



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores

ZARAGOZA

“IDENTIFICACION DE MARCADORES SEROTONINERGICOS EN
ESPERMATOZOIDES DE HUMANO:
EFECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

BLANCA BERENICE MÉNDEZ MARTÍNEZ

Director de tesis: Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo.

MÉXICO, D. F. 2008.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio de Biomembranas del Dr. Marco Tulio González Martínez, localizado en el Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, responsable técnico del proyecto “Modulación de el contenido de calcio intracelular en el espermatozoide de humano” con clave de registro 49517 ante CONACYT. Esta tesis estuvo bajo la Dirección del Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo. Se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CONACYT-12267). Agradezco el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización de mi trabajo de tesis.

Agradecimientos.

A Dios...

A mis familiares y amigos por su amor y ayuda a lo largo de mi vida.

Al Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo por la paciencia con la que dirigió este trabajo de tesis e iniciarme en el área de la investigación.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura, Dr. Marco Antonio Rodríguez Medina, M. en C. Araceli García del Valle y al Mtro. José Ángel Rojas Zamorano por participar como sinodales y las sugerencias a mi trabajo de tesis.

A mis compañeros del laboratorio de biomembranas: Víctor Manuel Torres Flores, Fernando Israel Alarcón Kenell, Giovanni Picazo Juárez y Yadira Libertad Hernández Rueda por su apoyo y amistad.

¡Gracias!

Dedicatoria.

A mis padres:

Martín y Margarita.

A mis hermanos y hermana:

Francisco, Minerva, Yair.

A la memoria de:

Dr. Marco Tulio González Martínez.

Índice.

	Página
I Resumen.	I
II Introducción.	III
1 Generalidades del espermatozoide.	1
1.1 Espermatocitogénesis	2
1.2 Espermiogénesis	3
1.3 Estructura espermática.	5
1.4 Bioquímica del espermatozoide.	7
1.4.1 Fosforilación de proteínas.	9
1.5 Reacción acrosomal.	11
1.6 El espermatozoide y la serotonina.	12
2 Aspectos generales de la serotonina (5-HT).	13
2.1 Metabolismo de la serotonina.	13
2.2 Receptores de serotonina.	14
2.3 Transporte de la serotonina.	17
2.4 La serotonina en el sistema reproductor.	18
3 Planteamiento del problema.	19
4 Objetivos.	19
5 Hipótesis de trabajo.	19
6 Material y Metodología.	20
6.1 Tipo de estudio	20
6.2 Materiales.	21
6.3 Métodos.	22
6.3.1 Preparación de la muestra.	22
6.3.2 Determinación de los parámetros de velocidad progresiva de los espermatozoides de humano. Computer-aided sperm analysis (CASA).	23
6.3.3 Inmunocitoquímica.	24
6.3.4 Western Blot.	27
7 Resultados.	30
7.1 Identificación de Marcadores Serotoninérgicos.	30
7.2 Efectos Fisiológicos (Motilidad progresiva).	36
7.3 Efectos Bioquímicos (Fosforilación de Proteínas de Tirosina).	39
8 Discusión.	41
9 Conclusiones.	46
10 Perspectivas.	48
11 Bibliografía.	49

I Resumen.

El espermatozoide es la célula germinal masculina en todas las especies de animales y contiene el material genético haploide (mitad del número de cromosomas) dentro del núcleo celular y su función fundamental es unirse al óvulo para dar origen a un nuevo individuo. Se encuentra conformado por una cabeza y un flagelo, estructuras en las que a su vez se encuentran diferentes secciones, en la cabeza se localiza el acrosoma el cual contiene las enzimas que producen la lisis de las capas que rodean al óvulo para poder penetrarlo y fecundarlo. La pieza media contiene las mitocondrias que son clave en los procesos de energía de la célula y la pieza principal del flagelo permite el avance y direccionalidad de los espermatozoides dentro del tracto genital femenino. La unidad funcional del flagelo es conocida como axonema, en él se llevan a cabo un sin número de procesos bioquímicos que también promueven la producción de ATP⁺ necesario para que el espermatozoide pueda moverse. Estas características han permitido que los espermatozoides de los mamíferos sean considerados como células con capacidad limitada para sintetizar proteínas o algún otro compuesto molecular.

Por otro lado, una molécula involucrada en la reproducción masculina tanto a nivel central como periférico es la Serotonina, la cual modula señales a través del eje hipotálamo-hipófisis-testículo como son la conducta sexual, el reflejo de erección y eyaculación, la espermatogénesis y probablemente la maduración espermática que se lleva a cabo en la cabeza del epidídimo. La razón principal de este trabajo ha sido mostrar que el espermatozoide de humano presenta la mayor parte de los componentes que conforman el sistema serotoninérgico (enzimas: Triptofano hidroxilasa, Arilaquil N-acetiltransferasa, Monoaminooxidasa A y serotonina), así como los efectos fisiológicos y bioquímicos que puede tener la serotonina al actuar sobre los receptores que identificamos (5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT₃) o el transportador (SER_T) que reportamos a lo largo de este trabajo con ayuda de técnicas tan sensibles como lo son la inmunocitoquímica e inmunotransferencia por Western Blot, además del apoyo del sistema automatizado para evaluar los parámetros espermáticos (CASA).

Hasta el momento no existen reportes de marcadores relacionados con el sistema serotoninérgico en los espermatozoides de humano, ni se han mostrado efectos relacionados sobre la fisiología (motilidad progresiva) y bioquímica (fosforilación de proteínas de tirosina) que pudiera inducir como respuesta la serotonina en estas células fundamentales para la reproducción animal.

En conclusión, los datos que aporta esta tesis son datos novedosos lo que nos permite señalar que los espermatozoides de humano podrían ser capaces de sintetizar serotonina, que existen los principales componentes que conforman el sistema serotoninérgico, que pueden ser estimulados por concentraciones de 50 μM o 100 μM de serotonina tanto a nivel fisiológico, como a nivel bioquímico por lo que la serotonina pudiera participar durante la espermatogénesis, en la maduración de los espermatozoides que se lleva a cabo en la cabeza del epidídimo, en el proceso de la capacitación o al momento de la fertilización del óvulo. En su conjunto estos datos nos permiten sugerir que los espermatozoides de humano no necesariamente deberían de ser considerados como células terminales.

II Introducción.

Hasta el momento los estudios que se tienen sobre los espermatozoides de humano no han permitido la elaboración de algún método anticonceptivo que sea eficaz, temporal, de fácil aplicación, reversible y sin efectos secundarios. A este respecto cabe mencionar que las relaciones sexuales humanas conllevan a un problema social muy grave ya que la tasa de natalidad que se tiene es muy alta al no existir las precauciones necesarias ni la información suficiente para evitar embarazos no deseados. Es en la mujer donde este tipo de alternativas para evitar concebir durante un momento no apropiado de su vida resulta de mayor responsabilidad, de esta manera cargando con el peso del control de la natalidad en la pareja, mientras que en los hombres por nuestro tipo de cultura es difícil inducir la responsabilidad compartida para evitar embarazos no deseados.

Para cierto número de la población la opción más fácil de solucionar este tipo de embarazos no deseados ha sido el aborto por ello el 24 de abril de este año 2008, se ha legalizado el aborto en la ciudad de México; bajo las especificaciones de permitirse la interrupción del embarazo dentro de las primeras 12 semanas de gestación, bajo decisión propia y sin necesidad de justificación.

Por otro lado, se encuentran las parejas que presentan problemas para poder tener hijos. A nivel mundial, los problemas para concebir afectan entre el 10%-20% de las parejas que se encuentran en edad reproductiva pero incapaces de tener descendencia, en un 30% de los casos la causa radica en la infertilidad masculina (otro 30% se debe a infertilidad femenina, y en un 40% de casos las causas son mixtas).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define como esterilidad aquellas personas con incapacidad irreversible de conseguir un embarazo, mientras que la infertilidad es la incapacidad temporal y reversible de una persona para poder concebir. Desde hace algunas décadas esta capacidad limitada es auxiliada por medio de técnicas de reproducción asistida como son:

- 1) Estimulación de la ovulación (Tratamiento hormonal para aumentar el número de óvulos en una mujer).

- 2) Inducción de la ovulación (Administración de hormonas para forzar al ovario para que produzca y elimine un óvulo en mujeres con ovulación deficiente o nula).
- 3) Fertilización *In Útero* (Introducción a través de una cánula de una población de espermatozoides dentro del útero para fertilizar al óvulo).
- 4) Fertilización *In Vitro* (Se refiere a la fertilización extracorporea de un óvulo por un espermatozoide, consiste en la confrontación de espermatozoides previamente capacitados con óvulos de una donadora).
- 5) Inyección directa del espermatozoide en el óvulo: ICSI (Por sus siglas en ingles; intracytoplasmic sperm insertion).
- 6) Transferencia intratubaria de gametos. GIFT (Gamete intrafallopian tube transfer; es la implantación del óvulo y espermatozoide en las trompas de Falopio para que fertilicen).
- 7) Vitricación (Criopreservación de embriones).

Aunque en la actualidad existen diversos estudios relacionados con sustancias o compuestos que se han probado para ver posibles alteraciones en los espermatozoides de mamíferos, nosotros trabajamos con una molécula que puede ser uno de los candidatos para ambos propósitos: la Serotonina (5-hidroxitriptamina: 5-HT) ya que está involucrada tanto a nivel central (conducta sexual, regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada) como a nivel periférico (testículo y epidídimo; ver más adelante). En este trabajo pretendemos mostrar que esta línea de investigación es importante ya que los resultados obtenidos durante el transcurso de este proyecto también nos podrían permitir valorar la participación de los componentes serotoninérgicos en técnicas de reproducción asistida como sería la fertilización *In Vitro* ya que la serotonina o análogos a los receptores que se mencionan podría aumentar la motilidad y por consiguiente la tasa de fertilización como sucede en los espermatozoides de invertebrados o bien hacía la búsqueda de un método anticonceptivo de uso en humanos y animales.

1 Generalidades del espermatozoide.

« Dijo Dios: “Hagamos al hombre a nuestra imagen y semejanza”... y existió el hombre con aliento y vida. Gen 1:26,2:7»... Hacia la sexta semana de desarrollo prenatal, los fetos masculino y femenino son idénticos. Ambos sexos presentan un par de gónadas indiferenciadas idénticas, que tienen la posibilidad de desarrollarse en testículos o en ovarios. El factor que controla su desarrollo parece ser un único gen localizado en el cromosoma Y denominado *Sry*. Este gen produce la proteína denominada factor determinante de los testículos, que hace que las gónadas indiferenciadas se conviertan en testículos. Si el gen *Sry* no está, entonces las gónadas indiferenciadas se convierten en ovarios. Una vez que se han desarrollado las gónadas se ponen en marcha una serie de acontecimientos que determinan el sexo del individuo; estos acontecimientos están dirigidos por hormonas las cuales actúan de dos maneras: con efectos organizadores en el desarrollo de los precursores de los órganos internos tanto femeninos como masculinos (sistema de Müller y sistema de Wolff, respectivamente) y diferenciación de los genitales externos, acontecimientos ocurridos alrededor del tercer mes de gestación y con efectos activadores ocurridos en etapas posteriores cuando los órganos sexuales ya están desarrollados. Por ejemplo, las hormonas (hormona luteinizante, foliculo estimulante y testosterona) inducen la aparición de los caracteres sexuales secundarios en la pubertad de ambos sexos por ejemplo la aparición de la barba, ensanchamiento de los hombros en los varones y en mujeres el crecimiento de pechos y cadera; también en la maduración sexual las hormonas posibilitan la erección, la eyaculación y activan la producción de espermatozoides (Carlson, 2006).

Por otro lado, en los mamíferos machos, el proceso de formación de los espermatozoides (espermatogénesis) que se realiza en los testículos inicia alrededor de la pubertad y a partir de este momento, se producirán espermatozoides de manera continua en la pared epitelial de los túbulos seminíferos. Apoyadas incondicionalmente por diferentes tipos celulares, como las células de Sertoli (que realizan funciones de soporte y tróficas para las células germinales en la luz tubular) y células de Leydig (encargadas de la secreción de Testosterona), y reguladas por un sistema complejo de señales hipofisarias e hipotalámicas

(eje: hipotálamo-hipófisis-gónadas; Oko y Clermont, 1990). Además, hay presencia de otros tipos celulares (células musculares lisas, endoteliales, epitelio cuboidal no secretor en la rete testis, mastocitos, fibroblastos, entre otras). Durante el proceso de la espermatogénesis se han caracterizado diferentes etapas de formación de los espermatozoides clasificadas en: espermatocitogénesis, espermiogénesis y espermiación (Oko y Clermont, 1990).

1.1 Espermatocitogénesis.

En 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 previo a la pubertad, momento en que se diferencian en espermatogonias de diferentes tipos. Las espermatogonias primordiales se diferencian en espermatogonias tipo 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 subtipo origina a las espermatogonias intermedias y después a las espermatogonias tipo B. Estas últimas, 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 los hombres es de 45 días (figura 1; Oko y Clermont, 1990).

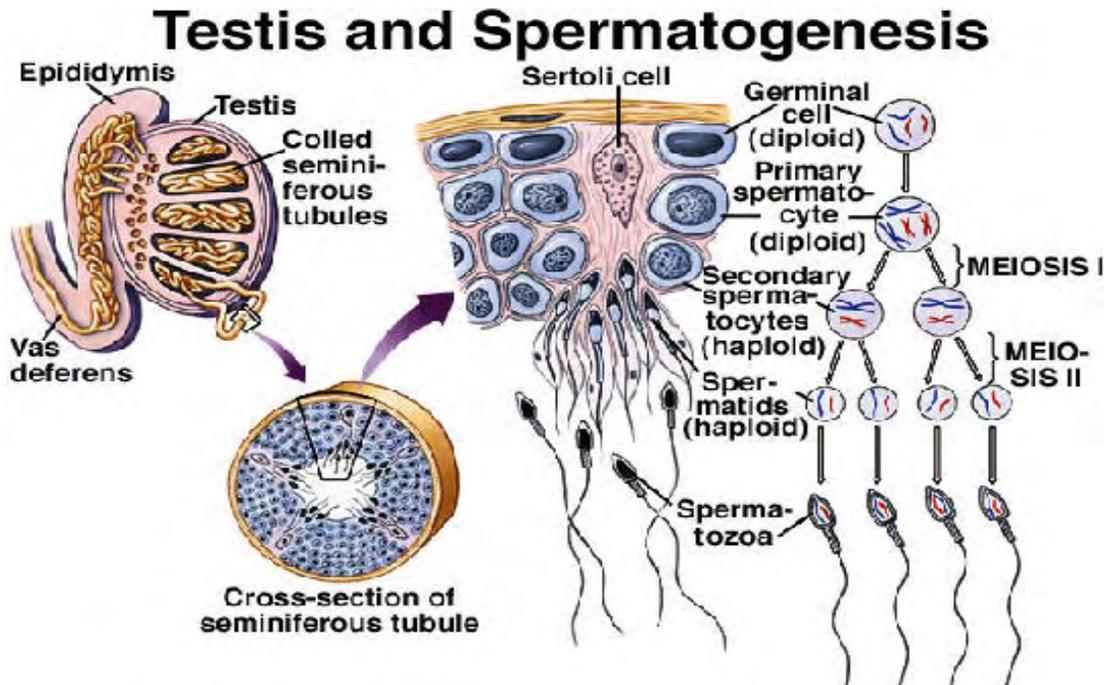


Figura 1. Producción de espermatozoides en el epitelio seminífero. Las espermatogonias que son células diploides ($2n$) originan, durante la primera división de la meiosis, a los espermatocitos primarios también diploides que, durante la segunda división de la meiosis originan a los espermatocitos secundarios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

1.2 Espermiogenesis.

En general, los cambios morfológicos que finalizan en la diferenciación de espermatidas a espermatozoides 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; figura 2; Oko y Clermont, 1990).

La fase I se caracteriza por el inicio de la formación del capuchón acrosomal facilitada 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 centriolo 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 espermatida, quedando cubierto por un delgado saco membranoso de doble capa que se adhiere a la envoltura nuclear. A partir de

los elementos del centriolo 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 espermátidas. 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 (figura 2).

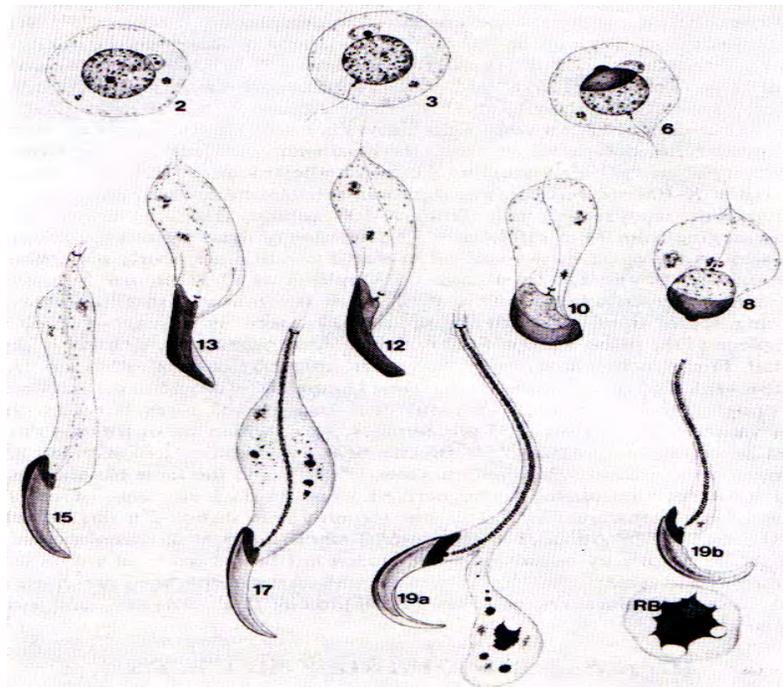


Figura 2. Fases principales de la diferenciación de las espermátidas durante la espermiogénesis. La fase Golgi se representa por los números 2 y 3, la fase de formación de la cabeza y acrosoma corresponde de las etapas 6-13 y la fase de maduración de las etapas 15-19 (modificada de Oko y Clermont, 1990).

Los espermatozoides ya formados en los testículos presentan una característica importante y está relacionada con su anatomía aerodinámica la cual les permite avanzar a través de medios viscosos presentes en los órganos sexuales femeninos (vagina, útero y oviducto) para optimizar la propagación de genes paternos, siendo la movilidad progresiva y su forma aerodinámica lo que les permiten adquirir eficiencia en la tarea de la fecundación.

Posteriormente a su liberación van a confluír hacia la luz de los túbulos seminíferos e inmediatamente localizarse en la red de testis (espermiación) y de manera continua avanzan hacia un órgano tubular completamente enrollado conocido como epidídimo, previamente pasando por los túbulos eferentes los cuales conectan al testículo con el epidídimo, formando 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.

En algunas especies los espermatozoides alcanzan la capacidad de mover el flagelo y la capacidad de fertilización durante su paso a través de varias regiones del epidídimo (maduración espermática), sin embargo el movimiento empieza hasta después de ser eyaculados.

1.3 Estructura espermática.

De esta manera los espermatozoides que salen de los testículos están compuestos por la cabeza y el flagelo; La función de la cabeza es mantener el material genético y la unión al óvulo para la fertilización (Inaba, 2003). En la cabeza se encuentra el material genético haploide dentro de un núcleo condensado rodeado por una zona enzimática denominada acrosoma, algunas de las enzimas hidrolíticas localizadas son hialuronidasa, acrosina, etc. Estas le permiten degradar las células foliculares que rodean al óvulo para su unión (De Lamirande y O'Flaherty, 2008). El núcleo se encuentra rodeado por una fina y densa capa de material citoplásmico llamada la teca perinuclear (Robaire B. y Hermo L, 1988). El flagelo comprende el aparato móvil del espermatozoide necesario para su movimiento a través del tracto masculino y femenino, varía en longitud dependiendo la especie, en humanos tiene alrededor de 60-80µm de longitud y cerca de 0.5µm de diámetro en la parte más ancha del flagelo (pieza de conexión; Satir P, 1980; Robaire B, Hermo L, 1988; Ford W.C.L, 2006); está constituido por cuatro regiones la pieza de conexión, pieza media, pieza principal y la pieza final (figura 3; Oko y Clermont, 1990; Turner R.M, 2006).

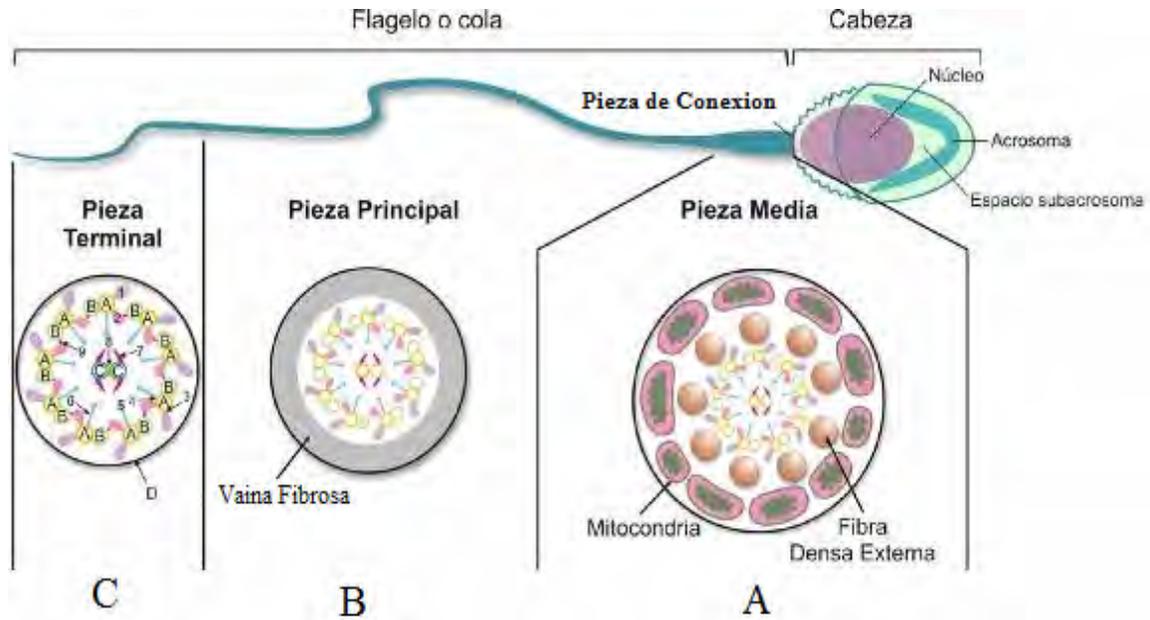


Figura 3. Estructura del espermatozoide mostrando las partes que lo componen así como la estructura del axonema; A) En la pieza media el axonema se encuentra rodeado por la vaina de mitocondrias, B) En la pieza principal por la vaina fibrosa y C) En la pieza terminal solo por la membrana plasmática. (Modificado de Olivera, 2006).

La unidad funcional del flagelo es una estructura conocida como axonema; este, se encuentra formado por brazos de dineína que se encuentran designados como brazos externos e internos y cuya actividad es dependiente de la generación de ATP, nueve microtúbulos dobles periféricos (túbulos-A completos y túbulos-B incompletos) rodeando a un par central (C_1 y C_2); cada microtúbulo doble se encuentra unido a los “brazos” externos de dineína a través de un factor de ensamble denominado ODA-DC (outer dynein arm docking complex), otro grupo de proteínas llamadas DRC (dynein regulatory complex) une a los brazos internos de dineína con un complejo llamado “radio”; se creó que este último se encuentra orientado al microtúbulo C_1 y que determina el plano de la onda flagelar (Inaba, 2003). En la pieza media el axonema se encuentra rodeado por dos estructuras conocidas como: fibras densas externas (FDO) y una serie de mitocondrias que son reemplazadas por la vaina fibrosa en la pieza principal del flagelo (Oko y Clermont, 1990; Olivera, 2006; Turner R.M, 2006).

1.4 Bioquímica del espermatozoide.

La activación del axonema requiere del metabolismo energético a partir de la glucosa. El ingreso de glucosa al citosol se da a través de transportadores como el GLUT3 en la pieza intermedia o el GLUT8 en la región acrosomal, o por reservas endógenas en forma de glicógeno. La glucosa es transformada en glucosa-6- fosfato por la enzima hexoquinasa, para generar ATP o NADPH, por una de tres vías, dependiendo del dominio del flagelo: la glicolítica, la vía pentosa fosfato y la vía mitocondrial de la fosforilación oxidativa; ésta última fuente principal de ATP^+ que conduce a la fosforilación de las proteínas flagelares para el movimiento (figura 4; Olivera, 2006; Turner R. M, 2006; Ford W.C.L, 2006).

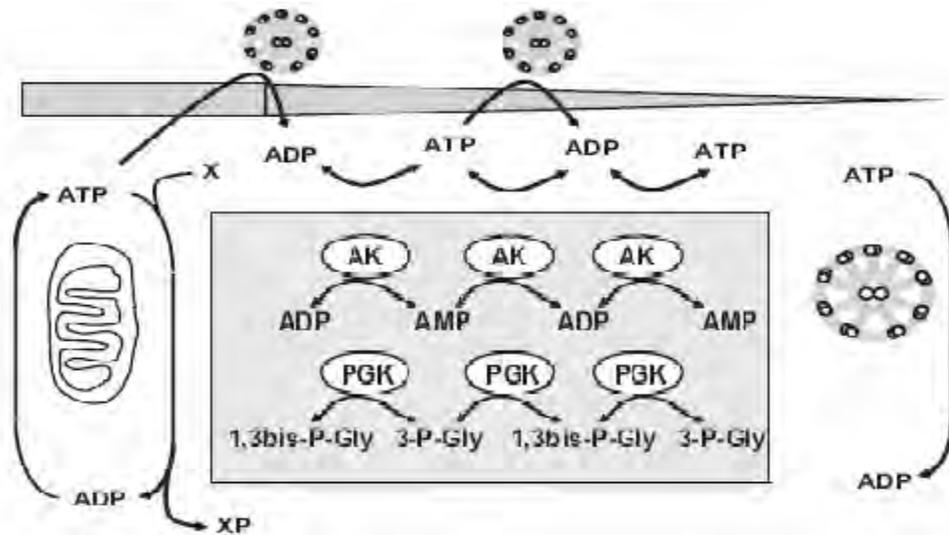


Figura 4. A lo largo del flagelo, el ATP es hidrolizado a ADP para proveer energía para la activación del deslizamiento del batido flagelar. El ADP es refosforilado por la transferencia de un ión fosfato del 1-3 bifosfoglicerato; esta reacción es catalizada por la adenilato-cinasa o 3-fosfoglicerato (3-P-Gly) cinasa. (Vía glicolítica. Tomada de Ford W.C.L, 2006).

Cuando los brazos de dineina son fosforilados, la dinein-ATPasa es activada y la hidrólisis del ATP^+ es convertida en fuerza mecánica. Los brazos de dineina bajo la influencia del ATP^+ , se mueven y tocan a los siguientes microtúbulos dobles en el círculo y mueven el primer doblete en dirección a la cabeza, impulsando el segundo, este sale y toca el tercer doblete en la serie causando que el segundo se mueva hacia delante. Este ciclo continúa hasta que la onda ha sido enviada en una dirección helicoidal a lo largo del flagelo. La onda se ve como un golpe helicoidal aplanado de la cola. Mientras que la onda viaja a lo largo de

la cola, el espermatozoide se propulsa hacia delante, y la cabeza del espermatozoide es forzado a rotar a lo largo del eje en la dirección del recorrido. De esa manera si en la fase inicial la onda flagelar esta cerca de la cabeza y pequeña en amplitud, entonces la cabeza espermática tendrá un pequeño movimiento lateral y un movimiento más pronunciado hacia delante. Si la onda del flagelo es de gran amplitud antes de ser propagado, entonces la cabeza tendrá un movimiento lateral muy ancho, y este parecerá más pronunciado que el movimiento hacia delante de la célula (figura 5. Mortimer, 2000).

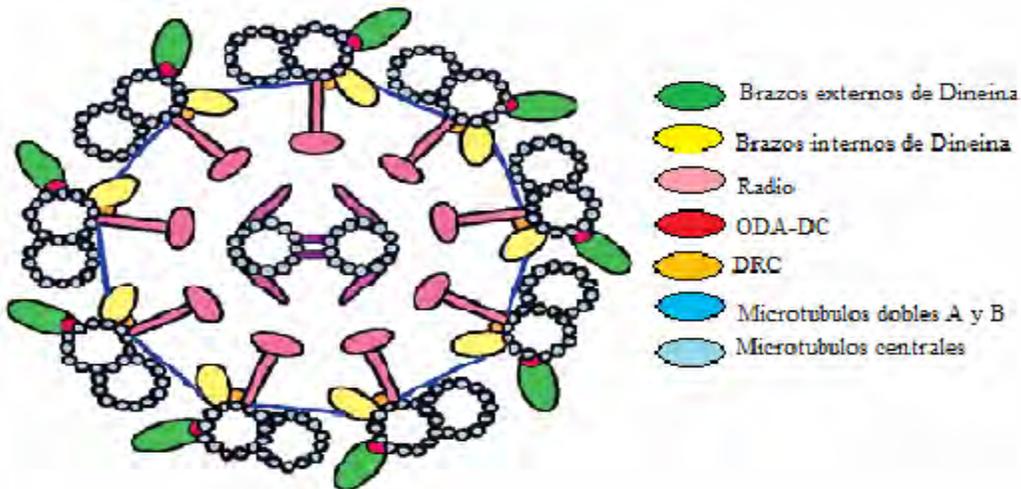


Figura 5. La unidad Funcional del flagelo en los espermatozoides es el Axonema; los brazos de dineína interactúan con su microtúbulo doble adyacente y generan un golpe fuerte que se desplaza de uno a otro de los microtúbulos dobles generando de esta manera el batido flagelar. (Inaba, 2003).

Como ya se menciona los espermatozoides van a ser almacenados en la parte final del epidídimo (cauda) y en la parte proximal de los conductos deferentes hasta el momento de ser expulsados durante el proceso de la eyaculación. Durante este proceso, se ha descrito que la eyaculación es realizada por un reflejo espinal, que produce contracciones musculares desde la cauda del epidídimo y conducto deferente.

El semen es el líquido expulsado durante el orgasmo masculino, es una mezcla de espermatozoides y diversas secreciones provenientes de glándulas como las vesículas seminales, la próstata y bulbo uretrales. La cantidad de semen varía dramáticamente en diferentes especies de mamíferos, 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 en promedio. También, entre las especies de mamíferos, 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 de las variaciones de las secreciones en los componentes en humanos no han sido comprendidas (Coffey, 1988).

Una vez liberados los espermatozoides por el proceso de eyaculación dentro del aparato reproductor femenino tienen que transportarse a través de éste para encontrarse con el óvulo y fecundarlo. Para que el espermatozoide pueda ser fértil, es necesario que ocurran mecanismos moleculares y fisiológicos conocidos como capacitación y reacción acrosomal.

La capacitación comprende una serie de cambios que se requieren para que se pueda llevar a cabo la reacción acrosomal. Estos cambios incluyen pérdida de las glucoproteínas y colesterol de la membrana plasmática, fosforilación de proteínas e hiperpolarización de la membrana plasmática así como intercambio de iones y un aumento muy marcado en la velocidad de nado de los espermatozoides (hipermotilidad; González-Martínez y cols, 2002; Jiménez-Trejo y cols, 2007).

1.4.1 Fosforilación de proteínas.

De esta manera la pérdida del colesterol induce la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CatSper) y de los canales de bicarbonato. La entrada del bicarbonato al citosol activa la adenilato ciclasa soluble dependiente de HCO_3^- (ACs) que aumenta las concentraciones de AMP cíclico, activando, a su vez, la proteína cinasa A (PKA); esta última fosforila algunas proteínas en los residuos de serina desencadenando la fosforilación de residuos de tirosina (figura 6; Olivera, 2006).

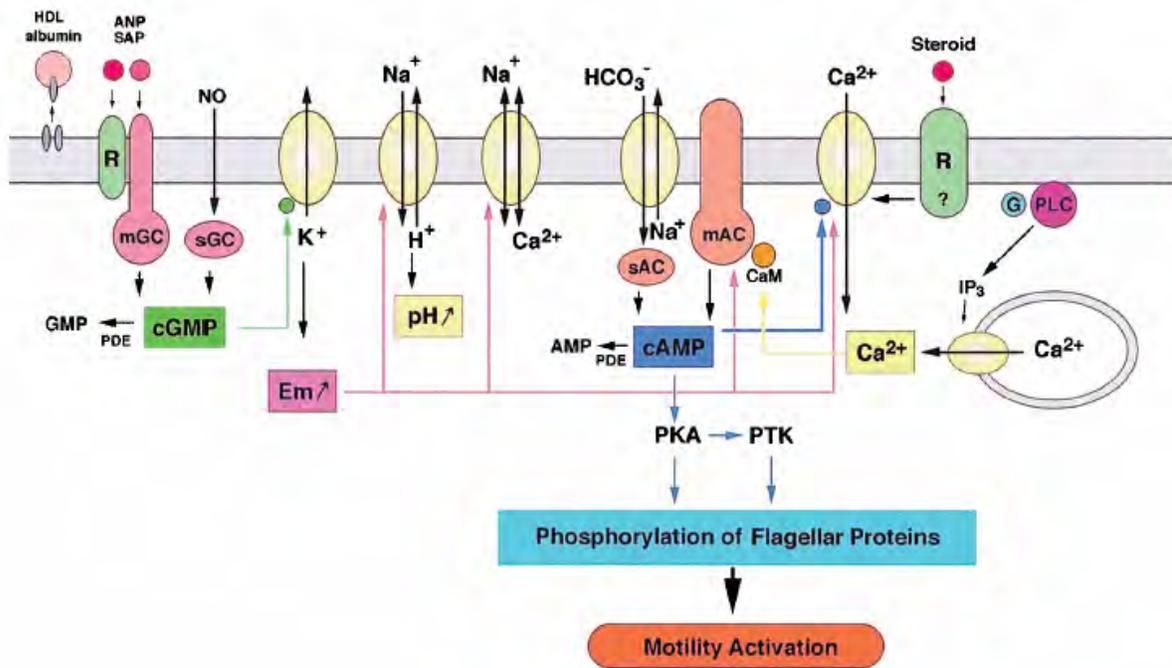


Figura 6. Vías de señalización para la activación de la motilidad espermática. La pérdida de colesterol provoca cambios en los fluidos del espermia; algunos péptidos como el SAP, activan receptores del segundo mensajero guanilato ciclasa (mGC); esta activa canales de potasio y en consecuencia la membrana es hiperpolarizada, ocasionando que los canales dependientes de voltaje por ejemplo Na^+/H^+ se activen y alcalinicen el medio. Esteroides como la progesterona inducen entrada de Ca^{2+} al unirse a sus receptores, la liberación de Ca^{2+} de los canales de almacenamiento inducido por IP_3 producido por la fosfolipasa C (PLC) como en la unión a proteínas G y las vías antes mencionadas, aumentan los niveles de AMPc y éste actúa sobre la PKA y la tirosin cinasa (PTK) para producir la fosforilación de proteínas de tirosina necesaria para el movimiento del flagelo espermático. (Inaba, 2003).

La fosforilación de proteínas de tirosina es una postraducción o modificación de las proteínas que permite a la célula controlar varios procesos celulares. El estado de fosforilación se encuentra controlado por la actividad de las proteincinasas y fosfatasas. La mayor fosforilación de proteínas de tirosina llevadas a cabo durante la capacitación del espermatozoide se localiza principalmente en el flagelo, sin embargo, también pero en menor actividad son reguladas en la cabeza espermática. En espermatozoides de humano las proteínas que son fosforiladas con mayor frecuencia y que se localizan en el flagelo son conocidas como AKAP, éstas son una familia de proteínas ancladoras de proteína cinasa A (PKA) dependientes de AMPc y cuya localización se encuentra en los radios, en los pares de los microtúbulos externos, en la vaina fibrosa y en las ODF (Inaba, 2003; Toshimori Kiyotaka, 2003; Balpai M. y Doncel G.F, 2003; Turner R.M, 2006); otra familia de

proteínas que contribuyen en el movimiento del flagelo están localizadas en las cadenas ligeras de los brazos externos de dineina y son conocidos con el nombre de Tctex (t-complex testis-expressed proteins), éstos también actúan de manera dependiente de AMPc.

La fosforilación de proteínas de tirosinas que se lleva a cabo en el flagelo está vinculada con la hiperactivación de la motilidad del espermatozoide, fenómeno que como ya mencionamos forma parte de la capacitación y durante la reacción acrosomal.

1.5 Reacción acrosomal.

Por otro lado, el acrosoma se encuentra confinado por dos membranas (externa e interna) y contiene una gran variedad de enzimas hidrolíticas. Durante la reacción acrosomal se realiza la fusión de la membrana plasmática de la célula con la membrana externa del acrosoma, quedando expuesta la membrana interna, con la liberación de sus enzimas. Este proceso se lleva a cabo cuando los espermatozoides capacitados entran en contacto con la cubierta de glicoproteínas del ovulo llamado zona pelúcida y tiene como significado permitir al espermatozoide penetrar dicha cubierta y fusionarse con la membrana plasmática del ovulo para fecundarlo (figura 7; revisar Guzmán-Grenfell y cols, 2002; Meizel, 2004). Se cree que los espermatozoides son células terminales que no tienen la capacidad de sintetizar algún compuesto o proteína y tienen como meta final la fertilización del óvulo (Darszon y cols, 1999; Betancourt y cols, 2003).

Cada uno de los mecanismos de maduración, capacitación y fertilización antes mencionados está íntimamente relacionado con la participación de hormonas (testosterona y sus derivados como la 5- α -dihidrotestosterona), enzimas (acrocina, hialuronidasa) y neuromoduladores (acetilcolina, serotonina, adrenalina).

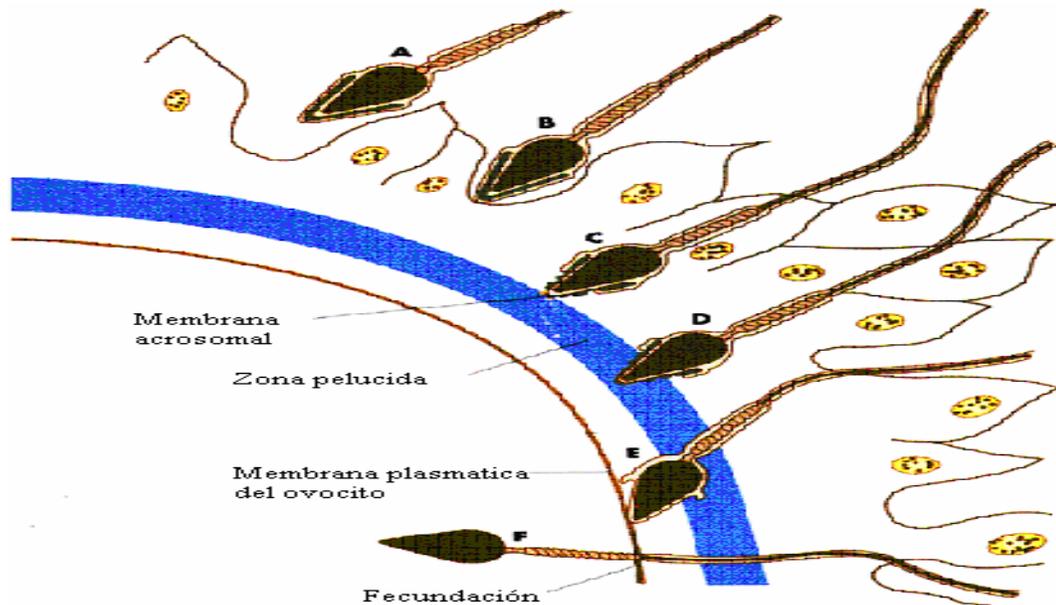


Figura 7. Reacción acrosomal que presenta un espermatozoide al contacto con la zona pelúcida del óvulo. A) Espermatozoide intacto, B) Unión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática. C) Liberación de enzimas. D-F) Paso a través de la zona pelúcida y fecundación del óvulo. Modificada de internet:<http://wwwk.dongguk.ac.kr/~moonis/lecture/female/VQKPW008.GIF>

1.6 El espermatozoide y la serotonina.

Un neurotransmisor que está relacionado con el sistema reproductor masculino a nivel central y periférico es la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT). Esta molécula se ha visto que participa en el inicio de la pubertad de los animales ya que la disminución de serotonina a nivel central afecta al eje hipotálamo-hipófisis-gónada, retardando la pubertad e interrumpiendo los procesos involucrados en la gametogénesis (Naumenko y Shiskina, 1978; Shiskina y Dígaló, 2000; Aragón M y cols, 2005). También, se ha documentado que los bajos niveles de serotonina alteran el comportamiento sexual (Malmnäs, 1974; Naumenko y Shiskina, 1978; Shiskina y Dígaló, 2000), a nivel periférico disminución de los niveles de serotonina afectan la espermatogénesis y la síntesis de andrógenos (Bocabella y cols, 1962; Cockett y cols, 1980; Campos y cols, 1990; Tinajero y cols, 1993; Aguilar y cols, 1995; Frungieri y cols, 1999). Por otro lado, en roedores, se ha propuesto que la serotonina regula de forma autocrina la liberación de testosterona en el testículo y que es liberada por las células de Leydig (Tinajero y cols, 1993; Tijmes y cols, 1996; Frungieri y cols, 1999).

2 Aspectos generales de la serotonina (5-HT).

La serotonina (5-HT) es una molécula que juega un rol en casi todas las células vivas. En el sistema nervioso central (SNC) la serotonina actúa como neurotransmisor, mientras que en el sistema nervioso periférico (SNP) tiene una función de neuromodulador o neurohormona (Purves y cols, 2004). A nivel central se le han atribuido efectos en el comportamiento de las personas en enfermedades como son esquizofrenia, ansiedad, depresión, violencia y desordenes alimenticios entre otros; a nivel periférico, regula la agregación plaquetaria, activación de las células inmune y contracción del musculo liso del estómago e intestino (Kandel y cols, 2000).

2.1 Metabolismo de la serotonina.

La serotonina en el cerebro es sintetizada en los núcleos del Raphe a partir del triptófano, uno de los veinte aminoácidos esenciales que solo se adquiere por medio de la dieta. Este aminoácido no puede atravesar la barrera hematoencefálica por lo que es introducido al cerebro a través de transportadores que se encuentran en relación a la concentración de otros aminoácidos como fenilalanina, leucina y metionina y por lo cual el transporte de triptófano depende no solo de su concentración en sangre sino también de la concentración de éstos (Siegel y cols, 2006). La enzima triptofano hidroxilasa (TPH) localizada únicamente en células que sintetizan serotonina es la enzima limitante de la biosíntesis de la serotonina; esta enzima añade un grupo hidroxilo en la quinta posición del núcleo indol de la molécula del triptófano produciendo 5-hidroxitriptofano (5-HTP) el cual por acción de la enzima descaboxilasa de amonoácidos aromáticos elimina al grupo carboxilo del 5-HTP produciendo la 5-hidroxitriptamina mejor conocida como serotonina (5-HT).

En las neuronas, inmediatamente después de realizar su efecto la serotonina puede ser degradada por la enzima monoamino oxidasa A (MAO_A). Esta enzima cataliza la reacción de desaminación oxidativa de las aminas biogénicas. Así, la MAO_A convierte a la serotonina en 5-hidroxi-indolacetaldehído y este producto es oxidado por la aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ en ácido 5-hidroxi indol acético (figura 8; Cooper y cols, 1996; Carlson, 2006). Un órgano que posee todas las enzimas necesarias para sintetizar serotonina a partir de triptófano es la glándula pineal la cual se encargada de controlar el ciclo de sueño y vigilia, en ella, su metabolismo ocurre por acción de la enzima

N-acetiltransferasa (aril-alquilamina N-acetil transferasa; AA-NAT) para convertirla en N-acetilserotonina y ésta es metilada por la enzima 5-hidroxi-indol-O-metiltransferasa para sintetizar melatonina (Siegel y cols, 2006).

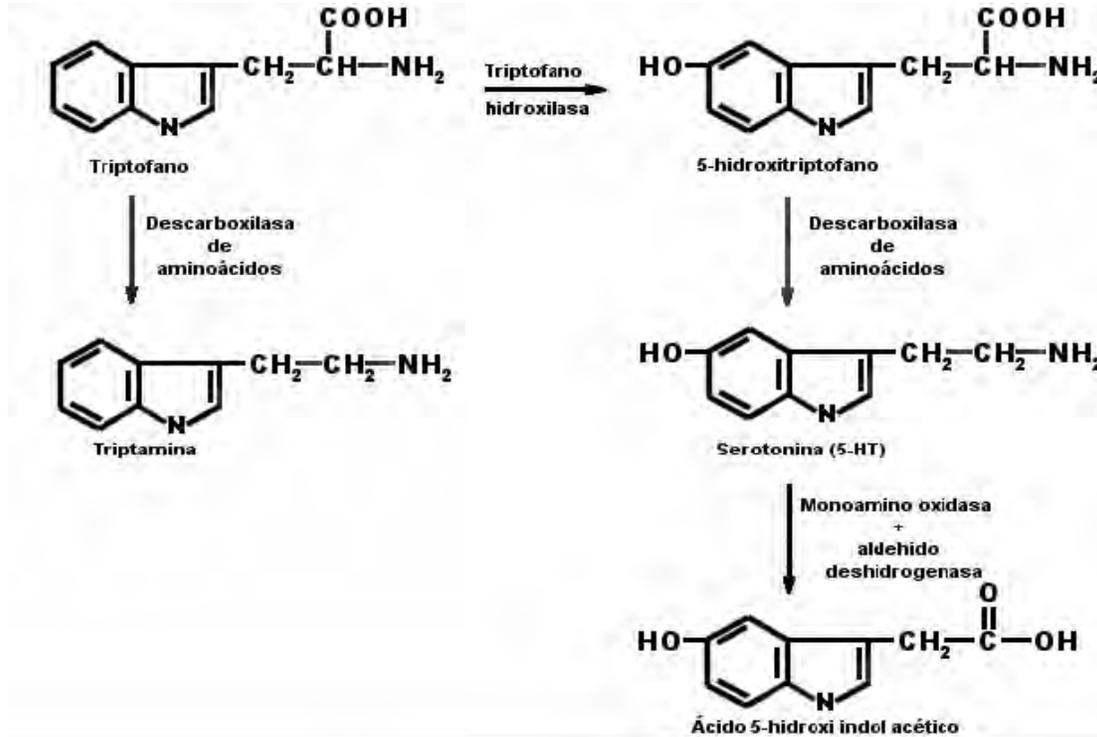


Figura 8. Vía metabólica de la síntesis de serotonina (5-HT). La enzima triptofano-5-hidroxilasa convierte al L-triptofano en 5-hidroxitriptofano, el cual sufre una descarboxilación por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos para dar origen a la serotonina. La descarboxilasa puede actuar directamente sobre el triptofano para dar origen a la triptamina. La monoamino oxidasa A junto con la aldehído deshidrogenasa degradan a la serotonina en ácido 5-hidroxi-indol acético (modificada de Cooper y cols, 1996).

2.2 Receptores de serotonina.

La actividad de la serotonina como neurotransmisor está iniciada por su unión al menos a 16 receptores que están farmacológicamente clasificados en siete grupos del 5-HT₁ hasta 5-HT₇ que a su vez están divididos en subgrupos. Casi todos los receptores se encuentran acoplados a proteínas unidas al nucleótido guanina (proteínas G) que potencializan o inhiben largas cascadas bioquímicas (figura 9; Adayev, 2005), excepto los receptores del grupo 3 que se caracterizan porque son receptores canal (ionotrópicos).

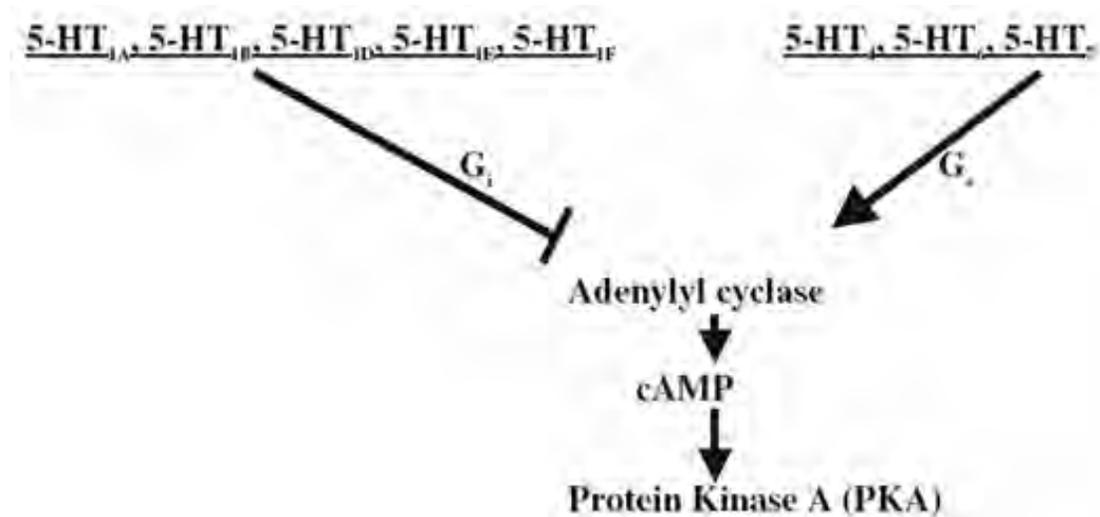


Figura 9. El primer grupo de receptores de serotonina (5-HT₁) se acoplan a proteínas G (G_i) causando la inhibición de la adenilato ciclasa. En contraste, los grupos de receptores 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ activan la adenilato ciclasa a través de su acoplamiento a proteínas G_s, de esta manera incrementan el nivel de AMPc intracelular causando la activación de proteína cinasa A (PKA; modificada de Adayev, 2005).

Los miembros del grupo de receptores de serotonina (5-HT₁) ejercen su acción a través de su unión a proteínas G (G_i) inhibiendo a la enzima adenilato ciclasa, se encuentran subdivididos en 5 tipos que son: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}.

El receptor 5-HT_{1A} además de inhibir la adenilato ciclasa abre canales de potasio ocasionando una hiperpolarización de la membrana neuronal, a nivel de SNC su activación está vinculada a variaciones en las respuestas del comportamiento como ansiedad y depresión, mientras que en el SNP modula el apetito, el comportamiento sexual y la temperatura corporal. La activación de estos receptores estimula la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH). El resto de los receptores de 5-HT₁ también producen la inhibición de adenilato ciclasa y se han asociado a enfermedades como Parkinson, comportamiento violento y tratamiento contra la migraña (Kandel y cols, 2000; Siegel y cols, 2006; Fernandez H. H. y cols, 2006).

La familia de receptores 5-HT₂ está subdividida en 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}; estos receptores se encuentran acoplados a proteínas G (G_q) activando la vía de la fosfolipasa C (PLC), la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), el incremento intracelular de calcio y activación de PKC. La activación de estos receptores en el SNC produce un

incremento en la temperatura corporal e inhiben la liberación de hormona luteinizante (LH), mientras que en el SNP la contracción del musculo liso vascular (figura 10; Adayev, 2005; Siegel y cols, 2006).

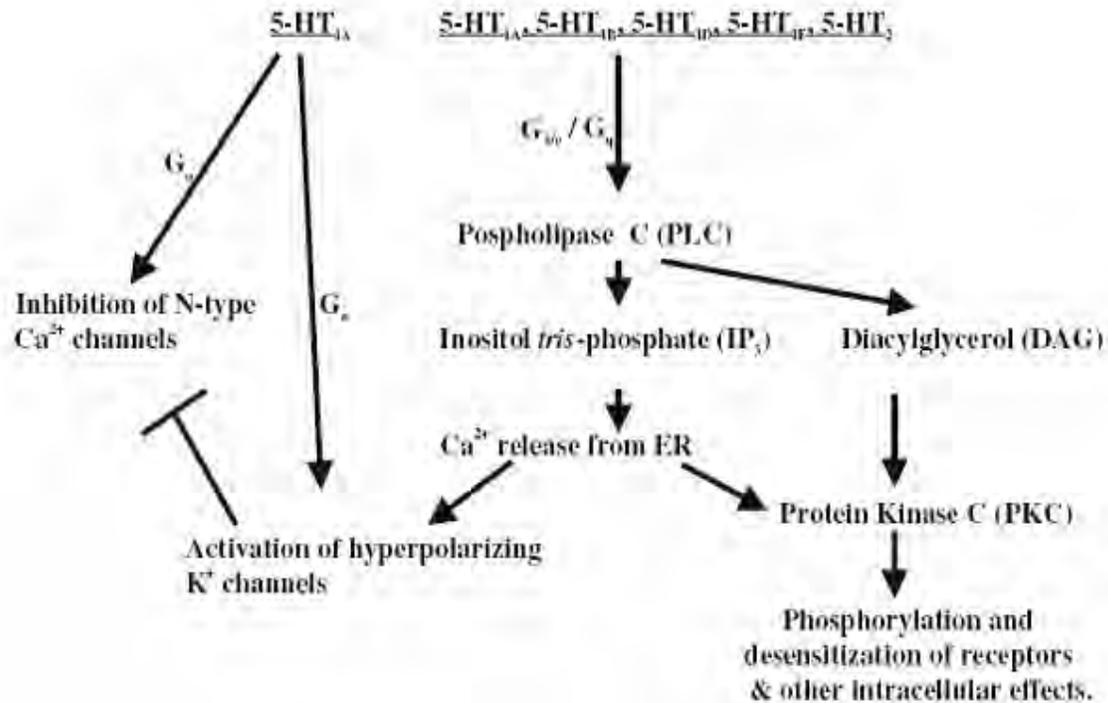


Figura 10. El tipo de receptor 5-HT₁ modula la activación de PLC a través de proteínas G_i o G_o; los receptores 5-HT₂ se acoplan a través de G_q causando un incremento en la activación de la PLC ocasionando la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplasmático (ER); este incremento interno de Ca²⁺ estimula la PKC para que esta controle la fosforilación de proteínas (modificada de Adayev, 2005).

El receptor de serotonina 5-HT₃ es un receptor ionotrópico que se encuentra acoplado a canales de Na⁺/K⁺, está localizado en la posinapsis de las neuronas en el sistema nervioso central y periférico. En el tracto gastrointestinal la serotonina regula la motilidad y secreción del intestino a través de este receptor; algunos antagonistas de los receptores 5-HT₃ son utilizados como antieméticos en personas que reciben tratamientos de quimioterapia. (Conn M. P, 2000; Fernandez H. H. y cols, 2006).

Los receptores 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ estimulan la adenilato ciclasa y el incremento de AMPc por la vía de las proteínas G del tipo G_s. Los receptores 5-HT₄ a nivel SNC modula la liberación de algunos neurotransmisores como la dopamina o acetilcolina; también se encuentran en las células del intestino delgado (íleon) en donde regulan la secreción y los

reflejos peristálticos. Los receptores 5-HT₇ son los recientemente identificados; se han implicado en la regulación del ritmo circadiano y el control de la relajación del músculo liso vascular (Siegel y cols, 2006).

Por otro lado, algunos estudios de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos para receptores 5-HT₅ han mostrado que se encuentran en los astrocitos; la vía bioquímica por la cual actúan no ha sido completamente comprendida, se sabe que actúan por acoplamiento a proteínas G, los receptores 5-HT_{5A} inhiben a la adenilato ciclasa, mientras que los 5-HT_{5B} la estimulan (Adayev, 2005; Siegel y cols, 2006).

2.3 Transporte de la serotonina.

En las neuronas, la concentración intracelular de serotonina modifica la recaptura de ésta a través de dos transportadores: uno citoplásmico (transportador vesicular) y otro anclado a la membrana celular (SER_T).

Las vesículas que almacenan serotonina parecen ser del mismo tipo de vesículas que se encargan del almacenamiento de las catecolaminas, ya que, se ha observado en células de la médula adrenal que fármacos como la reserpina inhiben la actividad de este tipo de transportador y por lo tanto los niveles de serotonina y catecolaminas. El almacenamiento de serotonina en vesículas requiere de la activación del transportador citoplásmico. El transportador vesicular usa un gradiente electroquímico generado por un transportador vesicular de ATPasa-H⁺, de esta manera la recaptura de serotonina está acoplada a la concentración de H⁺.

La activación de las proteínas cinasa (PKA y PKC) producida por la influencia de los receptores acoplados a proteínas G regulan la expresión del gen del transportador de serotonina, el cual ya se mencionó se encuentra localizado en la membrana plasmática de las neuronas; el SER_T es miembro de la familia de transportadores de neurotransmisores dependientes de sodio, cloro y potasio. La recaptura de serotonina es un proceso activo que es dependiente de la temperatura y de un requerimiento absoluto de Na⁺ y Cl⁻ extracelular. Ramamoorthy S. y cols 1998; Haase J. y cols, 2001; Devadoss J. y cols, 2005; Siegel y cols, 2006.

2.4 La serotonina en el sistema reproductor.

Se ha observado que la serotonina puede regular algunas funciones reproductivas de manera directa y /o indirecta, a través de sus efectos a nivel hipotalámico (central); estudios realizados en espermatozoides de invertebrados indican que la serotonina estimula la motilidad espermática a través de activar el movimiento flagelar, esta activación ocurre por medio de un proceso de fosforilación de la proteína dineína dependiente de AMPc (Stephens y Prior, 1992; Parisi y cols, 1984). Por otro lado, el bloqueo de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃ disminuye la motilidad y la capacidad de fertilización *In Vitro* de espermatozoides de erizo de mar (Parisi y cols, 1984; Stephens y Prior, 1992), en espermatozoides de hámster 50 µM de serotonina y su análogo 5α-Metoxitriptamina (5 µM) promueven la reacción acrosomal 15 minutos después de ser añadida al medio de cultivo (Meizel S. y Turner K.O, 1983).

Jiménez-Trejo y colaboradores (2007) han propuesto que la serotonina pudiera tener efectos locales e incluso que puede ser producida en los órganos reproductivos; ellos han encontrado que la concentración de serotonina aumenta en la cabeza del epidídimo conforme se llega a la madurez sexual en ratas y que se encuentra en mayores concentraciones en el epidídimo de ratas macho sometidas a un modelo de reproducción de tipo monogámico. Ratas entrenadas para copular en tiempos menores de 15 minutos, también muestran elevadas concentraciones de serotonina en testículo, epidídimo, vesículas seminales y próstata con respecto a ratas que se aparean en tiempos más largos (Lucio y cols, en preparación). Lo anterior, parece indicar que existe una concentración o rango funcional donde la serotonina regula directamente los procesos de espermatogénesis en el testículo, la maduración espermática en el epidídimo y la capacidad de fertilización de los espermatozoides eyaculados.

En humanos, pocos estudios se han realizado relacionados con la serotonina a nivel reproductivo específicamente en espermatozoides de humano. Gonzales y cols., (1989, 1992) observaron que altas concentraciones de serotonina en sangre (hiperserotoninemia) (120.8±33.0 ng/ml comparado con los valores del control 68.5±5.3 ng/ml) pueden disminuir la cantidad en el número de espermatozoides (azoospermia) y la movilidad espermática en el semen induciendo infertilidad en humanos.

3 Planteamiento del problema.

No existen reportes de marcadores relacionados con el sistema serotoninérgico en los espermatozoides de humano (receptores, enzima TPH, MAO_A, transportador de serotonina: SER_T) así como efectos relacionados sobre la fisiología (motilidad progresiva). Este trabajo es parte de una línea de investigación en la que se pretende mostrar la existencia de marcadores relacionados con la vía serotoninérgica y su posible relación fisiológica y bioquímica con la finalidad de orientar el trabajo hacia un modelo anticonceptivo de reproducción masculina.

4 Objetivos.

*Determinar la presencia de serotonina, enzima triptófano hidroxilasa, receptores de serotonina (5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃), transportador de la serotonina y enzimas MAO_A y AA-NAT en espermatozoides de humano por medio de la técnica de inmunocitoquímica e inmunotransferencia por Western Blot.

*Evaluar el efecto fisiológico [motilidad progresiva; computer-aided sperm analysis (CASA)] y bioquímico (fosforilación de proteínas de tirosina por técnica de Western Blot) que produce el tratamiento de serotonina sobre la motilidad de los espermatozoides de humano a través de una curva dosis-respuesta.

5 Hipótesis de trabajo.

*Existen marcadores de la vía de serotonina en espermatozoides de humano.

*La serotonina podría inducir efectos fisiológicos (motilidad progresiva) y bioquímicos (fosforilación de proteínas de tirosina) en espermatozoides de humano.

6 Material y Metodología.

6.1 Tipo de estudio.

Se llevo a cabo un estudio de tipo observacional y transversal.

Población de estudio.

Muestra de espermatozoides de humano obtenida por medio de masturbación de jóvenes con edades de entre 20-30 años de edad.

Criterios de inclusión. (Correspondiente a lo establecido por la OMS).

Varones con edad de entre 20-30 años de edad.

Presentando buena salud.

Con abstinencia sexual de por lo menos 3 días.

El color de la muestra debía ser blanco-grisáceo.

Con un volumen de muestra de entre 1.5 mL y 4.5 mL.

Con ausencia de aglutinación.

Licuefacción de entre 20-60 minutos a 37°C.

En donde los espermatozoides presentaran buena movilidad.

Criterios de exclusión.

Varones menores de 20 años y mayores de 30 años.

Enfermos.

Con tratamiento médico.

Con menos de 3 días de abstinencia sexual.

Con un color de muestra que no fuera blanco-grisáceo.

Con volumen de la muestra menor a 1.5 mL y mayor de 4.5 mL.

Con muestra aglutinada.

Muestras cuya licuefacción ocurriera antes de 20 minutos o después de 1 hora.

En la que los espermatozoides presentaran baja movilidad o ninguna.

Criterios de eliminación.

Muestras con más de 2 horas de obtenidas.

Muestras en las que los espermatozoides estuvieran muertos o la concentración de vivos fuera muy escasa.

6.2 Materiales.

Material Biológico	Reactivos
Espermatozoides de humano (semen humano).	Serotonin hydrochloride de SIGMA-Aldrich.
Anticuerpos primarios:	
SR-2A (H-18) goat Polyclonal IgG Sc-15074.	DAB substrate kit for peroxidase (Vector laboratories) catal number SK-4100.
SR-3 (C-20) goat Polyclonal IgG Sc-19152.	Ham's F-10 y Serum substitute supplement ambos de Irvine Scientific.
SR-1B (C-19) goat polyclonal IgG Sc-1460.	Percoll de SIGMA-Aldrich.
MAO-A (H-70) rabbit Polyclonal IgG Sc-20156.	
TPH (C-20) goat Polyclonal IgG Sc-15116.	CrSO ₄ , PFA, H ₂ O ₂ , Trizma base, TRIS HCl, NaCl, SDS, triton X-100, albumina, DTT, 2-β-mercaptoetanol, Tween 20, azul de bromofenol, acrilamida y glicerol. De Baker ANALYZED o SIGMA-Aldrich.
Todos de Santa Cruz Biotechnology.	
Serotonin (5HT-H209) Antibody GTX72708 Gene Tex, Inc.	
Monoclonal Anti-Phosphotyrosine-Peroxidase antibody produced in mouse de SIGMA-Aldrich A4595.	
Anti serotonin N.Acetyltransferase (198-208) phospho-specific (ser206) rat (rabbit) 566715 CALBIOCHEM.	
Rb X Serotonin transporter de Chemicon International AB9726.	
Anticuerpos secundarios:	
Normal goat IgG HRP Sc-2741 de Santa Cruz Biotechnology.	
Dky X Rb IgG HRP AP182P.	
Gt X Ms IgG (H-L) HRP AP124P de Chemicon International.	
Mouse anti-rabbit IgG-FITC Sc-2359.	
Rabbit anti-goat IgG-TR Sc-3919 de Santa Cruz Biotechnology.	

Material	Equipo	Instrumentos
Placas para el CASA Micro cell coating chambers. Conception technologies.	Agitador Platform varimix Thermolyne.	Hamilton thorne research.
Pipetas automáticas 200-1000 μ L Finnipipette, 20 P Gilson y 200 P, 100 P Pipetman.	Vortex Genie 2.	Cámara de electroforesis Mini proteam 3cell Bio Rad.
Probeta graduada de vidrio capacidad 50 mL y 1 L.	Sonicador COLE-Parmer.	Balanza semianalítica OHAUS.
Vaso de precipitado capacidad 10 mL, 250 mL y 1 L.	Microscopio epifluorescente y luz visible	pH meter 340 Corning.
Portaobjetos y cubreobjetos.		Incubadora NAPCO mod.5410.
Membrana de nitrocelulosa, Bio Rad.		Centrífuga DYNAC.
Tubos Ependorf 0.6 mL y 1.5 mL.		Centrífuga HERMLE Z 230 MA.
Tubos Fallcon 15 mL.		Parrilla de agitación y calentamiento Lindbery.
Puntas para pipetas 1-1000 μ L y 1-200 μ L Axigen Scientific.		

6.3 Métodos.

6.3.1 Preparación de la muestra.

En un tubo Fallcon de 15 mL se agrego 1 ml de Percoll al 75% e inmediatamente después, sobre éste se adiciono 1 mL más pero de Percoll al 50 % cuidando de mantener las fases separadas; se deposito el semen con espermatozoides del donador y posteriormente fue centrifugado durante 20 minutos a 3500 rpm para permitir la separación de los espermatozoides del semen. Se retiro el sobrenadante y al pellet de espermatozoides se le adiciono 4 mL de medio de cultivo: Ham's F-10 al 20% de serum substitute supplement (suero sintético sustituto); que es una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos, vitaminas y otros componentes esenciales para el mantenimiento celular.

6.3.2 Determinación de los patrones de velocidad progresiva de los espermatozoides de humano. Computer-aided sperm analysis (CASA).

Fundamentos.

El instrumento para determinar los patrones de velocidad en el espermatozoide CASA está constituido por una video cámara, tarjeta de video y una computadora. El software de computación es usado para identificar y seguir todo el movimiento del espermatozoide por medio de video imagen y realiza el cálculo de todos los datos obtenidos de esta imagen.

La imagen del microscopio es enviada a la cámara y convertida en una imagen digital, a esta imagen le son calculados los pixeles dentro de un máximo y un mínimo aceptado para una cabeza espermática de la especie. El CASA no diferencia de un espermatozoide o un resto celular y por lo tanto, si uno de estos restos entra en el intervalo de tamaño es tomado como espermatozoide y ocasiona un error o falso positivo.

Una vez identificado el espermatozoide, éste es localizado en coordenadas XY tomando como referencia el punto central de la cabeza espermática. Después de la identificación otro fragmento es analizado y la trayectoria de la cabeza espermática es rastreada y una serie de valores cinéticos son calculados.

Los valores de velocidad determinados para nuestro estudio fueron: la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad en línea recta (VSL) y el promedio de la velocidad de trayectoria (VAP). Todos los valores son presentados en decimales y expresados en unidades de $\mu\text{m/s}$. La VCL se refiere a la distancia total que la cabeza espermática cubre en el periodo de observación y es siempre el mayor de las tres velocidades. La VSL es determinada por la distancia en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria y presenta la ganancia neta de espacio en el periodo de observación. Ésta es siempre la menor de las tres velocidades de cualquier espermatozoide. La VAP es la distancia que el espermatozoide ha viajado en dirección promedio del movimiento en el periodo de observación. Éste es conceptualmente el valor de velocidad más difícil de entender porque representa fuertemente que puede ser similar a la VSL. En casos en que la trayectoria de la cabeza espermática es más regular y lineal con un movimiento lateral muy pequeño, entonces el

valor de la VAP es casi el mismo que la VSL. Sin embargo con trayectorias irregulares tales como aquellas que son no lineales, o cuando hay un alto grado de desviación de la cabeza acerca de la dirección del movimiento, entonces la VAP será más alto que la VSL (figura 11; Mortimer; 2000).

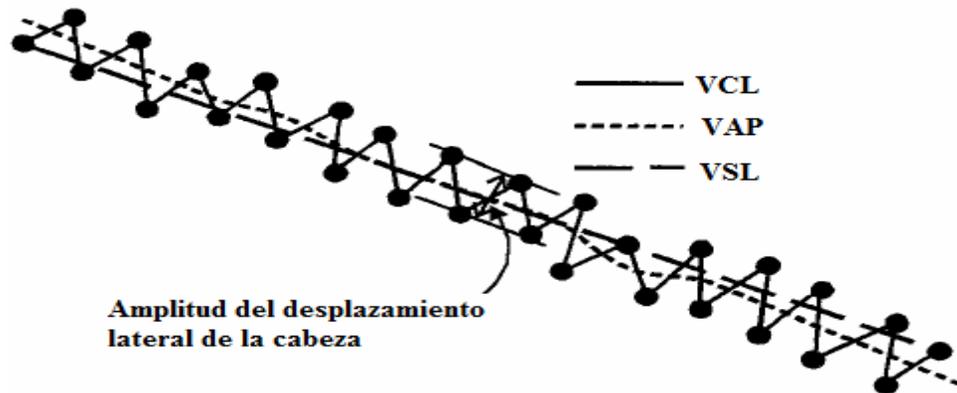


Figura 11. Determinación de la cinética de un espermatozoide. Como se representa en el esquema: la línea completa es velocidad curvilínea (VCL) ésta indica la distancia total que la cabeza espermática cubre en todo el recorrido, el promedio de la velocidad de trayectoria (VAP) mostrada como una línea punteada es la distancia en dirección promedio que cubre el espermatozoide, mientras que la velocidad en línea recta (VSL) es la distancia entre el punto de inicio del movimiento y el punto final del recorrido ejemplificada como una línea discontinua. Los valores de la velocidad están determinados por el largo del camino entre el tiempo y por lo tanto su unidad de medición se encuentra dado en $\mu\text{m/s}$. (Mortimer; 2000).

Procedimiento.

La muestra de espermatozoides fue dividida en partes iguales a una concentración aproximada de 20×10^6 células por mL de medio de cultivo Ham's F-10 SS pH 7.4 y se realizaron los primeros estudios sobre el efecto de la serotonina en una curva creciente de 10 μM , 50 μM , 100 μM de serotonina y en ausencia de ésta (control). Se incubaron los espermatozoides durante 15 minutos y se evaluaron los efectos producidos por la concentración de serotonina cada 3 minutos en el CASA que nos permitió evaluar los efectos sobre la VAP, VSL y VCL.

6.3.3 Inmunocitoquímica.

Fundamentos.

Es una técnica que se utiliza para localizar moléculas concretas en células determinadas con ayuda de anticuerpos.

El paso limitante inicial de la técnica es la fijación del tejido o la célula. En él, intencionalmente evitamos un cambio conformacional en la estructura secundaria o terciaria de la proteína para preservarla de su degradación lo que ocurre en tejidos no fijados, de la misma manera se preserva la localización del antígeno (núcleo, citoplasma, membranas) lo que provee de un blanco para el anticuerpo.

El fijador más común que se utiliza es la formalina o derivados como el paraformaldehído (4%) en soluciones de fosfato de sodio monobásico y dibásico a pH de 7.4. El siguiente paso es la utilización de anticuerpos. Un anticuerpo pertenece a un grupo de proteínas llamadas inmunoglobulinas (Ig) que están presentes en la sangre de animales inmunizados. Las inmunoglobulinas están conformadas de un par de cadenas pesadas (H) y otro par de cadenas ligeras (L), el número de ellas es lo que establece la diferencia en estructura y propiedades antigénicas entre ellas y es por lo que son divididas en cinco clases IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

De manera regular se pueden clasificar como policlonales o monoclonales. Un anticuerpo policlonal es aquel que se produce por diferentes clases de células y por ello actúa sobre varios epitopes de un mismo antígeno mientras que un anticuerpo monoclonal es producido por una clona de células por lo cual actúa sobre un epítipo específico; es por esta característica de especificidad lo que lo hace más utilizado en las pruebas inmunocitoquímicas.

Los anticuerpos también resultan valiosos para determinar la distribución espacial de los antígenos. En inmunohistoquímica, para detectar a la proteína de interés sobre un tejido o célula es utilizado un anticuerpo específico el cual es detectado a su vez con un anticuerpo secundario que se encuentra dirigido contra el primer anticuerpo utilizado; las células pueden teñirse con anticuerpos secundarios acoplados a un fluorocromo, una molécula que tiene la capacidad de absorber luz en una longitud de onda y emitir luz en otra longitud de onda y por lo tanto de diferente color el cual puede ser observado en un microscopio de epifluorescencia. Otra opción sería unir el segundo anticuerpo a una enzima, ésta como cualquier otra en su especie, necesita la participación de un sustrato para formar un

complejo enzima sustrato y poder ser precipitado revelando su presencia con ayuda de un cromógeno; una de las enzimas utilizadas de manera rutinaria es la peroxidasa de rábano para la cual el sustrato es el peróxido de hidrógeno y su complejo enzimático es revelado por la 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada (DAB; Stryer Lubert; 1990, Ber y cols; 2002, Marc K; 2006).

Procedimiento.

Para facilitar la adhesión de los espermatozoides a la laminilla y de esta manera evitar que éstos sean desprendidos y arrastrados a lo largo del procedimiento, las laminillas fueron bañadas con una solución al 5% de gelatina (marca comercial: Knox) y 0.05% de sulfato de cromo (CrSO_4) en agua destilada, procedimiento que fue repetido 4 veces en las que se les permitió secar durante una hora entre cada procedimiento.

Se realizaron frotis con 10 μL de la muestra de espermatozoides previamente fijados con paraformaldehído al 4% (PFA) sobre las laminillas gelatinizadas, al encontrarse éstos adheridos a la laminilla, se adiciono una solución de peróxido de hidrógeno (3%) a la preparación durante 30 minutos, para inactivar la peroxidasa endógena de los espermatozoides. Inmediatamente después se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con buffer TBS (2.42 g trizma y 29.2 g NaCl en 1 L de H_2O , pH 7.5), se agrego solución de bloqueo (TBS con 0.3% de Tritón X-100 y albumina al 3% durante 12 horas aproximadamente. Se incubaron las muestras con el anticuerpo primario en solución de bloqueo toda la noche (24 hrs aproximadamente), y se lavo el exceso de anticuerpo con TBS (3 lavados de 5 minutos cada uno), inmediatamente se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en solución de bloqueo.

Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con buffer TBS. La peroxidasa de los marcadores fue revelada con ayuda de un Kit de DAB (2 gotas de buffer amortiguador pH 7.5, 4 gotas de DAB, 2 gotas de peróxido de hidrogeno y 2 gotas de níquel en 5 mL de agua destilada (de acuerdo a especificaciones del proveedor; Vector laboratories) durante 2 minutos parando la reacción con buffer TBS; se dejaron secar hasta el día siguiente y se montaron las preparaciones con un medio comercial (Cytoseal; Richard Allan Scientific).

Marcador	Dilución del Ac.1º.	Tiempo de incubación.	Dilución del Ac. 2º.	Tiempo de incubación.
Receptores y transportador	1:100	24 hrs	1:250	6 hrs
Enzimas (MAO _A , AA-NAT) y Serotonina	1:250	24 hrs	1:500	24 hrs

Tabla 1. En la presente tabla se indica la dilución y el tiempo de incubación correspondiente utilizado para la realización de las preparaciones de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia.

NOTA: Para las preparaciones con fluorescencia, se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a marcadores fluorescentes en cuyo caso, después de la incubación con éste se le realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS, e inmediatamente se adicione durante 10 minutos una sonda fluorescente llamada diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) utilizada para la tinción específica del núcleo (ADN) del espermatozoide, se realizaron lavados con TBS y las preparaciones se montaron con glicerol-PB y se observaron en microscopio epifluorescente.

6.3.4 Western Blot.

Fundamentos.

La técnica de Western blot (Wb), es uno de los métodos más utilizados para detectar una proteína particular (en este caso receptores de serotonina sobre la membrana del espermatozoide) en una mezcla de proteínas que tienen una diferencia de masa molecular estrecha, combina la electroforesis una técnica de separación de moléculas a través de un campo eléctrico y la especificidad de los anticuerpos.

Las separaciones electroforéticas se realizan en geles (suspensiones semisólidas en agua) ya que tiene la propiedad de suprimir las corrientes de convección generadas por la temperatura; los geles de elección se obtienen por polimerización de diferentes concentraciones de acrilamida para conseguir poros de tamaño controlado.

Las mezclas de proteínas se disuelven primero en un medio con mercaptoetanol o ditioneitol (DTT) para reducir los puentes disulfuro y con dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico capaz de romper todas las interacciones no covalentes en las

proteínas forzándolas a adoptar conformaciones extendidas y que se une a la cadena principal proporcionándole una carga negativa obteniendo así una relación carga masa, de esta manera al ejercer un campo eléctrico sobre ellas, las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las grandes permanecen arriba cerca del punto de aplicación de la mezcla.

Las proteínas separadas sobre el gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa para hacerlas más accesibles al anticuerpo específico de la proteína deseada que se añade a continuación. El complejo antígeno anticuerpo de esta membrana puede detectarse impregnando la membrana con un segundo anticuerpo específico para el primero (por ejemplo anticuerpo de cabra que reconoce al anticuerpo de ratón) acoplado a una enzima. Así, por medio de una reacción enzimática el segundo anticuerpo adherido a la proteína que se encuentra en la membrana precipita y produce una banda de color oscuro. (Stryer Lubert, 1999; Ver y cols, 2002; Mark F y cols, 2006).

Procedimiento.

Las muestras de espermatozoides tratados con las diferentes concentraciones de serotonina, fueron centrifugadas durante 10 minutos a 3500 rpm para separar a los espermatozoides del medio; al pellet de células se añadió 80 µL de buffer de lisis (TRIS HCl 62.5 Mm, SDS 2%, glicerol 25%, DTT 2mM), la lisis fue aumentada con ayuda de un sonicador durante 1 minuto y posteriormente por proceso mecánico; se centrifugó la muestra nuevamente para obtener las proteínas disueltas en el sobrenadante.

La muestra para la electroforesis se preparó de la siguiente manera:

Se adicionaron 14 µL de proteínas, 6 µL de sample buffer (1 mL de Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 3.8 mL de H₂O, 0.8 mL de Glicerol, 1.6 mL de SDS 10%, 0.4 mL de 2-β-mercaptoetanol, 0.4 mL azul de bromofenol 1%), y 3 µL de DTT (1 mM) para ser montada en los geles.

Se preparó un gel de acrilamida al 12% y sobre éste, otro al 4 % en el cual fueron colocadas sobre los diferentes carriles las proteínas para su separación.

Para su concentración inicialmente se sometió a un voltaje de 45 volts durante 10 minutos y posteriormente a 85 volts durante el mismo tiempo; para la electroforesis el gel fue sometido a una carga de 145 volts hasta la separación completa de las proteínas.

Las proteínas fueron transferidas del gel a la membrana de nitrocelulosa durante 1.5 horas a 0.350 amperes. Inmediatamente después las membranas se colocaron en suero de bloqueo (leche descremada al 5% en una solución amortiguada de tris base (Buffer tris: TBS adicionada al 0.1% con Tween 20: TTBS) durante toda una noche.

Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS y se incubaron las membranas con el anticuerpo primario en solución de bloqueo (TTBS, albumina 1%, Tween 20 al 0.1 %) durante 12 horas aproximadamente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS y se incubaron las membranas durante 4 horas con el anticuerpo secundario correspondiente en solución de bloqueo, al termino del tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS.

Marcador	Dilución del Ac.1°.	Tiempo de incubación.	Dilución del Ac. 2°.	Tiempo de incubación.
Proteínas de Tirosina-P.	1:1500	24 hrs		
Receptores.	1:5000	24 hrs	1:5000	4 hrs
Transportador.	1:1000	36 hrs	1:1000	4 hrs
TPH	1:1000	24 hrs	1:2000	4 hrs
MAO _A	1:1000	24 hrs	1:2000	6 hrs

Tabla 2. Para la identificación por Western Blot de los marcadores del sistema serotoninérgico, se utilizaron los anticuerpos en dilución y tiempo de incubación como se muestra en la tabla.

Las membranas se revelaron utilizando el Kit DAB durante 1 hora aproximadamente, fueron escaneadas por computadora y a la imagen (para la fosforilación de proteínas de tirosina) se le realizó un análisis densitométrico con ayuda del programa Scion Image.

7 Resultados.

7.1 Identificación de Marcadores Serotonérgicos.

El trabajo en el laboratorio a través de la técnica de Western Blot ha permitido la identificación de manera consistente de una banda con inmunoreacción positiva contra anticuerpos específicos de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) en espermatozoides de humano correspondiente a la misma banda localizada en tejidos control como son el tallo cerebral, testículo y epidídimo de rata en los cuales la banda de expresión tiene un peso molecular aproximada de 48-51 kDa (figura 12).

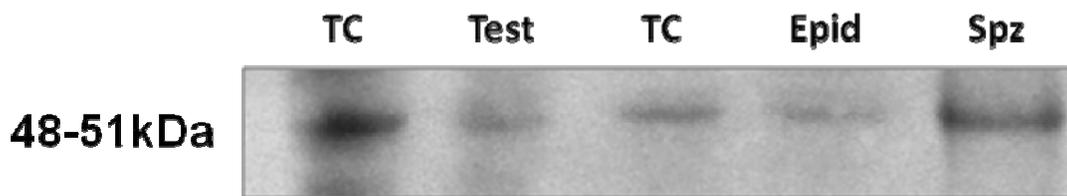


Figura 12. Imagen representativa de homogenados de varios órganos utilizados como control positivo que muestran una banda con peso molecular de aproximadamente 48-51kDa que corresponden a la expresión de la enzima triptófano hidroxilasa en tejidos como el tallo cerebral (TC), testículo (Test) y Epididimo (Epid) de rata, comparados con la misma expresión de la enzima TPH en espermatozoides de humano (Spz).

Identificación de Serotonina en el Espermatozoide de Humano.

Una vez detectada esta enzima y considerando que se encuentra localizada únicamente en células que tienen la capacidad para sintetizar serotonina se prosiguió a la detección de esta neurohormona en espermatozoides de humano. La inmunofluorescencia en este caso se llevo a cabo con un anticuerpo secundario (IgG) acoplado al fluoroforo rojo Texas y la presencia de la marca es observada en la pieza media del espermatozoide de manera exclusiva (figura 13).

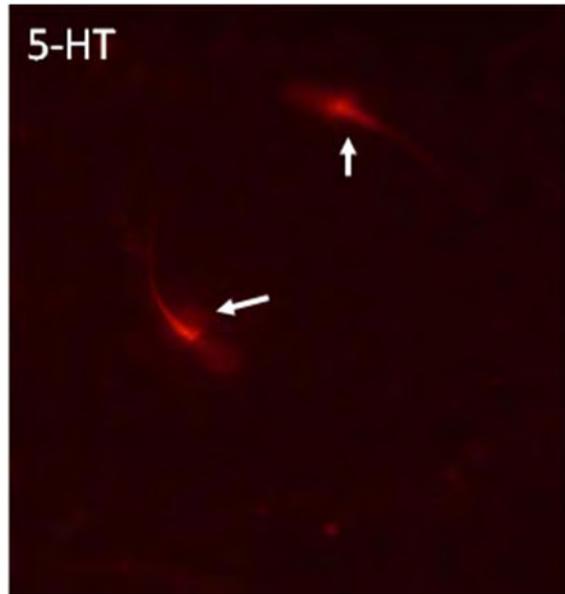


Figura 13. Fotomicrografía en fluorescencia que muestra la región de la pieza media del flagelo de espermatozoides positivos contra el anticuerpo para serotonina (flechas).

Identificación de las enzimas involucradas en el metabolismo de la Serotonina en los espermatozoides de humano.

La presencia de la enzima TPH y su capacidad para sintetizar serotonina mostrada por la presencia de ésta en los espermatozoides de humano, nos abrió la panorámica para seguir identificando otras enzimas que se encuentran involucradas tanto en el catabolismo (MAO_A), como en la síntesis hacia otra neurohormona dentro de esta vía como lo es la Melatonina (AA-NAT). Para esta parte del trabajo realizado en el laboratorio nuevamente nos apoyamos con técnicas de inmunocitoquímica e inmunotransferencia por Western Blot.

Enzima Monoaminoxidasa A (MAO_A).

La presencia de la MAO_A, la enzima encargada de la degradación de la serotonina hacia ácido indolacético fue localizada cuando se observó en las preparaciones de inmunocitoquímica la marca positiva para el anticuerpo dirigido contra esta enzima principalmente localizada en la pieza media y la parte posterior de la región ecuatorial (figura 14). Esto fue corroborado con la inmunotransferencia por Western blot ya que se

observo una banda específica de 61 kDa presente en los homogenados de los espermatozoides de humano definida para el mismo anticuerpo (ver figura 14).

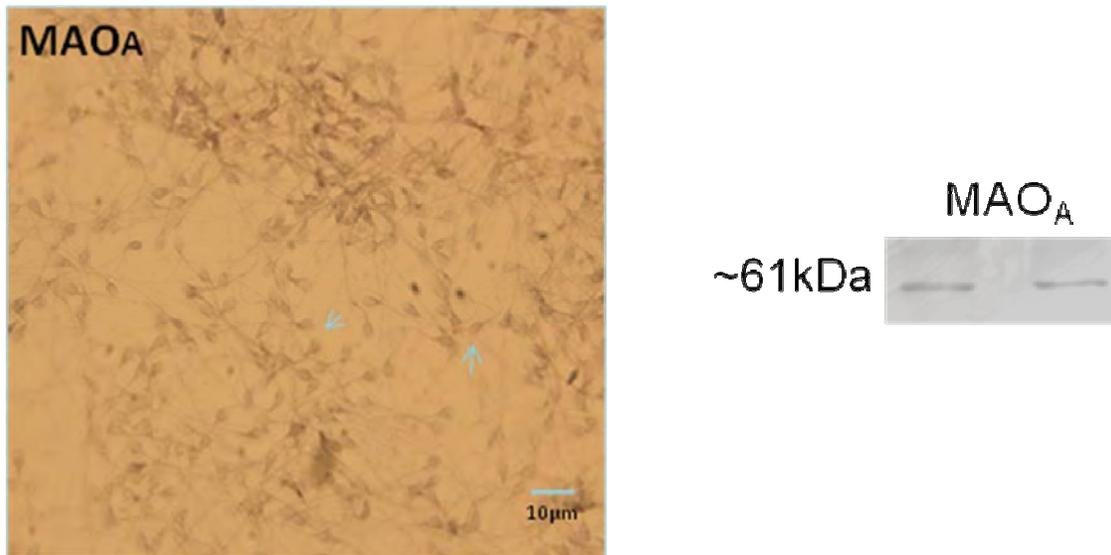


Figura 14. Fotomicrografía de espermatozoides que muestra inmunoreactividad para el anticuerpo de la enzima MAOA, en mayor grado en la pieza media del flagelo; al lado se muestra el Western blot en el que se observa una banda con peso molecular de 61kDa altamente específica.

Enzima aril-alquilamina N-acetil transferasa (AA-NAT).

Los estudios de inmunocitoquímica se llevaron a cabo con ayuda de un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína. La presencia de esta enzima nos revelo de manera consistente que se encuentra contenida en la región acrosomal de los espermatozoides (figura 15).

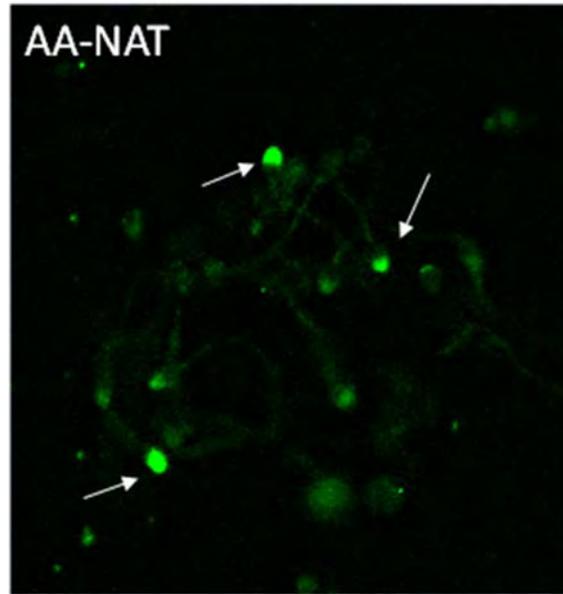


Figura 15. Fotomicrografía en fluorescencia que muestra espermatozoides positivos contra el anticuerpo de la enzima AA-NAT. Las flechas indican la zona de la región acrosomal.

Identificación de Receptores para Serotonina en el Espermatozoide de Humano.

El trabajo de dos grupos de investigadores ha permitido la localización de receptores para serotonina en espermatozoides de conejos (grupo 2; Young y Laing, 1990) y en ratas (5-HT_{2A} y 5-HT₃; Jiménez-Trejo y col, 2007) únicamente; sin embargo no se reportan estudios en los cuales se haya determinado la presencia de estos receptores en espermatozoides de humano, la figura 16 muestra imágenes de espermatozoides de humano con reacción positiva a tres diferentes tipos de receptores de serotonina; como se aprecia en esta imagen, la localización del receptor 5-HT_{1B} (a) se observa a lo largo del flagelo del espermatozoide concentrándose con más intensidad en la pieza media; en el lado derecho de la imagen se muestra una banda con peso molecular de aproximadamente 47 kDa en correspondencia con el anticuerpo dirigido contra el mismo receptor en estudios de Western Blot. En el inciso b) de la misma figura se muestra la localización del receptor 5-HT_{2A}, este receptor aparentemente se encuentra concentrado principalmente en la zona ecuatorial y el flagelo, su presencia fue confirmada por la expresión de una banda con reacción positiva a este anticuerpo de aproximadamente 53 kDa. El receptor 5-HT₃ el cual es un receptor inotrópico se encuentra ubicado por inmunolocalización en la zona posacrosomal y en el flagelo del

espermatozoide de humano (flecha azul) su expresión fue mostrada por inmunoelectroforesis obteniendo una banda de aproximadamente 48 kDa (c).

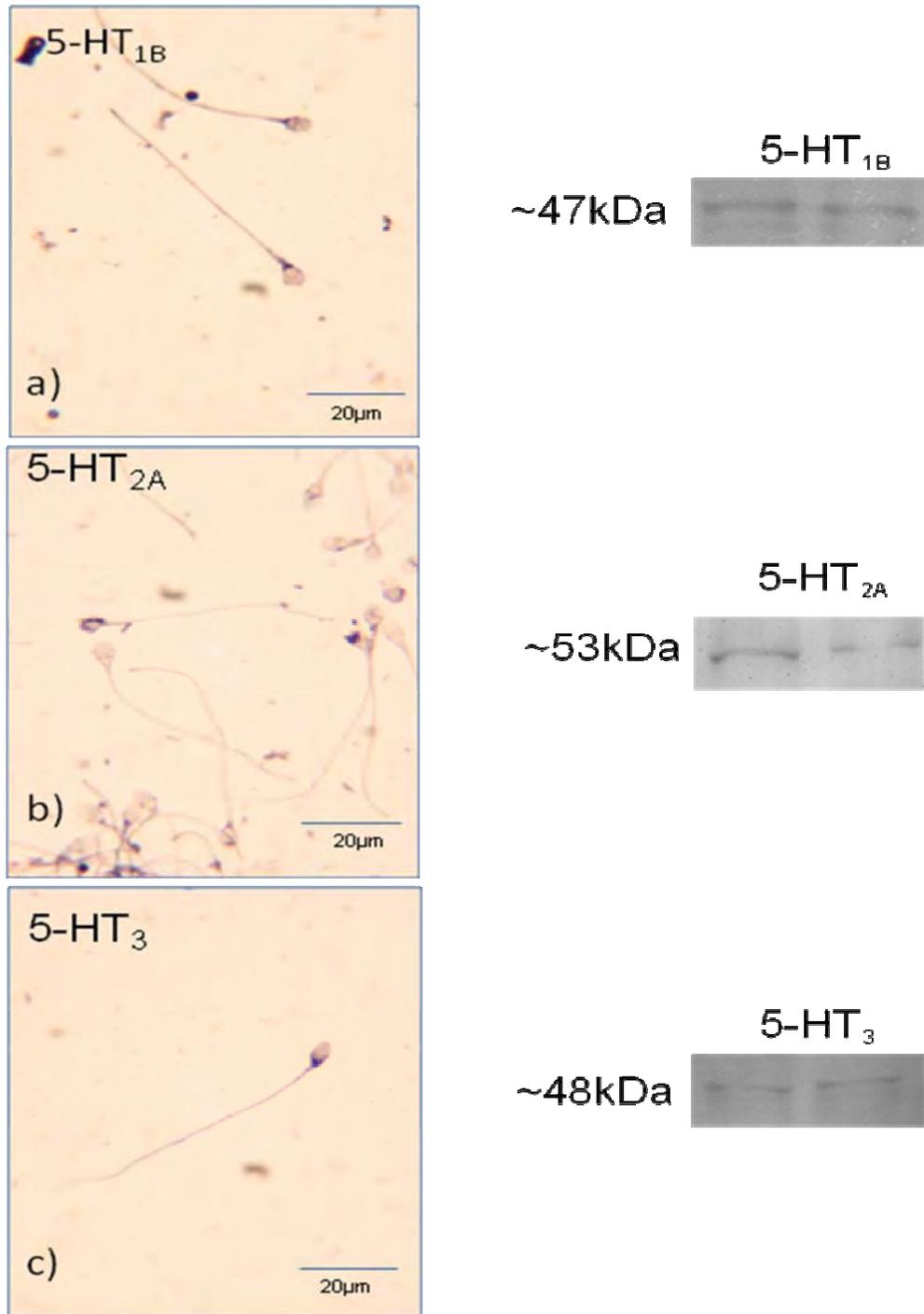


Figura 16. Fotomicrografías de espermatozoides de humano que presentan inmunoreactividad positiva para tres diferentes anticuerpos de receptores de serotonina: a)5-HT_{1B}, b)5-HT_{2A} y c) 5-HT₃; al lado de la imagen se muestra el Western blot de cada uno de los receptores con su correspondiente peso molecular.

Identificación del Transportador de Serotonina en el Espermatozoide de Humano.

Con la identificación de los receptores para serotonina en espermatozoides de humano, es importante determinar la forma en que esta es regulada; es por ello que se realizó un estudio de inmunocitoquímica y Western Blot para determinar la localización del transportador que juega un papel muy importante a nivel del SNC mediando la recapturación de la serotonina. En la figura 17 se muestra la presencia de un transportador de membrana localizado a lo largo de todo el espermatozoide, las flechas señalan la pieza media del flagelo y la zona ecuatorial de la cabeza de éste, región en la que el transportador parece estar más concentrado; por estudio de Western Blot se obtuvo una banda con reacción positiva al anticuerpo para el transportador, dicha banda presenta un peso molecular de aproximadamente 64 kDa (mismo reportado para el SER_T aislado en cerebro de rata).

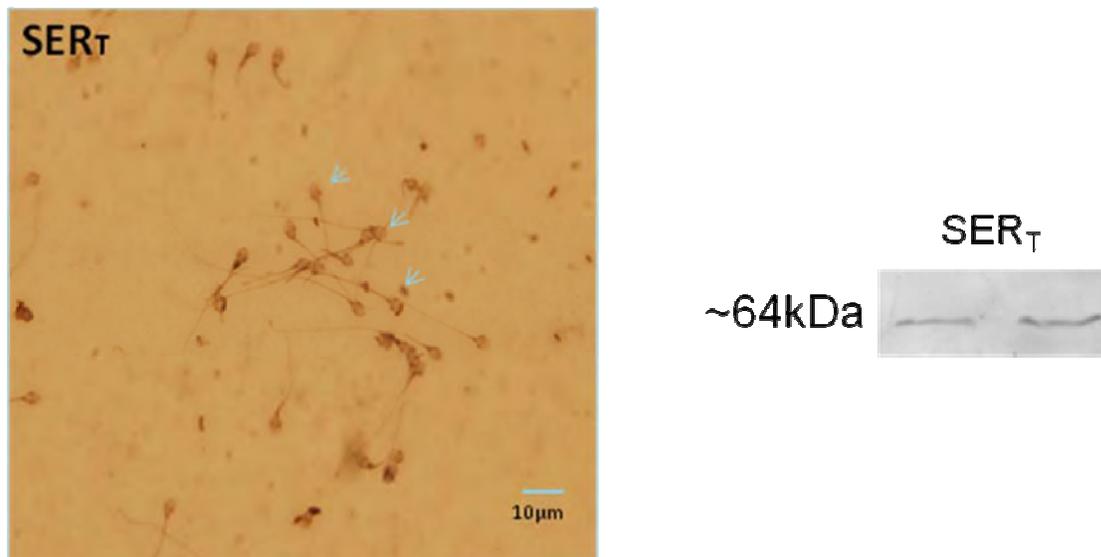


Figura 17. Fotomicrografía de espermatozoides de humano positivos para el anticuerpo de transportador de serotonina. Las cabezas de las flechas indican que la marca se concentra en la zona ecuatorial y la pieza media del flagelo de los espermatozoides.

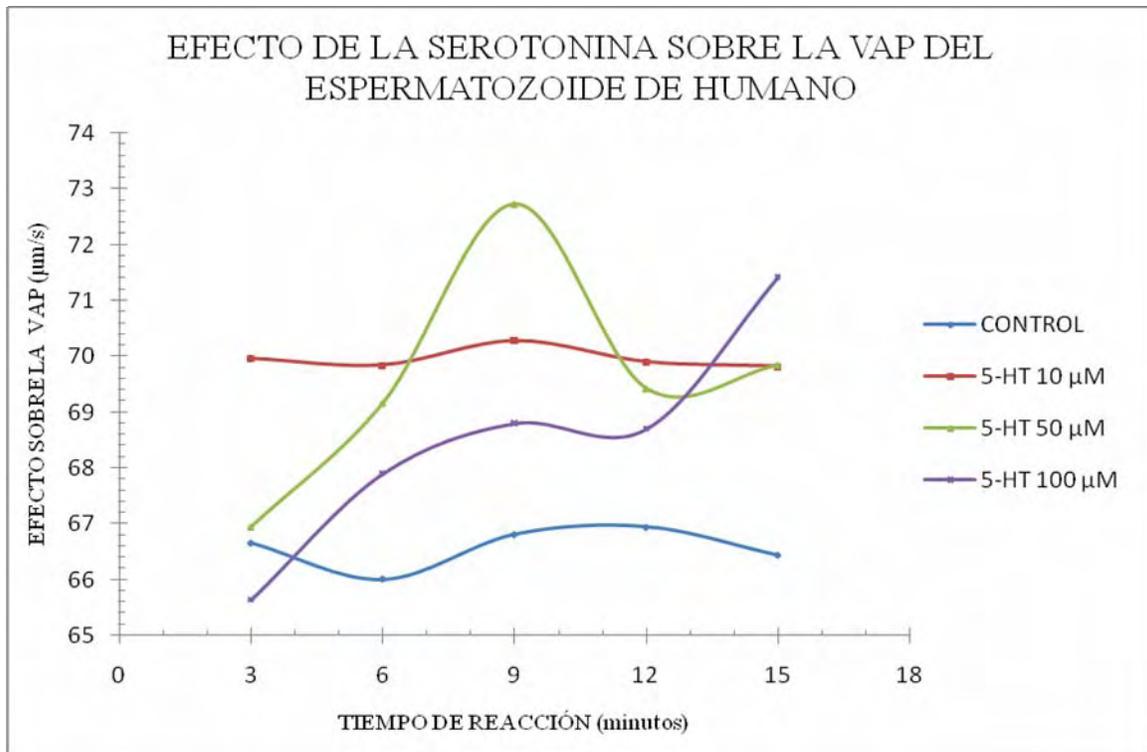
7.2 Efectos Fisiológicos (Motilidad progresiva).

Con la identificación de los principales componentes del sistema serotoninérgico presente en el espermatozoide de humano se prosiguió a determinar el efecto fisiológico que la serotonina puede producir en los espermatozoides. En primer lugar el efecto fue estudiado sobre la motilidad progresiva; debido a que representa un parámetro sumamente importante para determinar la capacidad de esta célula para la fertilización. Este estudio consistió en evaluar diferentes concentraciones de serotonina a manera de una curva-dosis respuesta seguida a lo largo de diferentes tiempos (control sin tratamiento, 10 μM , 50 μM y 100 μM ; en tiempos de 3, 6, 9, 12 y 15 minutos). Cabe recordar que el número de experimentos consistió en una N de 5 (N=5).

Efecto de la Serotonina sobre el promedio de la velocidad de trayectoria (VAP) del Espermatozoide de Humano.

Como fue mencionado en el apartado de la metodología el CASA es un sistema que permite la evaluación de los parámetros de velocidad progresiva tales como la VAP.

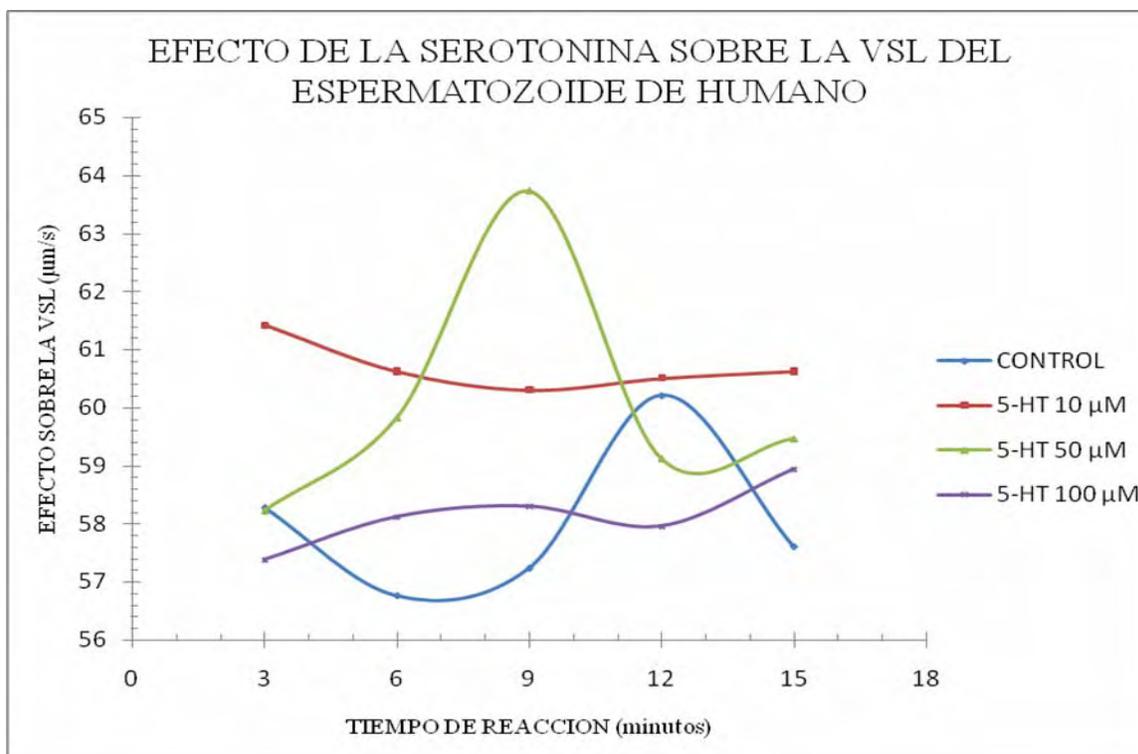
En la grafica 1 se presenta el efecto que produce el tratamiento con tres diferentes concentraciones de serotonina sobre la VAP del espermatozoide por medio de una curva dosis-respuesta-tiempo. Como se observa en la gráfica el comportamiento de los espermatozoides control (línea color azul) es prácticamente invariable a través del tiempo, respecto a éste una concentración de 10 μM de serotonina en el medio de cultivo produce un efecto estimulador sobre la velocidad de prácticamente 3 $\mu\text{m/s}$ que se mantiene hasta los 15 minutos (línea color rojo). Por su parte, el tratamiento con 50 μM observa un incremento en la velocidad del minuto 3 hasta el minuto 9, tiempo en el que este estímulo se da hasta de 6 $\mu\text{m/s}$ el cual es el máximo durante el tratamiento (línea color verde); después de este minuto se observa un descenso en la velocidad alcanzada que tiende a recuperarse aparentemente a partir del minuto 12. La línea de la curva que aparece de color púrpura muestra el efecto producido por una dosis de 100 μM , donde el efecto estimulador del promedio de esta velocidad progresiva presenta una tendencia a un aumento continuo a lo largo del tiempo.



Grafica 1. En la grafica se muestra el efecto de diferentes concentraciones de serotonina sobre la VAP a través del tiempo; el efecto de 50 µM al minuto 9 presenta el punto máximo de estimulación durante el tratamiento, por otro lado una concentración de 100 µM produce un estímulo continuo con tendencia al aumento, mientras que el control y la concentración de 10 µM no mostraron tendencia alguna.

Efecto de la Serotonina sobre la velocidad en línea recta (VSL) del Espermatozoide de Humano.

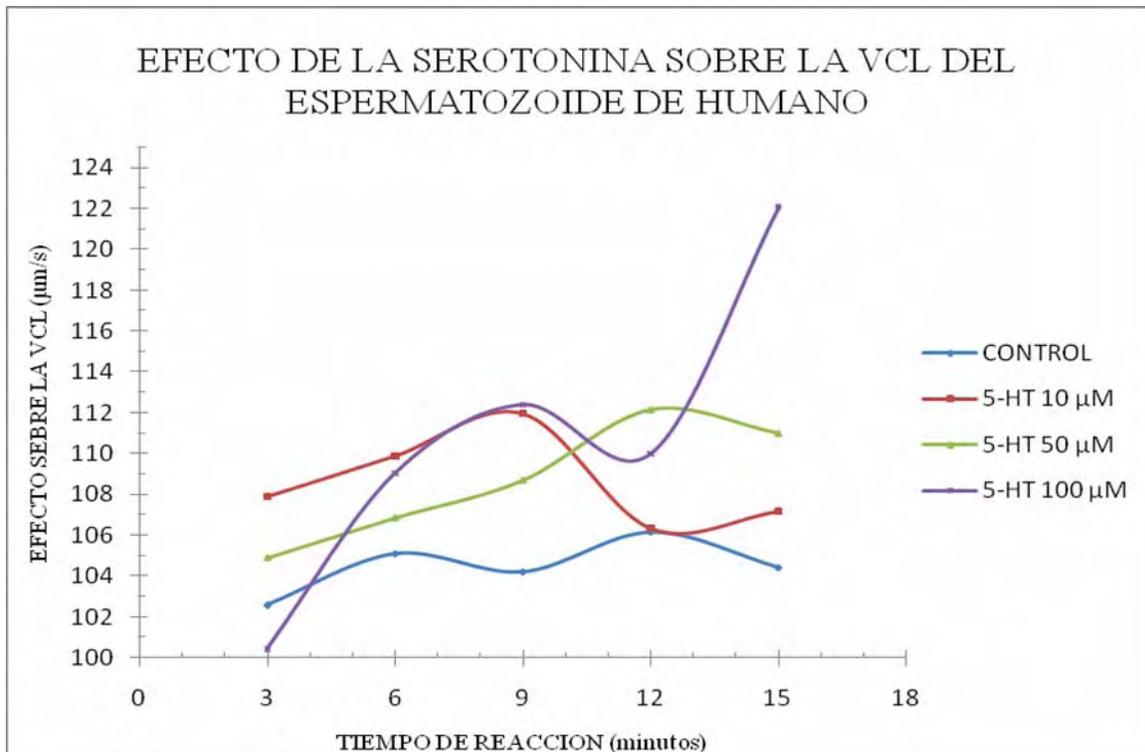
La curva dosis-respuesta-tiempo referente al efecto producido por la serotonina sobre la VSL del espermatozoide de humano se observa en la grafica 2. La línea que aparece de color azul representa la velocidad de una muestra control en la que la variación de la velocidad es muy estable (~ 2 µm/s) a lo largo del tiempo; comparado con el control la concentración de 10 µM es de casi 5 µm/s manteniéndose invariable a lo largo del tiempo (línea color rojo). De forma semejante a la grafica 1, el tratamiento de 50 µM produce un efecto estimulador máximo de 5 µm/s en el minuto 9 el cual tiende a disminuir durante el minuto 12 y se mantiene durante el minuto 15 (línea de la curva en color verde); por su parte el tratamiento con 100 µM (línea de la curva en color púrpura) parece no tener efecto a lo largo del tiempo.



Grafica 2. Efecto de la serotonina sobre la VSL del espermatozoide de humano. El tratamiento de 50 μM al minuto 9 produce el efecto máximo del estudio sobre la VSL.

Efecto de la Serotonina sobre la velocidad curvilínea (VCL) del Espermatozoide de Humano.

En la grafica 3 se observa el efecto de la serotonina sobre la velocidad curvilínea del espermatozoide de humano; en ella el control representado por la línea de color azul no tiene variaciones evidentes a lo largo del tiempo. Para el tratamiento de 10 μM el efecto inicia arriba de la velocidad del control y se mantiene hasta el minuto nueve ya que a partir de este tiempo tiende a caer la velocidad y se mantiene de los minutos 12 al 15; para 50 μM se observa un pico máximo hasta el minuto 12 para luego caer ligeramente y mantenerse. Para el tratamiento de 100 μM la estimulación tiende a un aumento continuo hasta de 18 $\mu\text{m/s}$ de diferencia con respecto al control hasta alcanzar el minuto 15, siendo éste el máximo efecto presente en el estudio para la VCL.



Grafica 3. La curva dosis-respuesta-tiempo presentada muestra el efecto de la serotonina sobre la VCL del espermatozoide de humano; como se puede observar, el control siempre se mantiene estable a lo largo del tiempo; para 10 μM existe una tendencia al aumento y disminuye a partir del minuto 9; el tratamiento de 50 μM mantuvo un efecto estimulador de la VCL y por último el tratamiento de 100 μM alcanzó su máximo efecto hasta el minuto 15 con una diferencia de casi 18 $\mu\text{m/s}$.

7.3 Efectos Bioquímicos (Fosforilación de Proteínas de Tirosina).

El efecto bioquímico de la serotonina sobre el espermatozoide de humano fue evaluado por medio de un estudio de inmunoelectroforesis después de 15 minutos de tratamiento utilizando un anticuerpo dirigido contra proteínas fosforiladas de tirosina las cuales fueron identificadas por una banda de peso molecular de aproximadamente 97 kDa. Como se observa en la figura 18, la expresión de la fosforilación de proteínas de tirosina en homogenados de espermatozoides sin tratamiento (control) es igual al tratamiento de espermatozoides tratados con 10 μM , ya que no hay variaciones significativas entre ambos, mientras que para los grupos de espermatozoides tratados con 50 μM y 100 μM el efecto que produce la serotonina sobre las tirosinas es muy evidente después de los 15 minutos del tratamiento confirmando su efecto a nivel bioquímico.

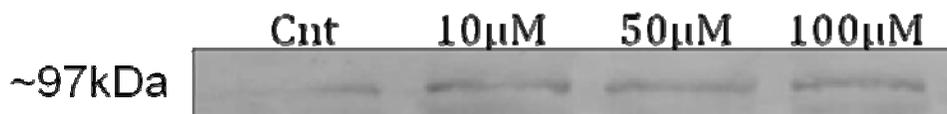
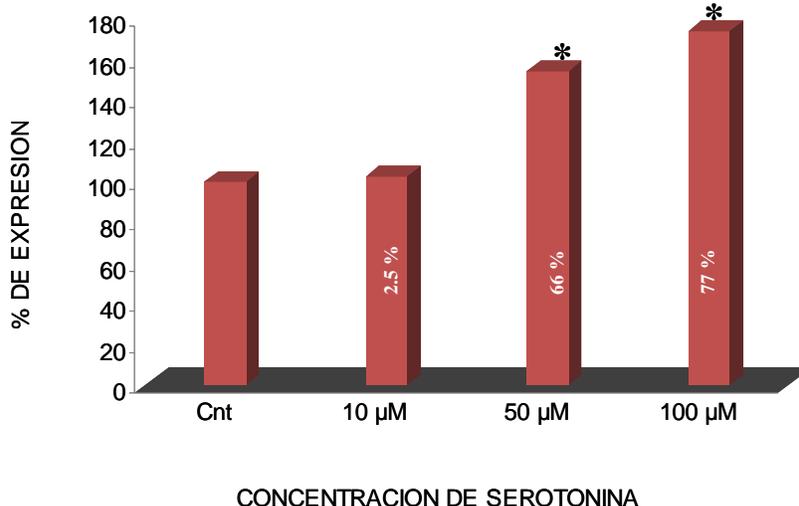


Figura 18. Expresión de la fosforilación de proteínas de tirosina en homogenados de espermatozoides de humano tratados con diferentes concentraciones de serotonina durante 15 minutos de ser añadida al medio de cultivo. Muestras de espermatozoides de humano del mismo donador sin tratamiento fue tomada como control del ensayo. La banda en Western blot fue identificada en un peso molecular de 97 kDa aproximadamente.

Este efecto observado visualmente fue evaluado con ayuda del programa Scion Image utilizado para el procesamiento y análisis cuantitativo de las diferentes bandas de proteínas de un Western blot. La grafica 4 muestra el estudio de densitometria en la que el porcentaje de intensidad de las bandas expresan la fosforilación de proteínas de tirosina de los diferentes tratamientos probados con serotonina (N=5); en ella se percibe claramente el aumento de 50 μ M y 100 μ M respecto al grupo control, en realidad la intensidad de la banda es 66% y 77% mayor en las concentraciones de 50 μ M y 100 μ M respectivamente con respecto al control, mientras que el tratamiento de 10 μ M no es significativo.

PORCENTAJE DE EXPRESION DE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS DE TIROSINA INDUCIDO POR SEROTONINA



Grafica 4. Porcentaje de intensidad de las bandas en ensayos de Western Blot para la fosforilación de proteínas de tirosina de una muestra control (sin tratamiento) y las producidas después de 15 minutos de tratamiento con 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M de serotonina en el medio de cultivo (N=5); analizadas con el programa Scion Image; * porcentaje de expresión significativo ($p < .05$).

8 Discusión.

Desde hace décadas se ha considerado a los espermatozoides de los mamíferos como células con capacidad limitada para sintetizar proteínas o algún otro compuesto molecular. En otras palabras los espermatozoides se consideran células terminales las cuales solo tendrán como objetivo final la fecundación en el tracto genital femenino (Toshimori K, 2003). En nuestro estudio, el hallazgo de la enzima limitante en la síntesis de serotonina, la TPH (en la región ecuatorial y el flagelo de los espermatozoides de humano demostrado por técnicas de inmunocitoquímica, dato no mostrado) en ensayos de Western blot nos confirma su presencia de manera muy localizada y específica en estas zonas. La enzima TPH se encuentra de manera muy importante a nivel central en el cerebro (tallo cerebral; TPH2) y a nivel periférico la TPH1 es la que promueve la síntesis de serotonina. Ambas isoformas recientemente fueron re-identificadas por (Walter y cols, 2003), ya que anteriormente se consideraba que existía un solo gen para una única isoforma de TPH. La TPH1 que es la isoforma periférica, se localiza de manera muy importante en la glándula pineal de los mamíferos, ya que se conoce que esta enzima es más activa en la noche porque está directamente relacionada con la regulación de ciclo sueño-vigilia y la estacionalidad reproductiva en algunos mamíferos, mientras que en el sistema gastrointestinal (estómago e intestino) promueve la secreción y regulación del ácido clorhídrico regulando también a las células enterocromafines localizadas en las criptas intestinales (Sakowsky,2006). Resultados adicionales en el laboratorio donde realice mi estancia indican que la enzima TPH es funcional ya que se realizaron ensayos de actividad *In Vitro* de homogenados de poblaciones de espermatozoides, esto fue corroborado por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, con ayuda de esta misma técnica se ha evaluado de manera preliminar en ensayos farmacológicos utilizando un antagonista específico para la enzima TPH (Paraclorofenilalanina: pCPA; 50 μ M; datos no mostrados) que es posible su inhibición, ya que el nivel de la actividad previamente evaluada disminuye drásticamente en los espermatozoides incubados con el fármaco a los 15 minutos del tratamiento (Jiménez-Trejo y cols, en preparación). Este fármaco (pCPA), ha permitido evaluar su utilidad en ensayos para depletar la actividad de la enzima TPH en el cerebro (tallo cebrebral; Weissmann y cols, 1990), además el tratamiento con el pCPA en animales en desarrollo interrumpe el eje Hipotálamo-Hipofisis-Gonadas en ambos sexos y

retrasa la madurez sexual (Shiskina y Dygalo, 2000). Por otro lado, la presencia de la serotonina en los espermatozoides localizada exclusivamente en la pieza media nos permite suponer que esta molécula al ser sintetizada es almacenada en esa zona y que probablemente lleva a cabo alguna función importante durante la maduración espermática que se lleva a cabo en la cabeza del epidídimo (Jiménez-Trejo y cols, en preparación). Un dato importante a este respecto es que la pieza media es la zona donde se encuentran localizadas las mitocondrias que proveen de energía a los espermatozoides a través de los ciclos del metabolismo oxidativo (fosforilación oxidativa) lo que nos podría sugerir que la serotonina participa en la regulación del aporte energético de los espermatozoides, permitiendo tener funciones tan relevantes como el aumentar la motilidad progresiva y por consiguiente la tasa de fertilidad, como ha sido demostrado en espermatozoides de especies de invertebrados después de ser expulsados para su eyaculación en experimentos de fertilización *In vitro* (erizo de mar y bivalvos como las almejas; Parisi y cols, 1984; Kadam y Koide, 1990; Bandivdekar, 1992), ya que aparentemente estimula la fosforilación de la proteína Dineina ATPasa presente en el axonema de los espermatozoides de estas especies. Caso contrario producen inhibidores de algunos receptores para serotonina (metergolina; antagonista del 5-HT_{1C}), ya que inducen respuestas inhibitorias como es la disminución de la motilidad y por ende disminución en la tasa de fertilidad de estas especies de invertebrados. Además, en los espermatozoides de mamíferos como el Hámster 50 μ M de serotonina o su análogo la 5 α -metoxitriptamina (5 μ M) promueven la reacción acrosomal 15 minutos después de iniciado el tratamiento (Meizel S. y Turner K.O, 1983). Aunado a estos resultados, la presencia del transportador de serotonina junto con la MAO_A en los espermatozoides nos permite proponer que los mecanismos de recaptura y degradación de la serotonina están presentes en los espermatozoides fenómeno conocido en células como las neuronas y en células neuroendocrinas como los mastocitos que se localizan en el espacio intersticial de órganos reproductivos (testículos y epidídimos de los mamíferos; Frungieri y cols, 2002; Mayerhoffer y cols, 1999; Jiménez-Trejo y cols, 2007). Por otro lado, la enzima AA-NAT podría ser capaz de dirigir la conversión de la serotonina hacia la vía de formación de la Melatonina como lo hace en la glándula pineal (Siegel y cols, 2006). A este respecto, cabe mencionar que en los espermatozoides de humano se han identificado diferentes receptores para la melatonina (Van Vuuren y cols, 1992). Aunque no se conoce

la función exacta de este tipo de receptores de Melatonina, estudios recientes *In Vitro*, indican que la molécula es quimiorepelente para los espermatozoides de humano (Sliwa y Stochmal, 2001).

Así mismo, otros datos novedosos son la presencia de los diferentes receptores de serotonina previamente mencionados (5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃), en los espermatozoides; en mamíferos solo existen dos reportes que muestran la presencia de receptores para serotonina, el primer reporte fue dado a conocer en especies como el conejo (Young y Laing, 1990) y recientemente reportados en ratas maduras sexualmente (Jiménez-Trejo y cols, 2007). Aunque Meizel y Turner (1983), muestran que la serotonina promueve la reacción acrosomal en espermatozoides de Hámster, ellos únicamente especulan sobre la probable presencia de receptores responsables de inducir la reacción acrosomal como podrían ser los receptores del grupo 3 que se conoce son ionotrópicos. En humanos estos datos en un futuro nos pueden permitir mostrar que los receptores de serotonina podrían participar ya sea en la maduración espermática que se lleva a cabo en la cabeza del epidídimo (Jiménez-Trejo y cols, 2007), o durante la capacitación que se lleva a cabo en el tracto genital femenino o más aún al momento de la fertilización como quimioatrayente o todo lo contrario como quimiorepelente (Sliwa y Stochmal, 2001; Riffell y cols, 2002), para la búsqueda de un método anticonceptivo en humanos o en mamíferos machos.

Por otro lado, los ensayos de la curva dosis-respuesta-tiempo (control, 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M) en los espermatozoides de humano, apoyados con el equipo automatizado (CASA), nos permitió evaluar las posibles alteraciones en los diferentes tipos de motilidad que anteriormente ya describimos para corroborar que la serotonina tiene un efecto directo sobre algunos de estos parámetros. Para el caso de la VAP y la VSL que es el promedio de la velocidad de trayectoria y la ganancia neta de espacio en el periodo de observación respectivamente, el tratamiento con 50 μ M de serotonina permitió que se alcance su máxima velocidad en el minuto 9, mientras que en la VCL el efecto de aumento sobre la velocidad fue constante. Esto nos sugiere que el espermatozoide recorre una distancia mayor en un periodo de tiempo corto. Estos tres parámetros se correlacionan en la curva de dosis-respuesta-tiempo. Para los espermatozoides tratados con 100 μ M de serotonina el efecto más evidente fue visto en la VAP y la VCL ya que para la VSL no hay cambios en

ningún tiempo observado, lo que indica que la distancia que recorre la cabeza del espermatozoide es mayor a $100\ \mu\text{M}$ que en espermatozoides control. En los estudios de Meizel S. y Turner K.O. (1983), quienes trabajaron con espermatozoides de Hámster y Parisi y cols, (1984) que utiliza como modelo espermatozoides de invertebrados, en ningún momento ellos evalúan los parámetros de velocidad progresiva (no se contaba con equipo automatizado como lo es el CASA), por lo que sería interesante dejar abierta la posibilidad de mostrar si la serotonina influye en alguno de los parámetros que nosotros mencionamos a lo largo de este trabajo en estas especies (VAP, VSL, VCL) o incluso en otros parámetros como son el desplazamiento lateral de la cabeza y la frecuencia de batido del flagelo.

Por último, para establecer que la serotonina tiene un efecto no solamente fisiológico a través de estimular la motilidad de los espermatozoides de humano, sino un efecto intracelular de tipo bioquímico, decidimos evaluar el tratamiento farmacológico de las diferentes concentraciones de serotonina en los espermatozoides pero a nivel bioquímico a través del uso de un anticuerpo específico contra proteínas fosforiladas de tirosina. Este anticuerpo es utilizado de manera muy común en espermatozoides para evaluar de manera indirecta la actividad de la PKA y la enzima adenilato ciclasa ambas involucradas en el aumento de la motilidad de los espermatozoide. Moss y Gerton (2001), han identificado en la vaina fibrosa de espermatozoides de ratón una familia de proteínas con un peso molecular de 97 kDa que se unen a protein cinasa y fosfatasas. Específicamente esta familia se une a la PKA dependiente de AMP_C controlando de esta manera la fosforilación de tirosinas y en consecuencia la generación del movimiento. Este tipo de proteínas que se unen a la PKA son conocidas como AKAP y representan el mayor número de proteínas que son fosforiladas en residuos de tirosina en espermatozoides de humano para generar movimiento (Urner y Sakkas; 2003).

Los resultados que muestran la expresión de las proteínas fosforiladas de tirosina en las diferentes concentraciones de serotonina en los espermatozoides indican que $50\ \mu\text{M}$ y $100\ \mu\text{M}$ promueven la activación para que se lleve a cabo la fosforilación de proteínas de tirosina por la vía de la PKA y de enzimas como la adenilato ciclasa promotora del aumento de AMP_C que tendría como consecuencia el aumento de la velocidad en estas dos

concentraciones mientras que para los espermatozoides control y los tratados con 10 μM , no hay el efecto.

Estos datos novedosos en el área de la reproducción masculina y probablemente en mamíferos nos permiten señalar que los espermatozoides de humano podrían ser capaces de sintetizar serotonina, que existen los principales componentes que conforman el sistema serotoninérgico, que pueden ser estimulados por concentraciones de 50 μM o 100 μM de serotonina tanto a nivel fisiológico (motilidad) como a nivel bioquímico (fosforilación de proteínas de tirosina) por lo que la serotonina como ya lo mencionamos anteriormente pudiera participar en la maduración de los espermatozoides que se lleva a cabo en la cabeza del epidídimo, en el proceso de la capacitación o al momento de la fertilización del óvulo. En su conjunto estos datos nos permiten sugerir que el espermatozoide de humano no necesariamente debe ser considerado como una célula terminal.

9 Conclusiones.

En base a los resultados antes expuestos y al análisis de éstos, llegamos a las siguientes conclusiones:

1.- Se ha mostrado la presencia de los principales componentes que conforman el sistema serotoninérgico en los espermatozoides de humano.

a) Presencia de la enzima limitante de la síntesis de serotonina: la enzima TPH específicamente en la región ecuatorial y el flagelo de los espermatozoides de humano, (dato no mostrado).

b) La enzima encargada del catabolismo de la serotonina (MAO_A) esta expresada principalmente en la parte posterior de la región ecuatorial y a todo lo largo del flagelo de los espermatozoides.

c) Se localizó de manera muy específica la enzima que forma parte de la vía de síntesis hacia Melatonina: la enzima aril-alquilamina-N-acetil transferasa (AA-NAT) en la región acrosomal de los espermatozoides.

d) Se mostró la presencia y expresión de los receptores de tipo metabotrópicos 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}, así como el receptor ionotópico (5-HT₃) en los espermatozoides de humano.

e) El transportador transmembranal encargado de la recaptura de la serotonina (SER_T) se localizó de manera muy intensa a lo largo de las células espermáticas.

f) Por otro lado, la Serotonina se identificó exclusivamente en la pieza media de los espermatozoides.

2.- Los experimentos de la curva dosis-respuesta-tiempo sobre los espermatozoides de humano mostraron que 50 μM y 100 μM de serotonina tiene una tendencia a promover un efecto fisiológico, en este caso, aumentando los parámetros de motilidad progresiva (VAP; promedio de la velocidad de trayectoria, VSL; velocidad en línea recta y VCL; velocidad curvilínea) lo que fue corroborado con los experimentos de inmunoelectroforesis para fosforilación de proteínas de tirosina evidenciando el efecto bioquímico que produce la

serotonina al estimular alguno de los marcadores que previamente identificamos en los espermatozoides de humano.

El conjunto de todos los datos nos permite sugerir que es muy probable que los espermatozoides de humano y probablemente de otros mamíferos no necesariamente tienen que ser señaladas como células limitadas para sintetizar moléculas (células terminales), en este caso los principales componentes de la vía de serotonina están presentes en estas células fundamentales para la continuidad de las especies, por lo que creemos que los espermatozoides de humano incluso puede considerarse como una célula serotoninérgica.

10 Perspectivas.

Diversos estudios se pueden realizar aún para abordar lo que esta línea de investigación novedosa está proponiendo:

- a) Caracterizar otros receptores serotoninérgicos que pudieran estar presentes en los espermatozoides de humano o en otras especies de mamíferos.
- b) Estudiar los efectos de otros antagonistas o agonistas de los receptores que describimos en este trabajo.
- c) Mostrar posibles efectos de la serotonina pero en espermatozoides previamente capacitados.
- d) Estudiar a nivel molecular y ultraestructural los efectos de la serotonina, de agonistas y antagonistas de los receptores y el transportador de serotonina.

A futuro consideramos que esta línea de investigación nos puede permitir la elaboración de un método anticonceptivo reversible, económico, sin efectos secundarios, de fácil uso en humanos, o caso contrario, podría auxiliar en técnicas de reproducción asistida como lo es en la Fertilización *In vitro* como se ha demostrado en especies de animales invertebrados.

11 Bibliografía.

- I. Adayev T, Ranasinghe B, Banerjee P. Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Bioscience Reports*. 2005; 25:363-384.
- II. Aguilar R, Anton F, Bellido C, Aguilar E, Gaytan F. Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. *J Endocrinol*. 1995; 46:15-21.
- III. Aragón M, Ayala M, Marín M, Avilés A, Damián-Matsumura P, Domínguez R. Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction*. 2005; 129:717-727
- IV. Bandivdekar AH, Segal SJ, Koide SS. Binding of 5-hydroxytryptamine analogs by isolated *Spisula* sperm membrane. *Invest Reprod Dev*. 1992; 21:43-46.
- V. Balpai M. and Doncel G.F. Involvement of tyrosine and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction*. 2003; 126:183-195
- VI. Bear Mark F. Barry W. Connors, Michael A. Paradiso. *Sistemas de neurotransmisores*. En: *Neurociencia explorando el cerebro*. Barcelona: Ed. Masson; 2002. 122-150.
- VII. Betancour M, Bonilla E, Casas E, Ducolom Y. Interacciones celulares y diferenciación. Jiménez-García F, Merchant H, *Biología celular y molecular*. México. Prentice Hall. 2003; 679- 712.
- VIII. Boccabella AV, Salgado ED, Alger EA. Testicular function and histology following serotonin administration. *Endocrinology*. 1962; 71:827-837.
- IX. Campos MB, Vitale ML, Calandra RS, Chiocchio SR. Serotonergic innervation of the rat testis. *J Reprod Fertil*. 1990; 88:475-479.
- X. Carlson N. *Fisiología de la conducta*. Madrid: Ed. Pearson Addison Wesley; 2006. 339-376.
- XI. Cockett AT, Al-Juburi A, Altebarmakian V, Vergamini RF, Caldamone AA. The varicocele: New experimental and clinical data. *Urology*. 1980; 15:492-5
- XII. Coffey DS, Berry SW, Walsh PC. *Endocrinology of male reproduction*. Philadelphia Saunders Company. EUA. 1988; 5-49 pp.
- XIII. Conn Michael P. Freeman Marc E. Neurotransmitters as regulators of hypothalamic function. En. Malven Paul V. *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. New Jersey: Ed. Humana Press; 2000. 61-67.

- XIV. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. Serotonin (5-hydroxytryptamine) and Histamine En: Bloom FE (ed) *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* Oxford University Press. Oxford. 1996; 338-367 pp.
- XV. Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev.* 1999; 79(2):481-510.
- XVI. De Lamirande Eve, O'Flaherty Cristián. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica* 2008; 1784:106–115
- XVII. Devadoss J. Samuvel, Lankupalle D. Jayanthi, Narayan R. Bhat and Sammanda Ramamoorthy. A Role for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Regulation of the Serotonin Transporter: Evidence for Distinct Cellular Mechanisms Involved in Transporter Surface Expression. *The Journal of Neuroscience.* 2005; 25:29–41.
- XVIII. Fernandez Humbert H. Stephan Eisenschenk, Yachnis Anthony T, Okun Michael S. Psychiatry, Neurobehavior and Neuropsychology. En: *Ultimate review for the neurology boards.* New York: Ed. Demos;2006. 453-458.
- XIX. Ford W.C.L. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Human Reproduction Update.* 2006; Vol.12, No.3:269-274.
- XX. Frungieri MB, González-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 regresion-recrudescence transition. *Neuroendocrinology.* 1999; 69:299-308.
- XXI. 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.
- XXII. Inaba Kasuo. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoological Science.* 2003; 20: 1043-1056.
- XXIII. Gonzales GF, García-Hjarles MA, Napuri R, Coyotupa J, Guerra-Garcia R. Blood serotonin levels and male infertility. *Arch Androl.* 1989; 22:85-89.
- XXIV. Gonzales GF, García-Hjarles M, Velasquez G. Hyperprolactinaemia and hyperserotoninaemia: Their relationship to seminal quality. *Andrologia.* 1992; 24:95-100.
- XXV. Gonzalez-Martínez M, Bonilla-Hernandez A, Guzmán-Grenfel A. Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*2002; 408: 205–210
-

-
- XXVI. Guzman-Grenfell A. Tesis doctoral. Identificación de un sistema de influjo de calcio dependiente de voltaje en el espermatozoide humano. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. (2002) 1-12.
- XXVII. Haase J. Killian A.-M. Magnani F and Williams C. Regulation of the serotonin transporter by interacting proteins. *Biochemical Society Transactions*.2001; 29:722-728.
- XXVIII. Jiménez-Trejo F. Tapia-Rodríguez M, Queiroz D, Padilla P, Avellar P, Rivas-Manzano P, Manjarrez-Gutiérrez G, Gutierrez-Espino G. Serotonin Concentration, Synthesis, Cell Origin, and Targets in the Rat Caput Epididymis During Sexual Maturation and Variations Associated With Adult Mating Status: Morphological and Biochemical Studies *Journal of Andrology*. 2007; 28: 1-16.
- XXIX. Kadam Arjun L. and Koide S.S. stimulation of sperm motility by 5-hydroxytryptamine analogs. *Invertebrate reproduction and development*. 1990; 17: 33-37.
- XXX. Kandel Eric R. Schwartz James H. Jessell Thomas M. *Principles of neural Science*.4^a ed. New York: Ed. Mc Graw-Hill; 2000. 1214-1220.
- XXXI. La Biblia. Latinoamérica. Sociedad Biblica Catolica Internacional (SOBICAIN). 85^a ed. España: Ed. San Pablo, Verbo Divino; 1995. Génesis 1:26, 2:7.
- XXXII. Malmnäs CO. Opposite effects of serotonin and dopamine on copulatory activation in castrated male rats. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1974; 11:243-248.
- XXXIII. Mann T., Lutwak-Mann C. *Male Reproductive Function and Semen. Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 1990; 139-156.
- XXXIV. Marc Key. *Pathology education guide immunohistochemical staining methods*. 4^a ed. California: Ed. Dako; 2006. 1-34.
- XXXV. 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.
- XXXVI. Meizel S. The sperm, a neuron with a tail:”neuronal” receptors in mammalian sperm. *Biol. Rev*. 2004; 79: 713-732.
- XXXVII. Meizel S, Turner KO. Serotonin or its agonist 5-methoxytryptamine can stimulate hamster sperm acrosome reactions in a more directmanner than catecholamines. *J Exp Zool*. 1983; 226: 171–174.
- XXXVIII. Mortimer Sharon T. CASA—Practical Aspects. *Journal of Andrology*.2000; 515-524.
-

-
- XXXIX. Moss Stuart B. and Gerton George L. A-kinase anchor proteins in endocrine systems and reproduction. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*. 2001; 12:434-440.
- XL. Naumenko EV, Shishkina GT. Role of serotonin in feedback control of hypothalamic-pituitary-testicular complex in male rats. *Neuroendocrinology*. 1978; 26:359-366.
- XLI. Oko R, Clermont Y. 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. 1990; 4-27.
- XLII. Olivera Martha, Ruiz Tatiana, Tarazona Ariel, Giraldo Carlos. El espermatozoide: desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec*. 2006; 19:426-436.
- XLIII. Parisi E, De Prisco P, Capasso A, del Prete M. Serotonin and sperm motility. *Cell Biol Int Reproduction*. 1984; 8:95.
- XLIV. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Lamantia A, Mcnamaras J, Williams S. Neurotransmisores y sus receptores. *Neurociencia*. Madrid. España. Editorial Médica Panamericana. 2004; 141-179.
- XLV. Riffell Jeffrey A. Krug Patrick J. and Zimmer Richard K. Fertilization in the sea: the chemical identity of an abalone sperm attractant. *The Journal of Experimental Biology*. 2002; 205: 1439–1450.
- XLVI. Ramamoorthy Sammanda, Giovanetti Elena, Qian Yan and Blakely Randy D. Phosphorylation and Regulation of Antidepressant-sensitive Serotonin Transporters. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 1998; 273:2458–2466.
- XLVII. Robaire B, Hermo L. 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. 1988; 999-1080.
- XLVIII. Sakowski Stacey A. Geddes Timothy J. Thomas David M. Levi Edi. Hatfield James S. Kuhn Donald M. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *BRAINRESEARCH*. 2006; 1085: 11–18.
- XLIX. Satir Peter. Structural Basis of Ciliary Movement. *Environmental Health Perspectives* 1980; 35:77-82.
- L. Shishkina GT, Dygalo NN. Role of serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comp Biochem Physiol*. 2000; 125:45-51.
-

- LI. Siegel George J. Albers Wayne R. Brady Scott T. Price Donald L. Basic Neurochemistry Molecular, cellular and Medical aspects. 7^a ed. Canada: Ed. Elsevier; 2006. 227-249.
- LII. Sliwa L, Stochmal E. The effect of melatonin on directional motility of human sperm under in vitro conditions. *Folia Med Cracov.* 2001; 42:123-128.
- LIII. 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.
- LIV. Stryer Lubert. Investigación en proteínas. En *Bioquímica T-1.* 3^a ed. Barcelona: Ed. Reverte S.A.; 1990. 43-70.
- LV. Tijmes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the rat testis: Evidence for local synthesis. *Steroids.* 1996; 61:65-68.
- LVI. Tinajero JC, Fabbri A, Ciocca DR, Dufau ML. Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology.* 1993; 133:3026-3029.
- LVII. Toshimori Kiyotaka. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy research and technique.* 2003; 61:1-6.
- LVIII. Turner Regina M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development.* 2006; 18:25-38.
- LIX. Urner Françoise and Sakkas Denny. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2003; 125:17-26.
- LX. Young RJ, Laing JC. Biogenic amine binding sites in rabbit spermatozoa. *Biochem Int.* 1990; 21:781-787.
- LXI. 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.
- LXII. 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.