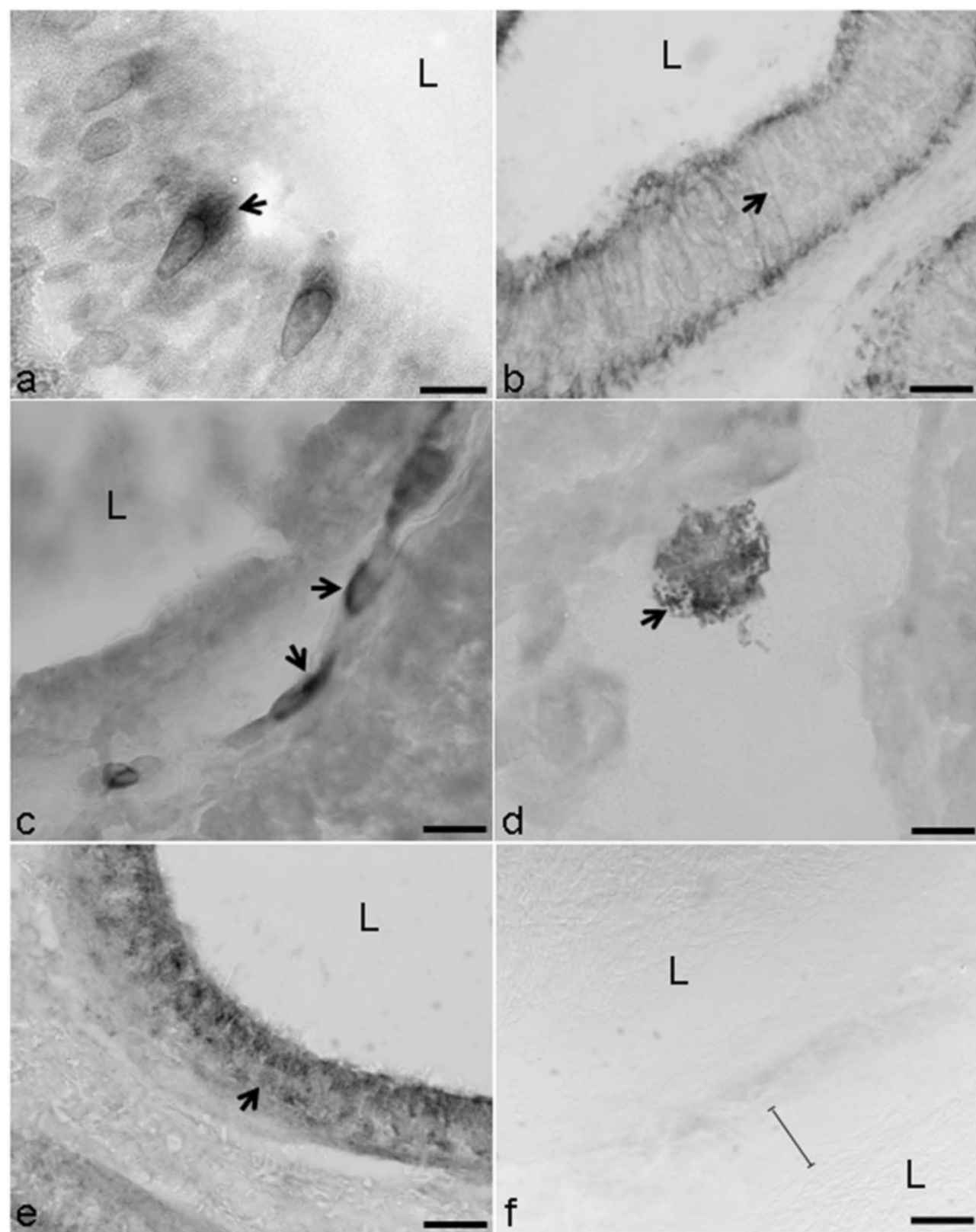
Figure 3. Photomicrographs that illustrate the pattern of cell staining for different types of serotonin receptors in the caput epididymis of 90 days old rats. 5HT_{1A} (a) and 5HT₃ (b) serotonin receptors immunoreactivity was detected in putative apical and principal cells, respectively, both indicated with arrows. Endothelial (c; arrows) and mast cells (d; arrow) displayed 5HT_{1B} serotonin receptors immunoreactivity. 5HT_{2A} serotonin receptors immunoreactivity was observed in putative principal cells (e; arrow). Notice the differential segregation of the staining for the different receptors either in the borders (5HT₃ in b) or in the cytoplasm of cells (5HT_{1A}, 1B and 2A in a, c and e, respectively). A representative negative control is shown in f where the line indicates the relative position of the epithelium. L=tubular lumen. Scale bars in a=10 μ m, in b-f =20 μ m.

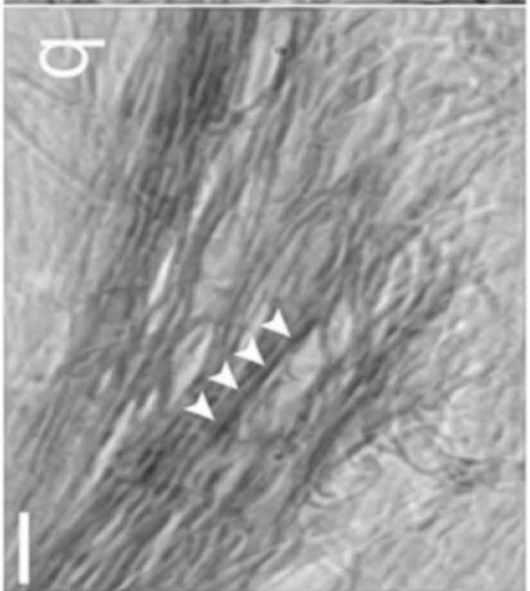
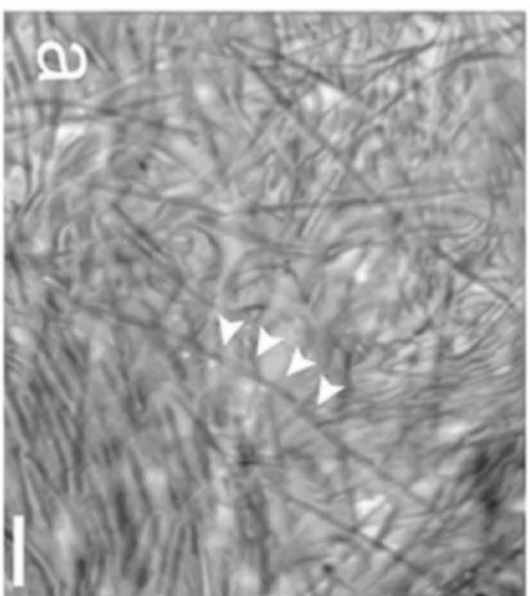
Figure 4. Digital photomicrographs showing spermatozoa in the caput epididymis of 90 days old rats immunostained for 5HT_{2A} (a) and 5HT₃ (b) serotonin receptors. Notice the intense staining for both receptors along the flagella (arrowheads). A representative negative control is shown in (c). Scale bar=10μm.

Figure 5. Digital photomicrograph that illustrates the cytoplasmic distribution of tryptophan hydroxylase immunoreactivity (arrowheads) in putative principal cells (a) of the caput epididymis of 90 days old rats. The line indicates the relative position of the epithelium (e). L=tubular lumen. Scale bar=20μm. In (b), the photograph shows a representative Western blot stained for tryptophan hydroxylase obtained from caput epididymis of rats at different ages. Brain stem homogenates were used as a control. In the caput epididymis two bands of approximately 48kDa and 51kDa of molecular weight labeled positive for the enzyme. In contrast, the adult brain stem only showed one positive band of approximately 48kDa.









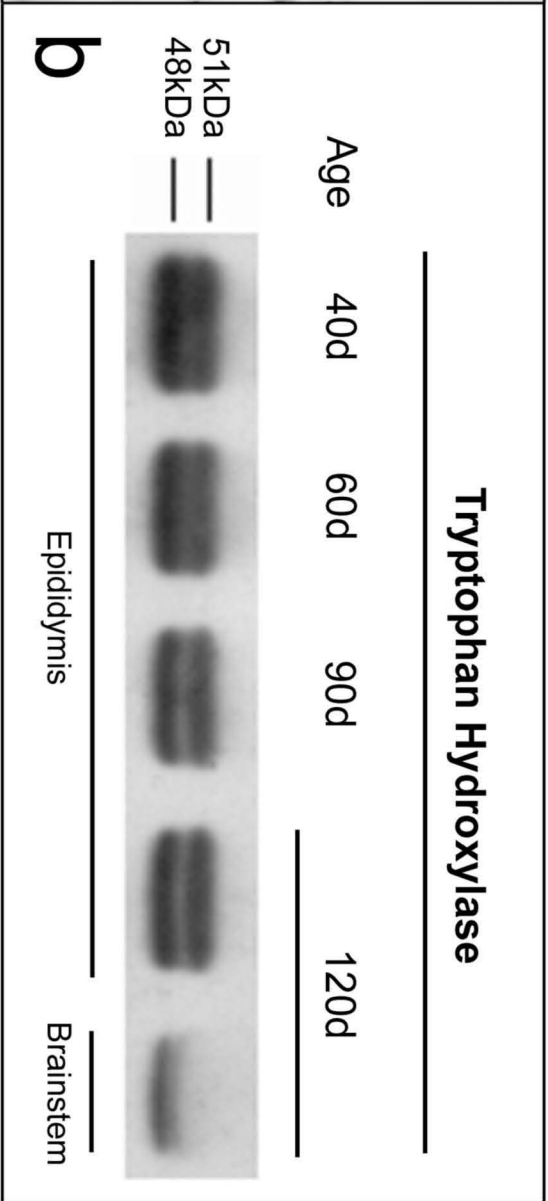
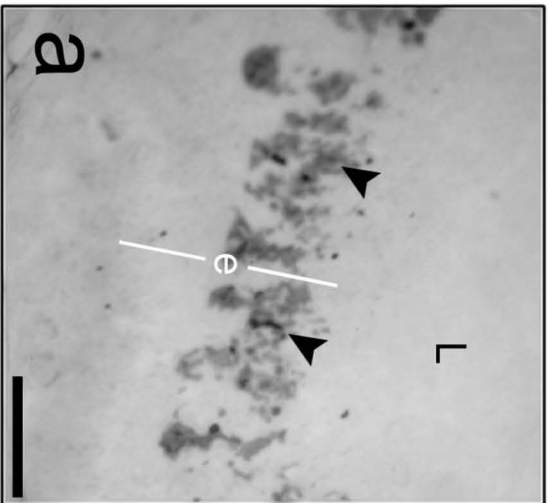


Table 1. Number of mast and neuroendocrine cells with immunoreactivity for serotonin and neurofilament in rat epididymis during sexual maturation.

Age (days)	Mast Cells ¹	Neuroendocrine Cells	
		Serotonin ²	Neurofilaments ³
40 (n=6)	7±1	2±0.4	16±3
60 (n=6)	18±2	27±3	45±2
90 (n=8)	30±1	81±2	59±2
120 (n=8)	29±1	28±1	24±1

Data are presented as mean±S.E.M.(780 μm^2)

¹ Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks: H=108.042, df=3, p<0.001

Dunn's test for multiple comparisons: 40 vs 60: Q=3.867, p<0.05; 60 vs 90: Q=5.368, p<0.05

² Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks: H=196.364, df=3, p<0.001

Dunn's test for multiple comparisons: 40 vs 60: Q=5.895, p<0.05; 60 vs 90: Q=7.948, p<0.05; 90 vs 120: Q=7.538, p<0.05

³ Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks: H=164.614, df= 3, p<0.001

Dunn's test for multiple comparisons: 40 vs 60: Q= 5.240, p<0.05; 60 vs 90: Q=3.018, p<0.05; 90 vs 120: Q=11.684, p<0.05

Table 2. Activity of tryptophan hydroxylase as monitored through the production of 5-hydroxytryptophan, and concentration of serotonin and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) in the rat caput epididymis during sexual maturation. The relation 5-HIAA/serotonin is also presented.

Age (days)	5-Hydroxytryptophan Production ¹ (nM/mg protein/h)	Serotonin Concentration ² ng/mg tissue	5-HIAA Concentration ng/mg tissue	5-HIAA/serotonin relation
40 (n=8)	0.0518±0.0353	0.247±0.0697	0.282±0.0107	1.14
60 (n=7)	0.396±0.0545	0.216±0.0270	0.160±0.0156	0.74
90 (n=7)	0.543±0.0161	0.308±0.0220	0.245±0.0114	0.79
120 (n=10)	0.965±0.0919	0.731±0.0320	0.150±0.0204	0.20

Data are presented as mean±S.E.M.

¹ ANOVA: F=38.010, df=3, p<0.001

Bonferroni's test for multiple comparisons: 40 vs 60: t=3.685, p<0.008; 90 vs. 120: t=4.416, p<0.001

² ANOVA: F=13.811, df=3, p<0.001

Bonferroni's test for multiple comparisons: 90 vs 120: t=5.626, p<0.001

Table 3. Activity of tryptophan hydroxylase as monitored through the production of 5-hydroxytryptophan, and concentration of serotonin in the caput epididymis of control and *p*CPA treated, 120 days old rats.

Age (days)	5-Hydroxytryptophan Production ¹ (nM/mg protein/h)	Serotonin Concentration ² (ng/mg tissue)	Epididymis Weight (g)	Testes Weight (g)	Body Weight (g)
Control	0.965±0.092 (n=8)	0.625±0.050 (n=23)	0.652±0.112 (n=27)	1.87±0.158 (n=27)	387±44 (n=27)
<i>p</i> CPA	0.0506±0.001 (n=8)	0.195±0.024 (n=20)	0.611±0.008 (n=27)	1.86±0.041 (n=27)	351±80 (n=27)

Data are presented as mean±S.E.M.

¹Mann-Whitney Rank Sum Test: T=100, p<0.001

²Mann-Whitney Rank Sum Test: T=220, p<0.001

Table 4. Activity of tryptophan hydroxylase as monitored through the production of 5-hydroxytryptophan, and concentration of serotonin in the caput epididymis of naïve and breeder, 170 days old rats.

Age (days)	5-Hydroxytryptophan Production ¹ (nM/mg protein/h)	Serotonin Concentration ² (ng/mg tissue)	Epididymis Weight (g)	Testes Weight (g)	Body Weight (g)
Sexually inactive	0.305±0.036 (n=4)	0.315±0.041 (n=14)	0.596±0.013 (n=19)	1.82±0.037 (n=19)	372±90 (n=19)
Breeder	0.390±0.027 (n=9)	0.622±0.060 (n=33)	0.621±0.009 (n=60)	1.86±0.022 (n=60)	443±60 (n=30)

Data are presented as mean±S.E.M.

¹ Student t-test: t=4. 131, df=45, p<0.001

² Student t-test: t=6. 647, df=47, p<0.001